



TRABAJO DE FIN DE MÁSTER
MÓDULO DE QUÍMICA ANALÍTICA

ALÉRGENOS EN ALIMENTOS: MÉTODOS ANALÍTICOS

Autora: LARA GARCÍA CAMPILLO

Tutor: ANTONIO ZAPARDIEL PALENZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

Junio, 2021

RESUMEN

Las alergias alimentarias son producidas por algunas sustancias normalmente inocuas presentes en los alimentos, las cuales, pueden generar graves problemas en la salud de algunas personas.

Actualmente no existe un tratamiento eficaz para las alergias alimentarias, siendo la eliminación de la dieta del alimento que produce la alergia, el método más eficaz. El principal problema existente, es la posibilidad de consumir alimentos que, por accidente o contaminación cruzada, contengan alérgenos que no deberían estar en el alimento.

En este aspecto, las industrias alimentarias necesitan realizar controles para garantizar la producción de alimentos inocuos y cumplir con la legislación respecto al etiquetado de los alérgenos. Para ello, necesitan técnicas más específicas y sensibles para poder detectar estos alérgenos que están a nivel traza en los alimentos que producen, y conseguir evitar la exposición de los pacientes a las sustancias alergénicas.

En este estudio se ha realizado una revisión bibliográfica de los métodos analíticos para la detección de alérgenos alimentarios en diferentes matrices alimentarias. Las técnicas inmunológicas como los inmunoensayos y las tiras de flujo lateral, son las más empleadas en las industrias alimentarias para los análisis de rutina, por su bajo coste, facilidad en su manejo y alta sensibilidad, mientras que las técnicas analíticas como la cromatografía líquida y la espectrometría de masas son las empleadas en el campo de la investigación por la necesidad de personal cualificado y una instrumentación más costosa.

Palabras clave: Alergias alimentarias, alérgenos alimentarios, métodos inmunológicos, PCR, legislación alérgenos, cromatografía, ELISA, espectrometría de masas.

ÍNDICE

	pág.
Abreviaturas	6
Índice de figuras y tablas	7
1. Introducción	8
1.1 Antecedentes: Alergia alimentaria.....	9
1.1.1 Importancia de la alergia alimentaria.....	9
1.1.2 Reacción alérgica.....	10
1.1.3. Clasificación.....	11
1.1.4. Alergias alimentarias, intolerancias alimentarias y reacciones tóxicas por alimentos.....	13
1.1.5. Diagnóstico y tratamiento.....	14
1.2 Antecedentes: Alérgenos alimentarios.....	15
1.2.1 Legislación y etiquetado.....	15
1.3 Justificación.....	20
2. Objetivos	21
3. Método de búsqueda de información	23
4. Resultados	25
4.1 Métodos directos	26
4.1.1 Técnicas inmunológicas.....	26
■ Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas.....	36
■ Inmunoensayo de flujo lateral.....	30
■ Empleo de electroforesis.....	32
● Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida.....	32
● Western blot.....	34
■ Empleo de biosensores.....	36

4.1.2 Técnicas no inmunológicas.....	39
■ Espectrometría de masas.....	39
4.2 Métodos indirectos.....	47
4.2.1 Técnicas de detección de ADN.....	47
■ Reacción en cadena de la polimerasa.....	47
4.3 Aplicación de los métodos analíticos de alérgenos en el etiquetado comercial.....	50
5. Discusión.....	51
6. Conclusiones.....	59
7. Bibliografía.....	61

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
AESAN	Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición
API	Presión atmosférica de ionización
BSA	Albúmina de suero bovino
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
ESI	Ionización por electrospray
FDA	Administración de Drogas y Alimentos
FALCPA	Ley de Etiquetado de Alérgenos Alimentarios y Protección al Consumidor
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HPLC-MS/MS	Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem
IgE	Inmunoglobulina E
LC	Cromatografía líquida
LC-MS / MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem
LFIA	Inmunoensayo de flujo lateral
MALDI	Desorción/ionización láser asistida por matriz
MRS	Monitorizaciones de reacciones múltiples
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
Q	Cuadrupolo
QQQ-MS	Espectrómetro de masas de triple cuadrupolo
qPCR	PCR en tiempo real o PCR cuantitativa
PBS	Tampón fosfato salino
PVPD	Polivinilpirrolidona
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida
SPR	Resonancia de plasmones superficial
TOF	Tiempo de vuelo
UHT	Tratamiento a altas temperaturas

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Etapas de las reacciones alérgicas

Figura 2. Símbolos utilizados en la declaración de alérgenos actualizados a 2021

Figura 3. Técnica ELISA tipo sándwich.

Figura 4. Técnica ELISA tipo competitivo indirecto

Figura 5. Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida.

Figura 6. Representación esquemática de la técnica western blot

Figura 7. Esquema de los componentes del biosensor

Figura 8. Esquema de los componentes del espectrómetro de masas

Tabla 1. Resultados de los estudios empleando métodos analíticos directos inmunológicos para la detección de alérgenos alimentarios

Tabla 2. Resultados de los estudios empleando métodos analíticos directos no inmunológicos para la detección de alérgenos alimentarios

Tabla 3. Resultados de los estudios empleando métodos analíticos indirectos para la detección de alérgenos alimentarios

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES: ALERGIA ALIMENTARIA

Las alergias alimentarias son reacciones adversas producidas por el sistema inmunológico frente a sustancias denominadas alérgenos, los cuales son proteínas presentes en los alimentos, que el organismo detecta como extrañas y genera una respuesta inmunitaria frente a ellas. Estas reacciones se producen al entrar en contacto con los alimentos, por su ingesta o inhalación.

Los individuos que desarrollan estas respuestas presentan susceptibilidad por estas sustancias alergénicas, siendo independientes de la dosis ingerida, ya que cantidades muy pequeñas pueden desencadenar la alergia.

1.1.1 IMPORTANCIA DE LA ALERGIA ALIMENTARIA.

Las alergias alimentarias se desarrollan por la susceptibilidad del sistema inmunológico que tienen algunas personas a reaccionar frente a algún alérgeno alimentario concreto. En las últimas décadas se ha visto un aumento exponencial de las alergias alimentarias que, además de la susceptibilidad de las personas, está influenciado por la predisposición de los individuos a ciertos factores que contribuyen a la incidencia de estas enfermedades.

Los cambios en la flora intestinal, los contaminantes ambientales (tabaco, dieta, la edad de introducción de la alimentación infantil etc.), son los factores causantes de los cambios epigenéticos que se heredan en la transmisión de los genes a futuras generaciones. En estas nuevas generaciones se está viendo mayor incidencia de alergias alimentarias, menor probabilidad de superar estas reacciones adversas a los alimentos y menor tolerancia a los alérgenos (Echeverría, 2019; Sicherer y Sampson, 2014).

Existe un aumento generalizado de la prevalencia de las alergias alimentarias en las últimas décadas, se estima que en España sería del 7,4%, pero en otros países llega incluso a cifras cercanas al 10% (Echeverría, 2019). A nivel mundial se estima que las reacciones alérgicas afectan al 2% de los adultos y al 6-8% de los niños (Roberts, col., 2019).

La alergia alimentaria es un problema de gran preocupación para los consumidores, ya que los individuos que la presentan, ven limitado el consumo de ciertos alimentos y por otra parte, el riesgo que presentan estas personas por el consumo de alérgenos, puede llegar a causarles una sintomatología de gravedad como el shock anafiláctico e incluso podría originar la muerte por la ingesta de cantidades pequeñas en algunos casos.

Las alergias alimentarias además de ser un problema de salud pública, también afecta a nivel socioeconómico. Los consumidores depositan su confianza en las industrias alimentarias y en la seguridad de su producción con la que garantizan alimentos inocuos. Sin embargo, cuando algún individuo tiene algún episodio digestivo tras la ingesta de ciertos alimentos, el consumidor va a dejar de adquirir esos alimentos afectando así a la economía de las industrias alimentarias.

1.1.2 REACCIÓN ALÉRGICA

La reacción alérgica es el conjunto de fases que se desarrollan en el individuo susceptible a un alérgeno, desencadenando una respuesta inmunológica exagerada y originando una sintomatología característica.

Inicialmente, antes de que se produzca la reacción alérgica se produce una etapa de sensibilización, en la cual se produce el contacto repetido con el alérgeno sin originar sintomatología (Yu col., 2016). En esta etapa se produce la activación de las células linfáticas T al reconocer al alérgeno, se produce la liberación de sustancias como las interleucinas que inducen la diferenciación de los linfocitos B específicos del alérgeno y se origina la síntesis de inmunoglobulinas E (IgE) (Figura 1. Primera exposición) (López col., 2009).

La siguiente etapa se origina cuando se expone el individuo de nuevo al alérgeno, en estas circunstancias interaccionan las IgE presentes en la superficie de los mastocitos tisulares con el alérgeno, produciendo su desgranulación. Estas condiciones originan la respuesta inmunitaria alérgica produciendo la liberación de mediadores proinflamatorios, como la histamina, prostaglandinas y leucotrienos, encargados de desencadenar la inflamación alérgica y activar a otras células inmunitarias como los linfocitos T, los basófilos y eosinófilos que van a producir la liberación de otras sustancias que causan vasodilatación y contracción de la musculatura, contribuyendo a la sintomatología de la hipersensibilidad inmediata (Figura 1. Segunda exposición) (Johansson, 2014; Metcalfe col., 2015; Reyes-Pavón col., 2020; Yu col., 2016).

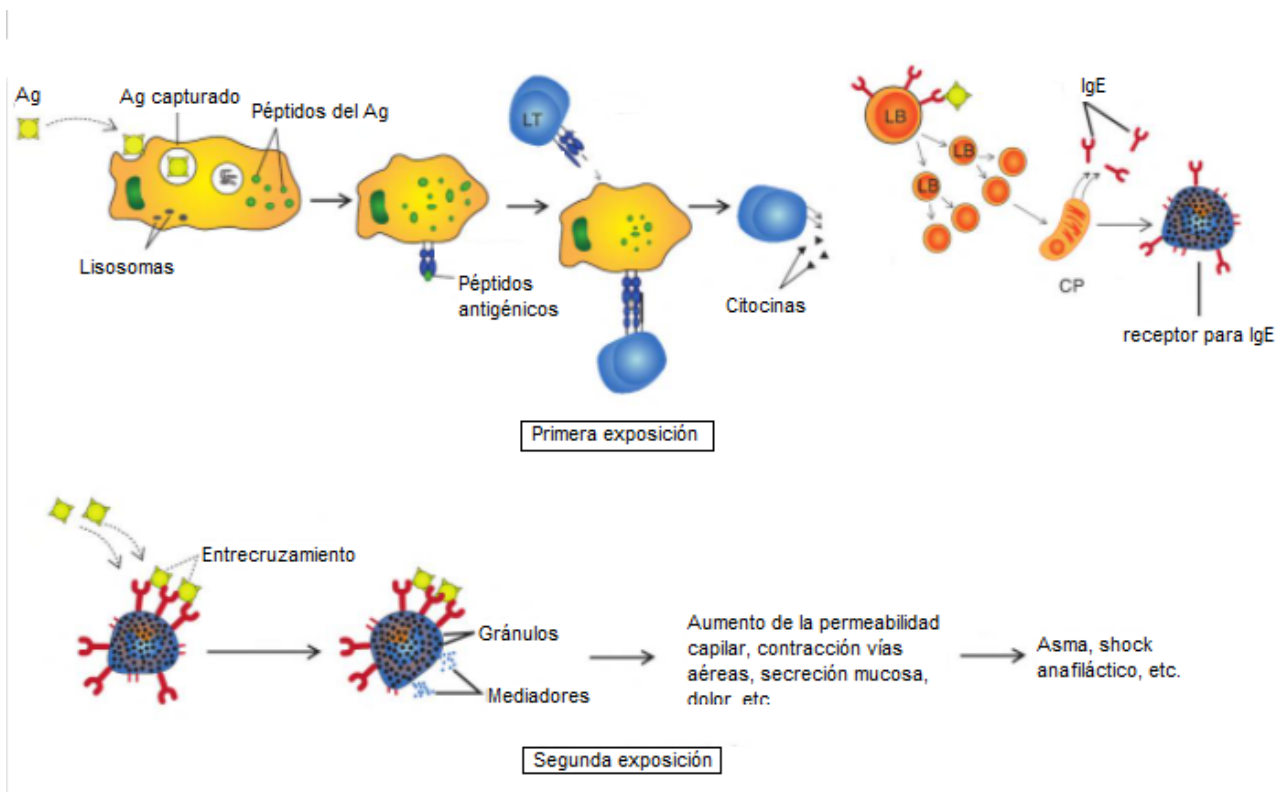


Figura 1. Etapas de las reacciones alérgicas. (Fuente: López col., 2009).

Las IgE sintetizadas por los linfocitos B en la primera etapa de sensibilización al antígeno, quedan retenidas en la superficie de mastocitos y basófilos. En la segunda etapa de exposición al alérgeno, se origina la degranulación y liberación de mediadores y sustancias encargadas de desencadenar la señalización en la respuesta alérgica.

1.1.3 CLASIFICACIÓN

Dentro de las alergias alimentarias se describen tres tipos, si se producen las inmunoglobulinas E se produce la alergia alimentaria mediada por IgE, si no intervienen las inmunoglobulinas E, se desarrolla la alergia alimentaria no mediada por inmunoglobulina E y la combinación de ambos tipos originando las alergias alimentarias mixtas (Boyce col., 2010; Yu col., 2016).

Las IgE son los anticuerpos que se producen en las reacciones alérgicas, producidas por células que se activan después de entrar en contacto con el alérgeno. Estos anticuerpos están en niveles bajos en la sangre y se encuentran en la superficie de basófilos y mastocitos en condiciones normales, células inmunitarias implicadas en la respuesta alérgica (Sicherer y Sampson, 2010; Yu col., 2016)

- **Alergia alimentaria mediada por IgE (hipersensibilidad o alergia de tipo inmediato).**

El desarrollo de la respuesta alérgica está determinada inicialmente por la producción de altos niveles de IgE durante la primera etapa de sensibilización. En la segunda exposición al alérgeno, se produce la liberación de mediadores originando la sintomatología característica de la alergia (Sicherer y Sampson, 2010).

Es la respuesta más peligrosa ya que es en la que se produce mayor riesgo con la ingesta de bajas dosis de alimento, en 1 o 2 horas puede generar una respuesta anafiláctica sistémica aguda grave (Renz col., 2018). En este tipo de alergias los síntomas son leves o moderados, como las afectaciones en la piel (urticaria, erupciones, angioedema) problemas respiratorios (broncoespasmo agudo, irritación nasal, rinitis alérgica, tos,) picor, inflamación de cara, lengua o labios, lagrimeo, enrojecimiento ocular, problemas gastrointestinales (dolor abdominal, calambres, vómitos, diarrea, sangre en heces). Los síntomas graves pueden llegar a problemas respiratorios como asma, opresión torácica, dificultad en la respiración, hipotensión, palpitaciones, mareos o pérdida de conciencia pudiendo llegar a anafilaxia, afectando a nivel cardiovascular, y a poner en riesgo la vida de la persona (Boyce col., 2010; Sicherer y Sampson, 2014; Yu col., 2016).

- **Alergias alimentaria no mediadas por IgE.**

En esta respuesta se produce el aumento de otros tipos de anticuerpos distintos a las IgE, como complejos inmunes y principalmente está mediada por células inmunológicas. En este tipo de alergia la respuesta es más tardía, se produce desde horas desde la ingesta hasta tres días después, además la cantidad ingerida de alérgeno es mayor. En esta reacción alérgica, los síntomas que se producen son de tipo digestivos y cutáneos (enterocolitis, esofagitis eosinofílica, dermatitis atópica etc.) (Boyce col., 2010; Yu col., 2016).

- **Alergias alimentaria mixtas**

En estas respuestas se produce una combinación entre la actuación de IgE y células inmunes. Se producen síntomas como la gastroenteritis, la esofagia eosinófila alérgica, la dermatitis atópica y el asma alérgica (AESAN, 2007; Boyce col., 2010; Metcalfe col., 2015; Yu col., 2016).

1.1.4 ALERGIAS ALIMENTARIAS, INTOLERANCIAS ALIMENTARIAS Y REACCIONES TÓXICAS POR ALIMENTOS.

Pueden existir situaciones en las que un cuadro clínico con la misma sintomatología puede confundirse con diferentes enfermedades como las alergias, las intolerancias y las intoxicaciones alimentarias. Sin embargo, existen diferencias en su patogenia y en los factores de cada individuo que las van a desarrollar, por lo que es importante que se diferencien estas reacciones adversas producidas por los alimentos.

- **Alergias alimentarias**

Para considerar una reacción como alergia alimentaria debe producirse una relación de dependencia entre el alimento consumido y la aparición de los signos y síntomas patognomónicos, de igual modo que la alteración del sistema inmunitario debe estar involucrado en el desarrollo de estos síntomas. En este tipo de reacciones a diferencia de las otras dos, no existe una relación entre la dosis ingerida y la respuesta generada, sin embargo, en las intolerancias e intoxicaciones cuanto mayor sea la dosis ingerida mayor es la reacción que se produce, hay una relación dosis-respuesta (AESAN, 2007).

- **Intolerancias alimentarias**

En las intolerancias alimentarias no existe o no se ha evidenciado un mecanismo inmunitario que lo origine. En este caso también se produce una reacción adversa al alimento, pero es producida por una deficiencia en la cantidad de la enzima encargada de su metabolismo en el organismo. La respuesta en las intolerancias, depende de factores intrínsecos del propio individuo y de la dosis que ingiere de la sustancia, ya que son producidas por sustancias que en las mismas dosis, no presentan toxicidad y son toleradas por otros individuos. (AESAN, 2007; Sicherer y Sampson, 2014)

Un ejemplo es la intolerancia a la lactosa producida por la deficiencia de lactasa, esta enzima es la encargada de la hidrólisis de la lactosa en forma de azúcares más simples como la glucosa y la galactosa de fácil absorción. Las personas intolerantes al no poder digerir la lactosa, queda en el intestino donde es descompuesta por las bacterias intestinales originando los síntomas característicos de la intolerancia, gases, malestar, hinchazón, diarrea etc.

