

INSERTO

# lab

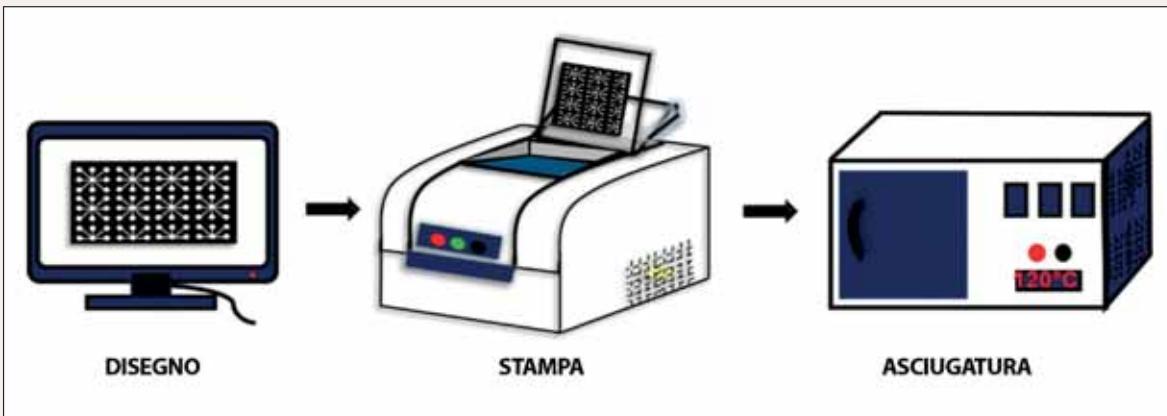
- **Microfluidica su carta, dispositivi per individuare ingredienti e allergeni nelle bevande** ..... 62
- **Allergie e intolleranze alimentari, metodiche per rilevare molecole e sostanze scatenanti** ..... 68



# Microfluidica su carta, dispositivi per individuare ingredienti e allergeni nelle bevande

*La sicurezza alimentare e la disponibilità di strumenti in grado di garantire l'individuazione di "pericoli" alimentari sono di fondamentale importanza. I metodi analitici convenzionali attualmente in uso sono sicuramente efficaci, ma richiedono strumenti complessi e personale specializzato. Particolarmente promettenti sono quindi i dispositivi a microfluido su carta, in quanto potrebbero rappresentare un metodo rapido e affidabile per le analisi di routine in loco di alimenti e bevande.*

**Gabriella Carcassola**  
DMV, PhD



**Foto 1.** Rappresentazione schematica della creazione dei dispositivi a microfluido su carta. **Step 1.** AutoCAD Design. **Step 2.** Stampa a cera su carta. **Step 3.** Asciugatura a 120 °C per 2 minuti.

**C**onsumare alimenti e bevande sicuri e di qualità è un'esigenza di primaria importanza. Ma con il progressivo e continuo aumento della domanda da parte dei consumatori e la durata limitata dei prodotti confezionati, è difficile per il settore alimentare mantenere standard elevati a costi sostenibili. Attualmente, per garantire la sicurezza di alimenti e bevande si ricorre a metodi analitici tradizionali, come la cromatografia liquida ad alta prestazione (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), la gaschromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, GC-MS) e il test ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

Tuttavia, sebbene queste tecniche siano assolutamente affidabili, richiedono grandi volumi di campioni, reagenti, macchinari complessi e personale specializzato. Per tali motivi, i dispositivi analitici su carta (*Paper-based Analytical Devices*,  $\mu$ PAD) hanno recentemente attirato l'attenzione, in quanto rappresentano strumenti promettenti, economici, facili da utilizzare e relativamente veloci. Ma fino a oggi, l'utilità dei  $\mu$ PAD è stata dimostrata soprattutto nel campo della diagnostica clinica, mentre la loro applicazione nel settore della sicurezza alimentare è solo agli inizi<sup>1,2</sup>.

I dispositivi analitici su carta prevedono la modellazione di carta da filtro porosa mediante cera idrofobica al fine di creare canali idrofilici in cui i reagenti vengono trasportati passivamente e, quindi, senza necessità di dispositivi esterni. E si parla di "carta microfluidica" in quanto la carta viene impiegata come substrato per creare strumenti che consentono di eseguire diversi test chimici con microvolumi di liquidi.

In tale quadro, interessante è un recente studio<sup>3</sup> in cui viene descritto lo sviluppo di un dispositivo a microfluido su carta e di un sensore multiplo colorimetrico per l'analisi delle sostanze presenti nei succhi di frutta e nei frullati confezionati e che potrebbero essere utilizzati di routine in applicazioni di sicurezza alimentare.

63

## ALLESTIMENTO DEI DISPOSITIVI E TEST

Per gli esperimenti di titolazione su carta microfluidica i dispositivi sono stati creati seguendo precisi step (foto 1).

