

BIOPLATAFORMAS ELECTROANALÍTICAS PARA SEGURIDAD ALIMENTARIA. DETECCIÓN DE ALÉRGENOS Y ADULTERACIONES ALIMENTARIAS

Susana Campuzano, Víctor Ruiz-Valdepeñas Montiel, Rebeca
M. Torrente-Rodríguez, A. Julio Reviejo, José M. Pingarrón



Facultad de Ciencias Químicas.

Dpto. Química Analítica

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID



Seguridad Alimentaria



La seguridad alimentaria existe cuando todas las personas tienen, en todo momento, acceso físico, social y económico a alimentos suficientes, inocuos y nutritivos que satisfacen sus necesidades energéticas diarias y preferencias alimentarias para llevar una vida activa y sana.



+ Satisfacer preferencias alimentarias

Fraude alimentario: introducción de alimentos en el mercado con la intención de engañar al consumidor, debido a razones esencialmente económicas

+ Alimentos inocuos

Alergia alimentaria



Afecta al (1-10)% de la población mundial



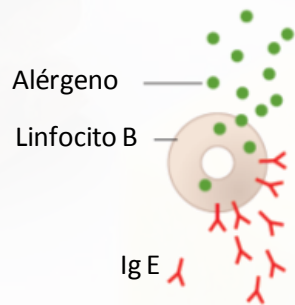
Alergia alimentaria



- ❑ Afecta al (1-10) % de la población mundial
- ❑ Afecta a $\left\{ \begin{array}{l} 15 \text{ millones de adultos (4 \%)} \\ 6 \text{ millones de niños (8 \%)} \end{array} \right.$
- ❑ Responsable de 30,000 causas de emergencias médicas y entre (150-200) muertes al año

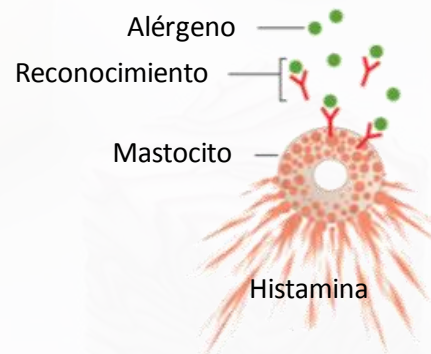
Reacción adversa a un alimento mediada por un mecanismo inmunológico

Sensibilización al alérgeno



Las células B en contacto con el alérgeno producen anticuerpos que se adhieren a los mastocitos

Exposición al alérgeno



Los alérgenos son reconocidos por los anticuerpos de los mastocitos que liberan histamina

Alergia alimentaria



Origen animal

L

Leche

H

Huevo

M

Marisco

Tropomiosina

P

Pescado

Parvoalbúmina

Reacciones sistemáticas,
a veces graves

Origen vegetal

Síntomas locales (picor en la boca)

P

En frutas (melón, cerezas...)

Profilina

Relación alergia a las gramíneas

10

En frutas y frutos secos

PR 10

Relación alergia al polen de abedul

LTP

Melocotón, frutos secos y
vegetales

LTP

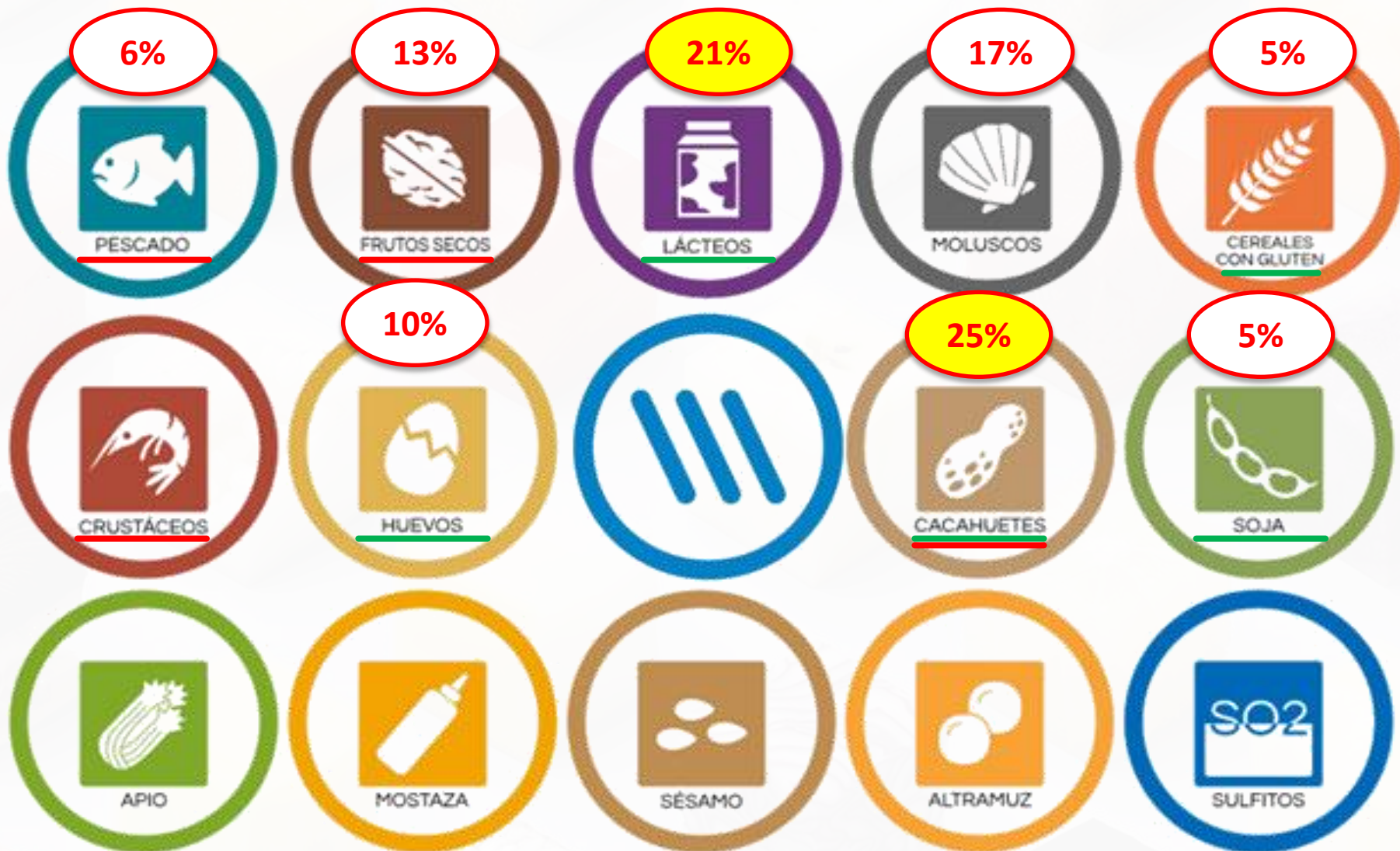
Alergia mediterránea

pR

Frutos secos y legumbres

Proteínas de reserva

Alérgenos alimentarios



Alergias más frecuentes en adultos

Alergias más frecuentes en niños

Alergia alimentaria

Síntomas más comunes

L H P 10 M P LTP pR

Picor bucal

Primeros síntomas de la alergia

L LTP

Urticarias

angioedemas

Locales por contacto
Generales por ingesta

P 10

Digestión del alérgeno
eliminación de los
síntomas

Síntomas digestivos

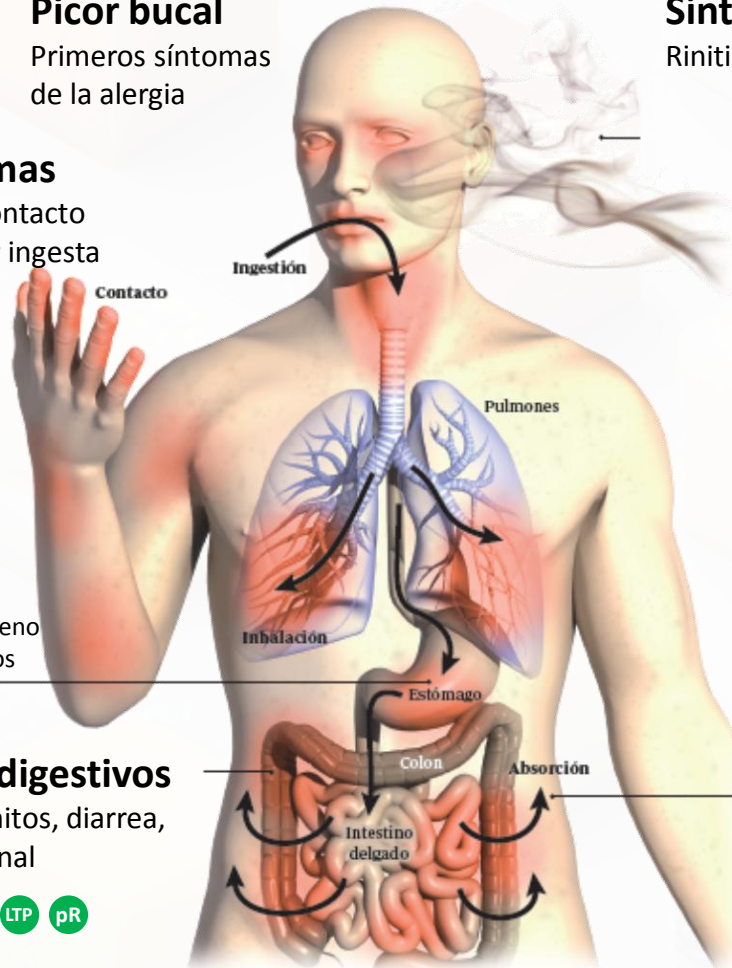
Nauseas, vómitos, diarrea,
dolor abdominal

L H M P LTP pR

L H M P

Síntomas por vapores

Rinitis, conjuntivitis, asma ...

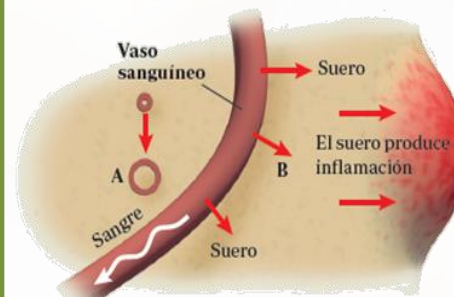
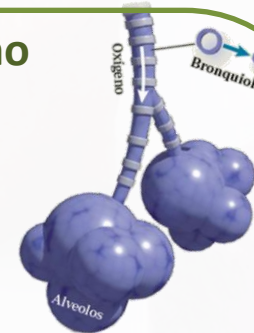


Absorción del alérgeno

L H M P LTP pR

Broncoespasmo

Asma, dificultad para respirar



Inflamación

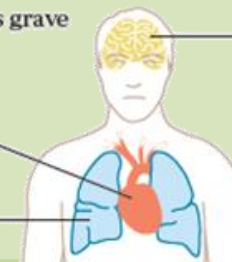
Dilatación de los vasos
sanguíneos
Pérdida de suero
sanguíneo

CHOQUE ANAFILÁCTICO

La reacción más grave

Dificultad para
la circulación
sanguínea

Dificultad
para respirar



Puede provocar
la muerte por
falta de oxígeno.

