



universidad
de león



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**PAN SIN GLUTEN: ESTUDIO DE MERCADO Y
CUMPLIMIENTO DE LA NORMATIVA EN LEÓN**

**GLUTEN-FREE BREAD: MARKET RESEARCH
AND COMPLIANCE IN LEÓN.**

Autor: Yaiza González Rodríguez

Tutores: Miguel Angel Ferrero García

Isabel San Martín Bécares

GRADO EN Biología

Septiembre, 2022

Índice de contenidos

1. Introducción	1
1.1 La enfermedad celíaca	1
1.2 El gluten en el pan	3
2. Objetivos	5
3. Estudio sobre la legislación referente a la enfermedad celíaca y métodos de análisis del gluten en los alimentos.	6
3.1 Materiales y métodos	6
3.2 Legislación sobre la enfermedad celíaca	6
3.2.1 Normativa Nacional	6
3.2.2 Normativa Europea	6
3.2.3 Normativa Internacional Extraeuropea	7
3.2.4 Límites de valores de gluten para el etiquetado en Europa	7
3.3 Métodos de extracción y cuantificación del gluten en alimentos	9
3.3.1 Métodos de extracción de prolaminas	9
3.3.2 Métodos de cuantificación de gluten	10
3.4 Discusión	12
4. Análisis del gluten presente en los panes obtenidos a través de la realización de encuestas en las panaderías de León.	13
4.1 Materiales y métodos	13
4.1.1 Materiales	13
4.1.2 Métodos	14
4.2 Resultados y discusión	16
5. Conclusiones	22
6. Bibliografía	24

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación del producto y los límites permitidos de gluten por el Codex Alimentarius	7
Tabla 2. Concentración de los estándares y absorbancia de cada uno de ellos.....	21
Tabla 3. Panes analizados junto con su absorbancia y concentración en ng/ml obtenidos de la ecuación de la recta patrón y en mg/kg.	22

Índice de figuras

Figura 1. Etiquetado para los productos libres de gluten (imagen extraída de la página de la federación de asociaciones de celíacos de España).....	8
Figura 2. Etiquetado para los productos muy bajos en gluten (imagen extraída de la página de la federación de asociaciones de celíacos de España).....	9
Figura 3. Esquema de las etapas de los métodos a) ELISA sándwich y b) competitivo, extraído de la página Web de la empresa Dr. Schär Institute.	10
Figura 4. Encuesta creada para realizar en las diferentes panaderías.....	13
Figura 5. Principio del test utilizado para la cuantificación del gluten (imagen extraída de Docplayer).....	15
Figura 6. Corte transversal de la barra de pan de Natural repostería.	17
Figura 7. Corte transversal de la hogaza de Natural repostería.....	18
Figura 8. Rebanada de hogaza del Mercadona.....	19
Figura 9. Corte transversal de la barra del Alimerka.	19
Figura 10. Corte transversal del bollo de pan del Alimerka.....	20
Figura 11. Panes utilizados para la cuantificación del gluten antes de su homogenización. (De izquierda a derecha: Hogaza de Mercadona, barra de Natural repostería, Hogaza de Natural repostería, barra de Alimerka, bollo de Alimerka).....	20
Figura 12. Muestras homogenizadas para la extracción del gluten.....	21
Figura 13. Recta patrón que representa la absorbancia con respecto a la concentración de gluten en ng/ml, obtenida de los estándares presentes en el kit ELISA.	22

Resumen

La enfermedad celíaca se define como una patología multisistémica con base autoinmune provocada por la ingesta de gluten. El término "gluten" incluye las proteínas de almacenamiento estrechamente relacionadas del trigo, centeno, cebada y avena. La importancia de estas proteínas formadoras de gluten radica en que juegan un papel fundamental en la elaboración de productos de panificación. En cuanto al etiquetado de los productos libres de gluten, tanto la normativa europea como el *Codex Alimentarius* declaran alimentos sin gluten aquellos que no contengan más de 20 mg de gluten por kg de alimento. Para cuantificar la cantidad de gluten existen diferentes métodos, pero los kits ELISA son los más efectivos y utilizados. Por ello, para nuestro estudio utilizamos un Kit Elisa-R5.

Durante la realización de este trabajo, se llevaron a cabo varias encuestas a diferentes panaderías en la ciudad de León. Con los datos obtenidos de las encuestas observamos que los celíacos encuentran muchas dificultades a la hora de encontrar panes de buena calidad que no contengan gluten. En la ciudad de León existen, únicamente, dos establecimientos en los cuales se pueden adquirir estos productos además de los supermercados. Tras analizar en el laboratorio, concluimos que efectivamente el pan que se vende en Natural repostería, Mercadona y Alimerka es un pan libre de gluten, apto para el consumo de celíacos.

Palabras clave: Elisa, Enfermedad Celíaca, Gluten, Pan, Proteína.

Abstract

Celiac disease is defined as a multisystemic autoimmune-based pathology caused by gluten. The term "gluten" includes the closely related storage proteins of wheat, rye, barley and oats. The importance of these gluten-forming proteins lies in the fact that they play a fundamental role in the production of bakery products. Regarding the labelling of gluten-free products, both European regulations and *Codex Alimentarius* declare gluten-free foods that do not contain more than 20 mg of gluten per-kg of food. To quantify the amount of gluten there are different methods, but ELISA kits are the most effective and used. Therefore, for our study we use a Kit Elisa-R5.

