

Chimica & Analitica

SICUREZZA DEGLI ALIMENTI *GLUTEN-FREE*: APPROCCI ANALITICI INNOVATIVI

Monica Mattarozzi*, Marco Giannetto, Maria Careri

Dipartimento di Scienze Chimiche, della Vita e della Sostenibilità Ambientale, Università di Parma e Centro Interdipartimentale SITEIA.PARMA, Università di Parma

monica.mattarozzi@unipr.it

DOI: <http://dx.medra.org/10.17374/CI.2019.6.5.43>

La valutazione della conformità degli alimenti dichiarati senza glutine rispetto alla legislazione europea vigente richiede l'applicazione di metodi analitici con un adeguato grado di sensibilità e affidabilità. Il presente articolo illustra lo sviluppo di due approcci analitici innovativi per la determinazione del glutine basati sulla biosensoristica e sulla cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa.

Innovative Analytical Approaches for Gluten-Free Food Safety

Assessment of compliance of food products declared as gluten-free requires the availability of sensitive and reliable analytical methods. The present article describes the development of innovative analytical methods for gluten determination based on biosensing devices and liquid chromatography coupled with mass spectrometry.

Studi epidemiologici dimostrano come l'incidenza della malattia celiaca, causata da una reazione autoimmune al glutine, sia in costante crescita soprattutto nei Paesi industrializzati, raggiungendo nei bambini una percentuale fino al 3% [1]. Poiché ad oggi la dieta senza glutine costituisce l'unica cura, negli ultimi anni si è osservato un notevole sviluppo nella produzione e commercializzazione di prodotti dichiarati "senza glutine", o "*gluten-free*", reperibili non solo in negozi specializzati, ma anche nella grande distribuzione. Il Regolamento (UE) N. 828/2014 prevede che la dicitura "*gluten-free*" sia consentita solo nel caso in cui il contenuto di glutine nell'alimento non sia superiore a 20 mg/kg, mentre definisce un alimento "con contenuto di glutine molto basso" quando la concentrazione del glutine non supera i 100 mg/kg. Rimane comunque irrisolto il problema della contaminazione accidentale, come dimostrato dalle numerose notifiche al Sistema di allerta rapido comunitario per alimenti e mangimi (RASFF) riguardanti la presenza di allergeni non dichiarati in etichetta, principalmente cereali contenenti glutine, oltre a latte ed uova [2]. In tale contesto, numerose attività di ricerca sono focalizzate sullo sviluppo di nuovi metodi sfruttando le più recenti tecnologie e strategie analitiche al fine di poter valutare in modo affidabile la conformità dei prodotti in commercio. La determinazione del glutine rappresenta una vera sfida dal punto di vista analitico: il glutine è infatti costituito da una miscela di centinaia di proteine con un elevato grado di omologia di sequenza ma con diverse caratteristiche chimico-fisiche ed un'elevata variabilità composizionale

* La Divisione di Chimica Analitica della SCI ha assegnato alla dott. Mattarozzi il premio "Giovane Ricercatore" 2018.

in base al tipo e alla varietà del cereale e alle condizioni di crescita. Tradizionalmente le proteine che compongono il glutine vengono suddivise approssimativamente in prolamine e gluteline, frazioni classificate in base alla loro solubilità o meno, rispettivamente, in soluzioni acquose alcoliche. La variazione della struttura proteica a seguito dei processi produttivi (cottura, idrolisi, fermentazione), in grado di alterarne anche le caratteristiche di estraibilità e di rivelabilità, introduce ulteriore complessità. Attualmente gli approcci analitici più comuni per la determinazione del glutine in alimenti sono rappresentati dai metodi immunologici: in particolare, il Codex Alimentarius e la AOECS (Association Of European Coeliac Societies) raccomandano l'uso di saggi ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), in configurazione *sandwich* o competitiva, basati sull'uso dell'anticorpo monoclonale R5.