- **Intoxicaciones alimentarias**

Las intoxicaciones alimentarias, son reacciones tóxicas transmitidas por los alimentos, no tienen ningún factor inmunológico que las cause. Se producen por la ingesta de alimentos, en cuyo interior, contienen sustancias químicas o biológicas que van a producir la reacción. Estas sustancias pueden ser productos químicos utilizados en su producción como herbicidas, insecticidas, fungicidas, fertilizantes, o biológicos por microorganismos como *Salmonella* o toxinas producidas por algunas bacterias como el *Clostridium botulinum*. En las intoxicaciones alimentarias no existen factores específicos para ser susceptibles a estas reacciones tóxicas, ya que cualquier individuo las puede sufrir con tal que la sustancia esté en cantidad suficiente en el alimento consumido. Por lo tanto, esta es la principal diferencia con las alergias e intolerancias, en las cuales la respuesta depende de las características de cada individuo (AESAN, 2007)

1.1.5 DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

Es de gran importancia el diagnóstico de las alergias alimentarias y poder determinar el alimento que causa la reacción de hipersensibilidad. Para ello, el primer diagnóstico se hace estableciendo una relación entre la ingesta de un alimento, la reacción alérgica que origina y su sintomatología mediante pruebas de provocación. Se realiza también, la detección de IgE mediante pruebas cutáneas, y determinaciones serológicas de los anticuerpos. Principalmente como elección, se utilizan las pruebas cutáneas por punción (prick-tests) como técnica de confirmación de la alergia (Boyce col., 2010; Echeverría, 2019).

El conocimiento del alimento causante de las reacciones alérgicas permite prevenir estas patologías, siendo el único tratamiento eficaz frente a ellas la retirada de su consumo del alimento problema. Por este motivo, se están llevando a cabo normativas que regulan el etiquetado de los productos para evitar el riesgo que tienen estos pacientes a la exposición de alérgenos presentes en los alimentos.

1.2 ANTECEDENTES: ALÉRGENOS ALIMENTARIOS

1.2.1 LEGISLACIÓN Y ETIQUETADO

Un alérgeno alimentario es la sustancia o componente de los ingredientes de un alimento que origina la alergia alimentaria en ciertos individuos susceptibles. La mayoría de los alérgenos alimentarios son proteínas, concretamente son glicoproteínas de 10 a 70 kDa. Estos alérgenos pueden desencadenar la reacción inmunológica tanto si son ingeridos crudos, como cocinados. Además, algunos alérgenos pueden producir reactividad cruzada, es decir, pueden ser reconocidos por anticuerpos específicos frente a otras proteínas alergénicas con las que comparten cierta homología en su estructura, produciendo igualmente la reacción alérgica (Boyce col., 2010).

Existen más de 160 alimentos que pueden desencadenar alergias alimentarias en personas sensibles a alérgenos. Sin embargo, en Estados Unidos, la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) y la Ley de Etiquetado de Alérgenos Alimentarios y Protección al Consumidor (FALCPA), han establecido ocho alimentos que son los causantes del 90% de las reacciones alérgicas por alimentos, a este grupo se los denomina “los grandes ocho” y son los principales alérgenos que deben ser identificados en el etiquetado de los productos (FALCPA, 2004; Food Allergies, 2021; Ho col., 2014):

1. Leche
2. Huevo
3. Maní
4. Nueces
5. Pescado
6. Mariscos
7. Soja
8. Trigo

El 23 de abril de 2021, la Ley de Seguridad, Tratamiento, Educación e Investigación de Alergias Alimentarias (FASTER) obliga la declaración del sésamo en el etiquetado, siendo el noveno alérgeno reconocido en Estados Unidos, sin embargo, esta ley no entra en vigor hasta el 1 de enero del 2023 (Food Allergies, 2021).

Actualmente no existe un acuerdo a nivel internacional sobre la cantidad mínima que puede haber de un alérgeno para originar la reacción alérgica. Este umbral es muy bajo, son pequeñas cantidades a nivel traza, por este motivo es importante la posibilidad de reacciones cruzadas, en las que la presencia de una mínima cantidad de una sustancia puede producir la alergia alimentaria en personas sensibles. Estas contaminaciones cruzadas se pueden producir en

cualquier punto de la cadena de producción, desde la recepción de las materias primas, su manipulación, el envasado, almacenamiento, transporte etc.

Desde el 13 de diciembre del 2014 en Europa se aplica el Reglamento (UE) nº 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a la información alimentaria facilitada al consumidor donde se establecen los 14 alimentos causantes de la mayoría de las alergias alimentarias. Este reglamento establece la obligatoriedad de declarar en el etiquetado de los productos la presencia de alguno o algunos de los alérgenos que los contengan. Estos alimentos son:

1. Cereales que contengan gluten, a saber: trigo, centeno, cebada, avena, espelta, kamut o sus variedades híbridas y productos derivados, salvo: a) jarabes de glucosa a base de trigo, incluida la dextrosa (1); b) maltodextrinas a base de trigo (1); c) jarabes de glucosa a base de cebada; d) cereales utilizados para hacer destilados alcohólicos, incluido el alcohol etílico de origen agrícola.
2. Crustáceos y productos a base de crustáceos.
3. Huevos y productos a base de huevo.
4. Pescado y productos a base de pescado, salvo: a) gelatina de pescado utilizada como soporte de vitaminas o preparados de carotenoides; b) gelatina de pescado o ictiocola utilizada como clarificante en la cerveza y el vino.
5. Cacahuets y productos a base de cacahuets.
6. Soja y productos a base de soja, salvo: a) aceite y grasa de semilla de soja totalmente refinados; 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 ésteres de fitosterol derivados de aceites vegetales de soja; d) ésteres 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 alcohólicos, incluido el alcohol etílico de origen agrícola; 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], nueces de Brasil (*Bertholletia excelsa*), alfóncigos (*Pistacia vera*), nueces macadamia o nueces de Australia (*Macadamia ternifolia*) y productos derivados, salvo los frutos de cáscara utilizados para hacer destilados alcohólicos, incluido el alcohol etílico de origen agrícola.
9. Apio y productos derivados del apio.
10. Mostaza y productos derivados de la mostaza.

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 en términos de SO₂ total, para los productos listos para el consumo o reconstituidos conforme a las instrucciones del fabricante.
13. Altramuces y productos a base de altramuces.
14. Moluscos y productos a base de molusco

Según el Reglamento (UE) n° 1169/2011, los alérgenos deben estar identificados en la lista de ingredientes del etiquetado de manera destacable, mediante diferente letra, subrayado, en negrita, para que puedan ser identificados fácilmente por el consumidor tanto en los alimentos envasados como en los no envasados. De igual modo este Reglamento indica que en los productos que no contengan lista de ingredientes tienen que aparecer “contiene” seguido del alérgeno (Reglamento 1169/2011).

En el Reglamento se han descrito además, que todos los productores deben poner en el etiquetado “puede contener (alérgeno)”, en el caso de que por circunstancias de la cadena de producción pueda existir accidentalmente por contaminación cruzada algún alérgeno de los indicados en la lista, a este aviso se le denomina etiquetado precautorio o preventivo (Lorenz, col., 2015; Reglamento (UE) 1169/2011). Esta información no es de declaración obligatoria en el etiquetado, pero sí recomendable, ya que permite a intolerantes y alérgicos evitar consumir productos que pueden contener trazas de ciertos ingredientes perjudiciales para su salud.

A nivel estatal el 5 de marzo entró en vigor el Real Decreto 126/2015 de 27 de febrero que desarrolla el Reglamento (UE) n° 1169/2011, por el que se aprueba la Norma general relativa a la información alimentaria de los alimentos que se presentan sin envasar para la venta al consumidor final y a las colectividades, de los envasados en los lugares de venta a petición del comprador, y de los envasados por los titulares del comercio al por menor.

En este Real Decreto, se obliga a declarar los requisitos alimentarios de los productos envasados o no envasados, suministrados en cualquier establecimiento de hostelería, bares, restaurantes, supermercados, hospitales, comedores escolares, venta de comida para llevar, residencias de ancianos, venta de comida preparada y los vendidos a granel. Es decir, en este Real Decreto se detalla la obligación de la declaración de los 14 alérgenos en estos establecimientos (Figura 2). El consumidor debe disponer de esta información antes de obtener el producto, ya sea mediante carteles, menús, cartas, en las fichas de productos, recetas, de manera oral, usando iconos, o escrita en la venta por internet etc. (Real Decreto 126/2015)



Figura 2. Símbolos utilizados en la declaración de alérgenos actualizados a 2021.

- DECLARACIÓN DE ALÉRGENOS

Para poder cumplir con los requisitos exigidos en las normativas y declarar correctamente los alérgenos en el etiquetado, las industrias alimentarias han tenido que analizar sus productos para garantizar la ausencia de alérgenos alimentarios o por el contrario declararlos en el etiquetado.

Los métodos utilizados para la detección de alérgenos en alimentos se dividen en dos grupos:

- Métodos directos: detectan la proteína alergénica siendo métodos inmunológicos o no inmunológicos, mediante técnicas electroforéticas, cromatográficas, inmunoquímicas y espectrométricas
- Métodos indirectos: detectan indicadores de la presencia de alérgenos, mediante técnicas genéticas que reconocen fragmentos de ácido desoxirribonucleico (ADN) que codifican para proteínas alergénicas.

Hace varias décadas, los métodos más comunes que se empezaron a utilizar fueron los inmunológicos por su facilidad de uso y los buenos resultados que obtenían (Kirsch col., 2009; Monaci col., 2006; Poms col., 2004). Sin embargo, las limitaciones que tenían estos métodos sirvieron como impulso para comenzar a estudiar técnicas más sofisticadas respecto a instrumentación, pero también a procesos más complejos. En relación a estos avances, algunos autores realizaron protocolos de detección utilizando cromatografía líquida y espectrometría de masas y se validaron comparando los resultados con las técnicas inmunológicas, confirmando los resultados obtenidos acordes por ambos métodos (Alves col., 2019; Stella col., 2020; New col., 2018).

Las normativas y leyes establecidas de información sobre los alérgenos alimentarios han permitido el desarrollo y estudio de numerosas técnicas analíticas para la detección de alérgenos, sin embargo, cada una presenta ciertas ventajas e inconvenientes en su aplicación. Actualmente

no existe un método ideal que incluya las principales ventajas de rapidez, sensibilidad, especificidad, fiabilidad, facilidad etc. requeridas para esas analíticas, sino que todas contienen algunas limitaciones, aún así hay métodos más idóneos respecto al tipo de alérgeno a analizar, a la matriz en la que se encuentra y al grado de procesamiento al que haya sido sometido.

No obstante, según el Real Decreto 126/2015 es obligatorio que todos los establecimientos donde se vendan o consuman alimentos conozcan los alérgenos que están presentes en sus productos y no está permitido el desconocimiento de alérgenos, ni la declaración de que todos los productos del establecimiento pueden contener trazas de alérgenos.

Por este motivo, para garantizar la seguridad alimentaria de los consumidores, se siguen estudiando técnicas específicas y sensibles para detectar los alérgenos alimentarios, tanto los añadidos de manera intencionada como ingredientes de los productos y los que se encuentran en la mínima cantidad posible, introducidos de manera accidental por contaminación. En este sentido se pretende conseguir técnicas con alta precisión y asequibles, que puedan emplearse de manera rutinaria en las industrias alimentarias.

1.3. JUSTIFICACIÓN

Estas reacciones adversas que se producen en ciertos individuos tras la ingesta de algunos alimentos, desencadenan episodios sintomatológicos que pueden llegar a ser muy graves y producir la muerte en ciertos casos. Las reacciones inmunitarias originadas por alérgenos, aunque se desconocen los motivos específicos por los que se originan, son cada vez más frecuentes, por este motivo uno de los objetivos fundamentales en el manejo de estas enfermedades, es el instaurar medidas de prevención que consigan disminuir su incidencia en la población.

En la actualidad no existe un tratamiento eficaz frente a las alergias alimentarias, siendo la eliminación de los alimentos problema de la dieta de los pacientes, la única medida efectiva para prevenirlas. Es por este motivo por el que las industrias alimentarias tienen que asegurar que sus productos están libres de alérgenos y de informar correctamente en su etiquetado al consumidor.

Inicialmente hace décadas, los consumidores alimentarios no disponían de toda la información necesaria sobre los alérgenos en el etiquetado. Además, los productores alimentarios no tenían obligación de informar de los posibles alérgenos que contenían sus productos, ni de la composición en pequeñas cantidades de ciertas sustancias, que podrían estar presentes por accidente en los alimentos y desencadenar estas reacciones alérgicas tan graves en algunos individuos. Actualmente, en nuestro país, la información de los alérgenos está cada vez más regulada por las normativas europeas y estatales para garantizar la seguridad alimentaria y la adecuada declaración de los alérgenos.

En base a esto, se lleva a cabo este trabajo realizando una recopilación de técnicas analíticas empleadas en la detección y cuantificación de alérgenos alimentarios en diferentes matrices, para poder asegurar su presencia o ausencia y garantizar una declaración correcta en el etiquetado de los productos. De esta manera, se consigue evitar la ingesta de alérgenos alimentarios presentes a nivel traza o alérgenos ocultos por los consumidores y conseguir mejorar la calidad de vida de los pacientes que sufren alergias alimentarias. Se necesitan por lo tanto, métodos específicos, sensibles y fiables para detectar alérgenos que pueden encontrarse en cantidades muy pequeñas en los alimentos.

2. OBJETIVOS

En el presente trabajo de revisión, se ha realizado una búsqueda bibliográfica de la literatura publicada para exponer los métodos analíticos utilizados en la detección de alérgenos alimentarios y los nuevos avances en estas tecnologías.

Los objetivos específicos que se han planteado son:

- Describir las técnicas que se emplean para el análisis de proteínas alergénicas, incluidos los métodos directos (inmunológicos y no inmunológicos) e indirectos.
- Analizar las aplicaciones en la detección de alérgenos alimentarios de los métodos utilizados en diferentes estudios
- Estudiar las limitaciones y las ventajas de los métodos analíticos en diferentes matrices alimentarias.

3. MÉTODO DE BÚSQUEDA DE INFORMACIÓN

Para la realización de este trabajo se utilizaron varias bases de datos bibliográficas, Pubmed, SpringerLink, Medline, Web of Science, ScienceDirect, Wiley Online Library.

Inicialmente se realizó una búsqueda general de métodos utilizados en la detección de alérgenos alimentarios. Una vez conocidas las técnicas utilizadas, se empezó la consulta en las bases de datos bibliográficas mencionadas anteriormente.

Los artículos generales y los de revisión sobre la información de los alérgenos y las alergias alimentarias se buscaron mediante los términos en inglés: "food allergies", "food allergen", "analysis food allergen" y se utilizaron para los apartados de la introducción, junto con otros recursos como libros y los datos obtenidos de las normativas publicadas en el Boletín Oficial del Estado, la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición para la información de la legislación y la Administración de Drogas y Medicamentos, todas ellas se emplearon como base del estudio por la importancia del contenido en el desarrollo de las alergias alimentarias y la significación de los alérgenos en la salud de las personas.

Se empleó en la búsqueda la combinación de los términos en inglés: "mass spectrometry and food allergen", "detection food allergen", "liquid chromatography and food allergen", "ELISA and food allergen", "PCR and food allergen", "biosensors and food allergen" y se seleccionaron los artículos más actualizados y relevantes de los últimos 6 años.

Para el desarrollo de los resultados del estudio, se eligieron inicialmente un total de 51 artículos implicados en la detección de alérgenos alimentarios. Se hizo una primera lectura de los artículos incluyendo el apartado del resumen y la discusión para la clasificación de los artículos. Entre los artículos seleccionados, se eligieron los artículos que contenían el estudio de los principales alérgenos alimentarios, los denominados "los grandes ocho".

Se clasificaron en función del tipo de técnica utilizada, se catalogaron 15 artículos dentro de las técnicas inmunológicas, 13 artículos en las técnicas no inmunológicas y 7 artículos dentro de los métodos indirectos. Los 9 artículos restantes fueron revisiones de las técnicas objeto de estudio. Estos 43 artículos en total son los que se han utilizado para la obtención de los resultados de esta revisión. Se descartaron 9 estudios, los estudios repetidos y los que aplicaban métodos de análisis pero no sobre muestras alimentarias, sino que las utilizaban como diagnóstico en pacientes.

4. RESULTADOS

En la actualidad existen gran variedad de técnicas analíticas empleadas en la detección y cuantificación de alérgenos alimentarios. Cada una presenta ventajas e inconvenientes en cuanto a sensibilidad, especificidad y fiabilidad. Según el ámbito de aplicación en el que se vayan a emplear y la matriz a analizar, resultan más adecuadas algunas técnicas que otras por los resultados que se obtienen. Generalmente las técnicas se pueden dividir en dos grupos, los métodos directos que identifican y detectan proteínas alergénicas, dentro de los cuales por un lado están los métodos inmunológicos como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, inmunoelectroforesis, tiras de flujo lateral y los que emplean biosensores, y por otro lado los no inmunológicos como la espectrometría de masas en tándem. En el segundo grupo están las técnicas indirectas, que detectan fragmentos de ADN codificantes de las proteínas alergénicas, entre las que están la reacción en cadena de la polimerasa.