During this work, several surveys were carried out to different bakeries in the city of León. With the data obtained from the surveys we observed that celiacs encounter many difficulties when it comes to finding good quality bread that does not contain gluten. In the city of León there are only two establishments in which these products can be purchased in addition to supermarkets. We analyzed these breads and with the results obtained from the laboratory analysis, we concluded that effectively the bread sold in Natural pastries, Mercadona and Alimerka is a gluten-free bread, suitable for the consumption of celiacs.

Keywords: Bread, Celiac Disease, Elisa, Gluten, Protein.

1. Introducción

1.1 La enfermedad celíaca

La enfermedad celíaca (EC) es la enfermedad más común entre los trastornos relacionados con la ingesta del gluten (Caio *et al.*, 2020). La EC se define según la Federación de Asociaciones de Celíacos de España (FACE) como una patología multisistémica con base autoinmune provocada por la ingesta de gluten y prolaminas relacionadas, en individuos genéticamente susceptibles. La interacción de factores genéticos y ambientales lleva a la pérdida de tolerancia a ciertas proteínas presentes en algunos cereales (Sciarini *et al.*, 2016).

Aproximadamente, el 95 % de los pacientes con enfermedad celíaca expresan los antígenos leucocitarios humanos (HLA, por sus siglas en inglés), IDQ2 en un 90 - 95 % y DQ8 en un 5-10 %. Sin embargo, su presencia se considera necesaria pero no suficiente para desarrollar la enfermedad, ya que la mayoría de las personas HLA-DQ2 o DQ8 positivos no la presentan. Según un metaanálisis reciente, la prevalencia mundial combinada de la autoinmunidad de EC es del 1,4 % (Scherf *et al.*, 2020). Este mismo estudio demostró, además, que el porcentaje de casos que se diagnostican clínicamente es mucho menor que la prevalencia general de EC.

La enfermedad celíaca se manifiesta a cualquier edad, aunque hay una mayor incidencia en la primera y cuarta década de vida (Correa-Parra *et al.*, 2021). Además, existen grupos de alto riesgo, entre los que se incluyen familiares, especialmente de primer grado. Un antecedente familiar de enfermedad celíaca definida por biopsia es el antecedente más importante con algunas estimaciones de hasta el 20% en familiares de primer grado.

También son grupos de alto riesgo: Enfermos de anemia, especialmente por deficiencia de hierro, pacientes con enfermedad ósea osteogénica, personas con diabetes insulino dependiente (tipo 1), con trastornos hepáticos, trastornos genéticos, incluidos los síndromes de Down y Turner, con endocrinopatía autoinmunitaria, especialmente enfermedad de la tiroides, trastornos de la piel, en particular dermatitis herpetiforme y trastornos neurológicos, como ataxia y convulsiones (Freeman, 2010).

La EC se presenta en formas sintomática o asintomática (Scherf *et al.*, 2020). Los síntomas se suelen detectar a edades tempranas de la vida, generalmente al introducir los cereales que contienen gluten en la alimentación del niño (6-12 meses de vida). Sin embargo, desde la última década del siglo XX, se han ido detectando pacientes con escasos síntomas o ausencia de estos

y en edades más tardías de la vida (incluso en la 7ª década) (Olivencia Palomar *et al.*, 2005). Estos síntomas son muy variables y se suelen clasificar en digestivos, que son la presentación clínica clásica de la enfermedad, y extradigestivos. Ambos dependen de la edad, ya que los síntomas no se presentan de la misma forma en diferentes edades. Entre los digestivos, se encuentran síntomas dispépticos, reflujo gastroesofágico y síntomas similares al síndrome de colon irritable, entre otros. Entre los extradigestivos se incluyen el compromiso de diferentes sistemas como neurológico, cardiopulmonar, renal, endocrinológico, dermatológico, etc (Correa-Parra *et al.*, 2021). Paradójicamente, los síntomas digestivos se presentan con menor frecuencia, por lo que las manifestaciones extraintestinales toman gran importancia, ya que su reconocimiento podría ayudar a un diagnóstico temprano y oportuno y reducir así el riesgo de neoplasias digestivas, que son más frecuentes en pacientes con enfermedad celíaca con respecto a la población general (Correa-Parra *et al.*, 2021).

El diagnóstico de la enfermedad celíaca ha variado mucho a medida que la evidencia científica iba proporcionando nuevos conocimientos. Así, en el año 2006, el principal requisito para el diagnóstico de enfermedad celíaca era el hallazgo de la lesión de intestino delgado, característico en el examen anatomopatológico, basado en criterios bien establecidos. El segundo requisito era la inducción de la remisión clínica con una dieta sin gluten. La biopsia de duodeno distal, tomada durante una gastroscopia estándar, constituía el “patrón oro” para el diagnóstico de la enfermedad celíaca, dado su elevado valor predictivo positivo y negativo. Actualmente, el diagnóstico de enfermedad celíaca ha incorporado nuevos criterios y elementos que hacen más precisa la detección de la enfermedad. Estos criterios se basan en la historia clínica, serología, endoscopia e histología (Salanova, 2017).