### Determinazione del pH

Per il test del pH sono stati allestiti dispositivi a stella con quattro o sei zone circolari e sono stati utilizzati quattro indicatori di pH: rosso fenolo, blu di bromofenolo, verde di bromocresolo e rosso di clorofenolo. A pH 3, i primi tre indicatori sono caratterizzati da una colorazione gialla, mentre il rosso di clorofenolo si presenta viola chiaro. Tale colorazione "di partenza" varia all'aumentare del pH (foto 2). Più in particolare, 1,5  $\mu$ L di ogni indicatore sono stati caricati nelle zone di rilevamento del pH, corrispondenti ai cerchietti esterni e sono stati quindi lasciati asciugare a temperatura ambiente. Dopo l'essiccazione, sono stati aggiunti altri 1,5  $\mu$ L di indicatori, nel medesimo punto, per ottenere colori più intensi. Tutti i test sono stati condotti in triplicato a temperatura ambiente (circa 25 °C) e con un'umidità relativa del 50%. Il test del pH è stato ulteriormente valutato depositando 10  $\mu$ L di acido citrico e nitrito di sodio sulla parte centrale del dispositivo.

## Acido ascorbico, nitrito di sodio e glucosio

Per i test dell'acido ascorbico (vitamina C), del nitrito di sodio e del glucosio è stata allestita una serie di dispositivi circolari (*foto 3a, 3c e 3d*).

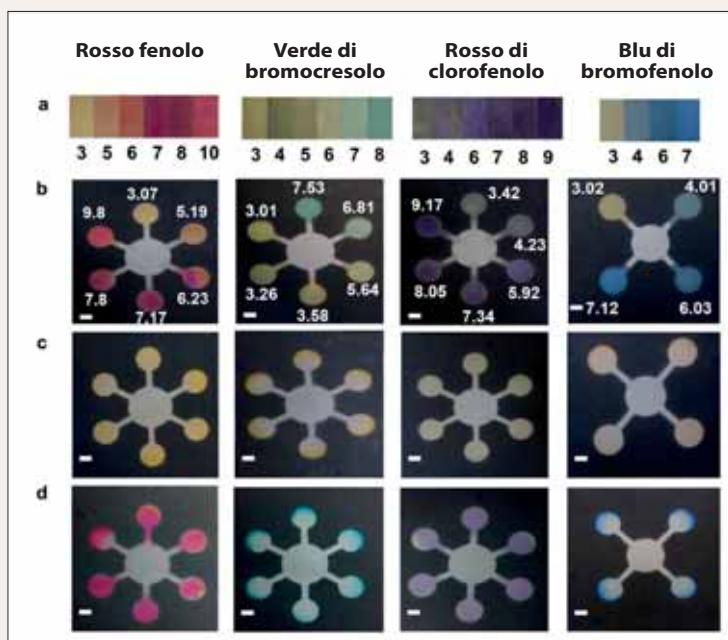
Per l'acido ascorbico, i reagenti sono stati caricati in

sequenza sui dispositivi circolari e lasciati asciugare a temperatura ambiente. Più in particolare, 0,5  $\mu\text{L}$  di ioduro di potassio sono stati caricati dopo asciugatura di 0,5  $\mu\text{L}$  di iodato di potassio ed è stato poi aggiunto 1  $\mu\text{L}$  di reagente di amido. Infine, è stato depositato 1  $\mu\text{L}$  di acido ascorbico.