Alergia alimentaria



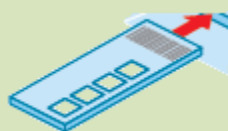
Diagnóstico

➔ **Historial Clínico**
Síntomas y costumbres alimentarias

➔ **Pruebas cutáneas**



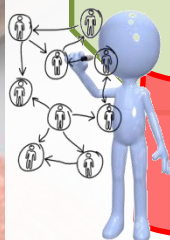
➔ **Microarrays**
Detección de autoanticuerpos en muestra de sangre



➔ **Prueba de provocación**
Ingesta controlada de alérgenos

L H Tolerancia del 80 % a los 3 años

Desarrollo de metodologías de diagnóstico menos invasivas



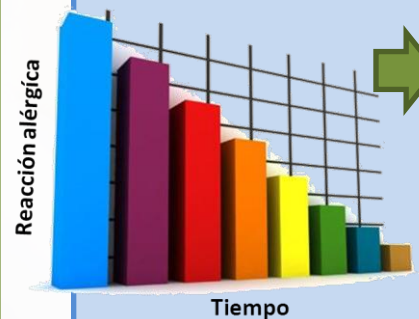
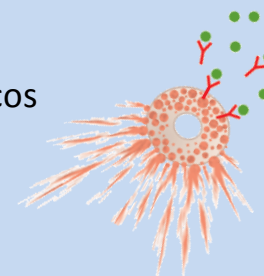
Tratamiento



Eliminación estricta de la dieta

➔ **Una vez ingerido**

- ✗ Antihistamínicos
- ✗ Corticoides
- ✗ Adrenalina



➔ **Desensibilización**

Aumento de la dosis y aumento de la tolerancia al alérgeno

L H

➔ **Tratamiento sintético**

LTP



Detección de alérgenos en alimentos



■ Detección de ADN

- Detecta la presencia de gen característico alérgeno ➔ PCR

■ Detección de proteínas alergénicas

- Detección de la proteína alergénica específica ➔ ELISAs
- Detección del total de proteínas alergénicas

➔ Falsos positivos

➔ Diferencia entre los resultados de distintos kits ELISA

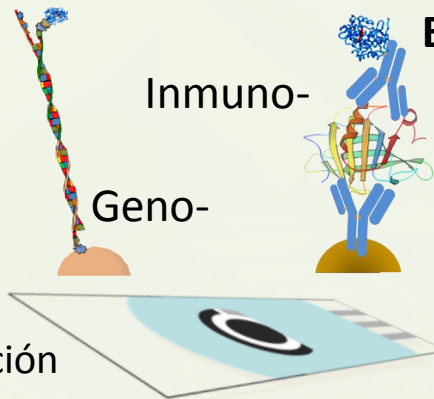
➔ Estándar adecuado para PCR

➔ Difícil aplicación en matrices complejas

Alternativa

Biosensores electroquímicos desechables

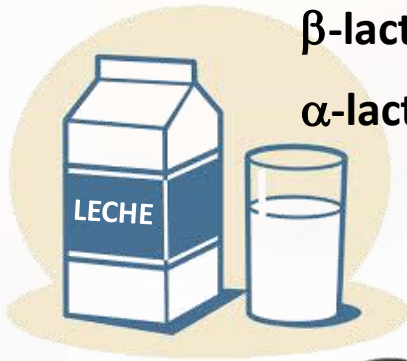
- Determinación rápida y simple
- Elevada sensibilidad y selectividad
- Bajo coste de instrumentación
- Fácil miniaturización y automatización



Empleo de partículas magnéticas

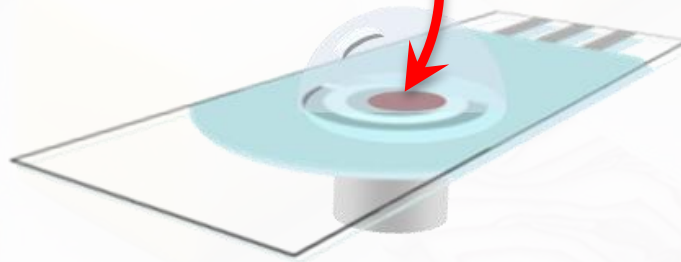
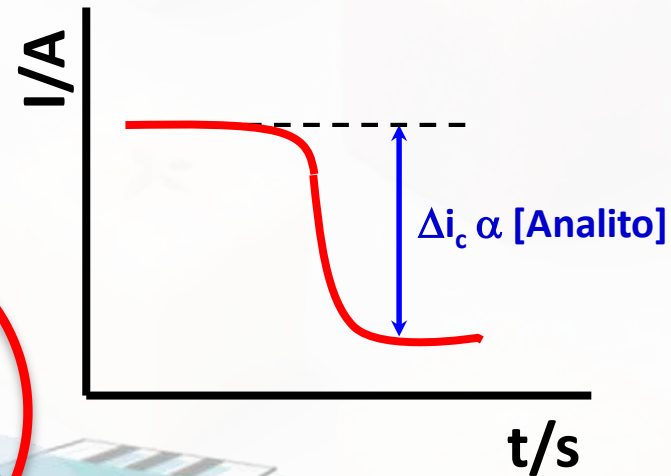
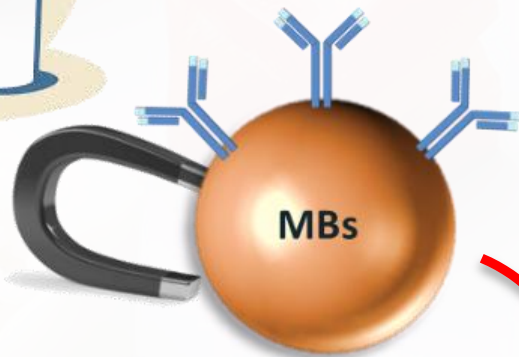
- No se modifica el sustrato
- Sensibilidad mejorada
- Reducción del tiempo de ensayo
- Minimización del efecto matriz

Detección de alérgenos proteicos



β -lactoglobulina (β -LG)

α -lactalbumina (α -LA)



Ara h 1

Ara h 2



Alergia a leche de vaca



Producto universal esencial para el consumo humano



30–35 g proteína L⁻¹
> 25 proteínas diferentes

Proteínas
alergénicas en el
suero

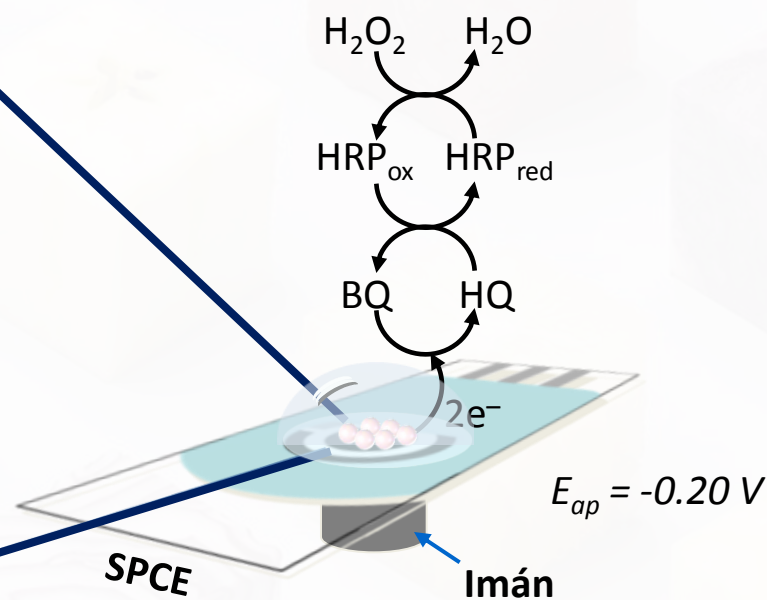
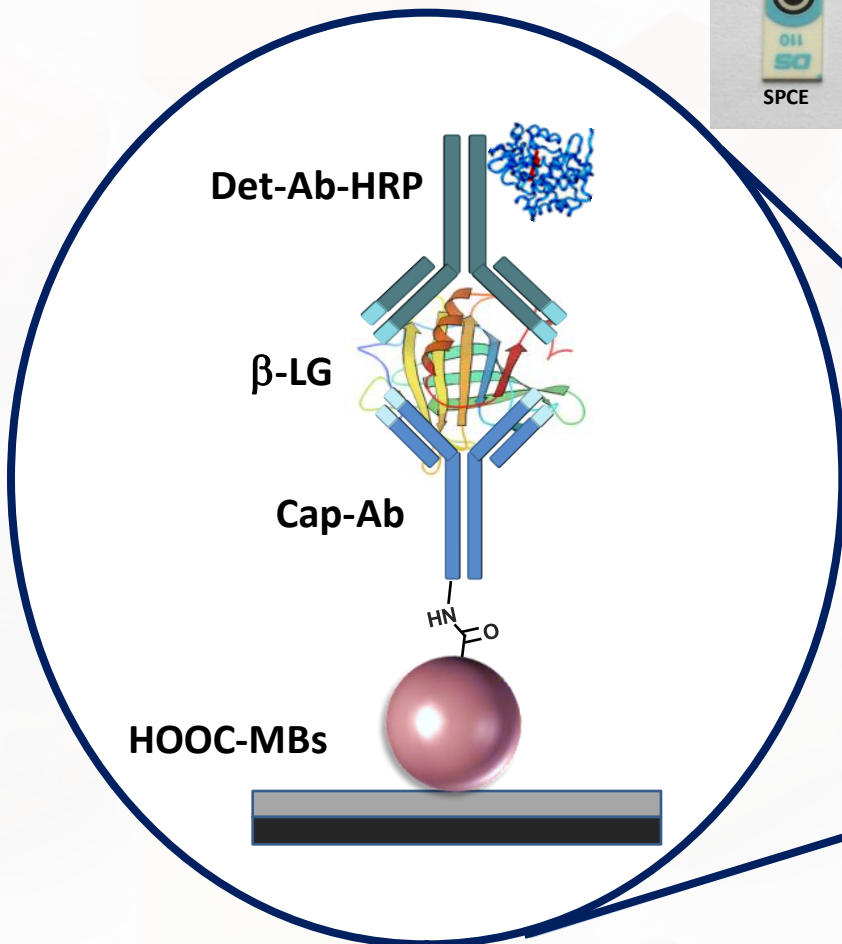
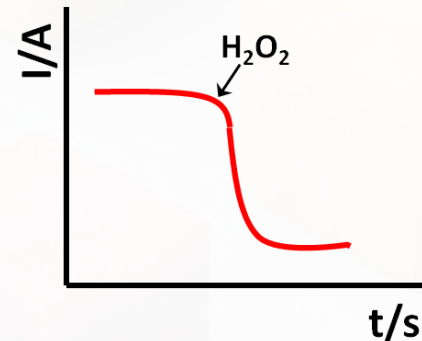
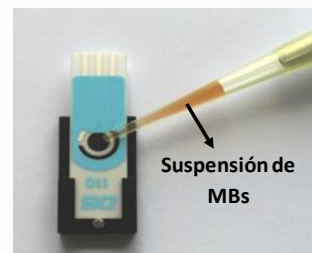
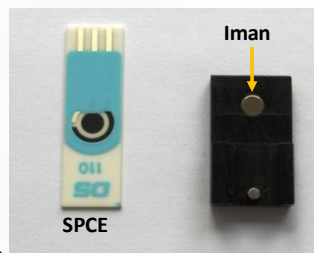
β -lactoglobulina (β -LG, 2–4 g L⁻¹)
 α -lactalbúmina (α -LA, 0.8–1.2 g L⁻¹)

Inmunoglobulinas
BSA
Lactoferrina

Alérgenos más importantes de la fracción del suero: ~10 y 5% de todas las proteínas de la leche

- Afecta al 3% de los bebés y niños pequeños
- El 85% de los niños alérgicos a la leche la supera
- La mayoría de los adultos la adquieren en la edad adulta

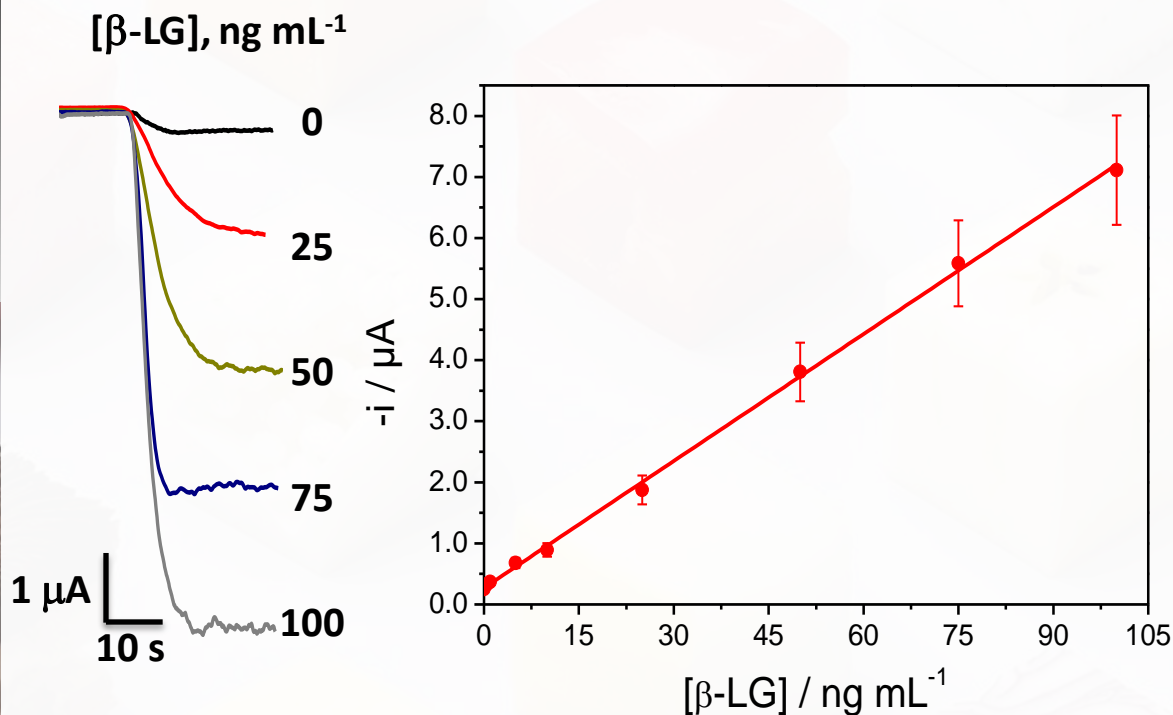
Determinación de β -LG



Talanta 131 (2015) 156–162.