El método más utilizado es el estudio serológico. La prueba serológica actualmente recomendada, tanto en niños como en adultos, es la detección del anticuerpo IgA contra la transglutaminasa tisular (ATG IgA), que es una prueba rápida, objetiva, de fácil interpretación, de elevada sensibilidad y especificidad (Kowalski *et al.*, 2017). Es, además, más económica que un perfil o panel de diversos autoanticuerpos. Otra prueba de utilidad es la detección del anticuerpo IgA contra el endomisio (EMA IgA), aunque es una técnica más engorrosa, con mayor costo y de interpretación subjetiva. Los niveles elevados de EMA se correlacionan con la gravedad de la lesión intestinal (Real Delor, 2016).

Aunque el diagnóstico de EC generalmente se basa en síntomas típicos y hallazgos histológicos y de laboratorio, hay casos poco claros en los que se requiere un examen más detallado. Cada método de diagnóstico es susceptible a diferentes factores que influyen en su resultado, lo que

debe tenerse en cuenta al evaluar los resultados. Un enfoque de diagnóstico cuidadoso y preciso reduce el riesgo de diagnóstico erróneo (Kowalski *et al.*, 2017).

Hasta ahora, el único tratamiento eficaz para la enfermedad celíaca es una dieta libre de gluten que se basa esencialmente en el consumo de alimentos naturalmente libres de gluten, como productos de origen animal, frutas, verduras, legumbres y nueces, así como productos dietéticos sin gluten (Scherf *et al.*, 2020). Anteriormente, las harinas sin gluten no estaban enriquecidas con nutrientes, lo que provocaba deficiencias nutricionales (por ejemplo, en hierro o vitaminas B) en pacientes con enfermedad celíaca después de una dieta libre de gluten. Las recomendaciones actuales se centran en lo que se puede comer y en elegir productos naturalmente libres de gluten con un alto valor nutricional, incluida la fibra (Rubin y Crowe, 2020).

1.2 El gluten en el pan

El término "gluten" incluye las proteínas de almacenamiento estrechamente relacionadas del trigo (gliadinas y gluteninas), centeno (secalinas), cebada (hordeínas) y avena (aveninas). (Scherf *et al.*, 2020). El gluten es un compuesto muy complejo, caracterizado por un alto polimorfismo (Briani *et al.*, 2008).

El trigo es uno de los cereales más importantes del mundo. Aunque el almidón es el componente principal de los granos de trigo (60 a 75 %), las proteínas del grano (9 a 18 %) son esenciales para la calidad del pan (García-Molina *et al.*, 2019). Las proteínas de los cereales se clasifican en cuatro tipos de acuerdo con su solubilidad: a) albúminas, que son solubles en agua; b) globulinas, las cuales son insolubles en agua y solubles en soluciones salinas diluidas; c) prolaminas, insolubles en agua y en soluciones salinas y solubles en alcohol al 70%; d) glutelinas, insolubles en los solventes anteriormente mencionados y solubles en ácidos o bases diluidos o en detergentes. Las proteínas del trigo están formadas en un 20-25% por albuminas y globulinas, que son proteínas no formadoras de gluten. El otro 75-80% de las proteínas, son prolaminas y gluteninas. Las proteínas formadoras de gluten juegan un papel fundamental en la elaboración de productos de panificación, fundamentalmente en aquellos que son sometidos a un proceso de leudado (Sciarini *et al.*, 2016).

La funcionalidad de la proteína del gluten es fundamental para la calidad del pan. Los experimentos de fraccionamiento y reconstitución muestran claramente que las variaciones en el rendimiento de la panificación están determinadas por las proteínas del gluten.

El pan es un alimento nutricionalmente balanceado ya que es fuente de energía, proteínas,

vitaminas, minerales y fibra dietética. Es un producto obtenido gracias a la acción de levaduras que fermentan el azúcar de la harina de trigo producida por la hidrólisis del almidón (por parte de las enzimas naturalmente presentes en la harina). Durante la fermentación se generan gases como producto de la actividad metabólica de las levaduras. Muchos microorganismos pueden fermentar azúcares para producir dióxido de carbono (CO₂). El CO₂ es el responsable del aumento de volumen de la masa, mientras que el alcohol colabora en la producción del aroma complejo de estos productos horneados (Sciarini *et al.*, 2016).

En cuanto a la panificación y el objeto de convertir la mezcla de ingredientes en una estructura esponjosa como lo es la miga de pan, se siguen una serie de procesos que llevan, en su conjunto, a la obtención de una masa con las propiedades mecánicas apropiadas que permitan la retención de gases, que da como resultado una pieza de pan expandida con una estructura de miga pareja. Independientemente del proceso de panificación tres hechos ocurren siempre. Por un lado, la hidratación ya que el amasado de los ingredientes, además de la tarea obvia de mezclarlos, tiene como función distribuir el agua entre los polímeros. Por otro lado, el desarrollo del gluten, aunque algunas de las proteínas presentes en la harina son solubles en agua, es en las proteínas insolubles, conocidas colectivamente como gluten, donde se enfocan los estudios que pretenden elucidar cómo el trabajo aplicado transforma al agua y la harina en una masa cohesiva. Cuando la masa se desarrolla bajo condiciones óptimas, estas proteínas forman una red viscoelástica que retiene el aire, y contiene a los gránulos de almidón y otros materiales. El óptimo desarrollo del gluten durante el amasado es vital para la formación de la estructura de la miga. Otro hecho es la incorporación y retención del aire, durante el amasado debe incorporarse el aire que formará la fase gaseosa de la miga de pan (Sciarini *et al.*, 2016).