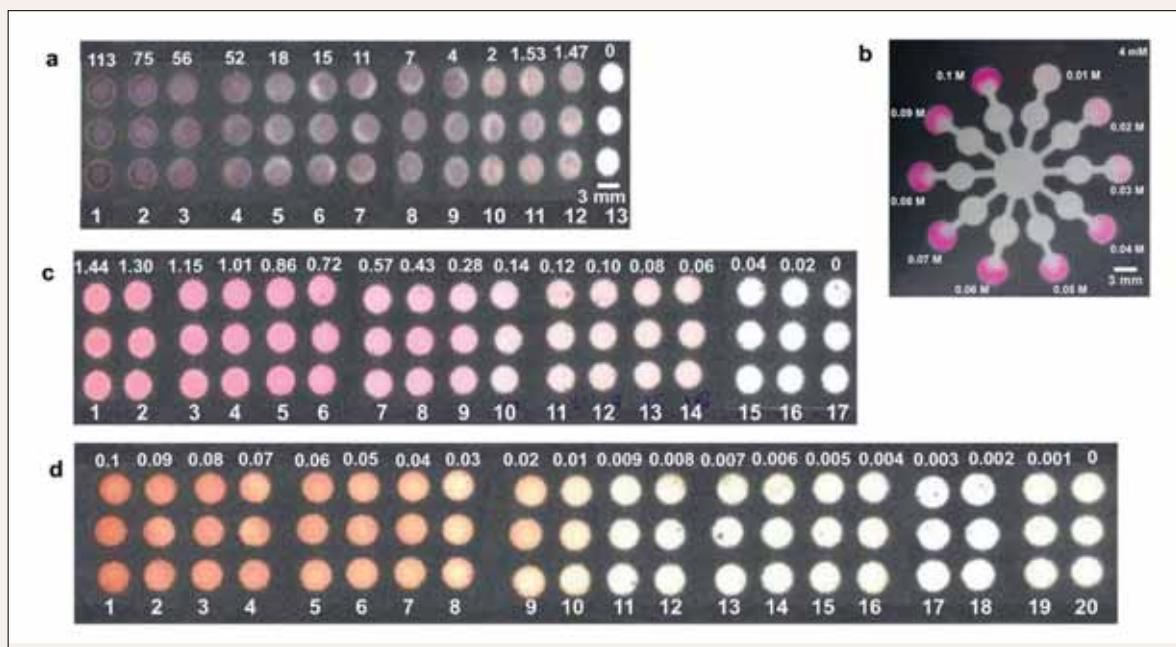
Per il test del nitrito, sono stati depositati 1,5  $\mu\text{L}$  di reattivo di Griess e, dopo asciugatura, è stato caricato 1  $\mu\text{L}$  di nitrito di sodio.

Per il glucosio, invece, sono stati caricati, in sequenza, 1  $\mu\text{L}$  di ioduro di potassio (1,2 M), 1  $\mu\text{L}$  di perossidasi di rafano e glucosio ossidasi (rapporto 1:5) sul dispositivo circolare. Dopo asciugatura, è stato depositato 1  $\mu\text{L}$  di glucosio.

Il limite di rivelabilità (*Limit Of Detection, LOD*) è stato determinato utilizzando concentrazioni variabili delle diverse sostanze (0-0,11 mM per l'acido ascorbico, 0-1,4 mM per il nitrito di sodio e 0-100 mM per il glucosio). La concentrazione più bassa delle diverse sostanze a cui è stato possibile osservare una variazione visibile di colore e dopo la quale non sono state evidenziate ulteriori modifiche è stata considerata come il limite di rivelamento



**Foto 2.** Test del pH con differenti indicatori. **a.** Barra colori. **b.** Standard a diverso pH. **c.** Acido citrico - pH 2,97. **d.** Nitrito - pH 8,64. Scala: 6 mm.



**Foto 3.** Titolazione con i dispositivi a microfluido su carta. **a.** Acido ascorbico ( $\mu\text{M}$ ). **b.** Acido citrico. **c.** Nitrito ( $\text{mM}$ ). **d.** Glucosio ( $\text{M}$ ).

Tabella 1				
Concentrazione di alcuni composti normalmente presenti nelle bevande				
Composto	Bevanda	Quantità presente	Concentrazione	LOD dei $\mu$ PAD dello studio
Vitamina C	Succo di frutta a basso contenuto di acido citrico	23–66 mg/125 mL	1-3 mM	1,47 $\mu$ M
	Succo di frutta e verdure	35–73 mg/12 mL	16-34 mM	
Nitrito	Succo di frutta e verdure	0,71 mg/100 g	0,1 mM	0,06 mM
Zucchero	Sode, succo di frutta e tè freddo	11 g/100 mL	600 mM	20 mM

$\mu$ PAD: Paper-based Analytical Devices

della metodica<sup>4</sup>.

Per il test dell'acido citrico, è stato allestito un dispositivo a stella con 10 zone circolari (*foto 3b*). Sulle zone circolari esterne (zone di rivelamento) è stato caricato 1  $\mu$ L di fenoltaleina, mentre su quelle intermedie 1  $\mu$ L di idrossido di sodio a diverse concentrazioni. Dopo asciugatura, sono stati depositati 10  $\mu$ L di acido citrico (4 mM) sulla zona circolare centrale.

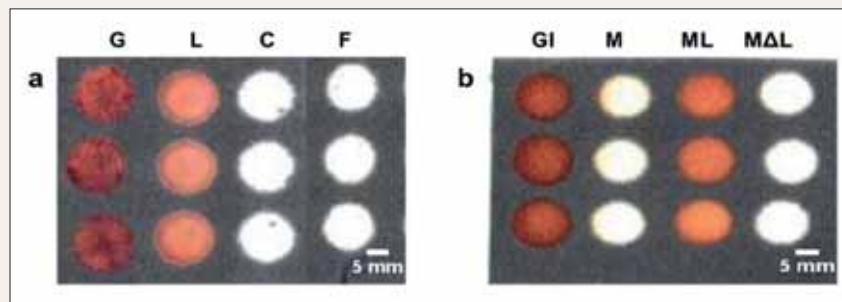
### Lattosio e guaiacolo

Un dispositivo circolare è stato progettato per testare la presenza di lattosio, un composto comunemente presente nella maggior parte dei succhi di frutta confezionati, nel latte aromatizzato alla frutta o nelle miscele di frutta a base di latte. Per i test, due lotti di latte intero sono stati addizionati di lattasi, alla concentrazione di 0,1 mg/mL. Dopo trattamento di uno dei due lotti a 100 °C, è stato condotto il test per il glucosio come precedentemente descritto.