Determinación de β -LG

Características analíticas y operacionales



Parámetro	Valor
r^2	0.999
Pendiente, nA mL ng^{-1}	69 ± 2
O.o., μA	0.27 ± 0.09
I.L., ng mL^{-1}	2.8–100
LOD, ng mL^{-1}	0.8
LOQ, ng mL^{-1}	2.8
$\text{RSD}_{n=10}, \%$	8.4
Estabilidad, días	12

LOD 3.75×10^6 veces inferior al contenido endógeno (3 g L^{-1})!!!

Determinación de β -LG

Análisis de muestras reales



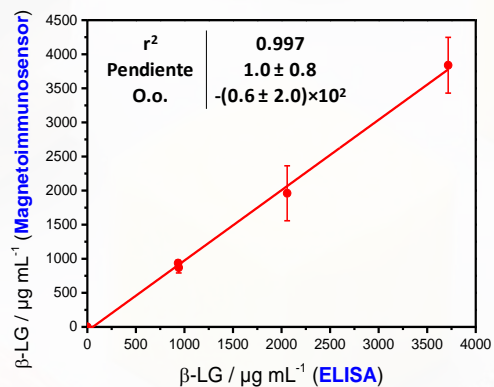
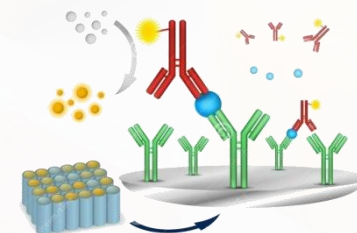
Tiempo de ensayo



60 min



No efecto matriz

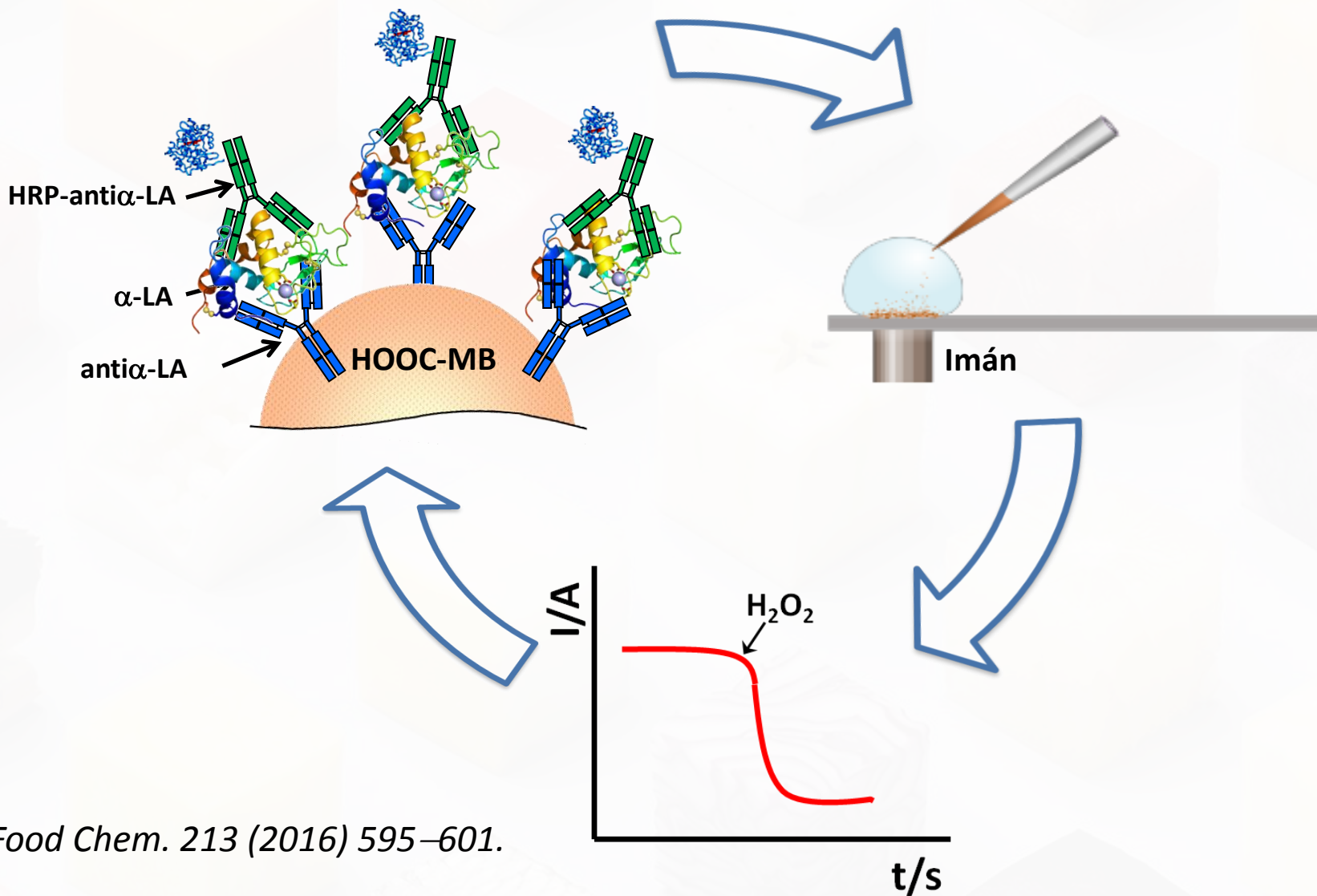


	Factor de dilución	Inmunosensor	ELISA
		[β -LG], $\mu\text{g mL}^{-1}$	[β -LG], $\mu\text{g mL}^{-1}$
Leche entera UHT	50,000	$(8.7 \pm 0.7) \times 10^2$	$(9 \pm 1) \times 10^2$
Leche entera UHT (enriquecida Ca^{2+})	50,000	$(9.3 \pm 0.3) \times 10^2$	$(9.3 \pm 0.8) \times 10^2$
Leche semidesnatada pasteurizada	100,000	$(2.0 \pm 0.3) \times 10^3$	$(2.0 \pm 0.1) \times 10^3$
Leche fresca	250,000	$(3.8 \pm 0.3) \times 10^3$	$(3.7 \pm 0.05) \times 10^3$
Leche humana	2,500	ND	ND

ND: no-detectable

Determinación de α -LA

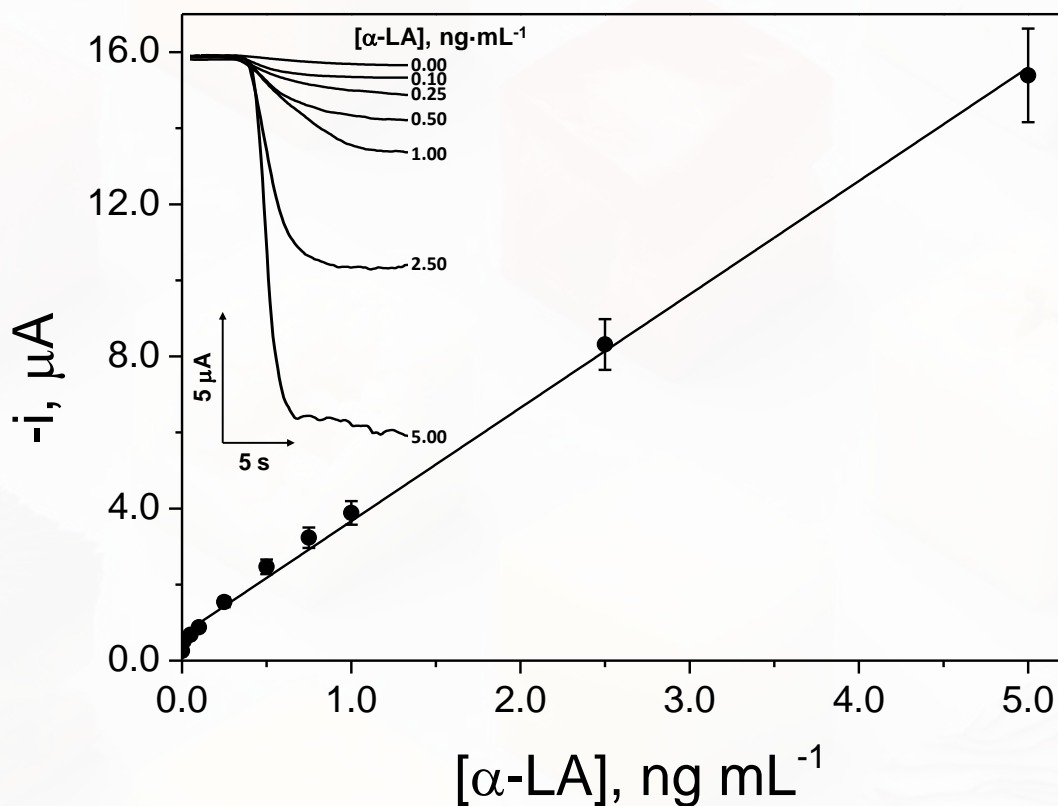
Características analíticas



Food Chem. 213 (2016) 595–601.

Determinación de α -LA

Características analíticas



Parámetro	Valor
r	0.999
Pendiente, $\mu\text{A mL ng}^{-1}$	2.97 ± 0.04
O.o., μA	0.71 ± 0.06
I.L., pg mL^{-1}	37 – 5,000
LOD, pg mL^{-1}	11
LOQ, pg mL^{-1}	37
$\text{RSD}_{n=10}, \%$	8.1–9.7
Estabilidad, días	12

LOD 1.1×10^{10} veces inferior al contenido endógeno (3 g L^{-1})!!!

Determinación de α -LA

Análisis de muestras reales



Muestras de leche	Inmunosensor		ELISA	
	Factor de dilución	$[\alpha\text{-LA}]$, g L ⁻¹	Factor de dilución	$[\alpha\text{-LA}]$, g L ⁻¹
Leche fresca de vaca	2,500,000	(1.1 ± 0.1) RSD _{n=3} = 4.2%	250,000	(1.12 ± 0.03) RSD _{n=3} = 1.0%
Leche de vaca UHT	1,000,000	(0.52 ± 0.07) RSD _{n=3} = 7.0%	100,000	(0.56 ± 0.04) RSD _{n=3} = 3.9%
Leche humana	20,000	(0.55 ± 0.08) × 10 ⁻³ RSD _{n=3} = 8.0%	2,000	(0.6 ± 0.1) × 10 ⁻³ RSD _{n=3} = 9.1%
Fórmula infantil 1	1,000,000	(0.33 ± 0.04) RSD _{n=3} = 6.5 %	100,000	(0.32 ± 0.02) RSD _{n=3} = 3.4 %
Fórmula infantil 2	1,000,000	(0.21 ± 0.01) RSD _{n=3} = 3.0 %	100,000	(0.177 ± 0.007) RSD _{n=3} = 2.1 %
Fórmula infantil hidrolizada 3	1,000	ND	1,000	ND

LOD 279 veces inferior y 8 veces menor tiempo de ensayo que el ELISA comercial!