La sustitución del gluten en el pan sin gluten presenta un gran desafío tecnológico, ya que el gluten es esencial para la construcción de estructuras, lo que contribuye a la apariencia y la estructura de la miga de muchos productos horneados. La propuesta más común para reemplazar al gluten es usar una mezcla de almidones, hidrocoloides, fibras e ingredientes lácteos para que, todos juntos, otorguen la funcionalidad necesaria. Estas materias primas tienen una mayor capacidad de absorción de agua en relación con la harina de trigo, por lo que el contenido de agua de las masas libres de gluten es generalmente alto. Esto significa que la tecnología y la metodología empleadas a la hora de obtener panes libres de gluten son distintas que las utilizadas en el proceso de panificación convencional.

En los últimos años, se han desarrollado panes libres de gluten aplicando diversos enfoques tales como el uso de diferentes tipos de almidón procedente de maíz, patata, mandioca o arroz ; harinas de legumbres, trigo sarraceno, sorgo y granos andinos; productos lácteos;

hidrocoloides tales como gelatina y almidón, emulsificantes; proteínas sin gluten y prebióticos, para mejorar su estructura, sabor, aceptabilidad y tiempo de vida útil, como así también modificaciones en la metodología de elaboración (Arendt Elke y Fabio Dal Bello, 2008).

La adición de hidrocoloides es muy eficaz para mejorar la estructura del pan sin gluten cuando se agrega una fuente rica en proteínas. Los hidrocoloides se utilizan para crear una red viscoelástica con el fin de equilibrar la falta de gluten (Culetu *et al.*, 2021). Tienen la capacidad de aumentar la viscosidad y la capacidad de retención de agua del sistema de masa debido al alto peso molecular y ayudan a crear una estructura más estable (Skendi *et al.*, 2021). Es recomendable utilizar transglutaminasa en panes sin gluten que contengan fuentes proteicas añadidas porque ayuda a la creación de una red proteica en la masa sin gluten (Skendi *et al.*, 2021).

2. Objetivos

El presente trabajo pretende ser un trabajo mixto, en el que desarrollaremos:

- a) Una parte bibliográfica. Esta parte está basada en la búsqueda de información sobre la enfermedad celíaca, el gluten, la legislación existente sobre el etiquetado de los productos libres de gluten, los métodos de análisis del gluten en los alimentos y el papel del gluten en el pan.
- b) Una parte experimental. Esta parte está basada en la realización de encuestas a panaderías de León y un posterior análisis en laboratorio de muestras obtenidas en algunas de estas panaderías.

Por tanto, los objetivos del trabajo son los siguientes:

- Ampliar conocimientos sobre la enfermedad celíaca, sobre la importancia del gluten a la hora de producir pan y cuáles pueden ser alternativas para conseguir panes libres de gluten. Revisar la legislación referente a la enfermedad celíaca y ver los diferentes métodos de análisis del gluten en el laboratorio.
- Determinar la facilidad con la que las personas celiacas pueden acceder al pan sin gluten en la ciudad de León.
- Comprobar que el contenido en gluten del pan de las panaderías de León encuestadas se ajusta a los límites establecidos por la ley analizándolo mediante un ELISA cuantitativo.

3. Estudio sobre la legislación referente a la enfermedad celíaca y métodos de análisis del gluten en los alimentos.

En esta primera parte del trabajo se presenta información acerca de la legislación relativa a la enfermedad celíaca, y a los niveles de gluten permitidos en los productos alimenticios para su consumo por personas con intolerancia al gluten, así como los métodos de análisis del gluten en los alimentos.

3.1 Materiales y métodos

La metodología utilizada ha sido la lectura, selección y análisis de normativas, artículos originales, revisiones y reglamentos para la extracción y análisis de los datos en función de su relevancia y calidad.

3.2 Legislación sobre la enfermedad celíaca

3.2.1 Normativa Nacional

A nivel Nacional, todo lo relativo a la EC está regulada por la Ley 26588/2009 y por el Decreto 528/2011. Este decreto, declara de interés nacional la atención médica, la investigación clínica y epidemiológica, la capacitación profesional en la detección temprana, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad celíaca, su difusión y el acceso a los alimentos libres de gluten. En 2015 la Ley 27196 modifica la Ley 26588 en cuanto a que los hospitales, cárceles, restaurantes, bares, comedores, kioscos, instituciones de enseñanza y paradores deben ofrecer al menos una opción de alimentos o un menú libre de gluten que cumpla con las condiciones de manufactura y los requerimientos nutricionales por porción, que certifique la autoridad.