Una promettente alternativa ai saggi ELISA tradizionali è rappresentata dai biosensori, in grado di garantire una maggiore sensibilità e semplicità d'uso abbinate alla possibilità di miniaturizzare i dispositivi per analisi *in situ*, soprattutto nel caso della trasduzione amperometrica. Inoltre, al fine di risolvere il problema della cross-reattività legata all'uso degli anticorpi, numerosi studi sono focalizzati sulla messa a punto di metodi non immunologici, che prevedono approcci di proteomica *bottom-up* basati sull'uso della cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (LC-MS o LC-MS/MS). Tale tecnica offre numerosi vantaggi in termini di "affidabilità" dell'identificazione, accuratezza del risultato e possibilità di diverse configurazioni strumentali con prestazioni elevate. In tale contesto, in un programma di ricerca volto allo sviluppo di metodi sensibili e selettivi per l'analisi di "allergeni nascosti" in tracce [3], il nostro gruppo di ricerca recentemente ha rivolto l'attenzione allo sviluppo e validazione di un innovativo immunosensore amperometrico di tipo competitivo indiretto [4] e di un metodo di conferma LC-MS/MS [5] per la determinazione di glutine in alimenti.

Immunosensore amperometrico

Il principio di funzionamento del biosensore sviluppato è schematizzato in Fig. 1; si sfrutta la competizione, per il legame con un anticorpo anti-gliadina, tra l'antigene (gliadina) immobilizzato su un elettrodo miniaturizzato di tipo *screen printed* e quello presente nell'estratto [4].

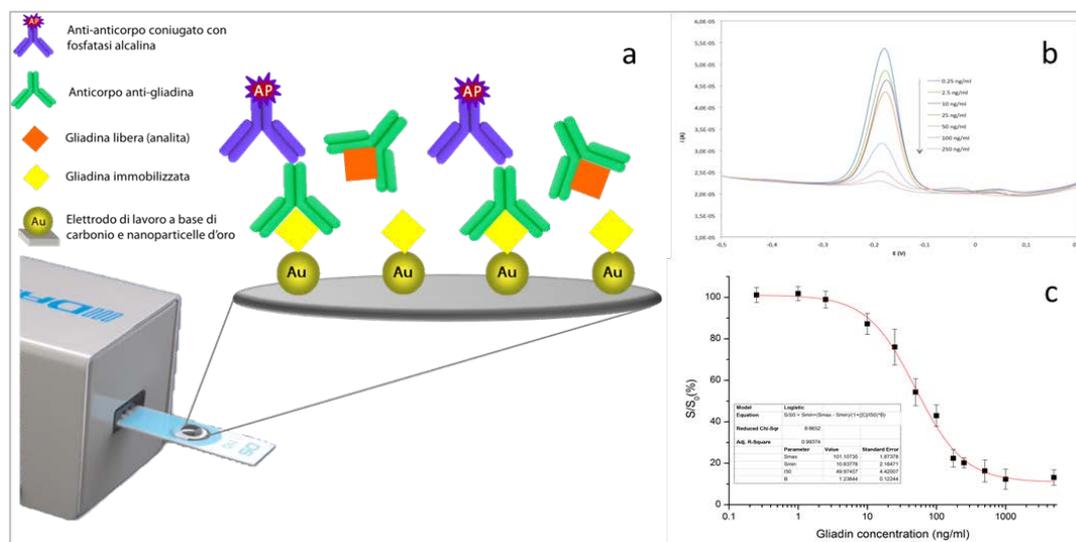


Fig. 1 - (a) Principio di funzionamento dell'immunosensore; (b) voltammogrammi differenziali ad impulsi a diverse concentrazioni di gliadina; (c) curva di inibizione nel caso dell'estratto in etanolo. (Riproduzione autorizzata del riferimento [4]. Copyright © 2016 Springer Nature)

L'anticorpo legato viene rivelato da un anti-anticorpo secondario, coniugato all'enzima fosfatasi alcalina, che promuove la defosforilazione del substrato idrochinone difosfato, rendendolo quindi elettrochimicamente attivo. Il segnale registrato risulta direttamente proporzionale alla

quantità di anticorpo legato all'elettrodo di lavoro, che quindi diminuisce all'aumentare della concentrazione dell'antigene nel campione. Le condizioni sperimentali ottimali per l'esecuzione del saggio sono state individuate tramite tecniche chemiometriche di disegno sperimentale, permettendo di raggiungere un valore di limite di quantificazione per la gliadina in estratto di etanolo pari a 22 µg/l, che in accordo con il fattore di conversione gliadina:glutine generalmente accettato corrispondono a 44 µg/l di glutine. In questo studio è stata valutata anche la compatibilità del sensore con la *Cocktail Solution*[®], contenente agenti riducenti e denaturanti, comunemente utilizzata per l'estrazione delle prolammine da prodotti alimentari; tali componenti hanno mostrato una interferenza nella fase di immunocompetizione, rendendo quindi necessaria una diluizione dell'estratto prima dell'analisi.