Antes de la detección de alérgenos mediante cualquiera de los métodos analíticos enunciados anteriormente, se lleva a cabo una primera fase que consiste en la extracción de las proteínas de los alimentos, siendo el proceso con mayor dificultad y del cual van a depender los resultados obtenidos.

4.1 MÉTODOS DE DETECCIÓN DE ALÉRGENOS DIRECTOS

4.1.1 Técnicas inmunológicas

Las técnicas inmunológicas se basan en la detección del complejo antígeno-anticuerpo. En estas técnicas se detectan las proteínas de los alérgenos alimentarios (antígenos) mediante la interacción con anticuerpos específicos frente a ellos. Las principales ventajas de estas técnicas, son la capacidad de detectar pequeñas cantidades de una sustancia en una muestra, alta sensibilidad y especificidad.

ENSAYO DE INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMA (ELISA) (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

Esta técnica es un método inmunológico basado en la reacción colorimétrica producida por el reconocimiento de antígenos, por medio de anticuerpos específicos marcados con una enzima, e inmovilizados sobre un soporte inmunoabsorbente (Pandey col. 2019).

Existen diferentes técnicas de ELISA, siendo los análisis más utilizados los de tipo sándwich (Figura 3) (Faisal col., 2019):

- Esta técnica consiste en tapizar una microplaca de poliestireno o polivinilo con un anticuerpo primario en los pocillos de análisis mediante interacciones hidrofóbicas. La inmovilización dependerá de la concentración del anticuerpo, el pH, el tiempo y la temperatura.
- Posteriormente se incorpora la muestra con la proteína alergénica que interacciona con el anticuerpo específico retenido en los pocillos.
- A continuación, se añade el anticuerpo secundario específico marcado con una enzima, denominado conjugado. Este conjugado va a reconocer el complejo antígeno-anticuerpo fijado en el soporte.
- Para evidenciar la unión se añade el reactivo, generalmente se utilizan sustratos incoloros, sobre el que actúa la enzima catalizando la reacción, obteniendo una solución coloreada. La reacción coloreada permite conocer si la muestra ha sido positiva, sin embargo, para análisis cuantitativos se mide la intensidad del color mediante la determinación espectroscópica de la absorbancia a una longitud de onda apropiada, siendo la señal obtenida directamente proporcional a la concentración de la proteína alergénica en la muestra (Sena-Torralba col., 2020).

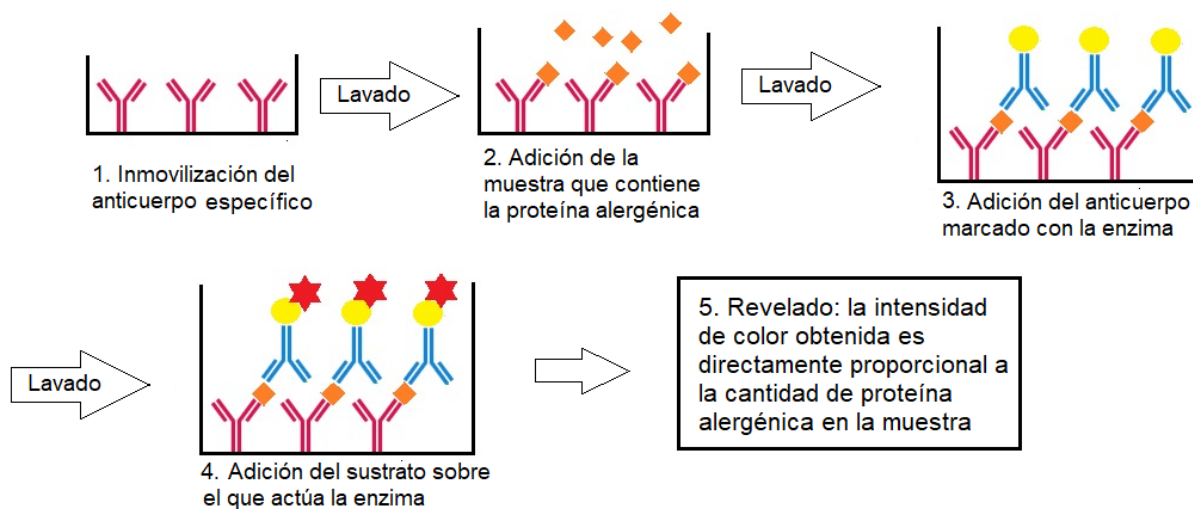


Figura 3. Técnica ELISA tipo sandwich. (Fuente: Elaboración propia)

Detección inmunológica basada en el reconocimiento antígeno-anticuerpo. Se utiliza en la detección de antígenos mediante anticuerpos específicos marcados con una enzima. El antígeno problema se une al anticuerpo específico fijado en el soporte. Este complejo antígeno-anticuerpo es reconocido por un segundo anticuerpo marcado con una enzima. La adición del sustrato produce la reacción colorimétrica, siendo la intensidad de color directamente proporcional a la concentración de alérgeno en la muestra.

Otro tipo de técnica ELISA que también se utiliza para detectar alérgenos, es el ELISA competitivo indirecto (Figura 4) (Faisal col., 2019):

- De igual modo que en el ELISA sándwich se tapiza el pocillo immobilizando en el soporte sólido el antígeno.
- Se incuba la muestra junto con el anticuerpo marcado con una enzima. Si la proteína alergénica está presente en la muestra, interacciona con el anticuerpo marcado formando un complejo antígeno-anticuerpo. En el caso de no existir alérgenos en la muestra, los anticuerpos permanecen con los lugares de unión libres.
- La mezcla incubada se adiciona al pocillo donde están fijados los antígenos. En las muestras positivas, los alérgenos al ocupar el sitio de unión de los anticuerpos, impiden que estos anticuerpos marcados se unan a los antígenos inmobilizados. Sin embargo, en las muestras negativas, los anticuerpos pueden interaccionar con los antígenos del pocillo.
- Se adiciona el sustrato sobre el que actúa la enzima que haya quedado retenida a los anticuerpos del soporte. En el caso de que la enzima esté presente en el conjugado retenido en el pocillo, cataliza la reacción colorimétrica.
- El revelado se realiza por espectroscopía siendo la intensidad del color inversamente proporcional a la concentración de proteína alergénica retenida en la muestra, es decir, cuanto más cantidad de alérgeno haya en la muestra, menos anticuerpos marcados con la enzima se van a unir a los antígenos y por lo tanto la reacción colorimétrica detectada será menor (Sena-Torralba col., 2020).

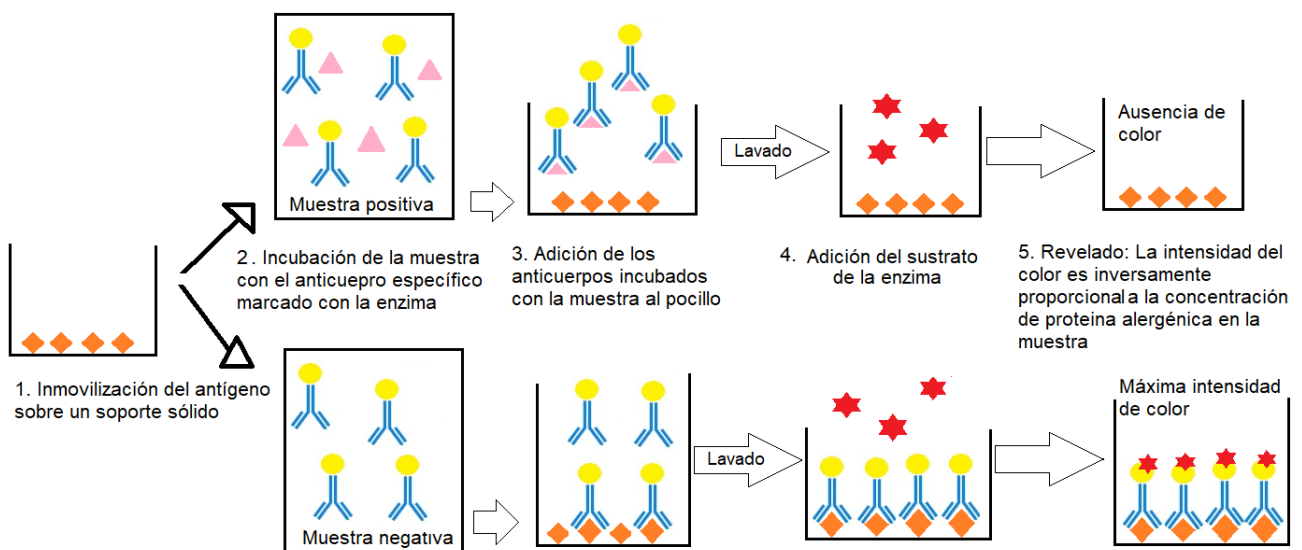


Figura 4. Técnica ELISA tipo competitivo indirecto (Fuente: Elaboración propia).

Detección inmunológica basada en el reconocimiento antígeno-anticuerpo. Se utiliza para la detección de antígenos mediante anticuerpos específicos marcados con una enzima. La presencia del antígeno problema va a impedir la unión del anticuerpo específico al antígeno fijado en el soporte, y no se produce la reacción colorimétrica, siendo la disminución de la intensidad de color inversamente proporcional a la concentración de alérgeno en la muestra.

El tipo más empleado es el ELISA sándwich por su rapidez, sencillez y los buenos resultados obtenidos. Algunos autores han empleado los métodos inmunológicos como el ELISA en la detección de alérgenos alimentarios (Tabla 1), como ejemplo está el trabajo de Pandey col., 2019 en el que han desarrollado un protocolo de ELISA tipo sándwich para la detección de alérgenos de cacahuete basándose en un proceso de extracción y dilución de las muestras para después compararlo con una curva patrón de estándares de concentración conocida, consiguiendo la cuantificación de la proteína alergénica de cacahuete.

Otros autores estudiaron cómo afectaba en la detección de alérgenos mediante ELISA, cuando las muestras eran sometidas a un tratamiento térmico y cómo interfieren los componentes presentes en la matriz de la muestra, en la cuantificación de proteínas alergénicas, para conocer las limitaciones de los métodos inmunológicos

De este modo Ueberham col., 2019 plantearon un método de ELISA tipo sándwich para la detección de alérgenos de soja en muestras de pastelería y salchichas sometidas a diferentes tratamientos térmicos. Se encontraron con diferentes problemas, primero en la preparación de la muestra debido a los tratamientos de extracción por el calentamiento, y en segundo lugar por la aparición de reacciones cruzadas producidas entre algunos anticuerpos, a causa de que estos anticuerpos son capaces de reconocer proteínas que presentan estructuras parecidas a los alérgenos diana. Para superar estos problemas, utilizaron anticuerpos monoclonales específicos de una proteína alergénica de la soja, consiguiendo la detección en niveles traza de los alérgenos.

En estos estudios en los que se ha empleado el método ELISA, se han detectado concentraciones de proteínas alergénicas del orden de ng/ml en alérgenos de cacahuete (Pandey, col., 2019) y hasta pg/ml en el caso de alérgenos de soja (Ueberham col., 2019), estos niveles confirman la sensibilidad del método, permitiendo detectar alérgenos en cantidades muy pequeñas presentes en los alimentos.

Por su parte, Nguyen col., 2019 estudiaron el ELISA sándwich para la detección de alérgenos de huevo en muestras que habían sufrido diferentes tratamientos térmicos, muestras con un calentamiento templado y muestras horneadas de pastelería. Para solventar los problemas de cuantificación en las muestras que sufren tratamientos térmicos, desarrollaron un protocolo de extracción de las proteínas de la matriz y compararon la extracción con tampón fosfato salino (PBS) y tampón desnaturizante, consiguiendo con éste último mejores resultados en la solubilidad y recuperación de las proteínas en las muestras tratadas térmicamente. Además, aplicaron su método en muestras comerciales para estudiar la validez del etiquetado de precaución consiguiendo detectar los alérgenos de huevo en todas las muestras que lo incluían en el producto.

Finalmente, Török col., 2015 aplicaron el ELISA en muestras crudas de harina y en galletas horneadas para analizar el efecto del tratamiento térmico sobre proteínas alergénicas de leche, huevo, soja y gluten. Los resultados que obtuvieron, fue una recuperación media de un 70% menos de la concentración de la proteína medida en todas las muestras que habían sufrido tratamiento térmico, frente a las muestras crudas. Además, estos autores no recomiendan el uso de los kits ELISA comerciales en los análisis de muestras que han sido tratadas térmicamente, por los problemas que encontraron en la solubilidad de las proteínas. Otro de los factores que estudiaron fue el efecto de la matriz alimentaria en los resultados. Analizaron las diferentes matrices que contenían más de un alérgeno simultáneamente y obtuvieron distinta concentración del alérgeno problema en comparación con las matrices que contenían un único alérgeno, sin embargo, no se encontró una asociación clara puesto que hallaron diferencias en las muestras con huevo y gluten pero no es la que contenían leche y soja. Esto era debido a que las interacciones que se producen entre las proteínas presentes en la matriz afectan a la solubilidad y a la extracción de las proteínas alergénicas, obteniendo resultados distintos según la complejidad de la muestra.

INMUNOENSAYO DE FLUJO LATERAL (LFIA)

Esta técnica es una versión más sencilla del análisis ELISA. Tiene las ventajas de rapidez y facilidad para ser utilizadas en las industrias alimentarias, además de tener la posibilidad de ser transportadas más fácilmente.

Este análisis consiste en unas tiras que están constituidas por unas membranas de nitrocelulosa, nylon o polivinil fluoruro en las que se inmovilizan los anticuerpos específicos marcados con enzimas o fluorocromos. La muestra se aplica sobre la tira, si la muestra contiene la proteína alergénica, se produce la interacción con el anticuerpo formando el complejo antígeno-anticuerpo. Este complejo asciende por capilaridad hasta la zona de la membrana que contiene otro anticuerpo fijado, que retendrá el complejo antígeno-anticuerpo. En caso positivo se visualizará una línea de color, siendo la intensidad directamente proporcional a la concentración del alérgeno en la muestra. Sin embargo, en ausencia de alérgenos no se observa la línea coloreada. Es una técnica muy sencilla y barata pero solo sirve de manera cualitativa puesto que la interpretación de los resultados se realiza de manera visual, aunque existe la posibilidad de detecciones cuantitativas utilizando lectores específicos

Tabla 1. Resultados de los estudios empleando métodos analíticos directos inmunológicos para la detección de alérgenos alimentarios

Referencia	Método	Proteína alergénica	Matrices alimentarias	Límite de detección	Resultados
Pandey col., 2019	ELISA sándwich	Cacahuete (Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 6 y Ara h 8)	Muestras comerciales	Detectan niveles de hasta 1,25 ng/ml	Consiguieron un método sensible y preciso realizando tres diluciones para la cuantificación de proteínas alergénicas. Compararon con una curva patrón de estándares de las 5 proteínas alergénicas de concentración conocida para la cuantificación, consiguiendo detectar niveles de ng/ml. La recuperación media de las proteínas alergénicas estuvo entre 81-115%.
Ueberham col., 2019	ELISA sándwich	Soja (proteína alergénica Gly m 8)	Muestras de pastelería y salchicha hervida.	Detectan niveles de 10 pg/ml.	Consiguen recuperaciones del 98-109% en tres matrices distintas detectando niveles de pg/ml de las proteínas alergénicas. Sin embargo, el tratamiento térmico afecta negativamente a la detección al tener limitaciones en la extracción proteica en las muestras procesadas térmicamente.
Nguyen col., 2019	ELISA sándwich	Huevo (ovoalbúmina y ovomucoide)	Galletas, muffins, barras de cereales y chocolate	Detectaron hasta niveles de 0,06-12 µg/g en tampón PBS.	Consiguieron generar anticuerpos policlonales aumentando la capacidad de reconocimiento de las proteínas alergénicas procesadas. Obtuvieron un método óptimo de detección de proteínas de huevo procesadas mediante la elaboración de una curva patrón con polvo de huevo entero.
Török col., 2015	ELISA sándwich	Leche, huevo, soja y gluten	Harina de amaranto, masas crudas y galletas horneadas	Detectan niveles de ppm	Se reduce la detección en un 80% de la proteína láctea, en un 100% la de soja y huevo y en un 40% la de gliadina del gluten en las muestras de galletas horneadas respecto a las muestras sin tratar.
Galan-Malo col., 2019	Tiras de flujo lateral	Leche (caseína y β-lactoglobulina)	Salchichas paté y pan	Detectan niveles entre 1-10 ppm	La β-lactoglobulina no pudo detectarse en todas las muestras al verse afectada por el tratamiento térmico, fue negativa en las muestras con mayores tratamientos térmicos como el paté y el pan, y solo se detectó en los embutidos. Sin embargo, la caseína aguanta las altas temperaturas y se detectó en todas las muestras
Cellerino col., 2012	SDS-PAGE Western blot ELISA	Proteínas de soja	Productos cárnicos crudos y cocidos.	100 ppm en Western blot, 2000 ppm en SDS-PAGE, 250 ppm en ELISA	La detección mediante el método ELISA se vio afectada por los tratamientos térmicos, influyendo en la solubilidad proteica e impidiendo su reconocimiento por los anticuerpos reduciéndose la cuantificación en un 40%.
Wang, col., 2018	Inmunosensor SPR Comparación con ELISA	Albúmina de suero porcino	Carne de cerdo	Detectaron hasta niveles de 19,81 ng/mL	Consiguieron gran reproducibilidad en las determinaciones analíticas mediante SPR con desviaciones inferiores al 5 % durante el mismo día y en días consecutivos. Consiguieron resultados similares sin diferencias significativas con el ELISA. Sin embargo, obtuvieron diferencias en las muestras tratadas térmicamente por cambios de conformación o alteración de los epítopos que impedían su reconocimiento.
Chinnappan, col., 2020	Aptasensor (ADN con fluoresceína y óxido de grafeno)	Tropomiosina de camarón	Sopa de pollo	Detectan niveles de 2,5 nM	Consiguieron un aptámero truncado con el doble de sensibilidad respecto al aptámero completo y 4 veces mayor afinidad por la proteína diana. Tuvieron reacciones cruzadas frente a las tropomiosina de otras especies por las similitudes en la estructura. Aun así, es un método sensible detectando niveles de nM y consiguiendo recuperaciones del 97% de la tropomiosina añadida en las muestras comerciales.