3.2.2 Normativa Europea

En el diario oficial de la Unión Europea encontramos el reglamento de ejecución número 828/2014 de la comisión del 30 de julio de 2014 relativo a los requisitos para la transmisión de información a los consumidores sobre la ausencia o la presencia reducida de gluten en los alimentos.

El punto número dos de este reglamento establece que “ La existencia de información sobre la ausencia o la presencia reducida de gluten en los alimentos debería ayudar a las personas con intolerancia al gluten a identificar y elegir una dieta variada cuando comen dentro o fuera del hogar.” (Comisión Europea (2014), Reglamento (UE) 828/2014) . El reglamento n °41/2009 de la Comisión Europea establece normas armonizadas acerca de la información que se facilita a los consumidores sobre la ausencia (“sin gluten”) o la presencia reducida de gluten (“muy bajo

en gluten”) en los alimentos. Las normas de dicho Reglamento se basan en datos científicos y garantizan que los consumidores no sean inducidos a error o a confusión debido a que se les facilite información con bases divergentes acerca de la ausencia o la presencia reducida de gluten en los alimentos. (Comisión Europea (2014), Reglamento (UE) 828/2014). Además, este reglamento incluye la necesidad de que la información sobre ausencia o presencia de gluten se basará únicamente en datos científicos.

Si nos atenemos a lo que dispone el artículo 3 (“Información a los consumidores”) del Reglamento de ejecución nº 828/2014:

1. Cuando se utilicen declaraciones para proporcionar información a los consumidores sobre la ausencia o la presencia reducida de gluten en los alimentos, dichas declaraciones se transmitirán de acuerdo con las condiciones establecidas.
2. La información alimentaria a que hace referencia el apartado 1 podrá ir acompañada de las declaraciones “adecuado para las personas con intolerancia al gluten” o “adecuado para celíacos” (Comisión europea (2014), Reglamento (UE) 828/2014).

3.2.3 Normativa Internacional Extraeuropea

A nivel internacional existe una Comisión dependiente de la Organización Mundial de la Salud encargada de las normativas para la identificación y control de alimentos: *Codex Alimentarius*, la Comisión de Nutrición y Alimentos para Usos en Dietas Especiales. En el año 1981 *el Codex Alimentarius* propuso el uso de dos límites para la identificación de productos para el consumo por pacientes con celiaquía. En la tabla 1 se muestra la calificación del producto y los límites permitidos de gluten.

Tabla 1. Clasificación del producto y los límites permitidos de gluten por el *Codex Alimentarius*

Productos naturalmente libres de gluten	20 mg/ kg
Productos manufacturados como libres de gluten	200 mg/ kg

3.2.4 Límites de valores de gluten para el etiquetado en Europa

El reglamento de ejecución 828/2014 incluye que: “Debe ser posible que, en un alimento que sea específicamente elaborado, preparado y/o procesado para reducir el contenido de gluten de uno o varios ingredientes que contienen gluten, o para sustituir los ingredientes que contienen

gluten por otros ingredientes exentos de gluten de forma natural, se indique la ausencia (“sin gluten”) o la presencia reducida (“muy bajo en gluten”) de gluten, de conformidad con las disposiciones establecidas en el presente Reglamento (Comisión Europea (2014), Reglamento (UE) 828/2014).

- **Sin gluten**

La declaración «sin gluten» solamente podrá utilizarse cuando los alimentos, tal como se venden al consumidor final, no contengan más de 20 mg de gluten por cada kg de alimento (Comisión Europea (2014), Reglamento (UE) 828/2014). (Figura 1)



Figura 1. Etiquetado para los productos libres de gluten (imagen extraída de la página de la federación de asociaciones de celíacos de España).

- **Muy bajo en gluten**

La declaración “muy bajo en gluten” (figura 2) solamente podrá utilizarse cuando alimentos que consistan en trigo, centeno, cebada, avena o sus variedades híbridas, o que contengan uno o más ingredientes hechos a partir de estos cereales, que se hayan procesado específicamente para reducir su contenido de gluten, no contengan más de 100 mg de gluten por cada kg de alimento tal como se vende al consumidor final (Comisión Europea (2014), Reglamento (UE) 828/2014).



Figura 2. Etiquetado para los productos muy bajos en gluten (imagen extraída de la página de la federación de asociaciones de celíacos de España).

Por último, determinar lo que ocurre con los productos alimenticios que contienen ingredientes exentos de gluten de forma natural, en estos alimentos “se indicará la ausencia de gluten, de conformidad con las disposiciones establecidas en el presente Reglamento, siempre que se cumplan las condiciones generales sobreprácticas informativas leales que figuran en el Reglamento (UE) nº 1169/2011”.

Como conclusión sobre este reglamento observamos que su principal objetivo es mantener dentro de la Unión Europea una normativa uniforme con respecto a la información alimentaria.

3.3 Métodos de extracción y cuantificación del gluten en alimentos.

En esta parte del trabajo nos centramos en el estudio de la analítica del gluten en el laboratorio.