Alergia alimentaria



El cacahuete está asociado a reacciones alérgicas graves, incluyendo el shock anafiláctico

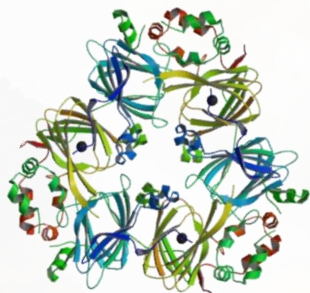


≥ 100 µg

➔ Afecta al 1 % de la población mundial

➔ Persiste en el 80 % de los individuos sensibilizados

➔ Es el responsable del 90 % de las muertes por alergia alimentaria en EEUU



Ara h 1
(12–16%)



Ara h 2
(5.9–9.3%)

Principales proteínas alérgicas

Potencial alergénico y tratamientos

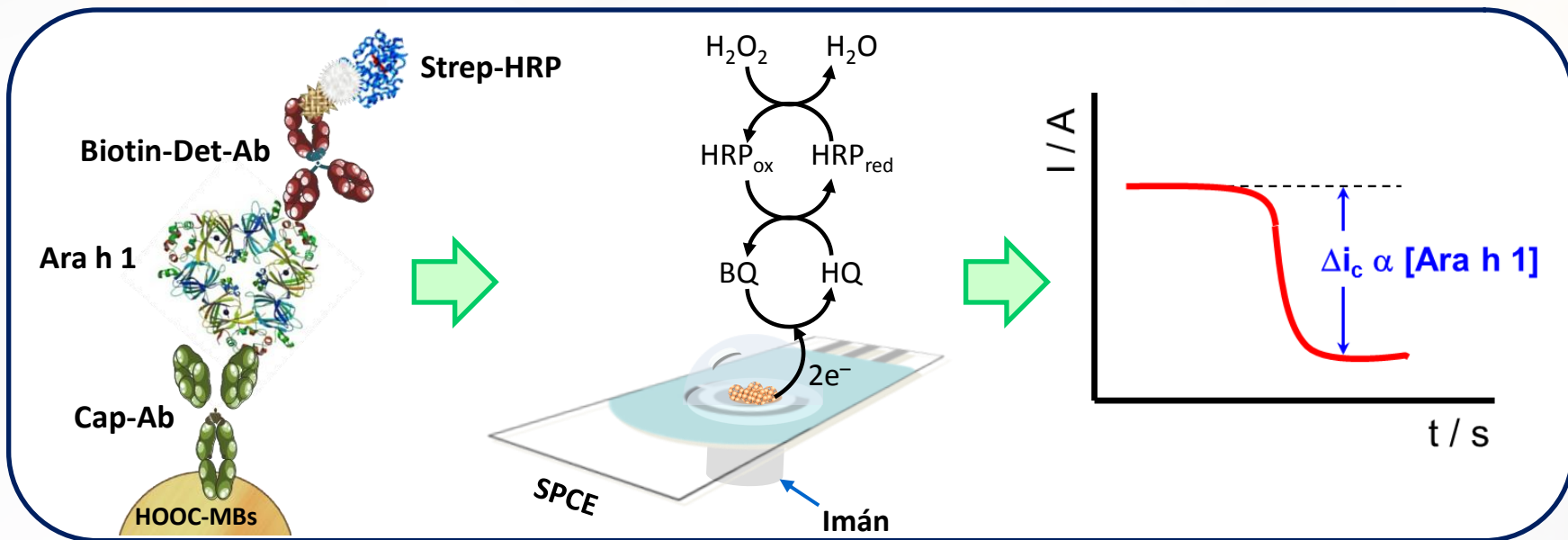
Cacah. Fritos	↑↑ AH1	(15 min, 110 °C)	↓AH2 ↓AH1
(30 min, 2.56 atm)	↓AH2 ↓AH1	Iones férricos	↓↓AH1
Chocolate	↓AH2 ↓↓AH1	Fermentación	↓AH2 ↓AH1
Tratamientos enzimáticos	↓AH2 ↓AH1	Transgénicos	
PUV	↓AH2 ↓AH1	Cacah. Tostado	↓AH2 ↓AH1

Determinación de Ara h 1

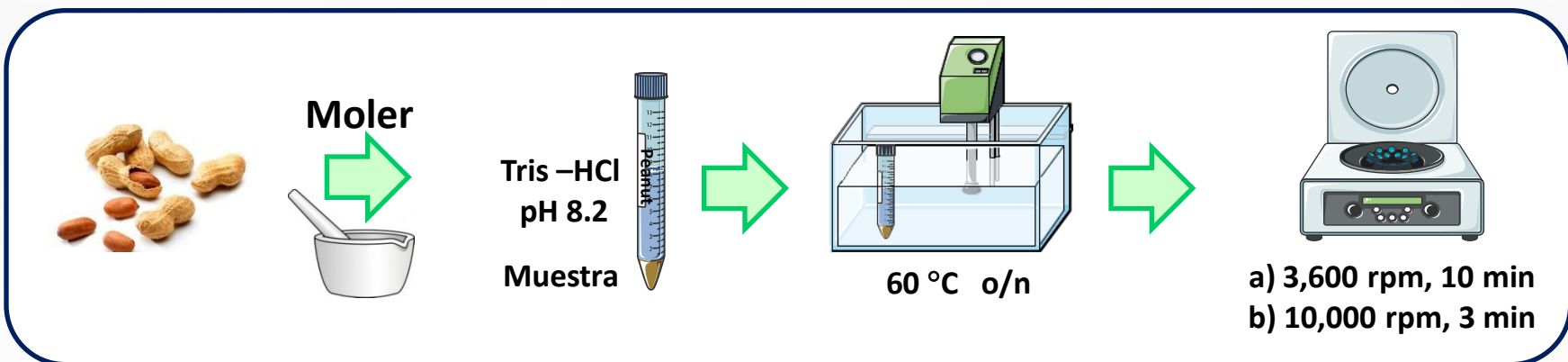
Análisis de muestras reales



-DETERMINACIÓN-

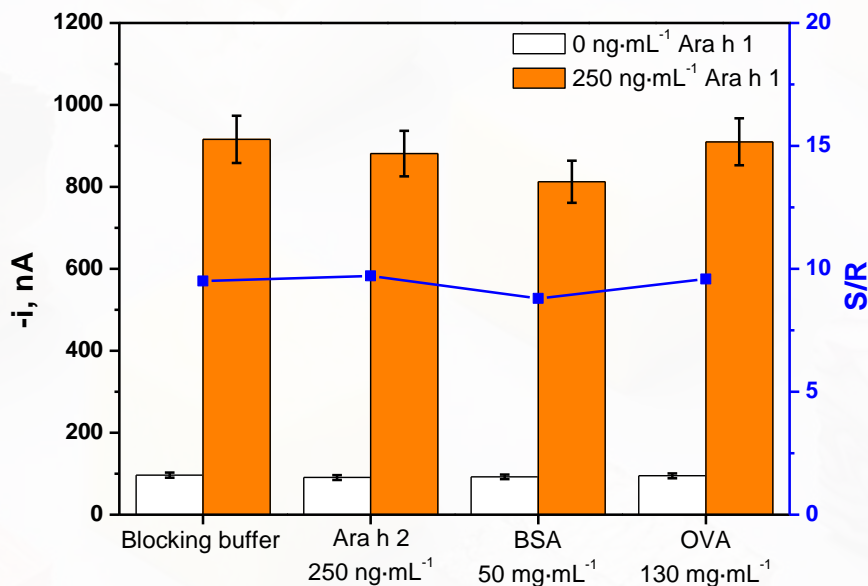
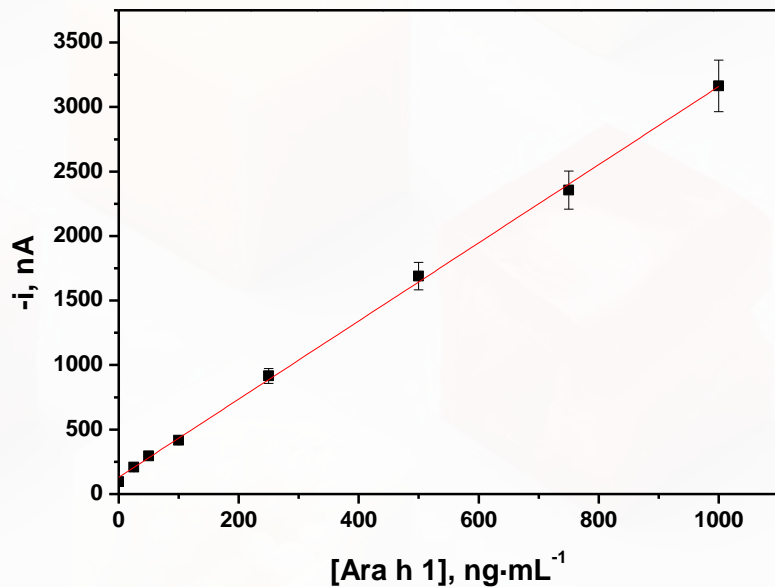


-EXTRACCIÓN-



Determinación de Ara h 1

Características analíticas y operacionales



Parámetro	Valor
r	0.999
Pendiente, nA mL ng ⁻¹	3.03 ± 0.03
O.o., nA	130 ± 13
I.L., ng mL ⁻¹	20.8 – 1,000
LOD, ng mL ⁻¹	6.3
LOQ, ng mL ⁻¹	20.8
RSD _{n=6} , %	6.3
Estabilidad, días	25

Determinación de Ara h 1

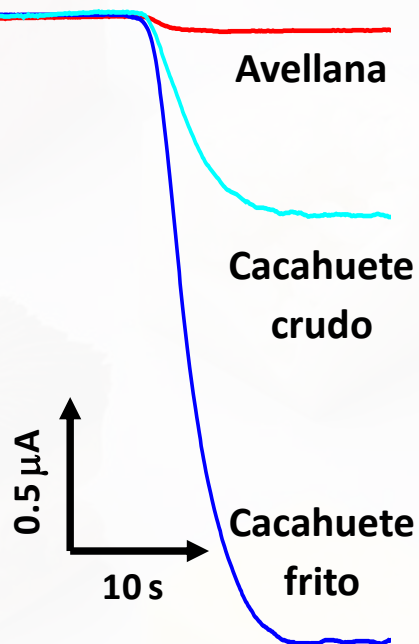
Análisis de muestras reales



-EXTRACTOS ALIMENTARIOS-



No efecto matriz



Extracto	Factor de dilución	Inmunosensor mg g ⁻¹	ELISA mg g ⁻¹
Cacahuetes fritos	1,000	(7.4 ± 1.0) RSD _{n=3} =5.4%	(7.5 ± 1.3) RSD _{n=3} =6.9%
Cacahuetes crudos	1,000	(2.9 ± 0.2) RSD _{n=3} =3.3%	(3.0 ± 0.6) RSD _{n=3} =7.8%
Cacahuetes recubiertos de chocolate	250	(0.026 ± 0.003) RSD _{n=3} =5.1%	(0.028 ± 0.004) RSD _{n=3} =6.1%
Barras de chocolate con cacahuete tostado	250	(0.155 ± 0.001) RSD _{n=3} =0.3%	(0.16 ± 0.03) RSD _{n=3} =7.9%
Crema de cacahuete 1	500	(1.8 ± 0.3) RSD _{n=3} =6.7%	(1.8 ± 0.4) RSD _{n=3} =9.0%
Crema de cacahuete 2	1,000	(4.3 ± 0.6) RSD _{n=3} =5.7%	(4.7 ± 0.5) RSD _{n=3} =3.9%
Aceite de cacahuete	100	ND	ND
Avellanas crudas	100	ND	ND