Altri test sono stati invece condotti per valutare la presenza di guaiacolo, un etere metilico prodotto dai batteri del genere *Alicyclobacillus*, microrganismi che contaminano e alterano i succhi di frutta e che suscitano notevoli preoccupazioni per la qualità dei succhi stessi. Nello specifico, per il guaiacolo è stato depositato sul dispositivo 1  $\mu$ L di perossido di idrogeno 30% e, dopo asciugatura, 1  $\mu$ L di perossidasi di rafano.

### RISULTATI E DISCUSSIONE

La maggior parte dei comuni succhi di frutta contiene diverse sostanze, tra cui l'acido ascorbi-



**Foto 4.** Test su succhi di frutta confezionati. **a.** Test per il lattosio con aggiunta di lattasi. **b.** Test di succhi deteriorati.

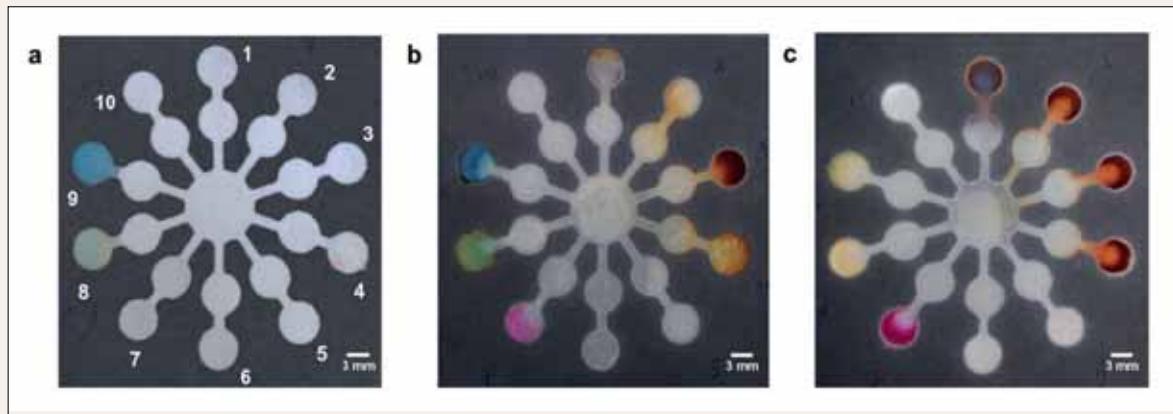
G: guaiacolo; L: limonata alterata; C: controllo; F: limonata fresca; GI: glucosio; M: latte + lattasi; MΔL: latte + lattasi riscaldato.

co, l'acido citrico (nella maggior parte dei succhi di agrumi), zuccheri aggiunti o dolcificanti (glucosio) e conservanti (nitriti).

Nello studio descritto, il LOD per l'acido ascorbico è risultato pari a 1,47  $\mu$ M, per il glucosio a 20 mM e per il nitrito a 0,06 mM. E la concentrazione a cui tali composti sono presenti nei prodotti disponibili in commercio è superiore ai LOD sopra elencati, fattore che indica l'idoneità dei dispositivi allestiti per l'analisi delle bevande (*tabella 1*).

Per quanto riguarda il lattosio, l'aggiunta di lattasi favorisce la conversione del lattosio in glucosio. Il test per il glucosio, come sopra descritto, mostra come risultato un colore marrone scuro, mentre il latte addizionato di lattasi fornisce un colore marrone chiaro. Per contro, nel latte senza lattasi o nel latte con lattasi scaldato a circa 70 °C (temperatura a cui avviene la denaturazione dell'enzima) non avviene alcuna reazione e non vi è alcuna variazione di colore (bianco) (*foto 4a*).

In una serie di test separati, è stata invece valutata la presenza di guaiacolo in succhi di frutta deteriorati. Se il guaiacolo è presente, la reazione tra perossido di idrogeno e perossidasi di rafano fa virare il colore verso il marrone scuro. Il test potrebbe quindi essere utile nell'individuazione



**Foto 5.** Dispositivo a microfluido su carta multiplo per testare diversi analiti. **a.** Dopo l'aggiunta dei reagenti. **b.** Dopo l'aggiunta di latte. **c.** Dopo l'aggiunta di limonata.  
1: acido ascorbico; 2: glucosio; 3: lattosio; 4: lattosio + riscaldamento; 5: nitrito; 6: guaiacolo; 7: acido citrico; 8: blu di bromocresolo (pH 7,53); 9: blu di bromofenolo (pH 7,12); 10: controllo.

dei succhi di frutta alterati, differenziandoli da quelli freschi, in cui la reazione non avviene (foto 4b).