3.3.1 Métodos de extracción de prolaminas

3.3.1.1 Etanol 60%

El método tradicional de extracción de prolaminas en alimentos se realiza con etanol al 60%. Sin embargo, no es el método adecuado para los alimentos procesados por calor (que se corresponden con el 80-90% de los alimentos que usualmente consumen los enfermos celíacos) ya que el etanol al 60% sólo extrae entre el 31 y el 63% de las prolaminas en estos casos (García *et al.*, 2005). Para estos alimentos debemos utilizar un “Cocktail de extracción”

3.3.1.2 “Cocktail de Extracción”

El “*Cocktail de Extracción*” está basado en agentes reductores y desnaturalizantes (como el

clorhidrato de guanidina y el β -mercaptoetanol) que solubilizan los agregados insolubles de todas las fracciones de las prolaminas (α , β , γ y ω), abren la conformación de estas proteínas y favorecen su solubilidad en etanol 60%, permitiendo así que puedan ser extraídas en su totalidad y posteriormente cuantificados con distintos métodos como; el ELISA-R5 Sándwich, el *Western Blot* R5 y/o las Tiras Inmunocromatográficas R5 (Mujico, 2007).

El “*Cocktail de Extracción*” viene incluido en todos los kits de ELISA-R5 Sándwich.

3.3.2 Métodos de cuantificación de gluten

3.3.2.1 Kits ELISA

Los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) se utilizan más comúnmente para controlar el cumplimiento de los productos sin gluten con el umbral reglamentario de 20 mg/kg de gluten (*Codex alimentarius* 118-19792). Hay más de 20 kits de prueba ELISA en el mercado que utilizan diferentes principios, sándwich vs competitivo, observamos las diferencias entre ambos en la figura 3 (Scherf *et al.*, 2020).

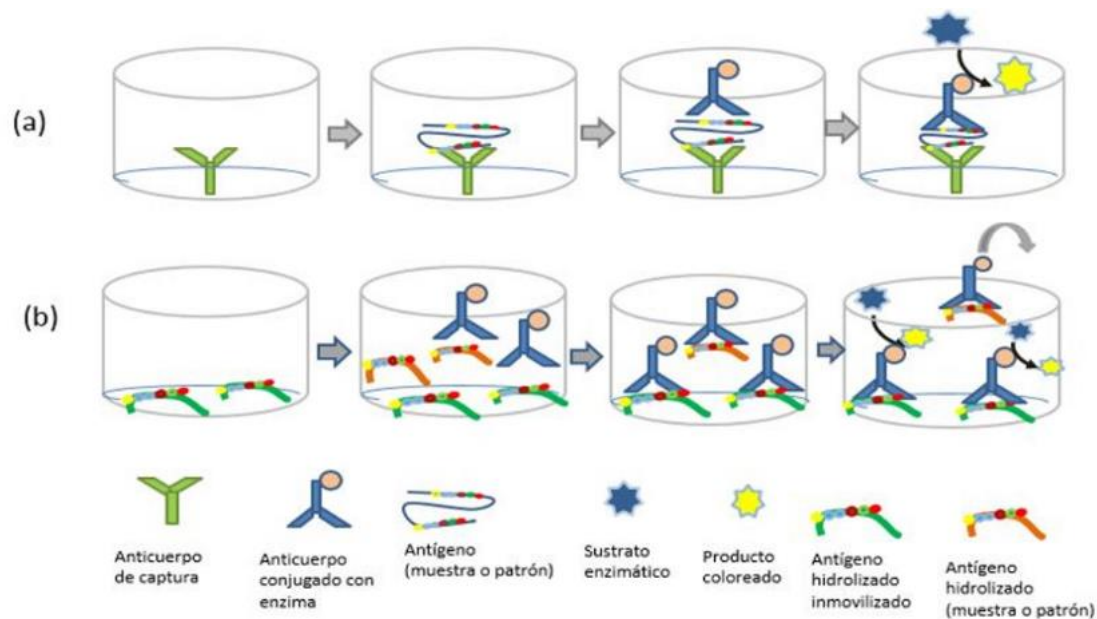


Figura 3. Esquema de las etapas de los métodos a) ELISA sándwich y b) competitivo, extraído de la página Web de la empresa Dr. Schär Institute.

El kit ELISA de trigo / gluten se desarrolló para medir el contenido total de proteína de trigo o gluten en cereales de trigo, cebada y centeno. Los métodos ELISA para la cuantificación del gluten han ido evolucionando y encontramos diferentes tipos.

ELISAS tipo sándwich

En el **ELISA- ω Sándwich** se utiliza un anticuerpo fijado a un soporte, que se une específicamente a la proteína diana (que funciona como antígeno). Un segundo anticuerpo conjugado a un enzima genera un producto cuyo color es visible al añadir un sustrato determinado, y es fácilmente cuantificable mediante una curva patrón de la proteína de interés. Este ELISA fue transformado en un *kit* comercial muy empleado y evaluado durante más de 10 años. Este método basado en el anticuerpo contra las ω -gliadinas, fue aprobado por la AOAC (*Association of Official Agricultural Chemists*) en 1991 (Skerritt y Hill 2016). Este sistema sólo detecta las prolaminas de trigo y de centeno (no detecta las de cebada). La fracción omega representa un porcentaje muy pequeño del total de las prolaminas (entre un 5% y un 20%, dependiendo de la variedad) y tiene una sensibilidad entre 200-400 ppm de gluten, insuficiente para detectar los dos niveles de gluten establecidos por el Comité del *Codex Alimentarius* para los alimentos “sin-gluten” (20-200 ppm).