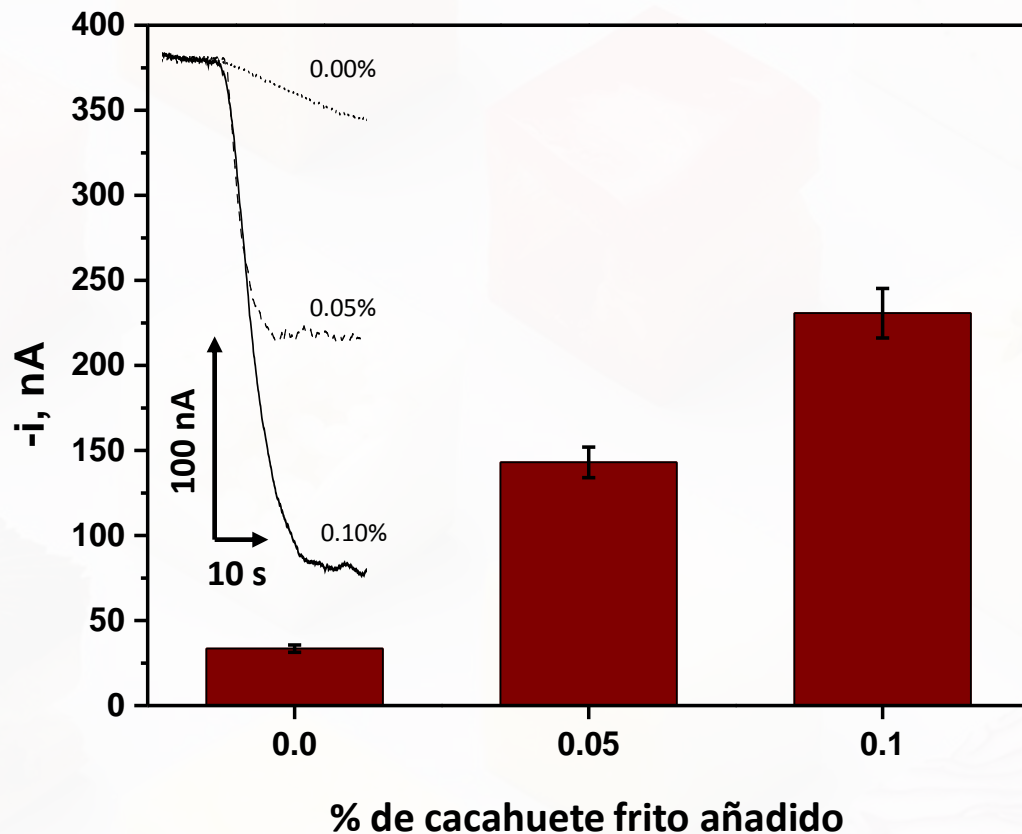
ND: no-detectable

Determinación de Ara h 1

Análisis de muestras reales



-EXTRACTOS DE GALLETA CONTAMINADA-



0.05% (w/w) fácilmente detectable!



0.5 mg cacahuete frito g^{-1} alimento
 $\sim 4 \text{ mg Ara h 1 kg}^{-1}$ alimento

Determinación de Ara h 1

Análisis de muestras reales

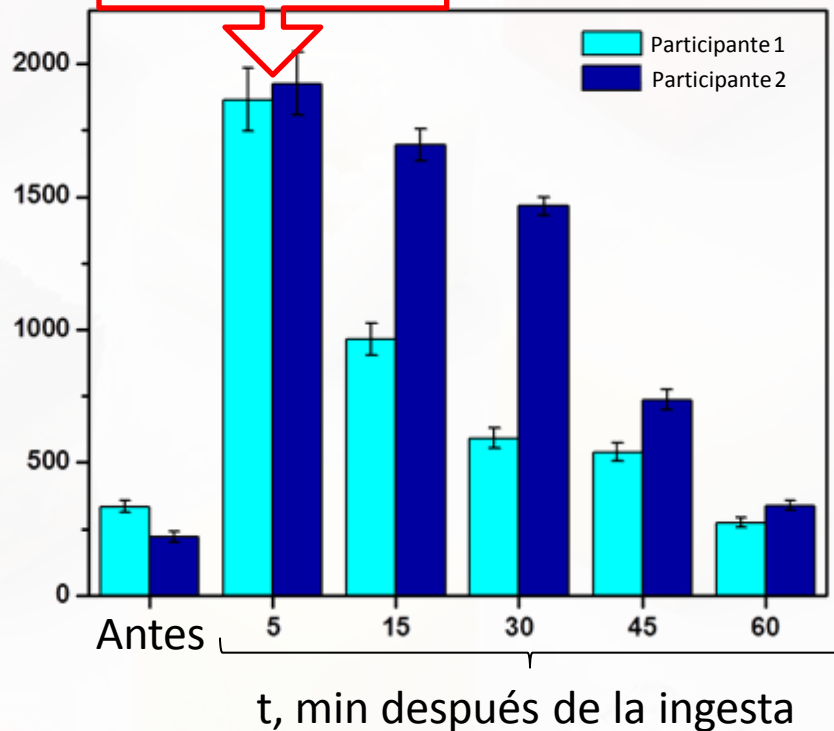


-SALIVA SIN DILUIR-

Antes y después de la ingesta de un sandwich de cacahuete



Ara h 1
713 y 740 ng mL⁻¹



Antes

Después de la ingesta

5 min

60 min

0.5 μ A
10 s

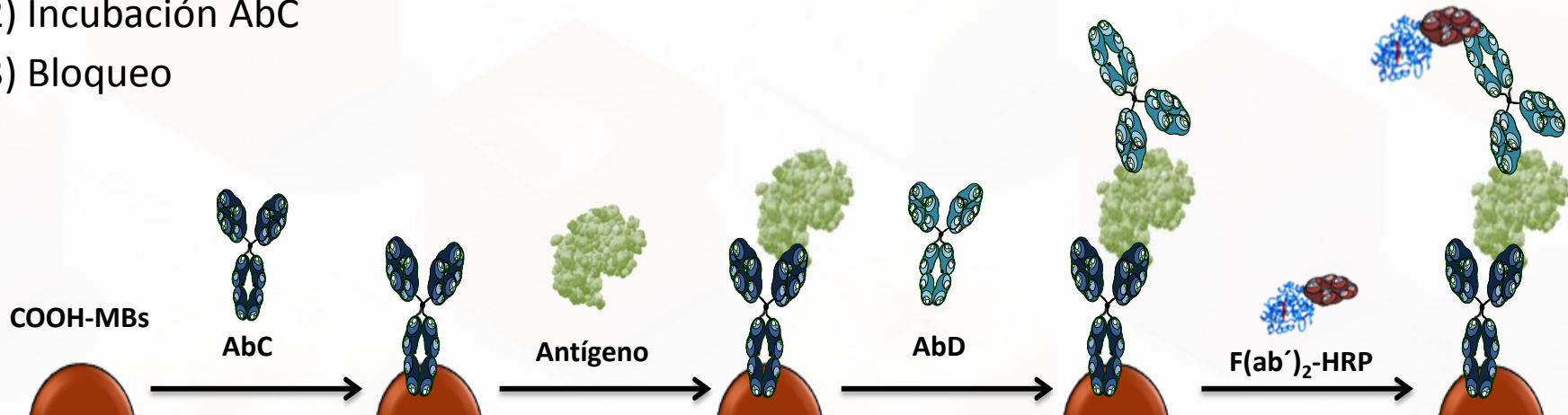


- Análisis directo en muestras de saliva sin diluir!!!

- No hay diferencias significativas entre las curvas de calibrado obtenidas con muestras de saliva de diferentes individuos

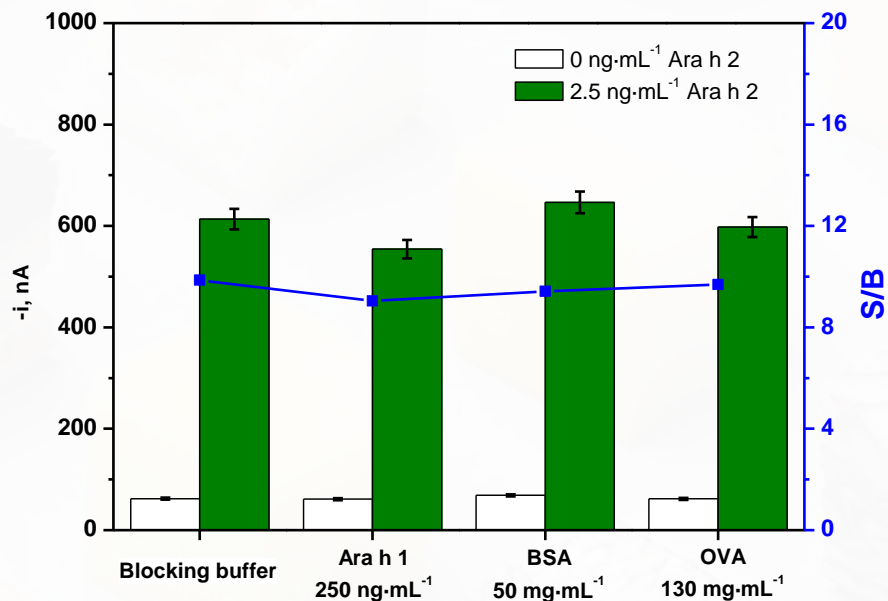
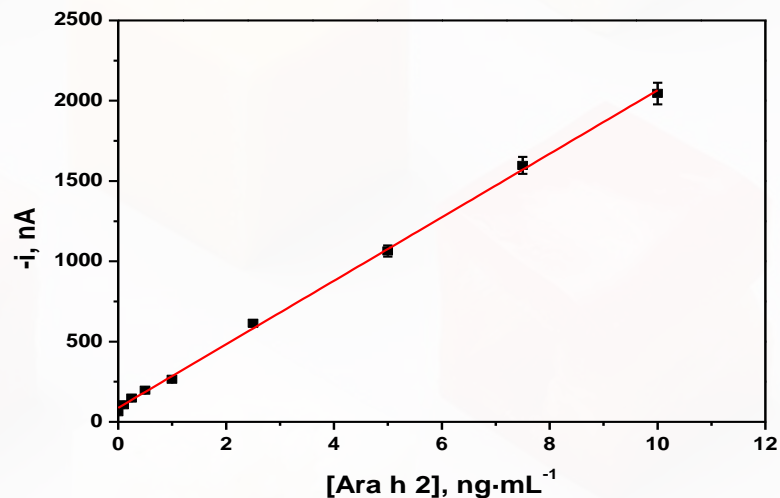
Determinación de Ara h 2

- 1) Activación
- 2) Incubación AbC
- 3) Bloqueo
- 4) Incubación Ara h 2
- 5) Incubación AbD
- 6) Marcaje



Determinación de Ara h 2

Características analíticas



Parámetros

r^2 0.9992

Pendiente, nA mL ng⁻¹ 198 ± 2

O.o., nA 87 ± 8

IL, pg mL⁻¹ 87 – 10,000

LOD, pg mL⁻¹ 26

LOD, pg 0.65

LC, pg mL⁻¹ 87

RSD_{n=10}, % 3.3

Estabilidad, días 50

Determinación de Ara h 2

Características analíticas



Ausencia de efecto matriz



-EXTRACTOS ALIMENTARIOS-

Extracto	Factor de dilución	Inmunosensor mg g ⁻¹	ELISA mg g ⁻¹
Cacahuete frito	1/100,000	(4.3 ± 0.3)	(4.4 ± 0.3)
Cacahuete crudo	1/100,000	(4.3 ± 0.4)	(4.1 ± 0.4)
Cacahuetes recubiertos de chocolate	1/1,000	(0.033 ± 0.005)	(0.034 ± 0.006)
Barras de chocolate con cacahuete tostado	1/10,000	(0.31 ± 0.04)	(0.38 ± 0.03)
Barras multicereales con cacahuete tostado	1/100,000	(3.5 ± 0.6)	(3.4 ± 0.5)
Crema de cacahuete 1	1/100,000	(3.6 ± 0.3)	(3.6 ± 0.8)
Crema de cacahuete 2	1/100,000	(1.3 ± 0.3)	(1.4 ± 0.2)
Aceite de cacahuete	1/1,000	(0.0022 ± 0.0004)	(0.0023 ± 0.0004)
Harina de cacahuete	1/500,000	(10.9 ± 0.7)	(11 ± 1)
Harina de trigo	—	ND	ND
Avellana cruda	—	ND	ND