Entre los estudios que utilizan las tiras de flujo lateral (Tabla 1), cabe destacar el trabajo de Galan-Malo col., 2019, en el que consiguieron analizar dos de las proteínas más alergénicas de la leche (caseína y β -lactoglobulina), de manera simultánea mediante una tira de flujo lateral doble. Detectaron en muestras tratadas térmicamente, como la leche UHT (leche tratada a altas temperaturas), ambas proteínas alergénicas en niveles de ppm. También prepararon diferentes matrices como salchichas, paté y pan, en las que añadieron leche en polvo y emplearon las tiras de flujo lateral en el ensayo. Aunque las proteínas de caseína fueron detectadas en todas las muestras, las β -lactoglobulina no se pudieron determinar en algunas matrices debido al tratamiento térmico a altas temperaturas al que habían sido sometidas, el cual producía la desnaturalización proteica de igual modo que ocurría en la técnica ELISA.

EMPLEO DE LA ELECTROFORESIS

Esta técnica se basa en la separación electroforética de las proteínas, es decir, en la migración de las proteínas al aplicar un campo eléctrico en geles electroforéticos. La técnica electroforética más utilizada en el análisis de alérgenos es la electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Esta técnica permite principalmente la detección cualitativa de alérgenos alimentarios y se emplea como método de screening.

Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La muestra que contiene las proteínas se somete a un proceso de preparación en la que se añade dodecilsulfato de sodio (SDS), éste proporciona la carga negativa a las proteínas además de actuar junto con otros agentes reductores en su desnaturalización, es decir, produciendo la pérdida de la estructura secundaria y terciaria de las proteínas. Esta carga negativa, es la que va a permitir su movimiento electroforético desde el electrodo negativo (cátodo) hacia el positivo (ánodo) del campo eléctrico.

La muestra se dispone en un gel de poliacrilamida formado por la polimerización química de una mezcla de acrilamida y bisacrilamida, dando lugar a una estructura que actúa como filtro poroso de diferente tamaño según la concentración de acrilamida utilizada.

El recorrido de las proteínas por el gel se realiza durante varias horas, la estructura porosa del gel va a permitir la separación de las proteínas según el tamaño (la longitud de la cadena de aminoácidos). Esto se consigue por el SDS adicionado, asegurando la separación según la diferencia de peso molecular al proporcionar una carga negativa constante a las proteínas.

Las proteínas con menor tamaño recorrerán más rápido el gel quedando más cerca del polo positivo, mientras que las de mayor tamaño quedan retenidas en los poros de la matriz del gel y

presentarán más dificultad en su movilidad por la mayor interacción con la acrilamida del gel, siendo por lo tanto, la velocidad de desplazamiento de las proteínas inversamente proporcional a su tamaño.

Después del recorrido electroforético, las proteínas quedan separadas en bandas en el gel de poliacrilamida, posteriormente, para poder visualizarlas, se somete a una etapa de coloración. El método más común es el empleo del colorante azul de Coomassie que interacciona con los aminoácidos de las proteínas y permite su visualización.

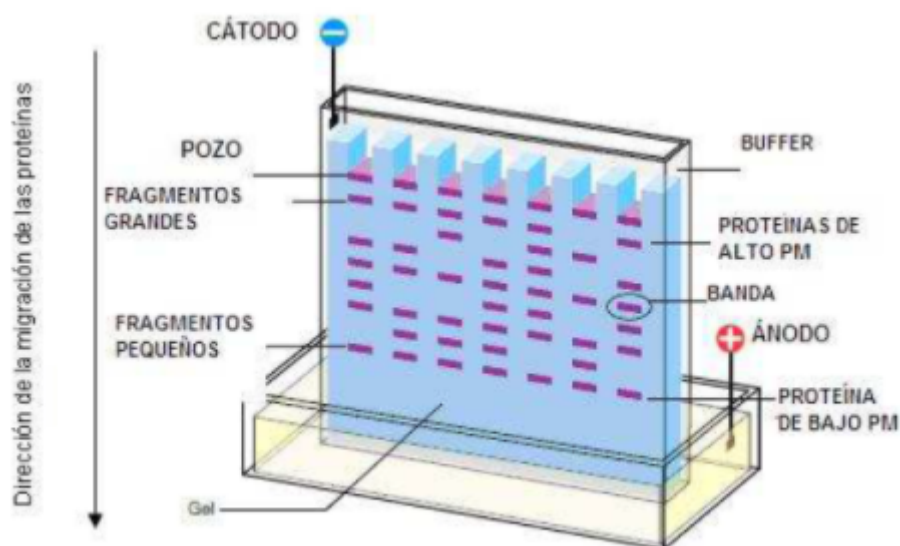


Figura 5. Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida. (Fuente: www.alimentoargentinos.gob.ar)

En este esquema se representa la celda donde se realiza la electroforesis, en los pocillos del gel de poliacrilamida se depositan las diferentes muestras a analizar. Se indica la ubicación donde se encuentra el cátodo, punto del inicio de la electroforesis y el ánodo, el electrodo hacia el que se van a desplazar las proteínas. Se observa la separación de las proteínas en bandas según su tamaño molecular, quedando las más pequeñas más cerca del ánodo al tener mayor velocidad de migración y las más grandes cerca del cátodo al tener menor desplazamiento.

Esta técnica permite comparar las bandas de una muestra patrón con las bandas de la proteína alergénica que se quiere estudiar, es decir, una proteína conocida se somete a la separación electroforética al mismo tiempo que la muestra problema. Gracias a las bandas características obtenidas, se puede contrastar con la muestra de referencia e identificar el compuesto que se quería buscar en el alimento. Una vez teñidas las bandas se puede comparar visualmente para obtener un resultado cualitativo de la presencia de alérgenos en la muestra. Sin embargo, las bandas pueden cuantificarse mediante un densitómetro, obteniendo unas gráficas que permiten comparar la muestra con el patrón y obtener un resultado más preciso. Esta técnica permite analizar los compuestos en una mezcla compleja siempre que se encuentren en cantidades lo suficientemente grandes para poder detectarlas. Tiene la limitación de no poder detectar a nivel trazas las proteínas alergénicas. Sin embargo, ofrece las ventajas de alto poder de resolución, gran versatilidad por la composición del gel de acrilamida, consiguiendo la retención de las

moléculas más grandes y el mayor desplazamiento de las pequeñas obteniendo un mapeo característico de las bandas. Algunos de los inconvenientes son, que consiste en un método laborioso y se necesita personal cualificado, lo que conlleva a no utilizarse de manera rutinaria, no obstante, se utiliza como técnica de preparación para la extracción de las proteínas para ser analizadas por otras técnicas más sensibles como la espectrometría de masas.

Inmunoelectroforesis: Western blot

Esta técnica se basa en la detección de proteínas mediante la interacción específica antígeno-anticuerpo. Inicialmente, la muestra problema tiene que prepararse mediante la separación de las proteínas por SDS-PAGE (Figura 6.1-2). Posteriormente, el gel de acrilamida obtenido, en el cual se encuentran las bandas de proteínas separadas, tiene que transferirse a una membrana para poder hacer interaccionar posteriormente los anticuerpos con ellas (Faisal col., 2019; Gavini y Parameshwaran 2020).

Generalmente se utilizan membranas de nitrocelulosa o polivinilpirrolidona (PVPD) para realizar la electrotransferencia. En este proceso se realiza una preparación tipo sándwich en la que se coloca una esponja, papeles de filtro, el gel donde están las bandas, la membrana de nitrocelulosa, papeles de filtro y otra esponja. Esta preparación se coloca en la cubeta de transferencia inmersa en un tampón de transferencia y se aplica una corriente eléctrica produciendo el desplazamiento de las proteínas hacia el polo positivo, quedando retenidas en la membrana (Figura 6.3) (Croote y Quake, 2016).

Posteriormente la membrana se somete a una etapa de bloqueo. Este proceso consiste en utilizar albúmina de suero bovino (BSA) para la incubación de la membrana. La albúmina se une a los lugares inespecíficos de unión de la proteína que hayan quedado libres en la membrana, es decir, que no están ocupados por las proteínas transferidas, para evitar interacciones tras la adición del anticuerpo (Figura 6.4) (Monaci y Visconti, 2009).

A continuación se produce el revelado, las membranas se ponen en inmersión con el anticuerpo primario monoclonal específico del antígeno. Este complejo de unión antígeno-anticuerpo es reconocido por un segundo anticuerpo, el cual puede estar marcado con una enzima, fluorocromo o sustancia quimioluminiscente. Posteriormente a la interacción, se revela la unión según el marcaje (Figura 6. 5-6) (Gavini y Parameshwaran, 2020; Monaci col., 2018):

- En la detección colorimétrica se adiciona el sustrato (colorante soluble) de la enzima produciendo la insolubilización del colorante y se consigue la visualización de las bandas teñidas en la membrana, la cuantificación se realiza por densitometría o espectroscopía.

- En la detección fluorescente, se excita el fluorocromo y la luz emitida es detectada por un fotosensor.
- En la detección quimioluminiscente, una enzima generalmente la peroxidasa, actúa sobre el sustrato añadido, emitiendo luz que es detectada en una película fotográfica.

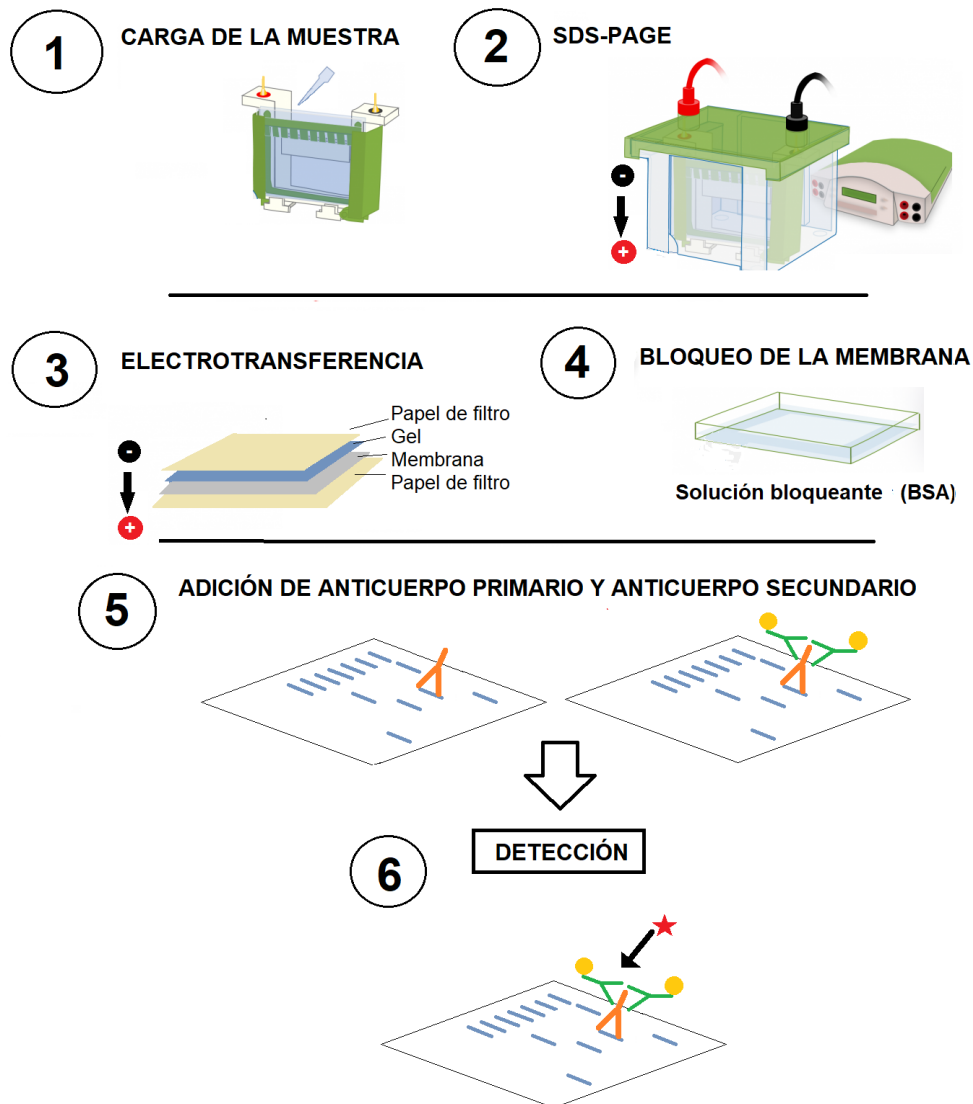


Figura 6. Representación esquemática de la técnica western blot (Fuente: Elaboración propia).

1. Carga de la muestra en los pocillos. 2. Electroforesis mediante gel de poliacrilamida. 3. Transferencia de las fracciones proteicas del gel a la membrana. 4. Bloqueo de los lugares de unión libre. 5. Interacción y reconocimiento antígeno-anticuerpo. 6. Detección de la unión antígeno-anticuerpo

Entre los trabajos en los que se ha utilizado SDS-PAGE y Western blot para la detección de alérgenos (Tabla 1), destaca el estudio de Cellerino col., 2012, en el cual analizaron alérgenos de soja en muestras crudas de carne y embutidos tratados térmicamente con diferentes concentraciones de la proteína alergénica. Además, compararon ambos métodos con un kit comercial de ELISA. El método con mayor sensibilidad fue el Western blot, seguido del kit ELISA y SDS-PAGE, consiguiendo la detección de concentraciones más bajas a niveles de ppm. Sin embargo, la afectación de la muestra por el tratamiento térmico, influyó en la detección proteica mediante el kit ELISA, obteniendo menores concentraciones en los alimentos tratados que en las muestras crudas.

Esta técnica tiene utilidad en el diagnóstico de IgE en el suero de pacientes alérgicos. En estos casos, permite la identificación de proteínas alergénicas extrayendo las proteínas de la matriz alimentaria y sometiéndolas a SDS-PAGE. Posteriormente, se realiza la inmunotransferencia utilizando sueros de pacientes que contienen IgE para interactuar con la proteína alergénica formando los complejos antígenos-anticuerpos para, a continuación, ser detectados (Jędrusek-Golińska, col., 2019)

Otros autores también utilizaron SDS-PAGE en la identificación de alérgenos de fresa mediante la separación proteica por electroforesis y la posterior transferencia a la membrana, permitiendo la interacción de las IgE presentes en el suero de pacientes con las proteínas alergénicas en la membrana (Guarino y Sciarrillo, 2018).

EMPLEO DE BIOSENSORES

Los biosensores son dispositivos analíticos que están constituidos por un sistema de bioreconocimiento (receptor bioquímico) que puede ser una enzima, anticuerpo o ácido nucleico, un sistema de transducción de la señal biológica en señales físico-químicas cuantificables y un mecanismo encargado de procesar y amplificar las señales, cuando interacciona la muestra con el elemento de reconocimiento biológico, permitiendo la obtención y el registro de datos (Figura 7) (Aquino y Conte-Junior, 2020). Las señales que se producen cuando se produce la interacción, consisten en cambios en el color, carga, pH, masa, transferencia de electrones y variación en las propiedades ópticas (Aquino y Conte-Junior, 2020).

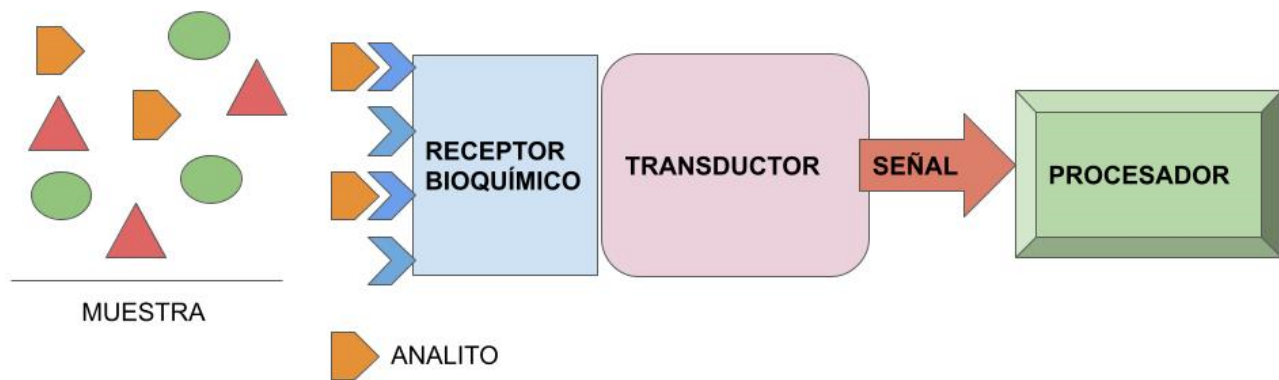


Figura 7. Esquema de los componentes del biosensor. Fuente: Elaboración propia.

Representación de la interacción entre el analito y el bioreceptor, formación de una señal cuantificable por el transductor y la posterior amplificación y registro de datos por el procesador.

Estudios recientes están analizando la aplicación de nanomateriales en el uso de nanosensores, consiguiendo límites de detección bajos. El uso de nanopartículas en los biosensores permite obtener mejor rendimiento por las propiedades ópticas, electroquímicas y magnéticas que presentan, consiguiendo mejores respuestas al traducir la señal, o mejorar la inmovilización del receptor bioquímico, ya sean enzimas, anticuerpos, oligonucleótidos, etc. Los nanomateriales más utilizados son las nanopartículas de metal (oro y plata), las de carbono como el grafeno y las nanopartículas magnéticas (Gómez-Arribas col., 2018).