El ELISA-R5 Sándwich basado en el anticuerpo monoclonal R5 es capaz de detectar las prolaminas del trigo (gliadinas), la cebada (hordeinas) y el centeno (secalinas) por igual. Además, tiene la capacidad de detectar todas las fracciones proteicas de las prolaminas (α , β , γ y ω) de todas las variedades de los cereales tóxicos para los enfermos celíacos. La buena reproducibilidad y repetibilidad del método ha supuesto un avance muy importante en el análisis de gluten en alimentos (Mujico, 2007). Este método ha sido la base para el desarrollo de 4 kits comerciales ELISA tipo sándwich.

El Comité Técnico de Proteínas y Enzimas de la Asociación Estadounidense de Químicos de Cereales inició un estudio colaborativo para confirmar si el kit de **prueba ELISA tipo sándwich basado en anticuerpos G12** es capaz de detectar gluten en el nivel más bajo de mg / kg (ppm). Veinte laboratorios investigaron 24 muestras tratadas térmicamente y no tratadas térmicamente con niveles de gluten de hasta 100 mg / kg. El estudio colaborativo mostró que los niveles bajos de gluten podrían ser detectados por G12 Sándwich ELISA (Halbmayer-Jech *et al.*, 2015).

3.3.2.2 Western Blot R5

El *Western Blot* es un método semicuantitativo basado en una primera separación de las proteínas (según su peso molecular) mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS,

seguida de una transferencia de las proteínas a membranas de Polifluoruro de Vinilideno (PVDF), una incubación con el AcM R5 (anticuerpo monoclonal R5) conjugado con peroxidasa y una posterior detección por quimioluminiscencia utilizando Immobilon™ Western (Millipore) (Mujico, 2007).

3.3.2.3 Tiras inmunocromatográficas R5

Este nuevo sistema de análisis de gluten, desarrollado y comercializado por la empresa española Operón, permite detectar y semicuantificar, de forma rápida y sencilla, contaminaciones de prolaminas en alimentos “sin-gluten”, con una sensibilidad de 2 a 5 ppm (García *et al.*, 2005). Entre las ventajas de las tiras en comparación con los ELISAs están su rapidez (resultados en sólo 5-10 minutos), su menor coste, no necesitan grandes aparatos y la interpretación es enormemente sencilla.

3.4 Discusión

Como observamos en las concentraciones para el etiquetado, tanto la normativa europea como el CODEX, declaran alimentos sin gluten aquellos que no contengan más de 20 mg de gluten por kg de alimento. El reglamento de ejecución de la Unión Europea declara que los alimentos “muy bajos en gluten” no deben contener más de 100 mg de gluten por kg de alimento. Por otro lado, el *Codex Alimentarius* manifiesta que los productos manufacturados como libres de gluten no pueden contener más de 200 mg de gluten por kg de alimento. A nivel nacional se establecen las mismas concentraciones para el etiquetado en el caso de alimentos libres de gluten.

En cuanto a los métodos de cuantificación vemos que son variados y que a veces dependiendo la situación es más conveniente utilizar unos u otros, pero por norma general los kits ELISA son los más efectivos y utilizados en la mayoría de los casos. Para nuestro estudio hemos decidido utilizar un Kit Elisa-R5 ya que como hemos visto es capaz de detectar las prolaminas del trigo, la cebada y el centeno por igual. Además, tiene la capacidad de detectar todas las fracciones proteicas de las prolaminas (α , β , γ y ω) de todas las variedades de los cereales tóxicos para los enfermos celíacos. Por todo esto y por su alta reproducibilidad, existen kits muy efectivos aprobados por varios comités para el análisis del gluten, y nosotros utilizaremos uno de ellos para el análisis del gluten de los panes obtenidos de las panaderías y comercios.

4. Analítica del gluten presente en los panes obtenidos a través de la realización de encuestas en las panaderías de León.

Esta segunda parte del trabajo se centra en la elaboración y realización de encuestas a varias panaderías y tiendas en la ciudad de León, para un posterior análisis del gluten presente en el pan de dichas panaderías.

4.1 Materiales y métodos

4.1.1 Materiales

Se realizaron encuestas a varias panaderías y pastelerías de la ciudad de León, principalmente aquellas que tuvieran obrador propio. La encuesta realizada se muestra en la figura 4.

ENCUESTA

Pan sin gluten Si/No

Pan sin gluten:

Tipo de harina:

Enfoque utilizado para estar libre de gluten (utilización de almidón, harinas de legumbres, sorgo, proteínas sin gluten, productos lácteos...)

¿Cómo se produce? (metodología, tecnología...) Suele ser diferente.

Masa madre/pan rápido

Unidades vendidas diariamente:

Pan con gluten:

¿Panecillos con harinas bajas en gluten?

Masa madre/pan rápido

Unidades vendidas diariamente:

Figura 4. Encuesta creada para realizar en las diferentes panaderías.