ND: no-detectable

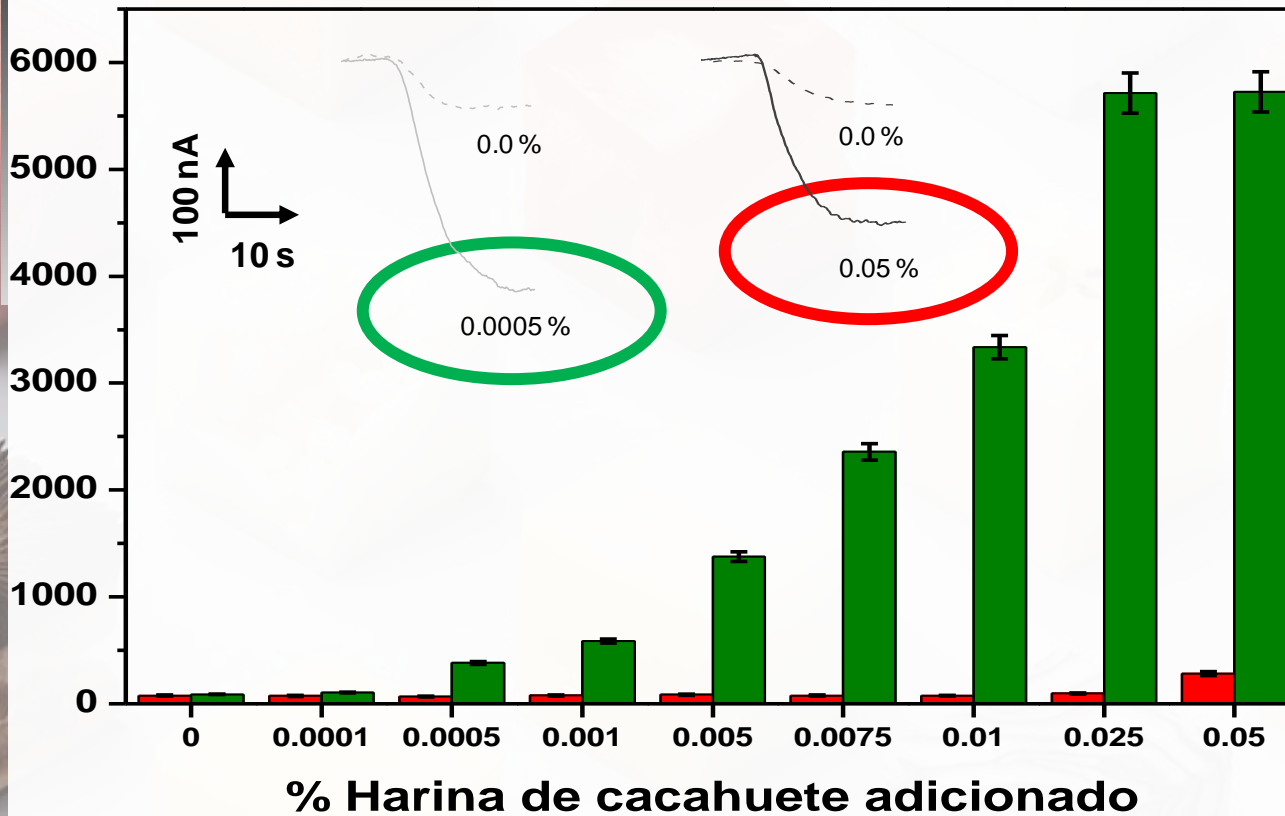
Determinación de Ara h 2

Características analíticas



-HARINA DE TRIGO CONTAMINADA CON HARINA DE CACAHUETE-

Protección del consumidor



Ara h 2

Ara h 1

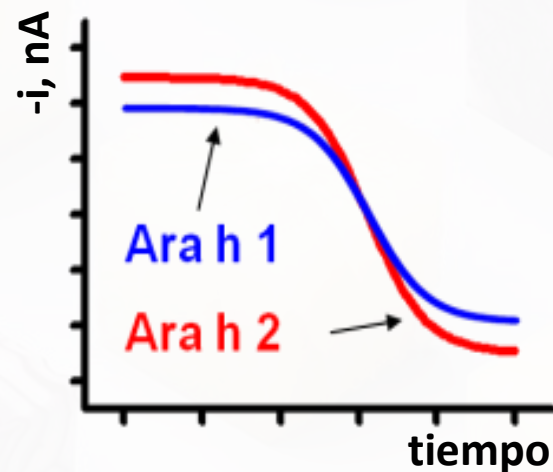
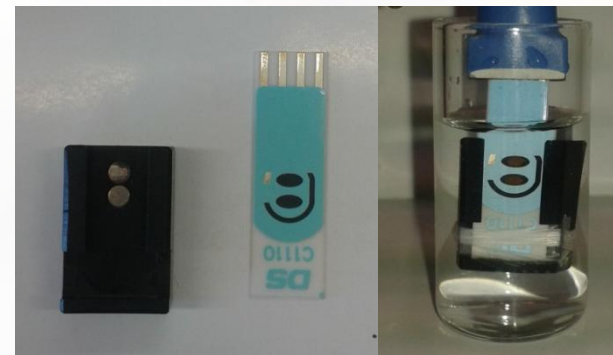
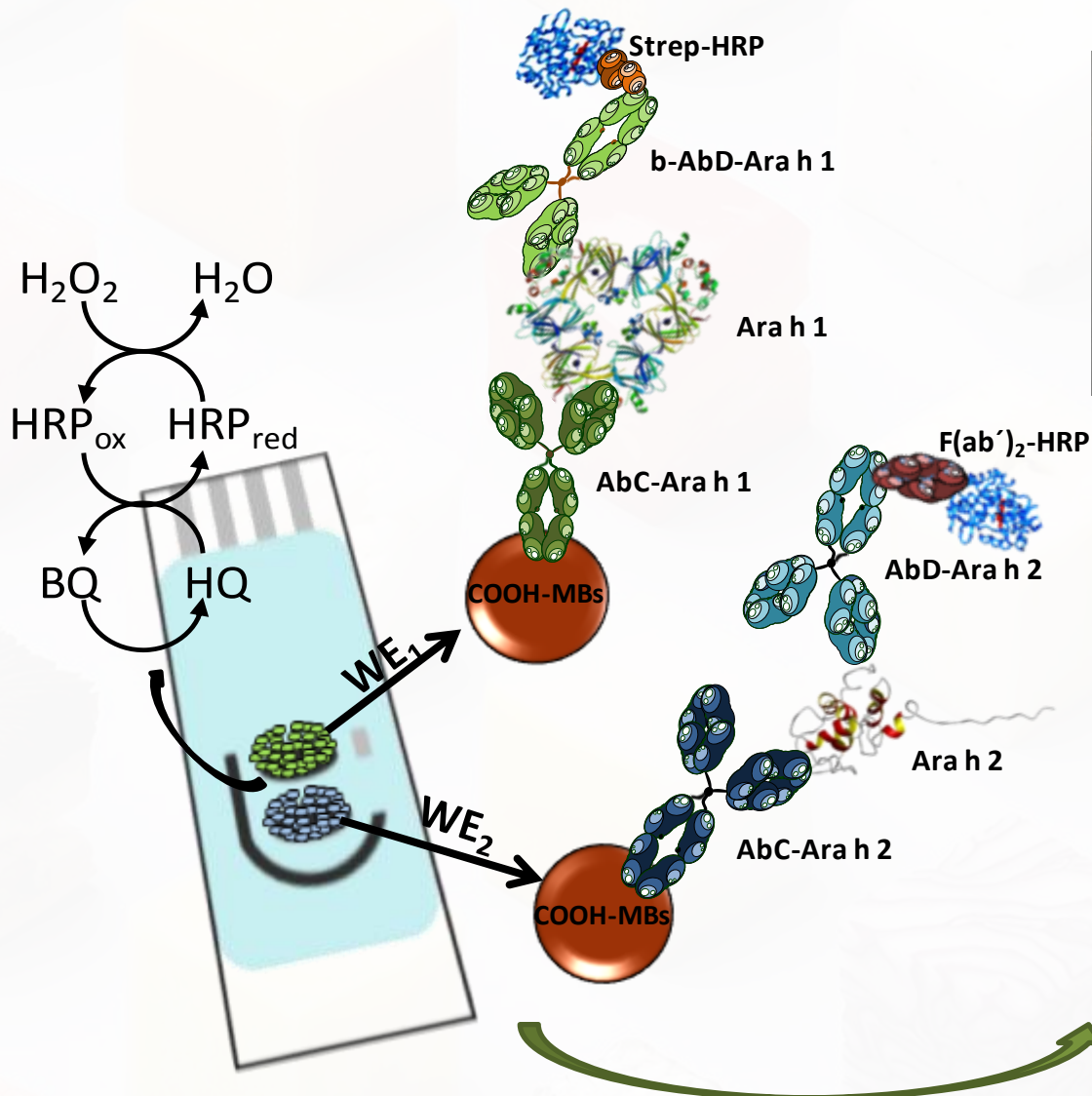
0.0005 % (p/p)
Fácilmente detectable

Detección de
cacahuete a niveles
de ppm

Ara h 1 Magnetoimmunosensor

Ara h 2 Magnetoimmunosensor

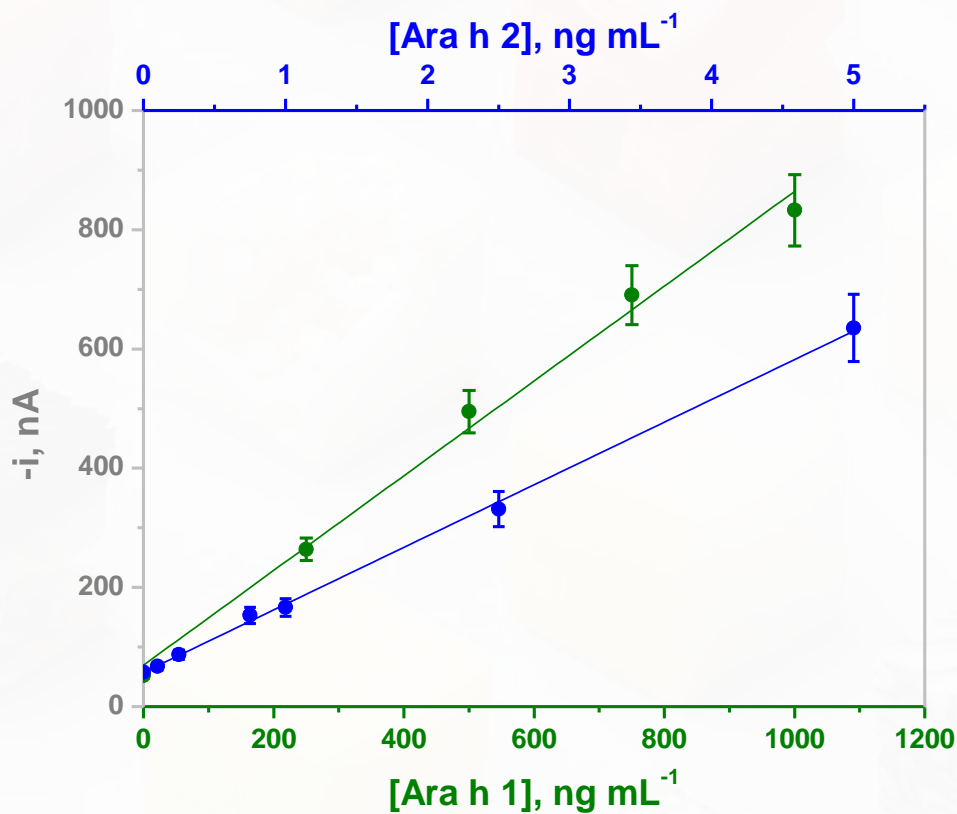
Determinación dual de los principales alérgenos del cacahuete Ara h 1 y Ara h 2



Determinación dual de los principales alérgenos del cacahuete Ara h 1 y Ara h 2



Características analíticas y operacionales



Parámetros	Ara h 1	Ara h 2
r^2	0.996	0.999
Pendiente, nA mL ng^{-1}	0.79 ± 0.05	115 ± 2
O.o., nA	69 ± 29	57 ± 4
I.L., ng mL^{-1}	60 - 1,000	0.25 - 5
LOD, ng mL^{-1}	18	0.07
LOQ, ng mL^{-1}	60	0.25
RSD _{n=8} , %	7.3	8.9
Estabilidad, días	25	50

