

INMUNOSENSOR PARA LA CUANTIFICACION DE ALERGENOS ALIMENTARIOS UTILIZANDO TINTAS CON NANOTUBOS DE CARBONO Y PARTICULAS DE LATEX

Molinari J.,¹ Medrano A.,² Monsalve L.,² Ybarra G.¹
 (1) INTI Procesos Superficiales; (2) INTI-CMNB
 molinari@inti.gob.ar

Introducción

La alergia alimentaria es un problema mundial que impacta en la seguridad alimentaria y en la salud pública. Las proteínas de la leche de vaca son una de las principales causas de alergia alimentaria en niños menores de tres años, con una prevalencia en la población general que varía entre 2 y 3 %. Suele desarrollarse en las primeras semanas posteriores a su introducción en la dieta y en niños que están siendo alimentados con leche materna debido al consumo de leche de vaca por parte de la madre o al uso de fórmulas de leche infantiles que contienen las proteínas completas. La mayoría de los pacientes están sensibilizados a varias proteínas. Caseína, β -lactoglobulina y α -lactoalbumina son los mayores alérgenos y los más abundantes en la leche de vaca. Más del 50% de los individuos alérgicos a la leche de vaca están sensibilizados a estas proteínas (65%, 61% y 51% respectivamente).

Hay varias técnicas analíticas para la detección de estas proteínas. ELISA es el método más comúnmente usado en la industria alimentaria debido a su alta precisión, bajo límite de detección y alta especificidad, pero requiere una instrumentación y reactivos costosos. Los biosensores, dispositivos compactos que utilizan moléculas de reconocimiento específicas para los analitos de interés y combinan una electrónica integrada, son una alternativa económica a las técnicas disponibles en el mercado. Aunque en el campo de los biosensores en los últimos años se han generados muchos trabajos, el uso de biosensores electroquímicos para la detección y cuantificación de alérgenos en alimentos es escasos.

Objetivo

Desarrollar un método alternativo innovador, económico y de producción nacional para la detección y cuantificación de alérgenos en alimentos. Este proyecto en desarrollo se basó en la cuantificación de β -lactoglobulina, una proteína altamente alergénica de la leche.

Descripción

El dispositivo consiste en un biosensor electroquímico amperométrico formado por una

instrumentación electrónica, llamado potencióstato y por electrodos de carbono que se conectan al equipo. El principio de detección está basado en un inmunoensayo de captura empleando anticuerpos inmovilizados covalentemente a la superficie de los electrodos. Sobre el electrodo ocurre el reconocimiento del alérgeno de la muestra. Un segundo anticuerpo conjugado a la enzima peroxidasa de rabano picante (HRP) se une a un epitope libre del alérgeno del complejo antígeno-anticuerpo unido al electrodo. La medida electroquímica de la actividad enzimática de la HRP luego de la adición de peróxido de hidrogeno, un mediador redox y la aplicación de un potencial al electrodo, es una corriente eléctrica procesada por un potencióstato portable conectado a una PC vía puerto USB. La señal eléctrica es proporcional a la cantidad de alérgeno permitiendo su cuantificación a través de una curva estándar de calibración. Los electrodos de carbono de trabajo y contraelectrodo fueron impresos mediante la tecnología de película gruesa y luego integrados en una celda electroquímica acrílica. Como electrodo de referencia se empleó $\text{Ag}|\text{AgCl}|0.1 \text{ M KCl}$. Los anticuerpos son moléculas complejas cuyos sitios de reconocimiento deben estar expuestos sobre la superficie de los electrodos de carbono para unirse a su antígeno específico. Los anticuerpos se inmovilizaron por la reacción de carbodiimida entre los grupos amino primarios del anticuerpo y los grupos carboxilos ubicados sobre partículas de latex inmersas en la tinta de nanotubos de carbono. Con dicha tinta se pintaron los electrodos de trabajo de las celdas electroquímicas. Los parámetros del inmunoensayo y condiciones de medición fueron optimizados.

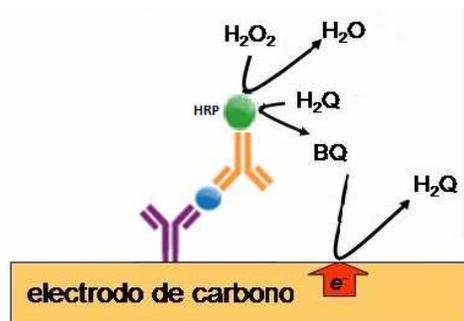


Figura 1: Representación esquemática de la interacción antígeno-anticuerpo sobre el electrodo de carbono después del inmunoensayo captura y detección electroquímica por el mediador redox (hidroquinona, H₂Q, y 1,4-benzoquinona, BQ).

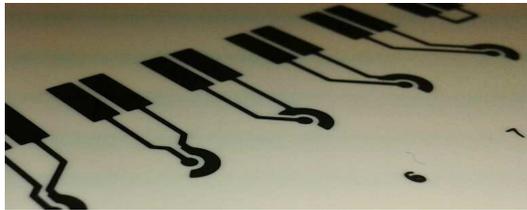


Figura 2: Impresión serigráfica de los electrodos de trabajo y contraelectrodos.

