eman ta zabal zazu

Universidad del País Vasco
Euskal Herriko Unibertsitatea

Laboratorio de Análisis de Gluten
UPV/EHU

Interés del control analítico del contenido en gluten de los productos alimentarios

Área de Nutrición y Bromatología

Dpto. Farmacia y Ciencias de los Alimentos

Facultad de Farmacia

INTRODUCCIÓN

Laboratorio de Análisis de Gluten
UPV/EHU

Inicio del Laboratorio: año 1998

- Más de 8000 productos alimentarios analizados.
- Diferentes técnicas de análisis: ELISA, PCR, etc
- Sistema de aseguramiento de calidad bajo norma ISO 17025 desde 2009.

INTRODUCCIÓN

Laboratorio de Análisis de Gluten
UPV/EHU

ENFERMEDAD CELIACA

- **Es una intolerancia anormal y permanente al gluten de la dieta.**

- **Enfermedad crónica intestinal más frecuente en nuestro país.**

  Prevalencia: ~1/100 nacidos vivos

- **Se presenta tanto en niños como en adultos.**

INTRODUCCIÓN

Laboratorio de Análisis de Gluten
UPV/EHU

¿Qué es el gluten?

Es una mezcla de proteínas que se encuentra en los cereales:

- prolaminas (solubles en alcohol)
- gluteninas (insolubles en alcohol

INTRODUCCIÓN

Laboratorio de Análisis de Gluten
UPV/EHU

¿Qué es el gluten?

	CEREAL	*Prolamina Tóxica*
	TRIGO	Gliadina
	CENTENO	Secalina
	CEBADA	Hordeína
	AVENA	¿Avenina?

INTRODUCCIÓN

Laboratorio de Análisis de Gluten
UPV/EHU

CEREALES PERMITIDOS

Maíz

Arroz

Sorgo

Mijo

Quinoa

Trigo sarraceno

Teff

PRESENCIA INVOLUNTARIA DE GLUTEN

Laboratorio de Análisis de Gluten
UPV/EHU

ELABORACIÓN DE ALIMENTOS: Contaminación Gluten

Posibles causas de contaminación con cereales tóxicos

- Crecimiento conjunto en los cultivos
- En el momento de la cosecha
- Durante la molienda
- Durante el transporte
- En la elaboración del producto final

PRESENCIA INVOLUNTARIA DE GLUTEN

Laboratorio de Análisis de Gluten
UPV/EHU

MATRICES ALIMENTARIAS HETEROGÉNEAS

SOMETIDAS A Tª ELEVADA | **INTACTAS/ ELABORADAS** | **HIDROLIZADAS**

Preparación de las muestras

EXTRACCIÓN

SOLUCIÓN HIDROALCÓHOLICA 60%

\+ AGENTE REDUCTOR

\+ PVP

\+ ……

PRESENCIA INVOLUNTARIA DE GLUTEN

Laboratorio de Análisis de Gluten
UPV/EHU

EJEMPLOS DE MATRICES COMPLEJAS

Productos hidrolizados o parcialmente hidrolizados:

siropes, cervezas, wiskys y otros

Almidones, extractos de cereales

Otras: soja, chocolates y ricos en taninos, fermentados, etc.

LEGISLACIÓN

Laboratorio de Análisis de Gluten
UPV/EHU

REGLAMENTO (CE) No 41/2009 DE LA COMISIÓN

En vigor desde enero de 2012

- Alimentos de reducido contenido en gluten: < 100 mg/kg de gluten
- Alimentos "exentos de gluten": < 20 mg/kg de gluten

Marca de garantía "Controlado por FACE"

Límite de 10 mg/kg de gluten

CODEX ALIMENTARIUS (Norma rev, Julio 2008)

Reglamento Europeo 41/2009

ALINORM 08/31/26, Apéndice III

2.1 Definiciones

Los productos regulados por la presente Norma son los siguientes:

2.1.1 Alimentos exentos de gluten

Los alimentos exentos de gluten son alimentos dietéticos que:

a) están constituidos por, o son elaborados únicamente con, uno o más ingredientes que no contienen trigo (es decir, todas las especies de *Triticum*, como el trigo duro, la espelta y el kamut), centeno, cebada, avena[1] o sus variedades híbridas, y cuyo contenido de gluten no sobrepasa los 20 mg/kg en total, medido en los alimentos tal como se venden o distribuyen al consumidor;

b) están constituidos por uno o más ingredientes procedentes del trigo (es decir, todas las especies de *Triticum*, como el trigo duro, la espelta y el kamut), el centeno, la cebada, la avena[1] o sus variedades híbridas que han sido procesados de forma especial para eliminar el gluten, y cuyo contenido de gluten no sobrepasa los 20 mg/kg en total, medido en los alimentos tal como se venden o distribuyen al consumidor.