El uso de nanomateriales en los biosensores les ha otorgado mayores ventajas respecto a las técnicas convencionales como el ELISA, la espectrometría de masas y la reacción en cadena de la polimerasa, obteniendo menor tiempo de análisis, bajo coste, alta sensibilidad y selectividad, menor límite de detección, alto rendimiento y la posibilidad de múltiples análisis en muestras complejas (Nehra, col., 2019).

Los biosensores más comunes utilizados en la detección de alérgenos son los constituidos por anticuerpos como sistema de bioreconocimiento, se denominan inmunosensores y el método de transducción más utilizado es la resonancia de plasmones superficial (SPR).

Estos inmunosensores SPR están formados por anticuerpos que se fijan en la superficie metálica del dispositivo y se producen interacciones antígeno-anticuerpo al ponerse en contacto con la muestra problema. Mediante el transductor SPR, se hace pasar un haz de luz a través de un prisma que está en contacto con una cara de la superficie del metal. Este haz de la luz, incide con un ángulo concreto de resonancia sobre la superficie metálica, originando la excitación de electrones de conducción del metal (los plasmones superficiales) al absorber esta energía, afectando por tanto a la intensidad de la luz reflejada. Cuando se producen las interacciones entre los analitos de la muestra problema (antígenos) con el elemento de reconocimiento (anticuerpos) se producen cambios en el índice de refracción del medio que está en contacto con la cara

opuesta de la superficie metálica y por lo tanto, se produce la variación del ángulo de resonancia que es detectado y cuantificado por el dispositivo (Aquino y Conte-Junior, 2020; Zhou, col., 2019).

Entre los trabajos que utilizan estas técnicas (Tabla 1), está el estudio de Wang, col., 2018 en el que utilizaron biosensores basados en la detección SPR para el análisis de proteínas alergénicas como la albúmina de suero porcino. Estos autores compararon la detección con estos dispositivos y kits comerciales de ELISA indirecto competitivo. Los resultados de ambos métodos fueron acordes entre sí, sin diferencias significativas en la detección proteica. Además, analizaron muestras tratadas térmicamente en comparación con muestras sin tratar, y observaron la afectación en la detección alergénica de los tratamientos térmicos. Este método presentó buena sensibilidad y selectividad, además de requerir menor tiempo de análisis y un proceso más sencillo de elaboración, en comparación con el ELISA.

Uno de los biosensores que está empezando a sustituir a los inmunosensores, son los que utilizan aptámeros. Son biosensores en los que se inmoviliza una molécula de ADN o ARN específicos, que se unen a la proteína diana y producen un cambio eléctrico u óptico que es detectado. Estos aptasensores permiten resolver los problemas debidos a reacciones cruzadas por el reconocimiento de proteínas que contienen similitud en la estructura (Nehra, col., 2019).

Otros autores Chinnappan, col., 2020, estudiaron un aptasensor para la detección de la proteína alergénica tropomiosina presente en el marisco y utilizaron como nanomaterial óxido de grafeno. Obtuvieron buenos resultados en 30 minutos de análisis, siendo un método sensible y selectivo consiguiendo un límite de detección de 2,5 nM, y una alta recuperación, cerca del 97%, en la detección proteica de tropomiosina contenida en muestras de sopa de pollo. Sin embargo, también detallaron la existencia de reacciones cruzadas por la similitud en la secuencia de aminoácidos de la tropomiosina de otras especies y propusieron el estudio futuro de esta limitación, mediante la dilución de la muestra para superarlo.

4.1.2 Técnicas no inmunológicas

ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica no inmunológica, utilizada para la identificación de compuestos de manera cualitativa por sí sola o en combinación con otras técnicas analíticas.

Esta técnica es muy utilizada en la detección de proteínas, permitiendo obtener una huella peptídica del compuesto analizado. En este campo, presenta gran cantidad de aplicaciones, como el análisis de muestras que contienen mezclas de sustancias con la ventaja de procesar e interpretar los resultados fácilmente (AESAN, 2011).

Esta técnica se fundamenta en la conversión de compuestos orgánicos gaseosos en iones que serán separados según su masa/carga y registrados por un detector. Como resultado, se obtiene un perfil proteico (espectro de masas) en el que se representa la abundancia de los iones separados en función de su relación masa/carga (New, col., 2018). Los resultados obtenidos en el espectro van a depender de la estructura química de la muestra problema. Con esta técnica se consigue detectar la masa concreta de un compuesto, así como la estructura y composición de las moléculas.

El equipo de la espectrometría de masas consiste en cuatro partes encargadas de diferentes funciones (Figura 8).

1. Sistema de introducción de la muestra, que permite vaporizar las sustancias que la componen. Estos sistemas pueden ser directos e indirectos o mediante el acoplamiento a otras técnicas de separación como la cromatografía.
2. Fuente de iones, encargado de originar iones de las sustancias volatilizadas. Se produce la pérdida de protones o electrones al convertirse los átomos o las moléculas en iones. Los métodos que se utilizan con mayor frecuencia para generar los iones son:
 - Desorción/Ionización láser asistida por matriz (MALDI)
 - Ionización por electrospray (ESI)
3. Analizador, encargado de separar los iones según su relación masa/carga. Los analizadores más utilizados pueden ser:
 - De tiempo de vuelo (TOF)
 - Cuadripolo (Q)
 - Orbitrap
 - De triple cuadripolo (QQQ)
4. Detector de iones y registrador de la señal generada obteniendo el espectro de masas. Se registra el número de iones asignado a cada valor masa/carga.

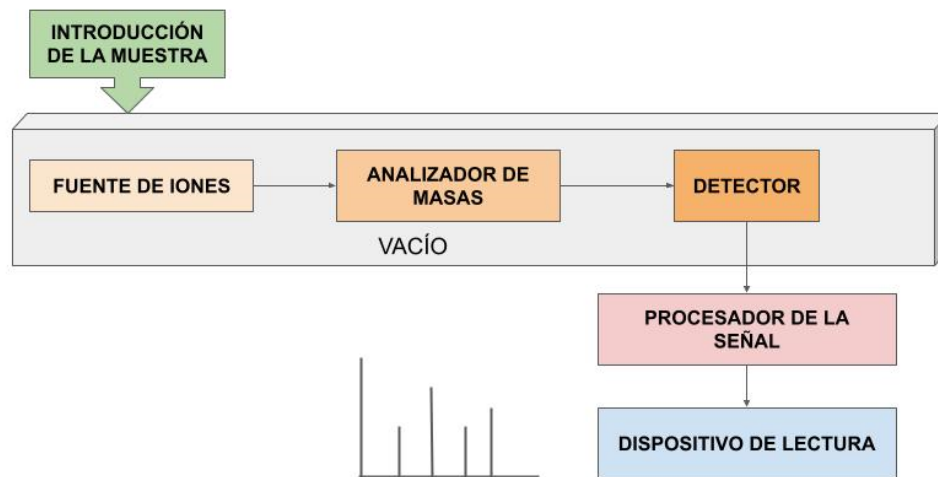


Figura 8. Esquema de los componentes del espectrómetro de masas. Fuente: Elaboración propia.

La muestra se introduce en la fuente de iones consiguiendo su volatilización. El espectrómetro transforma los compuestos gaseosos en iones y los separa según su relación masa/carga. Posteriormente son determinados individualmente mediante el detector y registrados para obtener el espectro de masas característico.

1. Sistema de introducción de la muestra

La espectrometría de masas se puede utilizar acoplada a otras técnicas analíticas como la cromatografía líquida (LC) para la introducción de la muestra en el espectrómetro, constituyendo la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS)

Esta técnica ha adquirido mayor importancia en la detección de alérgenos alimentarios puesto que permite detectar multitud de alérgenos en un solo ensayo (Croote y Quake, 2016)

Este acoplamiento LC-MS permite obtener mejores resultados al combinarse los dos métodos y sus ventajas, por un lado se consigue la separación de los péptidos mediante la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y posteriormente la alta especificidad y sensibilidad de la espectrometría de masas permite la detección e identificación de los compuestos alergénicos presentes en la muestra. El HPLC, es una versión de la cromatografía líquida en la que se utiliza una fase estacionaria en la columna con un tamaño de partículas menor que la utilizada en la LC convencional y además está sometida a un sistema de alta presión, que impulsa la fase móvil consiguiendo mayor eficacia. Si en la técnica se emplean dos espectrómetros de masas acoplados en tándem se denomina HPLC-MS/MS, con esta combinación de técnicas se consigue mayor sensibilidad y resolución, al eliminar las interferencias del fondo.

Esta técnica consiste en someter inicialmente a la muestra a una digestión proteica para conseguir pequeños péptidos mediante enzimas específicas (tripsina) y ser separados a continuación mediante cromatografía líquida. Se introduce la muestra en una fase móvil (eluyente) dentro de una columna que contiene a su vez una fase estacionaria, que consiste en un material poroso

normalmente gel de sílice, permitiendo la retención de algunas moléculas. Durante esta separación se producen interacciones de tipo hidrofóbico, iónico etc. entre los componentes de la muestra y la fase estacionaria lo que originará la retención de algunas moléculas en la columna, mientras que otras continuarán con el flujo de la fase móvil (Croote y Quake, 2016).

2. Fuente de ionización

El eluyente obtenido se introduce en la fuente de iones, que contiene una cámara con presión atmosférica (API, presión atmosférica de ionización), encargada de convertir los compuestos de la muestra en iones gaseosos.

El método más común de ionización es por electrospray (ESI), en el cual se parte de los iones preformados obtenidos en el eluyente de la cromatografía y se someten a campos eléctricos para conseguir pequeñas gotas cargadas. Estas gotas sufren un proceso de desolvatación en el que se produce el secado para evaporar el disolvente y finalmente se producen los iones en fase gas (Faisal col., 2019).

La desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI) consiste en la mezcla de una porción de la muestra con una matriz orgánica presente en mayor cantidad sobre una placa metálica. Después de la evaporación del disolvente, se forman unos cristales en la mezcla sobre los que va a incidir un haz láser de alta intensidad. La energía es absorbida por la matriz favoreciendo la desorción de la muestra y la formación de iones en fase gaseosa.

Posteriormente, los iones gaseosos generados pasan al analizador de masas, el cual se encarga de separarlos en función de su relación masa/carga,

3. Analizadores de masas.

Existen gran variedad de analizadores, siendo los más comunes utilizados en el análisis de alérgenos los siguientes:

- En los analizadores de masas de cuadrupolo (Q) la separación de los iones se realiza haciéndolos pasar por el eje central de cuatro barras conectadas eléctricamente entre sí. En estas barras se aplican campos eléctricos con un voltaje variable para producir la filtración y selección de los iones que llegarán al detector según el potencial electrostático que se haya aplicado y de su relación masa/carga, los iones que no llegan al detector son expulsados (Alves col., 2019).
- En el analizador de masas de tiempo de vuelo (TOF) los iones generados en la fuente, son acelerados mediante un voltaje y se les hace pasar a través de un tubo al vacío de una longitud determinada. La velocidad a la que atraviesan el tubo, va a depender de la masa y la carga que tengan.

- Analizador orbitrap: Los iones introducidos en este analizador oscilan entre dos electrodos exteriores y un electrodo central quedando atrapados por las fuerzas que actúan sobre ellos contrarrestándose. A su vez, los iones con una determinada relación masa/carga se mueven hacia delante y hacia detrás sobre el electrodo central consiguiendo separarse por las diferentes frecuencias de oscilación, las cuales se determinan mediante la transformada de Fourier para generar el espectro de masas.
- El analizador de masas de triple cuadrupolo (QQQ) forma parte de la técnica que se denomina espectrometría de masas en tándem (MS/MS), es decir, se acoplan dos espectrómetros de masas consiguiendo que los iones generados en el primer espectrómetro pasen a otro espectrómetro fragmentándose y obteniendo mayor sensibilidad y selectividad consiguiendo resultados cuantitativos.

En la espectrometría de masas se pueden seguir dos métodos de análisis. Uno de ellos se utiliza cuando se desconoce la proteína alergénica y se realiza un estudio general para obtener todos los péptidos característicos como una huella identificativa, posteriormente el espectro de masas se compara en unas bases de datos para identificar los péptidos y utilizarlos en la metodología dirigida. En esta técnica es fundamental el procesado de la muestra, es decir, la extracción de las proteínas diana y la eliminación de los componentes de la matriz que puedan afectarlas (Marzano col., 2020)

El otro método, se realiza cuando se conocen los péptidos alergénicos de estudio y se hace una investigación dirigida en la muestra problema. En este método se obtienen resultados específicos y sensibles puesto que se consigue identificar y cuantificar gran cantidad de alérgenos en un mismo análisis. En la realización de este método se aplica la espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Esta instrumentación y en concreto el espectrómetro triple cuadrupolo (QQQ), se utiliza en la metodología dirigida como técnica de elección para la realización de monitorizaciones de reacciones múltiples (MRM) detectando proteínas alergénicas específicas en muestras complejas y consiguiendo seleccionar los péptidos con una secuencia característica de esas proteínas (Alves col., 2019; Marzano col., 2020) Con la MRM se obtiene mayor selectividad y mejor resolución en la señal obtenida al reducir las interferencias de otros compuestos que forman parte de la matriz del alimento (Marzano col., 2020).

En la espectrometría de masas triple cuadrupolo, se utiliza el primer cuadrupolo y el tercero como seleccionadores de iones y el segundo es el que actúa como celda de colisión. Inicialmente los iones obtenidos de la fuente de iones se introducen en el primer filtro donde se selecciona los péptidos específicos para una determinada m/z , posteriormente en la celda de colisión estos péptidos se fragmentan de manera específica al estar en contacto con un gas inerte (nitrógeno o argón), y finalmente en el segundo filtro se selecciona los fragmentos de interés con una m/z

específica del péptido que se quiere identificar para posteriormente ser detectados. Los espectros de masas obtenidos son procesados en bases de datos para conseguir la identificación de las secuencias peptídicas obtenidas.

La espectrometría de masas se utiliza en combinación con otras técnicas que van a permitir una separación inicial de las proteínas a analizar, como la electroforesis en gel de poliacrilamida, y la LC. Algunos autores emplearon la extracción proteica de semillas de lentejas mediante SDS-PAGE, posteriormente se realizó una digestión enzimática mediante tripsina y se detectaron mediante HPLC-MS/MS (con analizador de triple cuadrupolo) proteínas alergénicas de bajo peso molecular (Shaheen col., 2019). Ambos métodos son técnicas eficientes, sin embargo, por las desventajas de la SDS-PAGE, debido a que presenta una preparación laboriosa y gran lentitud en el ensayo, se prefiere la cromatografía líquida de alta resolución, puesto que se obtienen buenos resultados y en menor tiempo de análisis.

Dentro de las técnicas de espectrometría de masas, el método que más se utiliza actualmente es la espectrometría de masas de alta resolución (HRMS), debido a la utilización de equipos más sofisticados se consigue mayor exactitud y precisión en la determinación de la masa del compuesto a analizar, como los analizadores de tiempo de vuelo y orbitrap.

Entre los trabajos que emplean la espectrometría de masas de alta resolución (Tabla 2), destaca el estudio de Gavage col., 2020, en el que analizaron proteínas alergénicas de cacahuete en diferentes matrices complejas para comparar la eficiencia del método HPLC-HRMS (con analizador de tiempo de vuelo) y de igual modo el trabajo de Van Vlierberghe col., 2020, quienes realizaron el mismo estudio, sin embargo analizaron alérgenos de avellana. En ambos estudios utilizaron matrices que simulaban los procesos de producción utilizados en las industrias alimentarias, analizaron los alérgenos en crudo, horneados a altas temperaturas, en muestras acidificadas, muestras sometidas a la reacción de Maillard y en matrices con elevada cantidad de grasas. Valoraron la eficacia del método para la detección de los alérgenos, teniendo en cuenta las posibles interacciones entre los componentes de la matriz y las alteraciones que podrían sufrir las proteínas. Las muestras se procesaron enzimáticamente con tripsina y después mediante HPLC-HRMS. Los resultados obtenidos demostraron que las muestras más complejas sometidas a tratamientos a alta temperatura o en ambientes acidificados y con mucha grasa, presentaban mayor problema en la cuantificación de algunos alérgenos alimentarios. No obstante, estos estudios concluyen con la obtención de péptidos específicos de cacahuete y avellanas, como marcadores estandarizados de alérgenos para su detección en alimentos mediante MS dirigida. Sin embargo, siguen siendo necesarios estudios futuros para desarrollar métodos y protocolos eficaces de MS para la detección de alérgenos alimentarios de rutina en industrias alimentarias.