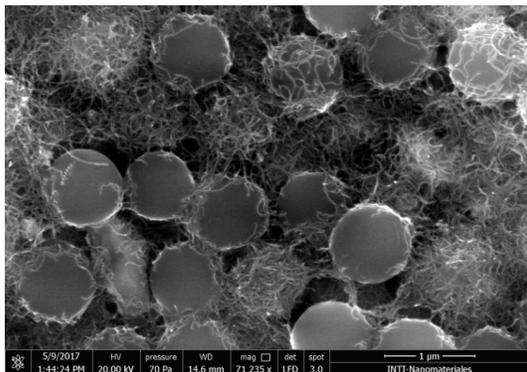


Figura 3: Imagen SEM de electrodo de trabajo pintado con tinta de nanotubos de carbono y partículas de latex funcionalizadas con grupos carboxilos.

Bajo el método desarrollado, la concentración de β -lactoglobulina esta directamente relacionada a la medida de la corriente generada como se muestra en la Fig. 4. Las óptimas condiciones del sistema fueron encontradas para obtener un rango de cuantificación de 0.02 ppm hasta 20 ppm. Los parámetros optimizados fueron las concentraciones de anticuerpos primario inmovilizado y anticuerpo conjugado, así como los tiempos de incubación. El rango de medición es útil para el control de alérgenos en alimentos y la portabilidad del equipo representa una importante ventaja con respecto a los métodos comerciales disponibles en el mercado.

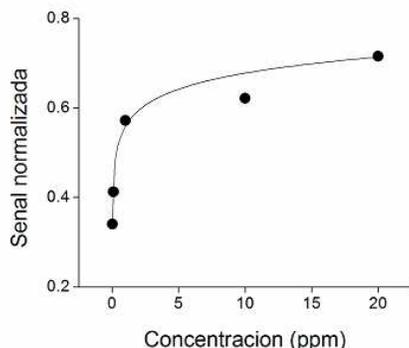


Figura 4. Curva corriente vs concentración. La corriente fue medida a los 60 s de aplicar un potencial de -280 mV con una concentración de H₂O₂ de 1.5 mM usando diferentes concentraciones de β -lactoglobulina en la muestra.

Conclusiones

La determinación de alérgenos en alimentos es un tema de creciente preocupación. El desarrollo de un biosensor electroquímico amperométrico asociado a un inmunoensayo de captura presentado en este trabajo para la cuantificación de β -lactoglobulina tiene varias ventajas. El uso de tintas con nanotubos de carbono y partículas de latex funcionalizadas con grupos carboxilos ha permitido inmovilizar covalentemente los anticuerpos anti β -lactoglobulina utilizados en el inmunoensayo en cantidad suficiente y con sus sitios de reconocimiento expuestos en la superficie del electrodo como para lograr la sensibilidad adecuada para la cuantificación del alérgeno. Dicha inmovilización no fue efectiva cuando se generaron sobre la superficie del electrodo de carbono grupos carboxilos mediante el tratamiento con plasma. En ese caso, el número de grupos formados fue insuficiente para inmovilizar el número de anticuerpos necesarios para generar la adecuada sensibilidad en el inmunoensayo.

No hay actualmente en la legislación de ningún país, a excepción de Japón, que establezca un límite de alérgenos en alimentos, pero generalmente se considera que trazas de alérgenos puede conducir a reacciones alérgicas. En Japón este límite se estableció en 10 ppm, en tanto que el límite de detección logrado en este ensayo es del orden de 0.02 ppm.

Bibliografía

1. A. Flocchi, J. Brozek, H. Schünemann, S. L. Bahna, A. von Berg, K. Beyer, M. Bozzola, J. Bradsher, E. Compalati, M. Ebisawa, M. A. Guzman, H. Li, R. G. Heine, P. Keith, G. Lack, M. Landi, A. Martelli, F. Rancé, H. Sampson, A. Stein, L. Terracciano, S. Vieths., *Pediatr. Allergy Immunol.* 21 (2010) 1-125.
2. G. Longinotti, G. Ybarra, P. Lloret, C. Moina, A. Ciochinni, D. Rey Serantes, L. Malatto, M. Roberti, S. Tropea, L. Fraigi, *Engineering in Medicine and Biology Society, Annual International Conference of the IEEE, Buenos Aires, Argentina, 2010*, 674-676.
3. C. Moina, G. Ybarra, "Fundamentals and applications of immunosensors" in "Advances in Immunoassay Technology", InTech, Zagreb, Croatia, 2012.
4. R. Pilolli, L. Monaci, A. Visconti, *Trends Anal. Chem.* 47 (2013) 12-26.
5. J. Molinari, C. Moina, G. Ybarra, *Electrochemical immunosensor for the determination of β -casein.* *J. Electrochem. Sci. Eng.* 5(1) (2015) 9-16
6. R. Pedreschi, J. Nørgaard, A. Maquet, "Current Challenges in Detecting Food Allergens by Shotgun and Targeted Proteomic Approaches: A Case Study on Traces of Peanut Allergens in Baked Cookies". *Nutrients* 2012, 4, 132-150

Agradecimientos: A Paulina Lloret y Lionel Veiga por las imágenes SEM.