Metodo LC-MS/MS

Lo sviluppo di un metodo basato sulla tecnica LC-MS/MS ha permesso di identificare e determinare simultaneamente le prolammine associate ai quattro cereali celiotossici (gliadine, ordeine, secaline e avenine) [5] (Fig. 2). Tale discriminazione, non consentita dai metodi immunologici a causa della cross-reattività tra le diverse prolammine, è resa possibile selezionando mediante software bioinformatici peptidi unici e caratteristici di ciascun cereale. La fase di trattamento del campione ha comportato, oltre all'uso di agenti denaturanti e riducenti, l'esecuzione di una fase di *defatting* con esano e una purificazione mediante tecnica SPE (*Solid-Phase Extraction*), al fine di ridurre la soppressione del segnale riconducibile all'effetto matrice. Inizialmente il metodo è stato validato nella matrice farina di riso, ottenendo buone prestazioni analitiche, con limiti di quantificazione compresi tra i 3 e i 18 mg/kg a seconda del tipo di cereale. Per valutare l'applicabilità e le performance analitiche del metodo sono stati preparati dei campioni di pane "ricostituiti", effettuando la fortificazione con il cereale allergenico prima della lievitazione e cottura. È interessante evidenziare come l'effetto del processo produttivo, attribuibile soprattutto alla fase di cottura, abbia modificato in modo significativo l'estraibilità delle proteine target, con una diminuzione sostanziale del fattore di recupero. Emerge in modo chiaro come sia necessario investire ancora molte risorse nello sviluppo di metodi affidabili per l'analisi di allergeni in prodotti alimentari, con un particolare interesse verso l'ottimizzazione di metodi di estrazione, così come nello sviluppo di materiali di riferimento volto ad una armonizzazione dei metodi analitici.

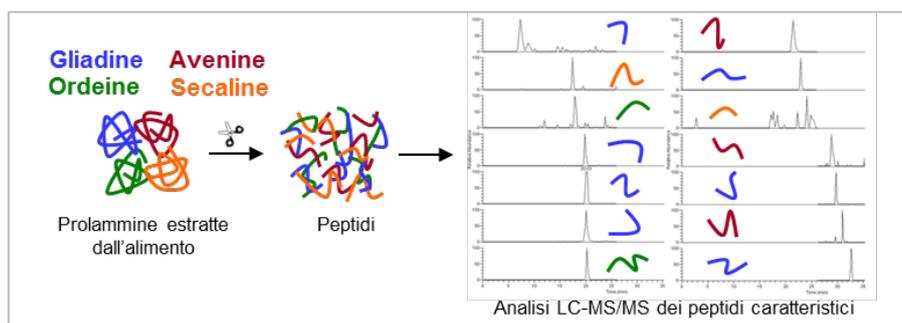


Fig. 2 - Approccio di proteomica bottom-up per la determinazione simultanea delle prolammine di frumento (gliadine), orzo (ordeine), segale (secaline) e avena (avenine). (Riproduzione autorizzata dal riferimento [5]. Copyright © 2015 Elsevier Ltd.)

BIBLIOGRAFIA

- ¹E. Liu, F. Dong *et al.*, *Gastroenterology*, 2017, **152**, 1329.
- ²I. Pádua, A. Moreira *et al.*, *Food Control*, 2019, **98**, 389.
- ³M. Mattarozzi, C. Bignardi *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2012, **60**, 5841.
- ⁴A. Manfredi, M. Giannettom *et al.*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, **408**, 7289.
- ⁵A. Manfredi, M. Mattarozzi *et al.*, *Anal. Chim. Acta*, 2015, **895**, 62.