Tabla 2. Resultados de los estudios empleando métodos analíticos directos no inmunológicos para la detección de alérgenos alimentarios

Referencia	Método	Proteína alergénica	Matrices alimentarias	Límite de detección	Resultados
Gavage col., 2020	HPLC-HRMS (tiempo de vuelo)	Cacahuete (péptidos de Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 6 y Ara h 8)	Productos comerciales crudos y tostados, leche de cacahuete/avellana fermentada, Cacahuete/avellana caramelizada, chocolate con cacahuete/ avellana	-	La intensidad de la detección variaba según el péptido, en algunos se reducía hasta en un 50% en las muestras tratadas térmicamente, en otros péptidos se reducía hasta un 75% en las muestras ácidas y las matrices grasas. Con los diferentes procesamientos consiguieron marcadores resistentes a estas condiciones, obteniendo 16 péptidos marcadores de cacahuete y 8 péptidos marcadores de avellana para ser utilizados en la detección de estos alérgenos mediante MS dirigida.
Van Vlierberghe col., 2020		Avellana (globulinas Cor a 9 , Cor a 11, Cor a 14, Cor a 8)			
Pilolli, col., 2021	HPLC-ESI-MS/MS (cuadrapolo-orbitrap)	Leche, huevo, cacahuete, soja, avellana y almendra	Chocolate y caldo en polvo	Detectaron niveles de 40 ppm en chocolate y 200 ppm en caldo	En las muestras de chocolate se consiguió una identificación del 94% mientras que en el caldo fue de un 74% debido al alto contenido de proteínas. Obtuvieron un protocolo eficaz para la preparación de las muestras y consiguieron 74 marcadores peptídicos alergénicos en las muestras de chocolate y 36 en el caldo en polvo para poder utilizarse en los análisis de MS dirigida para la detección de múltiples alérgenos.
New, col., 2018	LC-MS/MS (triple cuadrapolo)	Clara de huevo, leche desnatada, cacahuete, soja, almendra, nuez, nuez de Brasil y pecán, anacardo, avellana, piñón, pistacho	Pan y galletas	Detectaron niveles de 3 ppm de huevo entero y 10 ppm de leche entera mantequilla de cacahuete y avellana.	Detectaron simultáneamente 12 alérgenos y consiguieron marcadores específicos de cada uno. Además, cuantificaron con este método los alérgenos en niveles de ppm con una recuperación del 60-119% Los resultados del ELISA se vieron afectados por los tratamientos térmicos y la alteración de los epítomos.
Stella col., 2020	LC-HRMS/MS (cuadrapolo-orbitrap Comparación con ELISA)	Huevo (ovoalbúmina y ovomucoide), leche (β -lactoglobulina y caseína α -S1) soja (glicinina G1 y G3), crustáceos (tropomiosina)	Productos alimenticios procesados de pescado o porcino	Detectaron niveles de 0,25 μ g/g para leche 0,50 μ g/g para huevo 2,00 μ g/g para soja y crustáceo	Detectaron los cuatro alérgenos simultáneamente en muestras complejas de origen animal con alto contenido proteico, consiguiendo un límite de detección de μ g/g una recuperación media del 95% en las 20 muestras analizadas. Los resultados del ELISA fueron acordes a los obtenidos por MS
Qi col., 2019	LC-MS/MS (tiempo de vuelo)	Leche (α -caseína, β -caseína y κ -caseína)	Masas de panadería (pan y galletas)	Detectaron niveles entre 0,13 - 0,26 μ g/g	Obtuvieron con la tripsina inmovilizada mayor hidrólisis y consiguieron un aumento de aproximadamente 0,1 mg/ml de proteína en la extracción. Redujeron el tiempo de preparación a 15 minutos y detectaron a niveles de μ g/g con recuperaciones de la proteína entre 65,2% a 86,1%. La κ -caseína fue la más afectada por el tratamiento térmico, sin embargo la α S1-caseína y la β -caseína son las que resistieron mejor.

Algunos autores han utilizado métodos analíticos como la LC-MS/MS para la detección simultánea de múltiples alérgenos en matrices alimentarias (Tabla 2), entre los cuales hay que resaltar el trabajo de Pilolli, col., 2021 en el cual analizaron alérgenos alimentarios de leche, huevo, cacahuete, soja, avellana y almendra en muestras alimentarias de chocolate y preparados de caldo en polvo a nivel de ppm y utilizaron espectrometría de masas en tándem de alta resolución no dirigida. Utilizaron matrices alimentarias complejas, con altos contenidos de grasas y polifenoles y proteínas, y las sometieron a altos tratamientos térmicos. Estudiaron varios protocolos de extracción, consiguiendo mejores resultados con la extracción mediante agitación a temperatura ambiente y sonicación, la purificación por cromatografía y la posterior digestión mediante tripsina. A continuación, se procesaron en HPLC-MS/MS (con analizador cuadrupolo-orbitrap) y consiguieron un protocolo efectivo de preparación de muestras para obtener marcadores peptídicos para poder utilizarse en procedimientos de MS dirigidos como el método MRM en la detección de múltiples alérgenos.

Por su parte, New col., 2018 detectaron clara de huevo, leche, cacahuete, soja y una variedad de frutos secos en un límite de ppm en diferentes productos alimentarios horneados como pan y galletas. Además, compararon la LC-MS/MS (con analizador de triple cuadrupolo) con el ELISA y aplicaron ambos métodos en la detección de proteínas de soja. Obtuvieron mejores resultados en la detección y cuantificación de alérgenos con la espectrometría de masas respecto al ELISA, debido a que algunas muestras se trataron térmicamente alterando la estructura proteica, así como la modificación de los sitios de reconocimiento por el anticuerpo.

De igual modo Stella col., 2020 compararon el ELISA con la espectrometría de masas en tándem de alta resolución (con analizador cuadrupolo-orbitrap) en muestras complejas con altos contenidos de proteína como pescado y productos cárnicos. Detectaron simultáneamente proteínas de leche, huevo, crustáceos y soja en concentraciones de $\mu\text{g/g}$. Los kits ELISA comerciales empleados para cada alérgeno, mostraron resultados satisfactorios y acordes a los obtenidos por MS.

Otros autores como Alves, col., 2019 también compararon en su revisión los métodos inmunológicos como el ELISA frente a los no inmunológicos como la LC-MS/MS en muestras que contenían gluten. Concluyeron que las técnicas como el ELISA siguen siendo un método eficaz como análisis de rutina al ser rápido, barato y sensible, no obstante, no recomiendan el ELISA como método para identificar gluten en alimentos que han sido tratados térmicamente a altas temperaturas, ya que pueden dar lugar a resultados falsos negativos porque no todos los anticuerpos que se utilizan detectan todas las proteínas del gluten y se producen reacciones cruzadas. En estos casos, para solventar estas limitaciones, han aplicado la LC-MS/MS al ser una técnica más sensible y fiable al poder conocer la secuencia de aminoácidos y detectar cantidades pequeñas de péptidos.

Finalmente Qi col., 2019 desarrollaron un método de LC-MS/MS (con analizador de tiempo de vuelo) mejorando las limitaciones respecto a la preparación, obtuvieron un método de digestión proteica más eficiente, más rápido y con mejor resolución que la digestión con tripsina convencional. Utilizaron tripsina inmovilizada en nanopartículas magnéticas para la detección de alérgenos de la leche en alimentos horneados, consiguiendo mayor hidrólisis de las proteínas y mejores resultados en la secuenciación, siendo ventajosos su uso en las industrias alimentarias al reducir el tiempo de análisis. Además, se obtuvieron como marcadores de elección las dos proteínas más alergénicas de la leche por ser las que resisten mejor los tratamientos térmicos.

4.2 MÉTODOS DE DETECCIÓN DE ALÉRGENOS INDIRECTOS

4.2.1 Técnicas de detección de ADN

Los métodos indirectos se utilizan en la detección de alérgenos alimentarios, sin embargo, estos métodos no detectan la proteína alergénica, sino que van a detectar indicadores de la existencia de estas proteínas analizando fragmentos del ADN que codifican el alérgeno (AESAN, 2011; Monaci y Visconti, 2010).

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Este método consiste en la amplificación de una cadena de ADN para después ser detectado y cuantificado. Su desarrollo consiste en extraer la secuencia de ADN de la matriz alimentaria y someterla a varios ciclos de amplificación generalmente alrededor de 30 ciclos, aplicando etapas de calentamiento y enfriamiento, consiguiendo finalmente la amplificación de un fragmento específico de ADN. Esta técnica necesita varios componentes para su empleo, una enzima capaz de resistir a altas temperaturas, la Taq-polimerasa, nucleótidos para formar la cadena complementaria de la secuencia molde, cebadores (oligonucleótidos) específicos de los extremos de la secuencia a amplificar para marcar el inicio de amplificación de la enzima, y el instrumento termociclador donde se produce la amplificación. En la PCR se establecen varios ciclos de amplificación constituidos por una etapa de desnaturalización del ADN de doble cadena, una etapa de unión de los cebadores a los extremos de las cadenas y la extensión de los cebadores complementando la cadena molde de ADN, obteniendo finalmente dos copias completas por cada ciclo.

La PCR que se utiliza en la detección de alérgenos para obtener resultados cualitativos, es la denominada PCR de punto final o convencional. En esta técnica los fragmentos amplificados obtenidos se someten a SDS-PAGE para determinar el tamaño de las secuencias obtenidas y poder determinar la presencia o ausencia de los alérgenos en las muestras, en comparación con fragmentos conocidos de las proteínas.

Sin embargo, por su mayor sensibilidad, la técnica PCR que más se utiliza en la detección alergénica es la PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR), obteniéndose resultados cuantitativos o semicuantitativos. La técnica tiene el mismo fundamento que la PCR convencional, sin embargo, se utiliza un termociclador especial que permite la excitación de fluorocromos y la detección de la luz emitida.

En esta técnica los ciclos de amplificación se observan según se van completando, a medida que aumenta el número de ciclos se obtiene una curva, del mismo modo que aumenta la fluorescencia que se produce por la multiplicación del ADN. En la realización de esta técnica se necesita un

fluoróforo que se une a las secuencias de ADN de doble cadena, este fluoróforo es excitado durante los ciclos de amplificación y la intensidad de fluorescencia generada se va detectando, siendo mayor cuanto mayor número de copias de ADN hay en la muestra de análisis. Otro método de qPCR, que presenta mayor sensibilidad, es el uso de sondas específicas frente a la secuencia concreta codificante de la proteína alergénica, estas sondas emiten fluorescencia cuando se ha copiado el fragmento del ADN diana. Consisten en sondas que contienen dos fluoróforos que cuando están juntos y unidos al ADN no generan fluorescencia, pero al producirse la amplificación de las cadenas de ADN, la enzima hidroliza la sonda quedando separados y emiten la fluorescencia que es detectada.

Esta técnica presenta ventajas respecto a la PCR convencional, principalmente el tiempo necesario para el análisis es inferior a la PCR convencional, debido a la ausencia de la fase de electroforesis, además, permite amplificar y cuantificar en un mismo paso y también presenta mayor sensibilidad por el uso de fluorocromos. A su vez, presenta limitaciones en relación a que la instrumentación necesaria es más costosa y su funcionamiento es más complicado requiriendo personal especializado.

El principal problema de la detección de ADN para el análisis de alérgenos alimentarios, es que la presencia de las secuencias de ADN específicas de las proteínas causantes de la alergia en los pacientes, no implica que la muestra contenga la proteína alergénica, siendo este ADN no perjudicial en estas personas. Además, las proteínas alergénicas pueden estar presentes en la muestra sin detectarse la secuencia de ADN en la PCR, por lo que la prueba no detectaría la presencia del alérgeno y sin embargo, podría generar una alergia alimentaria en las personas susceptibles (Van Vlierberghe col., 2020).

Algunos estudios han utilizado métodos no inmunológicos como la PCR en tiempo real en la detección de alérgenos alimentarios (Tabla 3), se han identificado la secuencia de ADN que codifica para diferentes proteínas alergénicas. Dentro de estos estudios destaca el trabajo de Villa col., 2018, quienes estudiaron la PCR en tiempo real en el análisis de altramuz en harina de arroz, harina de trigo y pan. Obtuvieron peores resultados en la cuantificación de los alimentos procesados térmicamente como el pan respecto a las harinas crudas. También identificaron la disminución de la sensibilidad por variaciones en la matriz con peores resultados en las harinas de trigo respecto a las harinas de arroz.

Estos mismos autores también utilizaron la PCR en tiempo real para la detección de alérgenos de la leche en productos cárnicos procesados. Sometieron los alimentos a cocción suave al horno en jamones y la esterilización en autoclave en embutidos y las compararon con los alimentos crudos. Obtuvieron, igualmente, menor sensibilidad las muestras que tuvieron mayor procesado en autoclave respecto a las muestras crudas, sin embargo, las muestras horneadas no sufrieron

variaciones que afectaran la sensibilidad del método. Además, compararon la interacción de los componentes de la matriz en la detección de las proteínas lácteas, consiguiendo menor sensibilidad en los jamones sin tratar en comparación con los embutidos crudos. Con los resultados obtenidos, confirmaron la afectación de la sensibilidad de la técnica PCR en tiempo real por los tratamientos térmicos a los que se someten los alimentos y los componentes de la matriz (Villa col., 2019).

Tabla 3. Resultados de los estudios empleando métodos analíticos indirectos para la detección de alérgenos alimentarios

Referencia	Método	Gen alergénico	Matrices alimentarias	Límite de detección	Resultados
Villa col., 2018	PCR en tiempo real	Gen de ARNr 12S de leche de vaca	Productos cárnicos (jamones crudos y cocidos y salchichas esterilizadas en autoclave y embutidos crudos)	Niveles de 100 mg/kg en jamones crudos y cocidos y salchichas esterilizadas y niveles de 50 mg/kg en embutidos y salchichas crudos	La sensibilidad se reduce a la mitad del 0,005% (p/p) en los embutidos crudos al 0,01% (p/p) en los jamones cocidos. La sensibilidad también disminuyó del 0,005% (p/p) en las muestras de salchichas sin tratar, al 0,01% (p/p) en las esterilizadas. Sin embargo, el tratamiento térmico suave de cocción no afecta significativamente en la cuantificación.
Villa col., 2019	PCR en tiempo real	Gen que codifica el alérgeno Lup a 4 de altramuz	Harina de arroz, harina de trigo y pan	Sensibilidades de hasta 5 mg/kg en harina de arroz, 100 mg/kg en harina de trigo y 500 mg/kg en pan (p/p)	La matriz reducía la sensibilidad en 20 veces menos en la harina de trigo respecto a la harina de arroz, bajando del 0,01% (p/p) al 0,0005% (p/p) respectivamente. El tratamiento térmico también retrasó la amplificación en las muestras horneadas de pan no pudiendo detectarse concentraciones válidas en estas muestras.
Sanchiz col., 2020	PCR en tiempo real	Genes que codifican alérgenos (Cas s 5, Cas s 9 y TLP de Cas s) de castaña	Mezcla de harina de castaña y harina de trigo	Detectan niveles de 100mg/kg	Las muestras autoclavadas no se pudieron cuantificar por las altas temperaturas y presiones, mientras que en las muestras hervidas durante 30 y 60 minutos la detección disminuyó ligeramente reduciendo el límite de detección a 1000 mg/kg
Madrid col., 2021	PCR en tiempo real ELISA sándwich	Gen 18S rRNA y gen ITS1 de nuez	Harina de maíz	Detectan niveles de 0,1 mg/kg en PCR y 2,2 mg/kg en ELISA	Consiguieron niveles de detección 20 veces mayores mediante PCR en comparación con el ELISA. En el ELISA se encontró reactividad cruzada con la almendra, originando falsos positivos. El tratamiento térmico no afectó a la detección en nueces con PCR.

Por su parte Sanchiz col., 2020 detallan sus observaciones respecto al tratamiento térmico en su estudio, en el cual analizaron alérgenos de castaña mediante PCR en tiempo real bajo distintos tratamiento térmicos. En concordancia con otros estudios, confirman una disminución en el rendimiento de la detección en las muestras hervidas mientras que en las muestras autoclavadas no pudieron detectarlos.

Finalmente otros autores, Madrid col., 2021 han comparado la PCR con el ELISA en la detección de alérgenos de nuez y obtuvieron mayor sensibilidad con la PCR en tiempo real. Además, en la técnica ELISA se produjeron reacciones cruzadas con la obtención de falsos positivos y

problemas con los tratamientos térmicos apareciendo falsos negativos, estas muestras a su vez, se analizaron por PCR para confirmar los resultados por su capacidad de detección de ADN en un nivel más bajo.

4.3 APLICACIÓN DE LOS MÉTODOS ANÁLITICOS DE ALÉRGENOS EN EL ETIQUETADO COMERCIAL

En este trabajo bibliográfico se ha querido analizar el empleo de los métodos de detección de alérgenos para comprobar la utilización en el etiquetado la declaración de alérgenos en productos comerciales. En este aspecto se encontraron resultados muy dispares entre unos estudios y otros.

Entre los estudios realizados para la verificación del etiquetado mediante técnicas analíticas, en la bibliografía encontramos el trabajo de Villa col., 2018 quienes analizaron diferentes muestras comerciales mediante PCR en tiempo real y lo compararon con el método ELISA. Los datos por PCR fueron acordes a los obtenidos por ELISA, sin embargo, determinaron un uso excesivo del etiquetado preventivo ya que del total de las muestras que presentaban la declaración de trazas, más de la mitad de las muestras fueron negativas.

Otros autores utilizaron la LC-MS/MS en la verificación de la declaración de alérgenos en el etiquetado. Por su parte, Stella col., 2020 detectaron que en la mayoría de las muestras que declaran los alérgenos obtuvieron resultados negativos, sin embargo, en uno de los productos comerciales, fue detectado el alérgeno pero no estaba indicado en el etiquetado. De distinta manera, en otros estudios detectaron alérgenos por LC-MS/MS en la mitad de las muestras alimentarias que no los incluían en el etiquetado (Qi col.,2019).

También se han encontrado en la bibliografía algunos estudios que han analizado los alérgenos en productos comerciales que incluían en el etiquetado la posibilidad de contener alérgenos y han sido detectados en todos ellos

En este caso, Torricelli col., 2020 utilizaron PCR en tiempo real para verificar el correcto uso del etiquetado, validaron un método consiguiendo detectar cantidades muy pequeñas de alérgeno de sésamo, pistacho y nuez de macadamia y analizaron productos comerciales que contenían esas proteínas obteniendo resultados acordes al etiquetado declarado.

Por su parte, Eischeid y Stadig, 2018 también aplicaron la PCR en tiempo real en el análisis de cangrejo en diferentes matrices comerciales, en las cuales estaban identificados en el etiquetado la presencia de alérgenos, y obtuvieron concentraciones a nivel trazas en el nivel de ppm en todas las muestras menos una de ellas.