Determinación dual de los principales alérgenos del cacahuete Ara h 1 y Ara h 2



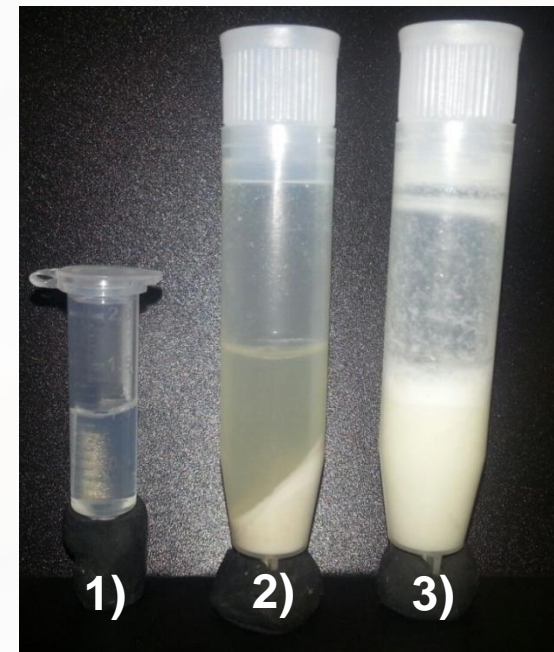
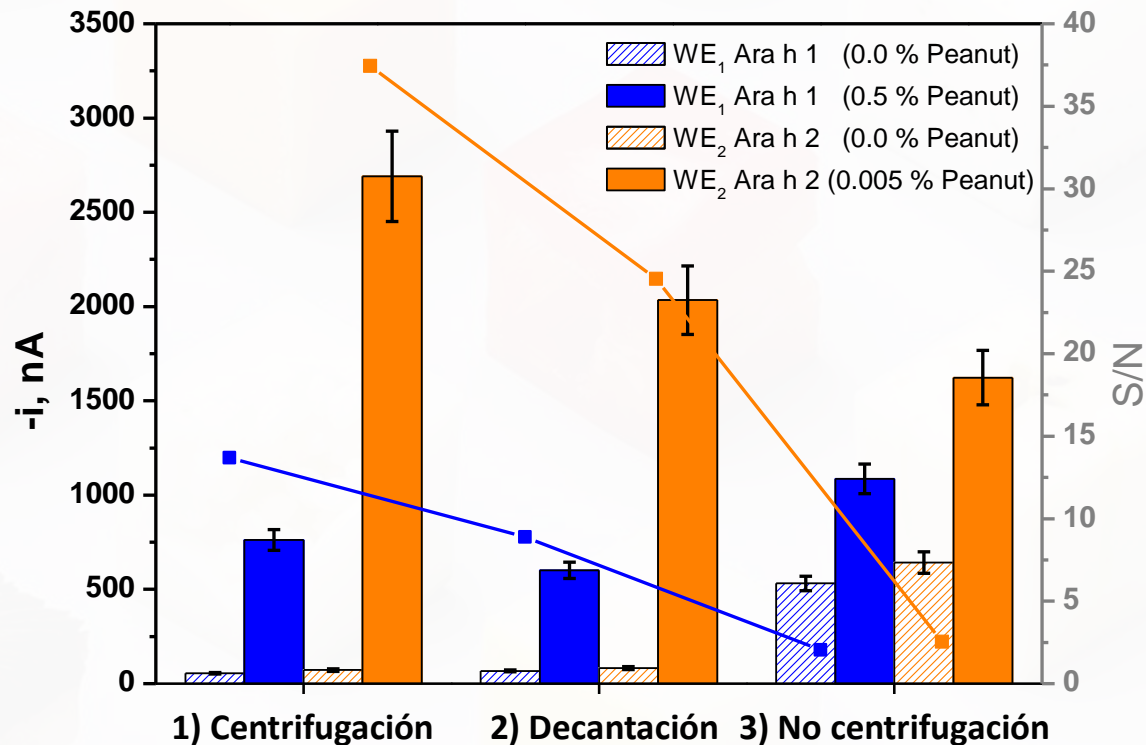
Contenido endógeno en extractos alimentarios



Extracto	[Ara h 1], mg g ⁻¹		[Ara h 2], mg g ⁻¹	
	Plataforma dual	ELISA	Plataforma dual	ELISA
Cacah. Frito	(7 ± 2) RSD _{n=3} = 9.6%	(7.3 ± 0.6) RSD _{n=3} = 3.4%	(3.6 ± 0.8) RSD _{n=3} = 8.4%	(3.4 ± 0.6) RSD _{n=3} = 7.6%
Cacah. Crudo	(2.3 ± 0.4) RSD _{n=3} = 7.7%	(2.8 ± 0.3) RSD _{n=3} = 4.4%	(3.8 ± 0.3) RSD _{n=3} = 3.6%	(4.1 ± 0.5) RSD _{n=3} = 5.3%
Barras de chocolate con cacahuete tostado	(0.18 ± 0.01) RSD _{n=3} = 2.3%	(0.18 ± 0.03) RSD _{n=3} = 7.4%	(0.23 ± 0.05) RSD _{n=3} = 8.9%	(0.30 ± 0.08) RSD _{n=3} = 10.5%
Crema de cacahuete	(1.9 ± 0.2) RSD _{n=3} = 4.4%	(1.8 ± 0.4) RSD _{n=3} = 8.9%	(4.5 ± 0.8) RSD _{n=3} = 6.8%	(4.3 ± 0.8) RSD _{n=3} = 7.2%
Avellanas	ND	ND	ND	ND
Harina de trigo	ND	ND	ND	ND

ND: no detectable

Determinación dual de los principales alérgenos del cacahuete Ara h 1 y Ara h 2

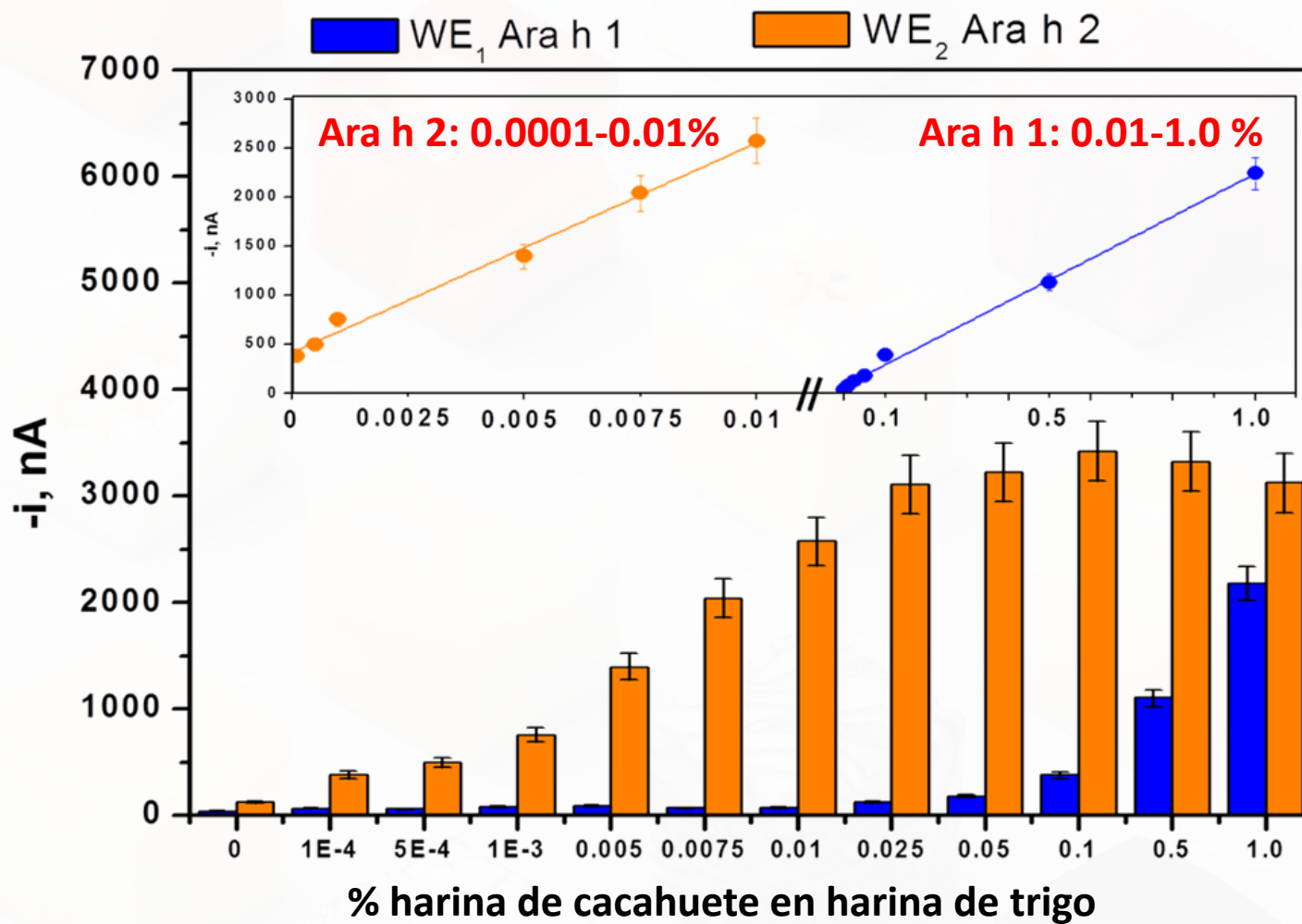


Método rápido de cribado capaz para detectar muestras que contengan sólo 0.005% de cacahuete a través de la determinación de Ara h 2 en extractos crudos!!

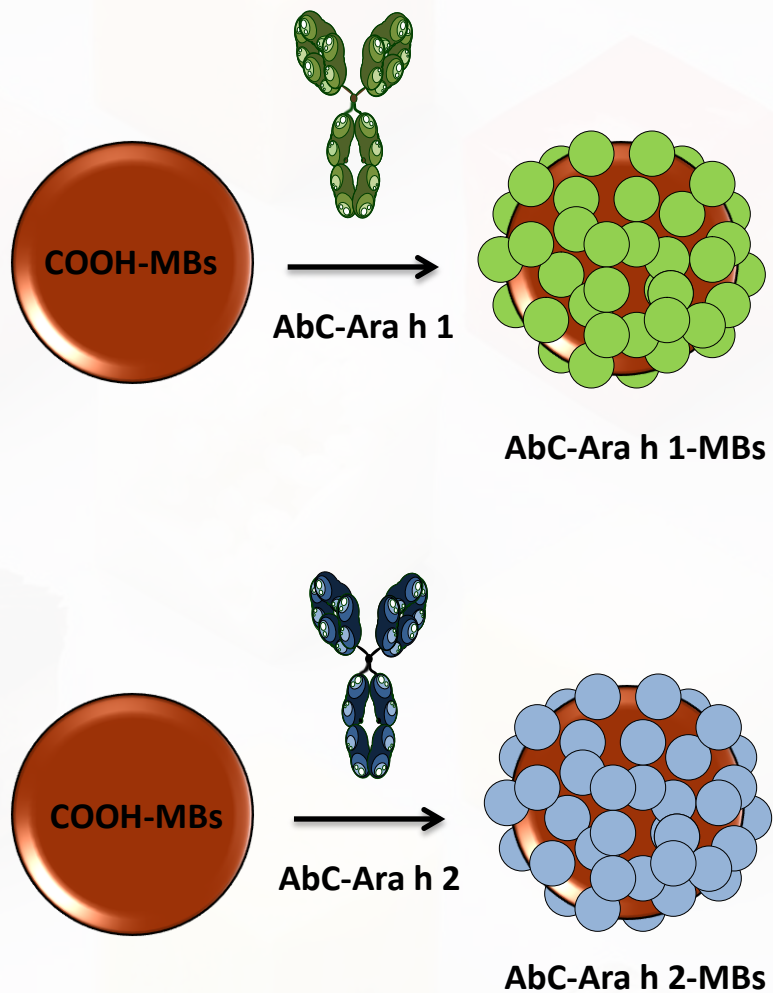
Determinación dual de los principales alérgenos del cacahuete Ara h 1 y Ara h 2