2.1.2 Alimentos procesados de forma especial para reducir el contenido de gluten a un nivel comprendido entre 20 mg/kg y 100 mg/kg

Estos alimentos están constituidos por uno o más ingredientes procedentes del trigo (es decir, todas las especies de *Triticum*, como el trigo duro, la espelta y el kamut), el centeno, la cebada, la avena[1] o sus variedades híbridas que han sido procesados de forma especial para reducir el contenido de gluten a un nivel comprendido entre 20 mg/kg y 100 mg/kg en total, medido en los alimentos tal como se venden o distribuyen al consumidor.

Las decisiones relativas a la comercialización de los productos descritos en esta sección podrán adoptarse a nivel nacional.

CODEX ALIMENTARIUS (Norma revisada, Julio 2008)

ALINORM 08/31/26, Apéndice III

5. MÉTODOS DE ANÁLISIS Y MUESTREO

5.1 Descripción general de los métodos

La determinación de la cantidad de gluten presente en los alimentos e ingredientes deberá basarse en un método inmunológico o en otro método que ofrezca como mínimo la misma sensibilidad y especificidad.

tóxicas para las personas intolerantes al gluten y no deberían reaccionar a otras proteínas de los cereales ni a otros constituyentes de los alimentos o ingredientes.

- Los métodos utilizados para la determinación deberían validarse y calibrarse en relación con material de referencia certificado, de haberlo.
- El límite de detección debe ser el apropiado con arreglo a la norma técnica y a los métodos más avanzados. Dicho límite debería ser igual o inferior a 10 mg/kg.

El análisis cualitativo que indique la presencia de gluten deberá basarse en métodos pertinentes (p. ej. métodos de ensayo con sustancias inmunoabsorbentes unidas a enzimas [ELISA] o basados en el ADN)

5.2 Método de determinación del gluten

Método ensayo sust. inmunoabsorbentes unidas enzimas (ELISA) R5 Méndez.

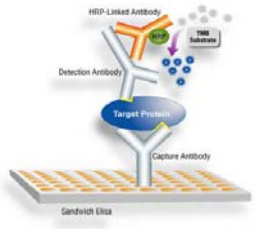
TÉCNICAS UTILIZADAS EN EL LABORATORIO

Laboratorio de Análisis de Gluten
UPV/EHU

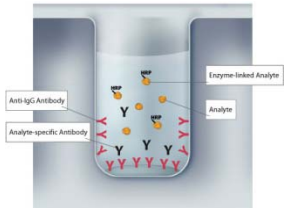
DETERMINACIÓN EN MUESTRAS DE ALIMENTOS

CONTENIDO PROTEICO EN GLUTEN

ELISA



ELISA Sandwich



ELISA Competitivo

CONTENIDO EN DNA DE CEREALES QUE CONTIENEN GLUTEN

PCR

PCR con WBR primers (cuantitativo)

TÉCNICAS UTILIZADAS EN EL LABORATORIO

Laboratorio de Análisis de Gluten
UPV/EHU

ELISA SANDWICH

Método Skerrit & Hill (AOAC, 1991)

Anticuerpo frente a **w-gliadinas**- resistentes al calor

Método Méndez (Méndez et al, 2002) – Codex Alimentario, 2008

Anticuerpo R5 frente al epítopo presente en 33 mer

Extracción mejorada

Otros: Glutentox G12 (Morón et al, 2008)

TÉCNICAS UTILIZADAS EN EL LABORATORIO

Laboratorio de Análisis de Gluten
UPV/EHU

ELISA COMPETITIVO

Método Méndez (Méndez et al, 2002) - BIOPHARM

ÚTIL PARA GLUTEN HIDROLIZADO

Otros: Gluten Tec (Mujico et al, 2012)