5.DISCUSIÓN

Debido a la prevalencia y la gravedad de las alergias alimentarias en las personas susceptibles, y según los avances científicos que se van obteniendo, se están regulando mediante normativas, la legislación de los alérgenos alimentarios. Las técnicas analíticas empleadas en la detección de alérgenos, son los principales métodos utilizados para poder garantizar la seguridad alimentaria y declarar correctamente los alérgenos en el etiquetado de los productos alimentarios, cumpliendo con las directrices que requieren las normativas respecto a esta información alimentaria. Uno de los problemas existentes respecto a la legislación, es la ausencia del límite establecido para declarar los alérgenos, a excepción del gluten, el único alérgeno regulado por la FDA en una concentración inferior a 20 ppm para declarar los productos como “libre de gluten” (Gluten and Food Labeling, 2018) Sin embargo, para el resto de alérgenos un resultado de cero es muy difícil de detectar ya que con la incertidumbre de la instrumentación actual, no se pueden conseguir esos límites de ausencia. Por lo tanto, se siguen realizando avances en la tecnología e instrumentación de estas técnicas para superar las limitaciones que presentan y conseguir equipos más sofisticados con mejores niveles de detección.

ANÁLISIS DE MÉTODOS DIRECTOS INMUNOLÓGICOS

El inmunoensayo ELISA, es el sistema más empleado para detectar alérgenos alimentarios de todas las técnicas inmunológicas existentes y es la más habitual en las industrias alimentarias. Debido a su alta sensibilidad, permite detectar bajas concentraciones de la proteína alergénica, por lo que resulta ser un buen método para la detección de ingredientes traza, es decir, contenidos de alérgenos en bajas cantidades presentes en el alimento, producidas por contaminaciones cruzadas no intencionadas durante el proceso de producción. Presenta muchas ventajas entre las que destacan su alta especificidad, su bajo coste respecto al equipo necesario en el análisis y los reactivos utilizados en su realización, además de su rapidez y sencillez en el manejo de la técnica, ya que evita contar con personal altamente cualificado. Por estos motivos, es la técnica de elección como método de rutina para analizar alérgenos alimentarios (AESAN, 2011; Faisal col., 2019; Pandey col. 2019).

El ELISA se utiliza como método cualitativo para detectar la ausencia o presencia de proteínas alergénicas en alimentos; aunque también permite la cuantificación de alérgenos utilizando estándares de concentración conocida, con los que se puede comparar la absorbancia obtenida y establecer la cantidad presente en la muestra problema.

Sin embargo, los métodos ELISA presentan limitaciones en su aplicación, pudiendo dar lugar a resultados falsos positivos y falsos negativos, siendo los principales problemas los efectos del procesado térmico de los alimentos en la detección de alérgenos, los tratamientos de extracción proteica, las interferencias de la matriz y las reacciones cruzadas por la variabilidad de los anticuerpos (Török col., 2015).

La principal limitación de este método la han explicado algunos autores en sus trabajos, en los cuales se ha visto afectado el análisis de alimentos que han sufrido algún proceso térmico (Mattarozzi y Careri, 2019; Török col., 2015). Algunos de estos autores que sometieron alimentos a diferentes procesos térmicos, concluyeron que cuanto más intenso era el tratamiento realizado menor concentración de proteína alergénica se detectaba en la muestra y desaconsejan el ELISA en alimentos con altos tratamientos térmicos (Török col., 2015; Ueberham col., 2019) Este inconveniente es debido a que algunos tratamientos térmicos con elevadas temperaturas como la esterilización, pasteurización, la reacción de Maillard, pueden afectar a la estructura conformacional de la proteína alergénica, desnaturalizando o cambiando los epítomos o los lugares donde interacciona la proteína con el anticuerpo que lo va a reconocer y se producen falsos negativos al no poder ser detectados los alérgenos.

Otros autores recomiendan el ELISA competitivo como mejor método para utilizarlo en muestras que han sufrido tratamiento térmico y en las que puede haber problemas a la hora de reconocer el antígeno. Con este método se consigue detectar fracciones de la proteína en vez de proteínas completas, por lo tanto se asegura su detección, además, este método competitivo está más recomendado para el uso en la detección de proteínas alergénicas que tienen menor tamaño y que están en concentraciones más bajas ya que presenta mejores resultados (Faisal col., 2019).

La preparación y extracción de las proteínas también se va a ver afectada en los casos en los que el producto sea tratado térmicamente, modificando la solubilidad y las conformaciones de las proteínas, además de originar falsos negativos. Algunos autores han descrito también este problema durante la propia preparación de la muestra para el análisis, puesto que debe someterse a condiciones de extracción que también pueden desnaturalizar la proteína, impidiendo su detección (Ueberham col., 2019). Otros estudios también detallan problemas en la preparación y extracción de las proteínas debido a las interacciones que se producen entre los componentes de la matriz alimentaria, afectando a la estructura de las proteínas alergénicas y en consecuencia a su detección (Török col., 2015)

Además, el ELISA es un método que no presenta gran reproducibilidad, ya que los diferentes anticuerpos pueden dar problemas y variaciones en la cuantificación de alérgenos al reconocerlos en el análisis del mismo alimento, debido a que los anticuerpos pueden detectar estructuras similares de proteínas alergénicas produciendo falsos positivos. Para garantizar la reproducibilidad del método, recomiendan el uso de anticuerpos monoclonales para evitar la posibilidad de reacciones cruzadas y los falsos positivos, así como el uso de pruebas de confirmación no inmunológicas de los resultados positivos (Ueberham col., 2019). Estos anticuerpos también mejoran la sensibilidad disminuyendo los falsos negativos, además, es necesario el uso de estándares de referencia para obtener una curva de concentración representativa para poder comparar con la muestra problema.

Por último, aunque la técnica no tiene grandes costos, si que supone un gasto al utilizarlo en analíticas de rutina, puesto que es una técnica que analiza alérgenos individuales y no permite simultáneamente el análisis de varios alérgenos en la misma muestra, dado que cada uno requiere anticuerpos específicos distintos frente al alérgeno.

Como método complementario al ELISA, están las tiras de flujo lateral con las ventajas del ELISA al tratarse de un ensayo de interacción antígeno-anticuerpo, además de la sencillez de la técnica al conocer el resultado en poco tiempo de manera visual y la posibilidad de su transporte.

El SDS-PAGE y el Western blot son técnicas inmunológicas que se han aplicado en el análisis de alérgenos alimentarios. Estas técnicas inmunológicas presentan ventajas en la detección de proteínas alergénicas, debido a la especificidad de la interacción antígeno-anticuerpo. Sin embargo, el SDS-PAGE se usa para la detección de proteínas en grandes cantidades, es decir, cuando la sustancia alergénica forma parte de los ingredientes de la composición del producto y no está a nivel trazas. El Western blot tiene mayor sensibilidad que el SDS-PAGE debido a la especificidad en la interacción, por lo que se suele utilizar como método de confirmación en muestras negativas SDS-PAGE, no obstante la sensibilidad es menor que el ELISA, siendo recomendable su empleo combinado como método para la cuantificación proteica (Sena-Torralba col., 2020).

En el caso del Western blot y el SDS-PAGE, los principales inconvenientes por los cuales estas técnicas no son empleadas de manera rutinaria para la detección de alérgenos, son la elaboración laboriosa que conlleva y la necesidad de mucho tiempo de análisis (AESAN, 2011). Sin embargo, el uso que se le da al SDS-PAGE, es como la primera fase de la extracción de proteínas en la preparación de las muestras, en combinación con otras técnicas como la espectrometría de masas. En cambio, la principal aplicación de ambas técnicas es el diagnóstico de personas alérgicas y la identificación de proteínas alergénicas utilizando suero de estos pacientes (Marzano, col., 2020)

La principal limitación de las técnicas inmunológicas en general, es el uso en alimentos que han sufrido altos tratamiento térmicos en su procesado como la esterilización, dado que se produce la desnaturalización de las proteínas, favorece la formación de aglomeraciones dificultando la separación proteica, y pierden la conformación de los epítomos disminuyendo la eficacia de esta técnica (AESAN, 2011).

Dentro de los métodos inmunológicos aplicados en la detección de alérgenos alimentarios, uno de los métodos que se está investigando en los últimos años son con los biosensores. La progresión en los avances de los biosensores, se está centrando en el uso de receptores biológicos como anticuerpos en combinación con transductores ópticos. Estos dispositivos se denominan nanobiosensores ópticos y los más comunes son los que utilizan nanopartículas metálicas

(generalmente oro o plata) en el sistema del receptor. Estas nanopartículas presentan propiedades ópticas, permitiendo la resonancia de plasmón superficial como señal cuantificable, siendo proporcional a la concentración del analito problema. En la detección de alérgenos, el uso de nanopartículas de oro junto con anticuerpos específicos de la proteína, permite obtener mejores resoluciones en la señal, que sin la utilización de elementos metálicos.

Los biosensores son dispositivos con grandes ventajas por su alta sensibilidad, selectividad, coste económico, menor cantidad de reactivos y menor muestra requerida para el análisis, además, permiten obtener resultados rápidamente y en tiempo real de múltiples alérgenos en muestras complejas (Gómez-Arribas col., 2018). Son técnicas que por las ventajas que presentan, están en estudio para su incorporación en las industrias alimentarias. Algunas de las principales ventajas aplicables para garantizar la seguridad alimentaria de los consumidores, son el poder realizar todo el análisis en un elemento portátil, desechable, de pequeño tamaño, in situ, de fácil aplicación, y la obtención de resultados en poco tiempo (Gómez-Arribas col., 2018). Además, el uso de anticuerpos monoclonales permite obtener gran especificidad, al unirse a la proteína alergénica en los alimentos y reducir la posibilidad de las interacciones producidas por otros componentes de la matriz (Aquino y Conte-Junior, 2020).

Del mismo modo que el resto de técnicas descritas en este trabajo, presenta desventajas. Pueden existir problemas por reacciones cruzadas, según el receptor utilizado y la inmovilización del receptor bioquímico es probable que pueda verse afectada la detección de las proteínas problema, al producirse la interacción de ciertos compuestos en la superficie.

Unos de los dispositivos que están en estudio con los que se están obteniendo buenos resultados para mejorar estas limitaciones, son los aptasensores en combinación con nanopartículas. Tienen alta especificidad, además de las ventajas de mayor estabilidad, menor coste y mayor facilidad de producción que los inmunosensores, al no requerir animales para su fabricación (Aquino y Corte, 2020; Nehra col., 2019)

De igual modo que los inmunosensores, los aptasensores permiten su combinación con superficies metálicas como el oro o nanopartículas y son aplicados para detectar alérgenos mediante SPR consiguiendo mejoras en la interacción con la proteína (Ashley, col., 2018). Debido al buen funcionamiento de los aptasensores, estos dispositivos siguen en estudio para poder ser utilizados a nivel comercial y poder obtenerse kits para su aplicación.

Por lo tanto, se están realizando muchos avances en estos dispositivos para el análisis de alérgenos alimentarios, y se siguen estudiando para superar las limitaciones que se exponen, consiguiendo mejorar la resolución de la detección, la amplificación de la señal, la transducción y la relación señal/ruido (Gómez-Arribas col., 2018). Es una técnica que presenta una amplia

progresión de desarrollo, con buenos resultados para implantarse como método de rutina en el sector agroalimentario.

ANÁLISIS DE MÉTODOS DIRECTOS NO INMUNOLÓGICOS

En el caso de los métodos no inmunológicos, la técnica que cada vez está teniendo mayor interés en su utilización para la detección de alérgenos alimentarios es la LC-MS/MS. La combinación de la espectrometría de masas junto con la cromatografía líquida es el método más eficaz empleado en la detección y cuantificación de alérgenos alimentarios en muestras complejas. Inicialmente los espectrómetros de masas tenían problemas en la detección de proteínas de gran tamaño, sin embargo con la sofisticación de los instrumentos y los avances tecnológicos, los espectrómetros son cada vez más potentes para el análisis cualitativo y cuantitativo de alérgenos alimentarios presentes en pequeñas cantidades en las muestras (Monaci col., 2018).

Muchos autores han utilizado esta técnica concluyendo con resultados muy buenos respecto a la detección de proteínas alergénicas, obteniendo alta resolución en muestras complejas. Mediante la espectrometría de masas se consigue como resultado, información sobre la estructura química y funcionalidad de alérgenos presentes en muestras alimentarias, así como el poder cuantificarlos.

Es una técnica que ofrece buenos resultados por su capacidad para detectar sustancias en bajos niveles en muestras sencillas y complejas, además, tiene la ventaja de poder analizar simultáneamente gran cantidad de péptidos del mismo alérgeno en un único análisis de la muestra, por lo que se consigue una técnica adecuada en la detección de alérgenos alimentarios en niveles traza (Korte y Brockmeyer, 2017; Pirolli, 2017; Stella col., 2020).

Este método presenta gran sensibilidad, especificidad y fiabilidad respecto a las técnicas inmunológicas y PCR, debido a que se reduce la posibilidad de falsos positivos y negativos,

La espectrometría de masas es capaz de solventar los problemas presentes en las técnicas inmunológicas, es capaz detectar alérgenos alimentarios en muestras que han sufrido altos tratamientos térmicos y en consecuencia se han modificado la estructura de las proteínas (Korte y Brockmeyer 2017).

Estas ventajas permiten superar las limitaciones de esta técnica, que siguen siendo la necesidad de personal con conocimientos suficientes para manejar los equipos, el coste de éstos y la preparación laboriosa de las muestras (Monaci col., 2018; Stella col., 2020).

ANÁLISIS DE MÉTODOS INDIRECTOS

A diferencia de los métodos directos, los métodos indirectos detectan el ADN codificante de las proteínas alergénicas en lugar de la proteína. El principal método indirecto utilizado en la

detección de alérgenos es la PCR. La PCR es una técnica que presenta alta especificidad debido al uso de cebadores y sondas específicas frente a la secuencia de ADN codificante del alérgeno, y alta sensibilidad permitiendo detectar concentraciones a nivel trazas, además de conseguir detectar varios alérgenos distintos en el mismo análisis (Torricelli col., 2020).

La PCR en tiempo real se emplea como técnica complementaria del ELISA, puesto que presenta mayor estabilidad el ADN durante el procesado de los alimentos que las proteínas, y por su especificidad se consigue evitar las reacciones cruzadas y los falsos positivos. Aunque tiene ventajas, también se ve limitada en alimentos muy procesados, sometidos durante mucho tiempo, a elevadas temperaturas de cocción, fermentación, esterilización, pudiendo degradar el ADN y en consecuencia detectar menor cantidad de alérgeno (Monaci col., 2018). Sin embargo, es una técnica más lenta y requiere cierta especialización en su empleo, además de la sofisticación del equipo, la convierte finalmente en una técnica bastante cara. De la misma manera que en otros métodos como el ELISA, puede haber interferencias de la matriz originadas por otros componentes presentes en ella, como hidratos de carbono y grasas que afectan en la extracción del ADN de la muestra y por lo tanto también a la amplificación y cuantificación por PCR (Villa col., 2018; Villa col., 2019).

Por estos motivos, el tiempo de análisis, el coste del equipo y los reactivos utilizados como cebadores específicos, las afectaciones por la matriz y los tratamientos térmicos, no es considerado como un método recomendable para los análisis de rutina en productos que contienen bajas cantidades del ADN de la proteína alergénica, ni que se hayan visto sometidos a altos tratamientos térmicos durante su procesado.

ANÁLISIS DEL ETIQUETADO COMERCIAL

Debido a la importancia del etiquetado para las personas alérgicas, en este trabajo se revisaron estudios en los que aplicaban los métodos analíticos descritos anteriormente, en la verificación de la información declarada en el etiquetado sobre muestras comerciales. Según las normativas actuales, la declaración del etiquetado de precaución de alérgenos no es obligatoria, sino que su aplicación es voluntaria. Sin embargo, es recomendable, puesto que existe la posibilidad de que durante la cadena de producción de los alimentos puede haberse producido contaminaciones cruzadas, que en bajas cantidades pueden afectar a la salud de las personas alérgicas, siendo esta información el único mecanismo para evitar el consumo de estos alérgenos.

Algunos estudios han demostrado el uso incorrecto del etiquetado precautorio de alérgenos, al incluir la declaración en el etiquetado pero no ser detectado el alérgeno en el producto (Stella col., 2020; Villa col., 2018; Villa col., 2019)

Aunque algunos estudios detectaron todos los alérgenos incluidos en los etiquetados comerciales (Eischeid y Stadig, 2018; Nguyen col., 2019; Torricelli col., 2020), otros autores detectaron

alérgenos en muestras que no los declaraban en los ingredientes del producto, ni aparecían como elemento precautorio (Qi col., 2019). Siendo esta ausencia de información, un grave problema para los consumidores alérgicos, dado que la ingesta de estos alimentos que contienen alérgenos no declarados, podrían poner en riesgo la salud de las personas susceptibles.

Por otra parte, también se ha observado que el etiquetado precautorio se utiliza comúnmente en los productos comerciales, sin embargo, numerosos estudios han demostrado la ausencia de alérgenos en la mayoría de alimentos que contienen en el etiquetado el aviso de precaución de poder contener esos alérgenos. Se han realizado por varios métodos estas confirmaciones, ELISA (Nguyen col., 2019) PCR (Villa col., 2018; Villa col., 2019) y espectrometría de masas (Qui col.,2019; Stella col., 2020).

Con estos estudios, se puede confirmar el uso excesivo del etiquetado preventivo de alérgenos por las industrias alimentarias, y en consecuencia acaba perjudicando a los individuos con alergia alimentarias, puesto que conlleva a la reducción de la variedad de alimentos que pueden consumir las personas alérgicas, cuando realmente podrían tener la seguridad de adquirir más productos libres de alérgenos si se aplicaran métodos validados fiables, sensibles y específicos para estas proteínas alergénicas.