### Sensore multiplo colorimetrico

Un sensore multiplo consente il rivelamento di più analiti su un unico dispositivo e i suoi principali vantaggi sono la facilità d'uso, la flessibilità, il costo contenuto e il volume ridotto dei campioni.

Dopo l'aggiunta del latte, le zone 3, 7, 8 e 9 hanno mostrato il cambiamento di colore visibile. Come riportato nella foto 5b, si è potuto concludere che il latte contiene lattosio e ha un pH di circa 6,8-7. Nella foto 5c, si è evidenziata una variazione di colore nelle zone 1, 2, 3, 4, 7, 8 e 9 dopo l'aggiunta di limonata e si è quindi concluso che la limonata contiene vitamina C, sono presenti molti zuccheri aggiunti e il pH è nell'intervallo 4-5.

La variazione di colore nelle zone di rilevamento ha richiesto circa 45-60 secondi. I risultati ottenuti e relativi ad acido ascorbico, nitrito, acido

citrico e glucosio sono stati confermati mediante analisi spettrofotometrica.

### MICROFLUIDICA SU CARTA, UNO STRUMENTO IN PIÙ

L'obiettivo dello studio descritto è l'applicazione dei concetti della chimica analitica alle analisi di routine mediante un semplice dispositivo a microfluido su carta. In particolare, i ricercatori hanno dimostrato che, grazie a un simile strumento, è possibile determinare il pH e individuare diverse sostanze, tra cui vitamina C, zuccheri, conservanti, allergeni e il composto che indica l'alterazione dei succhi di frutta confezionati e che la microfluidica su carta può trovare ampie applicazioni nel settore della sicurezza alimentare.

In futuro, gli studi dovrebbero essere focalizzati sull'integrazione di tale metodica con lettori automatici per applicazioni di sicurezza alimentare e monitoraggio.

- 
- ● ●
1. Esfahani M.M., Tarn M.D., Choudhury T.A., Hewitt L.C., Mayo A.J., Rubin T.A., Waller M.R., Christensen M.G., Dawson A., Pamme N. *Lab-on-a-chip workshop activities for secondary school students*. *Biomicrofluidics*, 2016. doi: 10.1063/1.4940884.
  2. Carrilho E., Phillips S.T., Vella S.J., Martinez A.W., Whitesides G.M. *Paper microzone plates*. *Anal. Chem.*, 2009; 81:5990–5998.
  3. Prasad A., Tran T., Gartia M.R. *Multiplexed paper microfluidics for titration and detection of ingredients in beverages*. *Sensors (Basel)*, 2019. doi: 10.3390/s19061286. (©Authors, www.creativecommons.org/licenses/by/4.0).
  4. Lavín Á., Vicente J., Holgado M., Laguna M.F., Casquel R., Santamaría B., Maigler M.V., Hernández A.L., Ramírez Y. *On the determination of uncertainty and limit of detection in label-free biosensors*. *Sensors (Basel)*, 2018; 18(7). doi: 10.3390/s18072038.

**Intervista a** | Gabriella Tedeschi, Prof.ssa di Biochimica e Proteomica, Dip. di Medicina veterinaria, Università degli Studi di Milano, e Francesca Grassi Scalvini, Dottoranda di ricerca in Biochimica, Dip. di Medicina veterinaria, Università degli Studi di Milano

# Allergie e intolleranze alimentari, metodiche per rilevare molecole e sostanze scatenanti

*Le allergie alimentari e le intolleranze alimentari rappresentano importanti problemi di ordine sanitario. È quindi di fondamentale importanza avere a disposizione metodi in grado di individuare e quantificare tanto gli allergeni quanto le sostanze all'origine di intolleranze. E come sottolineato dall'Efsa, tali metodi devono soddisfare cinque fondamentali criteri: sensibilità, specificità, riproducibilità, precisione e accuratezza.*

a cura di **Giovanni Abramo**

Biologo

**U**n'allergia alimentare è una risposta immunitaria avversa a una proteina del cibo normalmente tollerata. In genere, si tratta di una reazione mediata dalle immunoglobuline E (IgE) e si manifesta negli individui che sono geneticamente predisposti all'allergia, oppure in quelli che sono stati precedentemente esposti a un allergene. Dopo il primo contatto con esso, vengono prodotte le IgE antigeno-specifiche che si legano alla superficie dei mastociti e dei basofili, le cellule principali dell'immunità innata. La successiva esposizione dei soggetti ormai sensibilizzati a



un allergene alimentare produce una risposta allergica, tramite il *cross-linking* delle IgE antigeno-specifiche, causando una risposta immediata, che prevede il rilascio di potenti mediatori, uno tra tutti l'istamina. Nei casi più gravi, le persone vanno incontro a shock anafilattico, talvolta, fatale.