TÉCNICAS UTILIZADAS EN EL LABORATORIO

Laboratorio de Análisis de Gluten
UPV/EHU

OTRAS TÉCNICAS INMUNOCROMÁTICAS

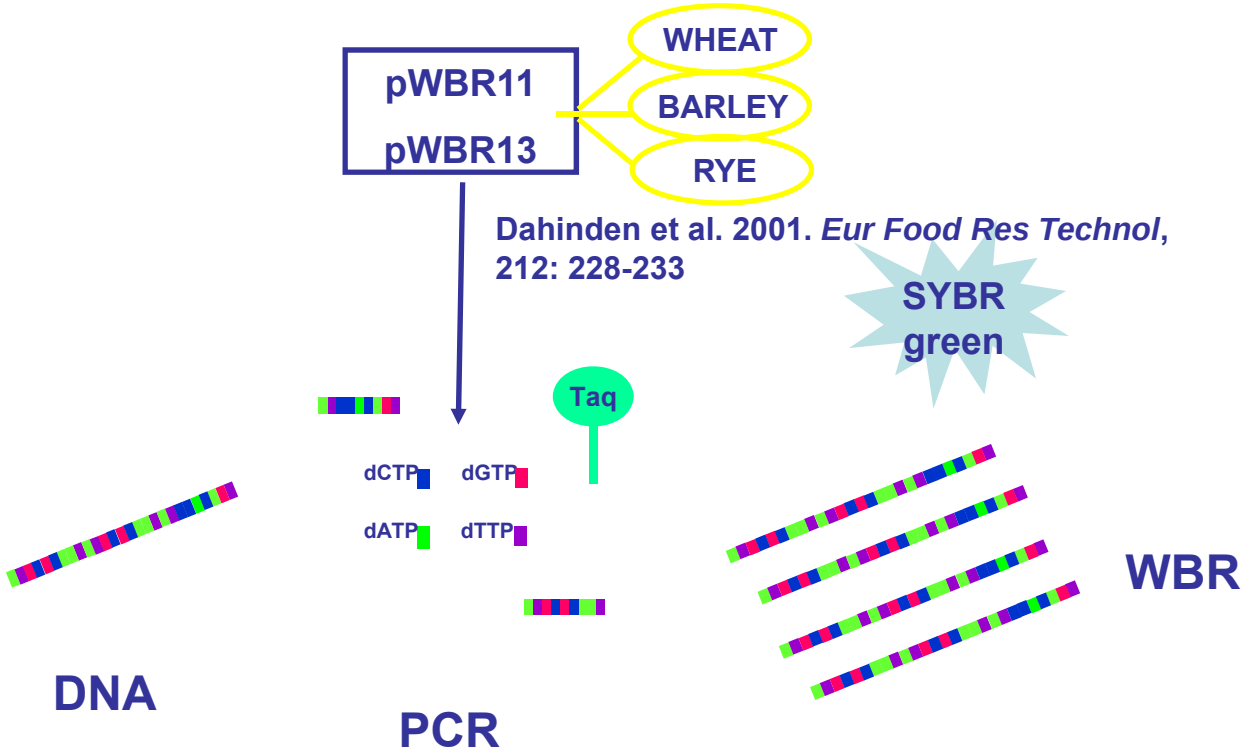
Tiras Inmunocromáticas

TÉCNICAS UTILIZADAS EN EL LABORATORIO

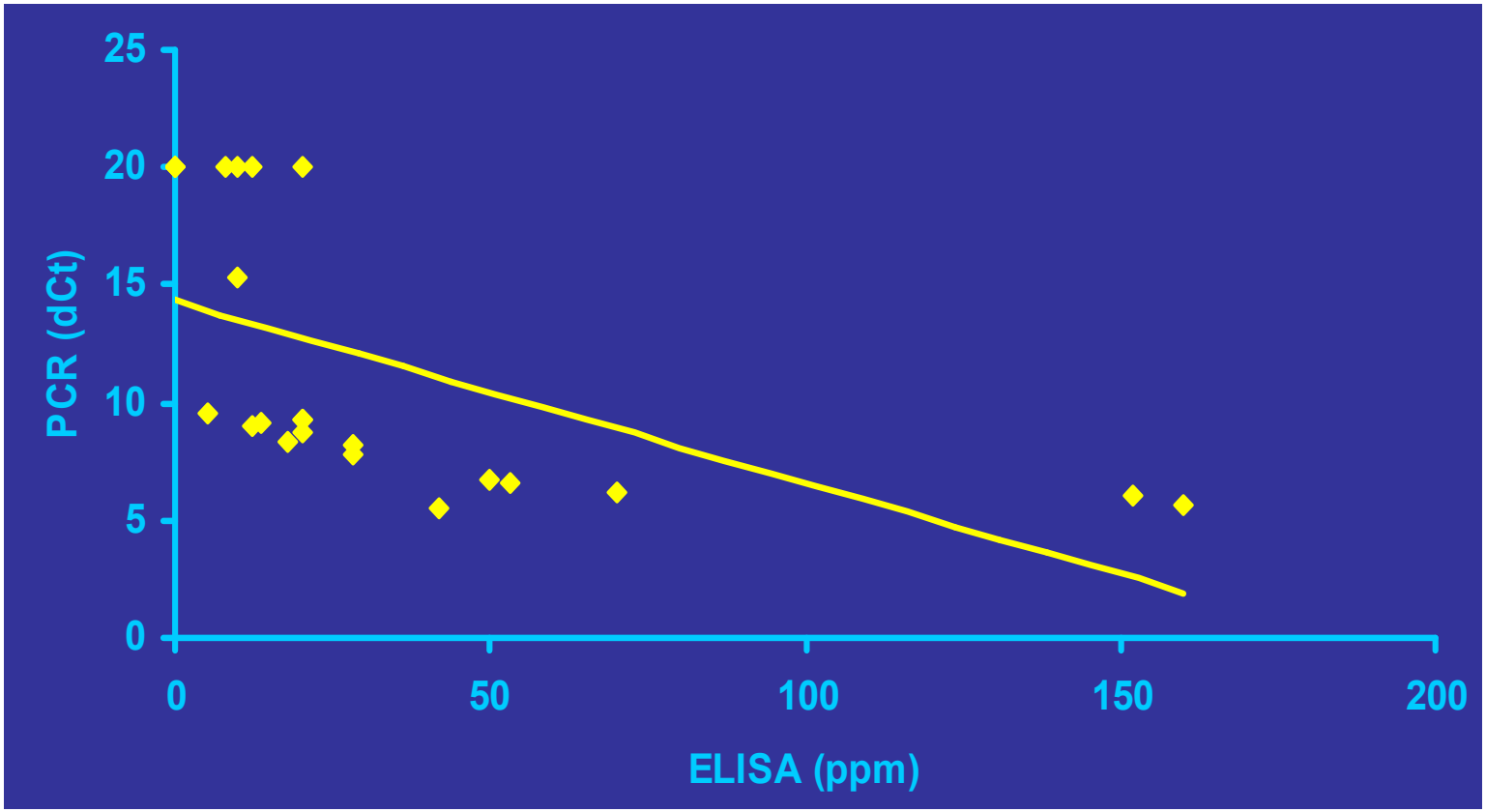
Laboratorio de Análisis de Gluten
UPV/EHU

DISEÑO DE PCR CUANTITATIVA

WBR-DNA por PCR a tiempo real con primers diseñados



2. PCR cuantitativo *vs* ELISA



2. PCR cuantitativo *vs* ELISA

ELISA (ppm)	PCR (ΔCt)
> 200	< 5
100 – 200	5.1 – 6
20 – 100	6.1 – 8
10 – 20	8.1 – 10
< 10	> 10

Laboratorio de Análisis de Gluten
UPV/EHU

Universidad del País Vasco
Euskal Herriko Unibertsitatea

ALIMENTOS ANALIZADOS

8000 muestras

Laboratorio de Análisis de Gluten UPV/EHU

Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea

DISTRIBUCIÓN POR GRUPO DE ALIMENTOS

GRUPO ALIMENTARIOS	% muestras positivas
Cereales y derivados	11
Productos cárnicos	4
Especias y condimentos	20
Productos infantiles	8

Laboratorio de Análisis de Gluten UPV/EHU

Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

CEREALES Y DERIVADOS

AÑO	Muestras analizadas	% positivas
1998-2001	325	37
2002-2003	132	18
2004-2005	478	10
2006-2010	1076	9