6. CONCLUSIONES

- Las alergias alimentarias siguen siendo un problema de salud pública, por lo que es necesario el cumplimiento de las normativas alimentarias respecto al etiquetado y la declaración de alérgenos como ingredientes y alérgenos ocultos, para garantizar la seguridad alimentaria de las personas alérgicas.
- Las principales técnicas utilizadas en los análisis de rutina son los métodos inmunológicos como el ELISA, por la alta especificidad, rapidez y fácil manejo. Sin embargo, presenta inconvenientes por los posibles efectos producidos por los componentes de la matriz que pueden alterar las proteínas, así como el efecto del procesado de los alimentos en la conformación de las proteínas.
- Los métodos indirectos como la PCR presentan mayor estabilidad al analizar el ADN, aunque también se ven afectados por los tratamientos térmicos altos y además son métodos que detectan la secuencia codificante de la proteína alérgica pero no implica la presencia de ésta en la muestra.
- Las técnicas no inmunológicas como la espectrometría de masas y la cromatografía líquida son técnicas que ofrecen muy buenos resultados en la caracterización de la estructura de las proteínas alérgicas, además, salvan las limitaciones de las técnicas inmunológicas ya que tienen mayor sensibilidad y permiten la detección simultánea de múltiples alérgenos, sin embargo, siguen siendo técnicas costosas y requieren de requisitos específicos como una alta cualificación para su manejo y no están generalizados para el empleo en industrias alimentarias, quedando reservadas a los estudios de investigación.
- Existen técnicas emergentes como los biosensores que presentan las ventajas de las técnicas inmunológicas, como la especificidad y sensibilidad, y se están estudiando como alternativas a las técnicas actuales de rutina por su bajo coste, fácil uso y la posibilidad de transportarlos. Sin embargo, se necesitan estudios futuros para depurar la técnica, ya que presentan inconvenientes respecto a la posibilidad de reacciones cruzadas y la controversia de su producción. Se están sustituyendo por aptasensores por sus ventajas y la posibilidad de evitar los problemas de los inmunosensores. Las perspectivas futuras de estos dispositivos son buenas por los resultados que se han ido obteniendo, pero hay que seguir mejorando las técnicas; no obstante, los biosensores siguen siendo un método que actualmente no puede superar a la espectrometría de masas respecto a la determinación e identificación inequívoca de proteínas y péptidos.

7. BIBLIOGRAFÍA

Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) a. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición sobre Alergias Alimentarias. *Revista del Comité Científico de la AESAN*. Esp. **2007**, 5, 19-76.

Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) b. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición sobre Alergias Alimentarias. *Revista del Comité Científico de la AESAN*. Esp. **2011**, 13, 37-58

Alves, T.O.; D'Almeida, C.T.S.; Scherf, K.A.; Ferreira, M.S.L.; Modern Approaches in the Identification and Quantification of Immunogenic Peptides in Cereals by LC-MS/MS. *Front. Plant. Sci.* **2019**,10,1470.

Aquino, A.; Conte-Junior, C.A. A Systematic Review of Food Allergy: Nanobiosensor and Food Allergen Detection. *Biosensors*. **2020**,10,194.

Ashley, J.; D'Aurelio, R.; Piekarska, M.; Temblay, J.; Pleasants, M.; Trinh, L.; Rodgers, T.L.; Tothill, I.E. Development of a β -Lactoglobulin Sensor Based on SPR for Milk Allergens Detection. *Biosensors* **2018**, 8, 32.

Boyce, J.A.; Assa'ad, A.; Burks, A.W.; Jones, S.M.; Sampson, H.A.; Wood, R.A.; Plaut, M.; Cooper, S.F.;Fenton, M.J.; Arshad, S.H.; Bahna, S.L.; Beck, L. A.; Byrd-Bredbenner, C.; Camargo, C. A.; Eichenfield, L.; Furuta G. T.; Hanifin J. M.; Jones C.; Kraft M.; Levy B.D.; Lieberman, P.; Luccioli, S.; McCall, K. M.; Schneider, L.C.; Simon, R. A.; Simons F.E.R.; Teach S.J., Yawn B.P; Schwaninger J.M., Guidelines for the Diagnosis and Management of Food Allergy in the United States: Report of the NIAID-Sponsored Expert Panel. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2010**, 126, S1–S58.

Sanchiz, A.; Ballesteros, I.; López-García, A.; Ramírez, A.; Rueda, J.; Cuadrado, C.; Linacero de la Fuente, R. Chestnut allergen detection in complex food products: Development and validation of a real-time PCR method. *LWT - Food Sci. Technol.* **2020**, 123, 1-17.

Cellerino, K.; Binaghi, M. J.; Cagnasso, C. E.; Docena, G.; López, L. B. Comparison of SDS-PAGE and immunochemical methods for the detection of soy proteins in raw and cooked meat products. *Rev. Chil. Nutr.* [online]. **2012**, 39, artículo 3; 52-57 [visitado 25 de enero de 2021]

Chinnappan, R.; Rahamn,A.A.; AlZabn, R.; Kamath, S.; Lopata, A.L.; Khalid M.; Abu-Salah, K.M.; Zourob, M. Aptameric biosensor for the sensitive detection of major shrimp allergen, tropomyosin. *Food Chem.* **2020**, 314,126133

Croote, D.; Quake, S. R. Food allergen detection by mass spectrometry: the role of systems biology. *NPJ Syst. Biol. Appl.* **2016**, 2, 16022.

Echeverría, L.A. *Novedades en diagnóstico y prevención de la alergia alimentaria*. En: AEPap (ed.). Congreso de Actualización Pediatría. Lúa Ediciones 3.0. Madrid, **2019**; pp. 233-247

Eischeid, A. C.; Stadig, S. R. A group-specific, quantitative real-time PCR assay for detection of crab, a crustacean shellfish allergen, in complex food matrices. *Food Chem.* **2018**, 244, 224-231.

Faisal, M.; Vasiljevic, T.; Donkor, O. N. A review on methodologies for extraction, identification and quantification of allergenic proteins in prawns. *Food Res. Int.* **2019**,121, 307-318.

Food Allergies, **2021** [(consultado el 05 de febrero de 2021 y 01 de mayo de 2021)]; Disponible en línea: <https://www.fda.gov/food/food-labeling-nutrition/food-allergies>

Galan-Malo, P.; Pellicer, S.; Pérez, M. D.; Sánchez, L.; Razquin, P., Mata, L. Development of a novel duplex lateral flow test for simultaneous detection of casein and β -lactoglobulin in food. *Food Chem.* **2019**, 293, 41-48

Gavage, M.; Van Vlierberghe, K.; Van Poucke, C.; De Loose, M.; Gevaert, K.; Dieu, M.; Renard, P.; Arnould, T.; Gillard, N. High-resolution mass spectrometry-based selection of peanut peptide biomarkers considering food processing and market type variation. *Food Chem.* **2020**, 304, 125428.

Gavini, K.; Parameshwaran, K. Western Blot. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. **2020**

- Gluten and Food Labeling, 2018 [(consultado el 22 de enero de 2021)]; Disponible en línea: <https://www.fda.gov/food/nutrition-education-resources-materials/el-gluten-y-el-etiquetado-de-los-alimentos>.
- Gómez-Arribas, L. N.; Benito-Peña, E.; Hurtado-Sánchez, M.; Moreno-Bondi, M. C. Biosensing Based on Nanoparticles for Food Allergens Detection. *Sensors*. **2018**, 18, 1087.
- Ho, M.H.; Wong, W.H.; Chang, C. Clinical spectrum of food allergies: a comprehensive review, *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **2014**, 46, 225-240.
- Jędrusek-Golińska, A.; Piasecka-Kwiatkowska, D.; Zielińska, P.; Zielińska-Dawidziak, M.; Szymandera-Buszka, K.; Heś M. Soy Preparations Are Potentially Dangerous Factors in the Course of a Food Allergy. *Foods*. **2019**, 8, 655.
- Johansson, S. G. O. The discovery of immunoglobuline and its role in allergy. *Chem. Immunol. Allergy*. **2014**, 100, 150-154.
- Kirsch, S.; Fourdrilis, S.; Dobson, R.; Scippo, M. L.; Maghuin-Rogister, G.; De Pauw, E. Quantitative methods for food allergens: a review. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, 395, 57–67.
- Ley de etiquetado de alérgenos alimentarios y protección al consumidor de 2004 (FALCPA) [(consultado el 30 de enero de 2021)]; Disponible en línea: <https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/Allergens/ucm106187.htm>.
- Lorenz, A.R.; Scheurer, S.; Vieths, S. Food allergens: molecular and immunological aspects, allergen databases and cross-reactivity. *Chem. Immunol. Allergy*. **2015**, 101, 18-29.
- López, M. T. R.; Grajales, P. J. P.; Guarín, C. J. M. Inmunología. Una ciencia activa 2.a edición. Editorial: Universidad de Antioquia, 2009.
- Madrid, R.; García-García, A.; Cabrera, P.; González, I.; Martín, R.; García, T. Survey of Commercial Food Products for Detection of Walnut (*Juglans regia*) by Two ELISA Methods and Real Time PCR. *Foods*. **2021**, 10, 440.
- Marzano, V.; Tilocca, B.; Fiocchi, A.G.; Vernocchi, P.; Levi Mortera, S.; Urbani, A; Roncada, P.; Putignani, L. Perusal of food allergens analysis by mass spectrometry-based proteomics. *J Proteomics*. **2020**. 215, 103636.
- Mattarozzi, M.; Careri, M. The role of incurred materials in method development and validation to account for food processing effects in food allergen analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **2019**, 411, 4465-4480
- Metcalf A.D; Sampson H.A.; Simon R.A.; Lack G. Alergias alimentarias. Reacciones adversas a alimentos y aditivos alimentarios 5.a edición. Editorial: Elsevier 2015.
- Monaci, L.; Visconti, A. Mass spectrometry-based proteomics methods for analysis of food allergens. *TrAC, Trends. Anal. Chem.* **2009**, 28, 581-59
- Monaci, L.; De Angelis, E.; Montemurro, N.; Pilolli, R. Comprehensive overview and recent advances in proteomics MS based methods for food allergens analysis. *TrAC, Trends. Anal. Chem.* **2018**, 106, 21-36.
- Monaci, L.; Visconti, A.; Immunochemical and DNA-based methods in food allergen analysis and quality assurance perspectives, *Trends Food Sci. Technol.* **2010**, 21, 272-283.
- Monaci L.;Tregoat V.; van Hengel, A.V.; Anklam E. Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review. *Eur. Food Res. Technol.* **2006**, 223, 149-179
- Nehra, M.; Lettieri, M.; Dilbaghi, N.; Kumar, S.; Marrazza, G. Nano-Biosensing Platforms for Detection of Cow's Milk Allergens: An Overview. *Sensors*. **2019**. 20, 32.
- New, L. S.; Schreiber, A.; Stahl-Zeng, J.; Liu, H.-F. Simultaneous Analysis of Multiple Allergens in Food Products by LC-MS/MS. *J. AOAC Int.* **2018**, 101,132–145.
- Nguyen, A. V.; Williams, K. M.; Ferguson, M.; Lee, D.; Sharma, G. M.; Do, A. B.; Khuda, S. E. Enhanced

- quantitation of egg allergen in foods using incurred standards and antibodies against processed egg in a model ELISA. *Anal. Chim. Acta.* **2019**, 1081, 157-167
- Pandey, A. K.; Varshney, R. K.; Sudini, H. K.; Pandey, M. K. An Improved Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Based Protocol Using Seeds for Detection of Five Major Peanut Allergens Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 6, and Ara h 8. *Front Nutr.* **2019**, 6, 68.
- Pilolli, R.; Van Poucke, C.; De Angelis, E.; Nitride, C.; de Loose, M.; Gillard, N.; Huet, A. C.; Tranquet, O.; Larré, C.; Adel-Patient, K.; Bernard, H.; Mills, E.; Monaci, L.. Discovery based high resolution MS/MS analysis for selection of allergen markers in chocolate and broth powder matrices. *Food Chem.* **2021**, 343, 128533.
- Qi, K.; Liu, T.; Yang, Y.; Zhang, J.; Yin, J.; Ding, X.; Qin, W.; Yang, Y. A rapid immobilized trypsin digestion combined with liquid chromatography – Tandem mass spectrometry for the detection of milk allergens in baked food. *Food Control.* **2019**, 102, 179-187.
- Real Decreto 126/2015, de 27 de febrero, por el que se aprueba la norma general que se presenten sin envasar para la venta al consumidor final y a las colectividades, de los envasados en los lugares de venta a petición del comprador, y de los envasados por los titulares del comercio al por menor. <https://www.boe.es/eli/es/rd/2015/02/27/126/con>
- Reglamento (UE) n° 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de octubre de 2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor y por el que se modifican los Reglamentos (CE) n° 1924/2006 y (CE) n° 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, y por el que se derogan la Directiva 87/250/CE de la Comisión, la Directiva 90/496/CE del Consejo, la Directiva 1999/10/CE de la Comisión, la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 2002/67/CE, y 2008/5/CE de la Comisión, y el Reglamento (CE) n° 608/2004 de la Comisión. <http://data.europa.eu/eli/reg/2011/1169/oj>
- Renz, H.; Allen, K. J.; Sicherer, S. H.; Sampson, H. A.; Lack, G.; Beyer, K.; Oettgen, H. C. Food allergy. *Nat. Rev. Dis. Primers*, **2018**, 4, 17098.
- Reyes-Pavón D; Jiménez M.; Salinas E. Fisiopatología de la alergia alimentaria. *Rev. Alerg. Méx.* **2020**, 67, 34-53
- Roberts, G., Grimshaw, K., Beyer, K. K., Boyle, R., Lack, G., Austin, M., Mills, E. N. C. Can dietary strategies in early life prevent childhood food allergy? A report from two iFAAM workshops. *Clin. Exp. Allergy.* **2019**, 49, 1567-1577.
- Korte R.; Brockmeyer, J. Novel mass spectrometry approaches in food proteomics. *Trend. Anal. Chem.* **2017**, 96, 99-106
- Poms, R. E.; Klein, C. L.; Anklam, E. Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Addit. Contam.* **2004**, 21, 1-31
- Sena-Torrallba, A.; Pallás-Tamarit, Y.; Morais S.; Maqueira, Á. Recent advances and challenges in food-borne allergen detection, *TrAC-Trend. Anal. Chem.* **2020**, 132, 116050
- Shaheen, N; Halima, O; Akhter, K.T.; Nuzhat, N.; Rao, R.S.; Wilson, R.S.; Ahsan, N.; Proteomic characterization of low molecular weight allergens and putative allergen proteins in lentil (*Lens culinaris*) cultivars of Bangladesh. *Food Chem.* **2019**, 297, 124936.
- Sicherer, S.H.; Sampson, H.A. Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2014**, 133, 291-307.
- Sicherer, S.H.; Sampson, H.A. Food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2010**, 125, S116-S125.
- Stella, R.; Sette, G.; Moressa, A.; Gallina, A.; Aloisi, A. M.; Angeletti, R.; Biancotto, G. LC-HRMS/MS for the simultaneous determination of four allergens in fish and swine food products. *Food Chem.* **2020**, 331, 127276.
- Török, K.; Hajas L.; Horváth, V.; Schall, E.; Bugyi, Z.; Kemény, S.; Tömösközi, S. Identification of the factors affecting the analytical results of food allergen ELISA methods. *Eur. Food Res. Technol.* **2015**, 241, 127-136.

- Torricelli, M.; Pierboni, E.; Rondini, C.; Altissimi, S.; Haouet, N. Sesame, Pistachio, and Macadamia Nut: Development and Validation of New Allergenic Systems for Fast Real-Time PCR Application. *Foods*. **2020**, *9*, 1085.
- Ueberham, E.; Spiegel, H.; Havenith, H.; Rautenberger, P.; Lidzba, N.; Schillberg, S.; Lehmann, J. Simplified Tracking of a Soy Allergen in Processed Food Using a Monoclonal Antibody-Based Sandwich ELISA Targeting the Soybean 2S Albumin Gly m 8. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 8660-8667.
- Van Vlierberghe, K.; Gavage, M.; Dieu, M.; Renard, P.; Arnould, T.; Gillard, N.; Coudijzer, K.; De Loose, M.; Gevaert, K.; Van Poucke, C. Selection of universal peptide biomarkers for the detection of the allergen hazelnut in food through a comprehensive, high resolution mass spectrometric (HRMS) based approach. *Food Chem.* **2020**, *309*, 125679,
- Villa, C.; Costa, J.; Gondar, C.; Oliveira, M. B. P. P.; Mafra, I. Effect of food matrix and thermal processing on the performance of a normalised quantitative real-time PCR approach for lupine (*Lupinus albus*) detection as a potential allergenic food. *Food Chem.* **2018**, *262*, 251-259.
- Villa, C.; Costa, J.; y Mafra, I. Detection and Quantification of Milk Ingredients as Hidden Allergens in Meat Products by a Novel Specific Real-Time PCR Method. *Biomolecules*. **2019**, *9*, 804.
- Wang, W.; Zhu, X.; Teng, S.; Xu, X.; Zhou, G. Development and Validation of a Surface Plasmon Resonance Biosensor for Specific Detection of Porcine Serum Albumin in Food. *J. AOAC Int.* **2018**, *101*, 1868-1872.
- Yu, W.; Freeland, D.M.H.; Nadeau, K.C.; Food allergy: immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy, *Nat. Rev. Immunol.* **2016**, *16*, 751-765
- Zhou, J.; Qi, Q.; Wang, C.; Qian, Y.; Liu, G.; Wang, Y.; Fu, L. Surface plasmon resonance (SPR) biosensors for food allergen detection in food matrices. *Biosens Bioelectron.* **2019**, *142*, 111449