L'intolleranza alimentare, dal canto suo, è una reazione avversa a un alimento o a un ingrediente alimentare, ma non di natura immunologica. L'intolleranza alimentare è molto più diffusa dell'allergia ed è normalmente causata da un disordine nella digestione, nell'assorbimento o nel metabo-

**Gabriella Tedeschi,**  
Prof.ssa di Biochimica  
e Proteomica, Dip. di  
Medicina veterinaria,  
Università degli  
Studi di Milano.

lismo di un componente alimentare. I due termini sono spesso usati in modo erroneo e confusi tra loro per la somiglianza dei sintomi; tuttavia, l'intolleranza alimentare è meno grave dell'allergia, la reazione non è immediata e l'intensità è spesso correlata alla quantità di cibo assunta. Abbiamo approfondito l'argomento con l'aiuto di Gabriella Tedeschi, Prof.ssa di Biochimica e Proteomica (Dip. di Medicina veterinaria, Università degli Studi di Milano) e Francesca Grassi Scalvini, Dottoranda di ricerca in Biochimica (Dip. di Medicina veterinaria, Università degli Studi di Milano).

**lab: Prof.ssa Tedeschi, cosa sono gli allergeni alimentari?**

**Gabriella Tedeschi:** Secondo l'art. 27, disposizioni per l'attuazione della Direttiva 2007/68/CE, gli allergeni alimentari sono alimenti o loro componenti che possono scatenare reazioni immuno-mediate; più nello specifico, sono proteine o peptidi responsabili dell'allergicità degli alimenti.

**lab: Dr.ssa Scalvini, quali e quanti sono gli allergeni alimentari?**

**Francesca Grassi Scalvini:** Sono state individuate circa 200 proteine allergeniche appartenenti a diverse famiglie, ma solo poche sono responsabili delle più gravi e frequenti reazioni allergiche<sup>1</sup>. L'elenco degli allergeni, che devono essere segnalati al consumatore, è contenuto nell'Allegato II al Regolamento UE n. 1169/2011; pur essendo più di 160, solo 8 sono responsabili del 90% delle reazioni allergiche, e sono: cereali, crostacei, uova, pesce, arachidi, soia, latte, frutta a guscio.

**lab: Come è possibile identificare tali allergeni?**

**FGS:** La legislazione prevede l'obbligo di indicare la presenza di allergeni nelle etichette degli alimenti, ma questo riguarda solo quelli introdotti intenzionalmente; tuttavia, la contaminazione non intenzionale dei cibi con ingredienti allergenici può avvenire a qualsiasi stadio del processo di produzione. Per garantire la conformità dell'etichetta-

tura degli alimenti e aumentare la protezione del consumatore servono metodi di identificazione e quantificazione degli allergeni, robusti e standardizzati, che soddisfino cinque criteri, definiti fondamentali dall'Efsa: sensibilità, specificità, riproducibilità, precisione e accuratezza.

Questi metodi si basano sul riconoscimento dell'allergene stesso, oppure, più frequentemente, puntano a rintracciare un marker che ne indica la presenza. I marker più utilizzati sono due, le proteine caratteristiche di un ingrediente allergenico oppure una sequenza di DNA specifica. La scelta di uno dei due dipende dal tipo di prodotto alimentare analizzato, perché entrambi presentano vantaggi e svantaggi; infatti, le proteine sono spesso alterate durante i processi produttivi e, in più, i trattamenti termici ne riducono la solubilità. Il DNA risulta interessante a scopi quantitativi e quando è richiesta un'elevata sensibilità, poiché non subisce la variabilità del fenotipo e presenta una stabilità termica maggiore delle proteine. Un altro vantaggio del DNA, come target, è la possibilità di amplificare il numero di copie tramite PCR, permettendo una maggiore sensibilità e la quantificazione con una PCR quantitativa. D'altro canto, molti allergeni contengono una quantità elevata di proteine e poco DNA e, inoltre, la disponibilità di sequenze di DNA, per alcuni allergeni, è limitata nelle banche dati pubbliche; risulta quindi chiaro che la scelta tra i due sia da effettuare in base alle specifiche caratteristiche dell'ingrediente da analizzare.