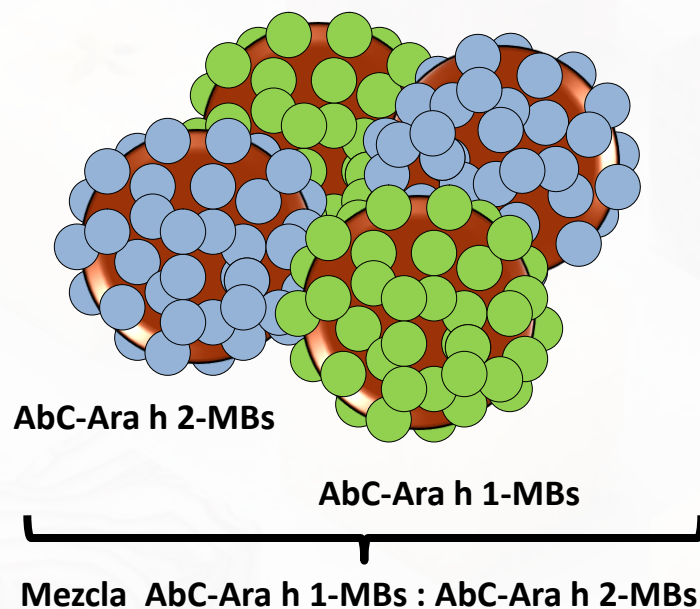
Determinación en harinas de trigo contaminadas



Determinación dual de los principales alérgenos del cacahuete Ara h 1 y Ara h 2



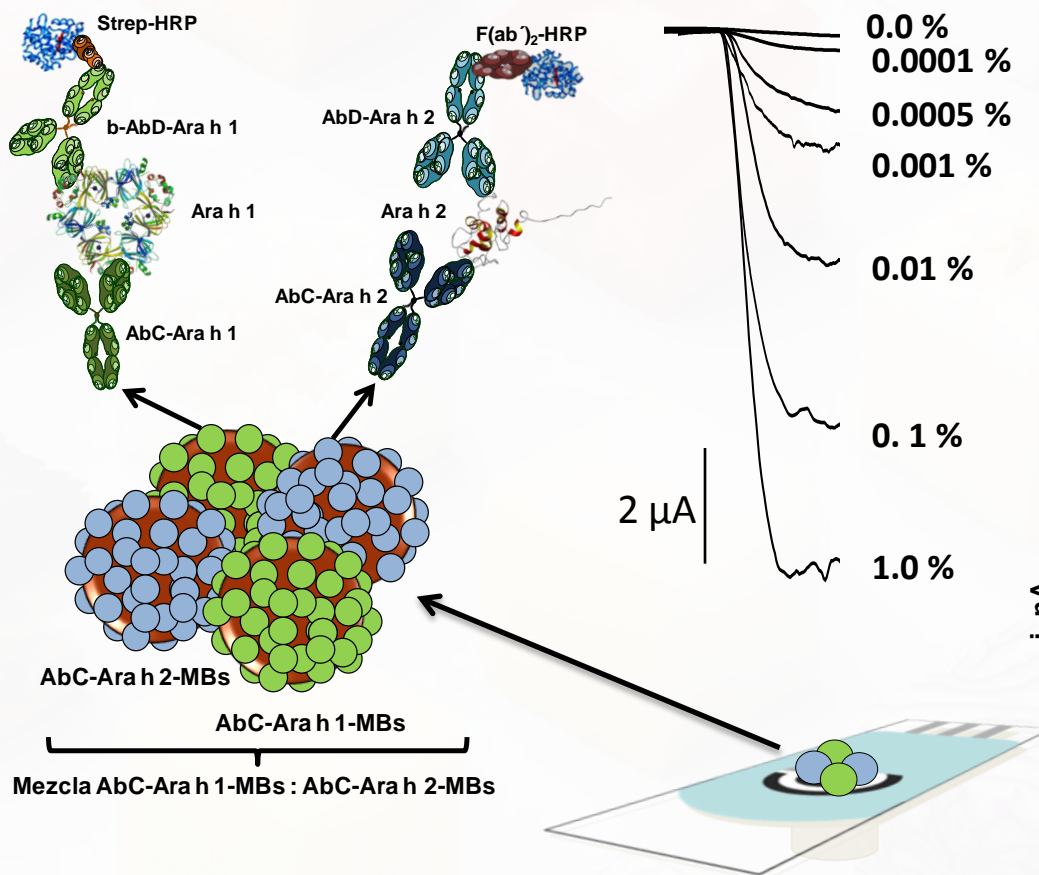
Plataforma biosensora electroquímica para la detección de trazas de cacahuete



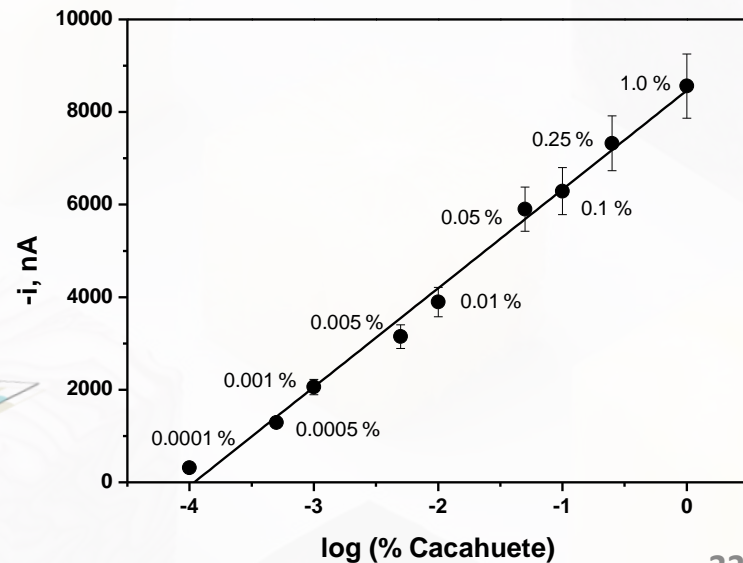
Determinación dual de los principales alérgenos del cacahuete Ara h 1 y Ara h 2



Plataforma biosensora electroquímica para la detección de trazas de cacahuete



Muestras contaminadas con cacahuete (0.0001 – 1) % (p/p)



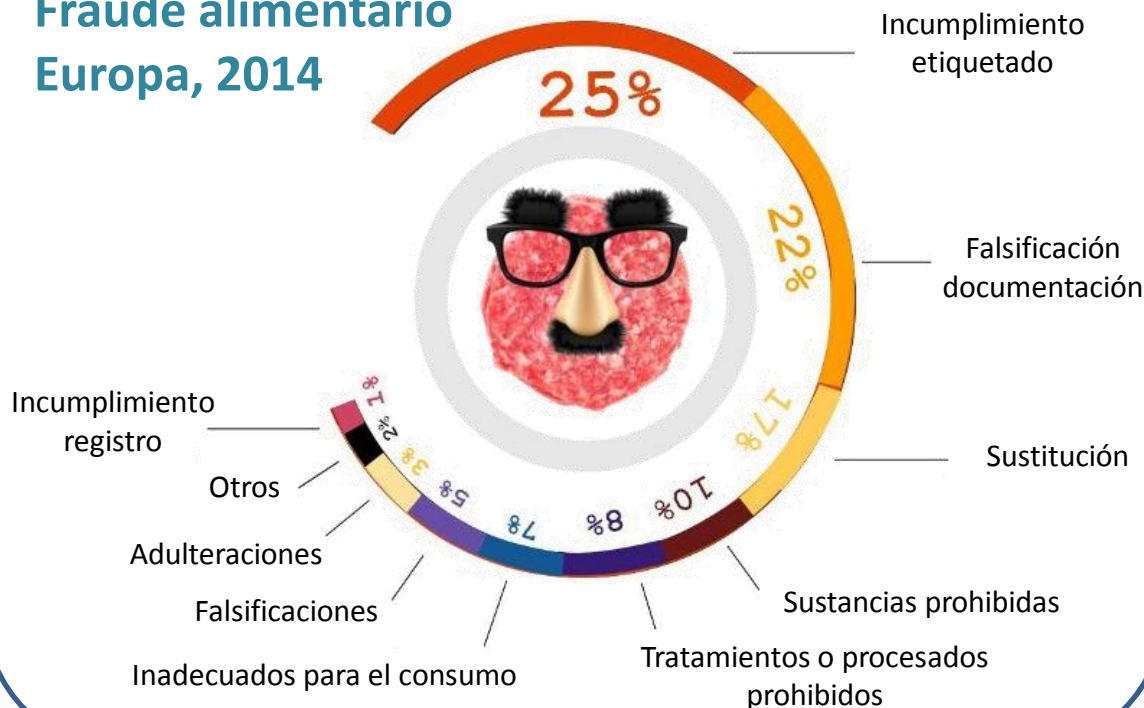
Fraude alimentario



Introducción deliberada en el mercado de un alimento, para obtener un beneficio económico, con la intención de engañar al consumidor

Food Standards Agency del Reino Unido

Fraude alimentario Europa, 2014



Pérdida de confianza del consumidor



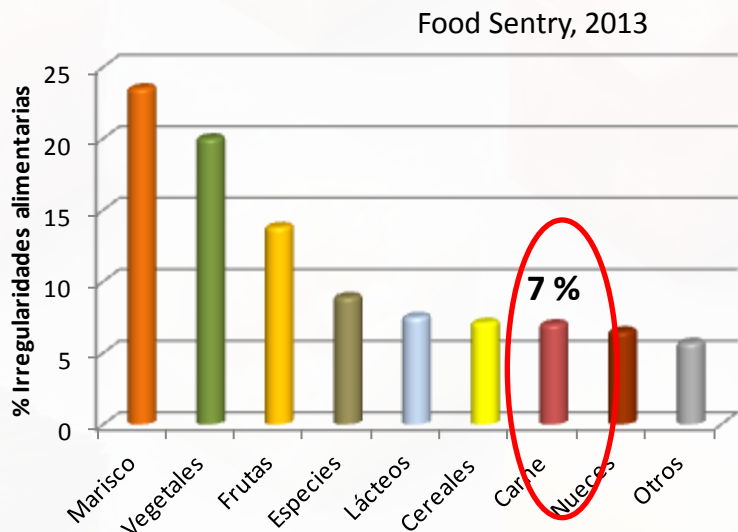
Seguridad Alimentaria



Fraude alimentario



Adulteración: adición de ingredientes extraños, inadecuados o de baja calidad a un producto alimentario



OCU detecta la presencia de carne equina en diferentes productos (hamburguesas, tortelini o albóndigas)

**Islas Británicas
2013**



**Hamburguesas adulteradas
con carne equina**

FRAUDE



Se detectan adulteraciones por toda Europa 5 % de la carne de ternera contiene carne equina



Conclusiones



- ➔ Nuevas plataformas electroquímicas basadas en el empleo de micropartículas magnéticas, receptores específicos y electrodos serigrafiados para la **determinación selectiva, precisa, fiable y reproducible** de alérgenos o adulterantes de relevancia (de naturaleza proteica o genética) en muestras complejas, **fácilmente trasladables a la determinación de otros analitos de interés y a la multidetección de analitos de diferente naturaleza.**
- ➔ Las metodologías desarrolladas se han comparado ventajosamente con otras de uso común en términos de simplicidad, coste y tiempo de ensayo y portabilidad de la instrumentación requerida, lo que les hace **herramientas analíticas fiables y prometedoras para seguridad alimentaria y protección del consumidor.**

Agradecimientos



Personas involucradas

Prof. José M. Pingarrón
Dr. A. Julio Reviejo García
Dr. Rosario Linacero de la Fuente
Dr. F. Javier Gallego
D. Rebeca M. Torrente-Rodríguez
D. Víctor Ruiz-Valdepeñas Montiel
D. Alessandro Pellicanò



Financiación

- Ministerio de Economía y Competitividad de España (CTQ2015-64402-C2-1-R)
- NANOAVANSENS Programa de la Comunidad de Madrid (S2013/MT-3029)
- Contratos predoctorales del MINECO (R.M. Torrente-Rodríguez) y UCM (V. Ruiz-Valdepeñas Montiel)

Gracias