MÁS INFORMACIÓN

Laboratorio de Análisis de Gluten
UPV/EHU

http://glutenehu.blogspot.com.es/

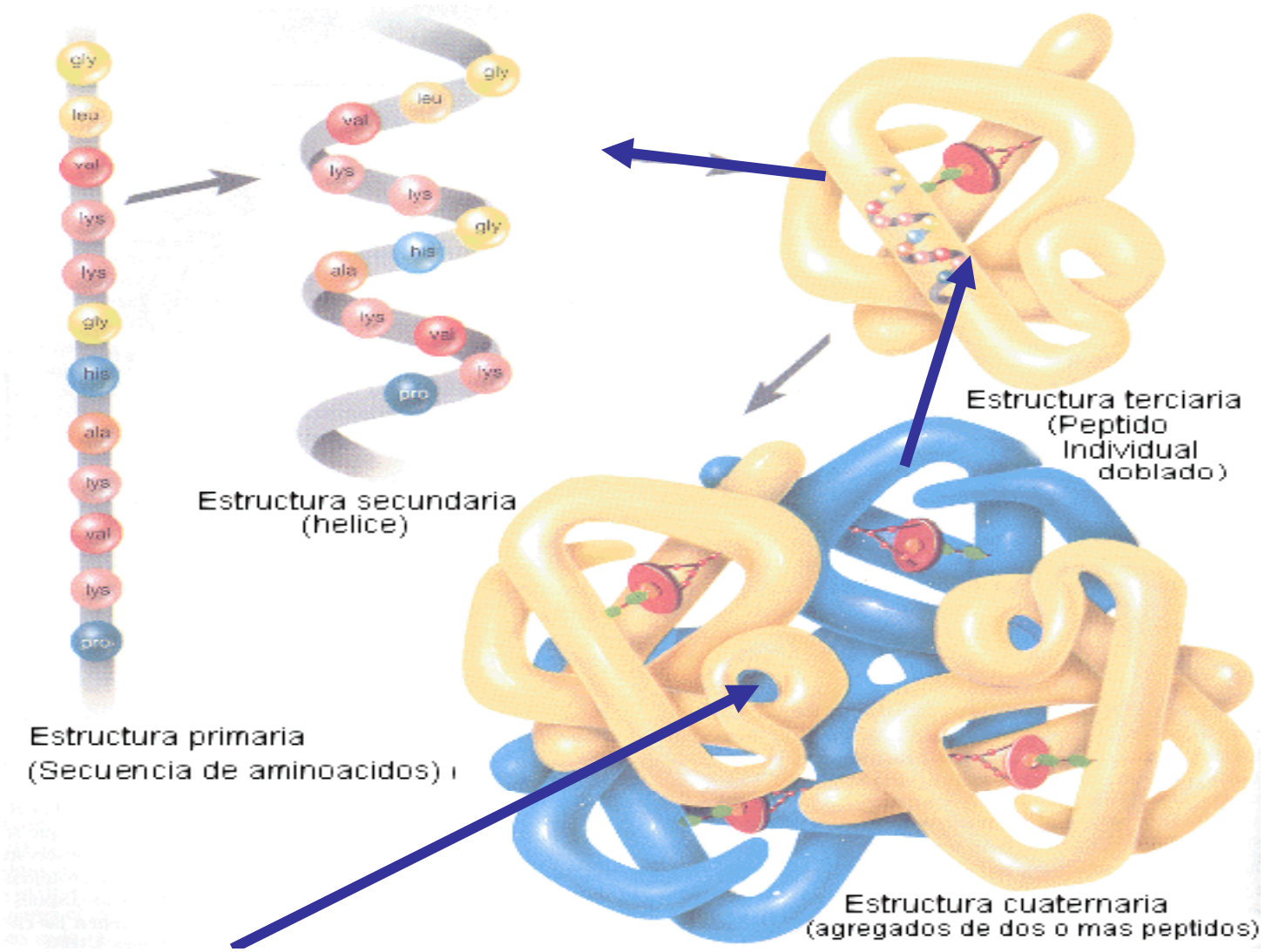
Laboratorio de Análisis de Gluten
UPV/EHU

Acreditado bajo la norma

ISO 17025

para la

[redacted]

DETERMINACIÓN DE GLUTEN EN ALIMENTOS, ADITIVOS Y PRODUCTOS DE PARAFARMACIA

COCKTAIL DE EXTRACCIÓN DEL ANTÍGENO: GLIADINA