I metodi che utilizzano come target le proteine sono principalmente immunologici, quindi basati sul riconoscimento di un anticorpo specifico della proteina target. L'ELISA, in cui gli anticorpi IgG, ottenuti da animali immunizzati, sono utilizzati per rintracciare l'allergene, è la metodica maggiormente utilizzata a questo scopo. Nell'ELISA la quantificazione è

basata sul colore prodotto da un enzima che è accoppiato all'anticorpo specifico per l'antigene; si utilizza sia l'ELISA diretta, in cui l'estratto proteico è direttamente immobilizzato nel pozzetto della piastra, che il sandwich ELISA, dove la proteina target viene catturata dall'anticorpo



**Francesca Grassi Scalvini,**  
Dottoranda di ricerca in Biochimica, Dip. di Medicina veterinaria, Università degli Studi di Milano.

specifico, legato al supporto o da un anticorpo secondario, legato al primario (ELISA indiretta). Inoltre, anche l'ELISA competitiva nella quale l'antigene marcato e non marcato competono per lo stesso sito sull'anticorpo primario (diretta) o secondario (indiretta), è molto utilizzata.

Questo test, quindi, è di facile esecuzione e offre una buona sensibilità; infatti, esistono numerosi kit commerciali che utilizzano anticorpi policlonali, già disponibili per la quantificazione e/o la rilevazione di grano, crostacei, uovo, arachidi, soia, latte, frutta a guscio, molluschi, lupini, sesamo, mostarda e grano saraceno.

Sebbene rimanga il metodo prediletto per il rilevamento e la quantificazione degli allergeni, presenta alcuni svantaggi, primo tra tutti la cross-reattività degli anticorpi con altre proteine, con conseguenti falsi positivi. Per evitare questo problema è possibile separare le proteine con un'elettroforesi mono- o bidimensionale e poi individuare le proteine con specifici anticorpi tramite *immunoblotting*.

I metodi *DNA-based*, per ritracciare gli allergeni negli alimenti, sono basati sull'amplificazione del numero di copie del DNA target iniziale tramite PCR, altamente sensibile. La specificità del metodo è garantita dall'uso di *primers* che riconoscono il frammento di DNA dell'ingrediente allergenico. Diversi approcci, comunque basati sulla PCR, sono utili a tale scopo come: l'end-point PCR, la PCR-ELISA, la qPCR, la multiplex PCR e più recentemente la qPCR accoppiata all'HRM (*High Resolution Melting Analysis*).

Tra tutti i tipi di PCR nominati precedentemente, la qPCR sembra essere la più utile per la possibilità di utilizzare frammenti di DNA più corti, tipici di campioni che subiscono degli importanti processi produttivi, come gli alimenti. Questa tecnica ha anch'essa degli svantaggi, rappresentati soprattutto dalla frammentazione del DNA causata dai trattamenti termici, dall'inibizione della reazione di PCR da parte di alcuni ingredienti che compongono gli alimenti e dalla resa e purezza del DNA che dipendono dal metodo per la sua estrazione e purificazione, non universale per tutti i cibi.

Quindi, per fornire un risultato quantitativo affidabile per gli ingredienti allergenici nei prodotti alimentari, è necessario svolgere un'attenta valutazione del metodo PCR da utilizzare, tenendo presente il potenziale impatto dei trattamenti termici, la possibile interferenza dell'allergene

con la reazione PCR e il sistema di purificazione ed estrazione del DNA.

### lab: Cosa prescrivono le normative a riguardo?

**GT:** Tutte le aziende hanno l'obbligo di produrre alimenti sicuri per i consumatori (art. 14 del Reg. CE 178/2002). In relazione al rischio allergeni, le aziende alimentari garantiscono la sicurezza degli alimenti prodotti sia attraverso la progettazione e la realizzazione di un sistema di gestione della sicurezza alimentare in base ai principi del sistema HACCP sia attraverso la corretta etichettatura dei prodotti alimentari, per informare i consumatori sulla presenza di allergeni. L'etichettatura rappresenta infatti uno strumento essenziale per la tutela dei soggetti affetti da allergie o intolleranze, in quanto fornisce indicazioni importanti circa la composizione dei prodotti alimentari. Come precedentemente anticipato, la normativa di riferimento è raccolta nel regolamento UE n. 1169/2011 relativo alla fornitura di informazioni sugli alimenti ai consumatori, recepito in Italia con il Decreto legislativo del 15 dicembre 2017, n. 231. Esso, oltre a confermare alcune disposizioni già previste dalla normativa nazionale, introduce alcune importanti novità in materia di allergeni. In sostanza, rimane invariato l'obbligo già previsto dalla precedente normativa di indicare nell'elenco degli ingredienti la presenza di qualsiasi elemento che possa provocare nel consumatore allergie o intolleranze, mentre viene introdotto a partire dal 13 dicembre 2014 il nuovo obbligo di evidenziare dette sostanze con un carattere chiaramente distinto dagli altri ingredienti elencati. Per la quasi totalità degli allergeni riportati nell'allegato II del Regolamento mancano delle soglie di sicurezza, ossia non è stato possibile stabilire la quantità minima di sostanza in grado di scatenare una reazione in una percentuale rilevante di consumatori vulnerabili. Di conseguenza, mancano delle soglie anche relative all'etichettatura, ossia dei livelli superati i quali è necessaria una specifica dichiarazione sulla confezione del prodotto circa la presenza dell'allergene stesso e al di sotto dei quali, viceversa, non è necessario indicare la sua presenza. Solo per alcuni ingredienti sono presenti delle soglie minime, come per l'anidride solforosa e i solfiti, il cui limite è posto a 10 mg/kg o 10 mg/L, per il glutine negli alimenti senza glutine (20 ppm) e per il lattosio (0,1 g).

**lab: Cosa prevede per il futuro in termini di metodiche per la determinazione e in termini di sensibilizzazione da parte di aziende e consumatori?**

**GT:** Le metodiche del futuro sono rappresentate dallo sviluppo di biosensori, dall'utilizzo delle nanoparticelle e dall'impiego degli spettrometri di massa.

I biosensori rappresentano un'interessante alternativa da utilizzare nei piccoli laboratori di controllo oppure direttamente *in situ* nelle aziende alimentari. Sono costituiti da tre elementi: un recettore biologico specifico per la sostanza da analizzare, un trasduttore in grado di convertire il riconoscimento dell'elemento in un segnale adatto e uno strumento di lettura per conoscere il risultato dell'analisi. La molecola target viene quindi immobilizzata sulla superficie di un sensore e ne viene quantificata la capacità di legame. L'attenzione dei ricercatori si sta focalizzando sugli aptameri, piccole porzioni di DNA a singola elica o di RNA, per la loro capacità di legare diversi target, come piccoli ioni, proteine o perfino cellule. Queste piccole molecole rappresentano un'alternativa molto interessante agli anticorpi, utilizzati nelle metodiche descritte finora, poiché presentano alcuni vantaggi: la possibilità di utilizzarle come target anche molecole tossiche o non immulogiche, non richiedono l'immunizzazione *in vivo* degli animali per generare anticorpi e possono essere modificati facilmente con l'inserimento di gruppi funzionali o molecole, che ne facilitino l'immobilizzazione su un supporto solido o l'introduzione di un marcitore. Sebbene molti aptameri per il rilevamento di allergeni siano già stati selezionati da tempo, rimane ancora molto lavoro da fare per integrarli in veri e propri biosensori.

Tuttavia, i recenti sviluppi delle nanotecnologie hanno permesso l'impiego di nano- e microparticelle nel campo della sicurezza alimentare, non solo come marcatori ma anche per la selezione o la separazione di alcune molecole target. Le nanoparticelle possono essere utilizzate sia su supporti solidi sia in soluzione e trovano già ap-

plicazione nell'identificazione degli allergeni del latte, del bianco d'uovo e delle arachidi. I biosensori con nanoparticelle rappresentano, quindi, un promettente strumento per la sicurezza alimentare; tuttavia, servono delle analisi più dettagliate circa la loro applicazione su matrici alimentari di diversi tipo.

Poiché le proteine rappresentano dei possibili biomarker alimentari, la proteomica risulta essere una tecnica promettente nell'ambito delle scienze alimentari. L'approccio più utilizzato è quello *shotgun*, per cui tutte le proteine di un campione vengono direttamente digerite e la miscela di peptidi risultante è separata mediante HPLC e analizzata con uno spettrometro di massa. Alcune applicazioni di questo tipo includono le analisi degli allergeni dell'uovo nella maionese e nei biscotti, così come l'identificazione dei peptidi delle caseine del latte in diversi cibi o nel vino bianco. La spettrometria di massa riesce a superare lo svantaggio della cross-reattività riscontrato nei metodi immunologici e, in più, raggiunge lo stesso livello di sensibilità dei metodi classici. Per questa tecnica, però, risulta critica la selezione del target più appropriato e bisogna comunque, tener conto dei processi produttivi subiti dal prodotto in esame.

In ogni caso, poiché permette una veloce, accurata, altamente sensibile e specifica analisi delle proteine, la spettrometria di massa è largamente utilizzata come tecnica per confermare i classici metodi immunologici.

Attualmente, le allergie alimentari rappresentano un importante problema sanitario in tutto il mondo. Infatti, è stata confermata la possibilità reale che un'allergia si manifesti durante il corso della vita; anzi, è piuttosto comune che una persona, che ha sempre utilizzato un prodotto contenente determinati allergeni, inizi a manifestare segni di ipersensibilità verso una o più sostanze. Da qui la tendenza di molte industrie alimentari a produrre i cosiddetti prodotti "senza", utili e potenzialmente non nocivi.



1. L'elenco di tutte le proteine allergeniche sul sito [www.allergome.com](http://www.allergome.com)