Kit para extracción y cuantificación.

Contenido del kit de extracción: *cocktail* de extracción y tampón de dilución.

Materiales para la extracción: Baño de agua, etanol al 80%, microtubos, Eperdorff, pipetas graduadas, centrífuga de mesa, tubos “Falcon”.

Contenido del kit de cuantificación: Placa de microtitulación (96 pocillos), tampón concentrado (5X), 6 estándares de diferentes concentraciones de gluten(0 ng/ml, 5,0 ng/ml, 10,0 ng/ml, 20,0 ng/ml, 40,0 ng/ml y 80,0 ng/ml), tampón de lavado (11x), conjugado concentrado (11x), sustrato, cromógeno y solución de stop.

Materiales para la cuantificación: Pipetas graduadas, micropipetas y espectrofotómetro. Además de guantes y agua destilada tanto para la cuantificación como para la extracción.

4.1.2 Métodos

Para la extracción y cuantificación de gluten utilizaremos el ***Cocktail de extracción*** y el método **ELISA R5 tipo sándwich**.

RIDASCREEN Gliadina es un inmunoensayo enzimático sándwich R5, basado en un anticuerpo monoclonal específico contra secuencias de prolaminas de aminoácidos tóxicos para celíacos, con él determinados el contenido de gliadina, como medida del gluten presente en los alimentos.

El sándwich ELISA cuantifica gliadina del trigo y también proteínas del centeno y cebada.

Principio del test: El test se basa en la reacción antígeno-anticuerpo. Los pocillos están recubiertos con anticuerpos R5 específicos contra las gliadinas. Cuando agregamos la solución estándar o de muestra a los pocillos la gliadina presente en las soluciones se unirá a estos anticuerpos específicos formando el complejo antígeno-anticuerpo. Después del paso de lavado, se añade una solución que contenga anticuerpos R5 con peroxidasas. Este conjugado se une al complejo antígeno-anticuerpo y se forma un anticuerpo-antígeno-anticuerpo (sándwich). Cualquier conjugado no unido se elimina con otro lavado. Se añaden un sustrato y un cromógeno a los pocillos y se incuban. El conjugado convierte el cromógeno incoloro en un producto azul y la solución de parada produce de un cambio de color de azul a amarillo. La absorbancia de la solución, que es proporcional a la concentración de gliadina en la muestra, se mide fotométricamente a 450nm y se expresa como ng/ml (ppb) de gliadina (Figura 5).

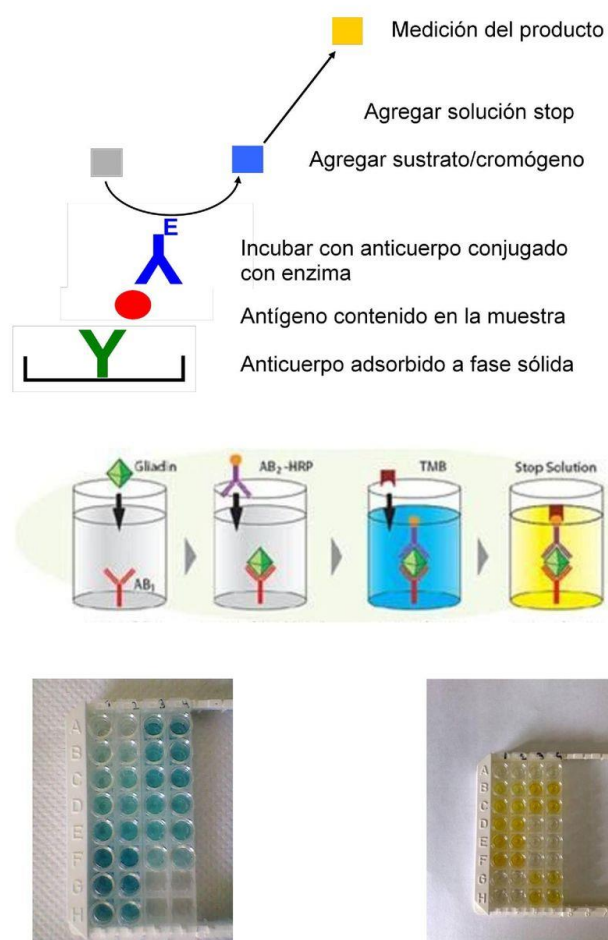


Figura 5. Principio del test utilizado para la cuantificación del gluten (imagen extraída de Docplayer)

Protocolo para la extracción:

1. Pesamos 50 gramos de muestra con máxima homogenización.
2. De estos 50 gramos pesamos exactamente 0,25 gramos de muestra homogenizada.
3. Añadimos 2,5 mililitros de *cocktail* de extracción a los 0,25 gramos de muestra homogenizada e incubamos 40 minutos a 50 °C en baño de agua.
4. Añadimos 7,5 mililitros de etanol al 80% a la muestra y agitamos durante 1 hora.
5. Transferimos la muestra a tubos de centrifugación y centrifugamos durante 10 minutos a más de 2500 g.
6. Transferimos el sobrenadante a otro vial.

7. Diluimos las muestras con un tampón B.

Protocolo para la cuantificación

1. Insertamos una cantidad suficiente de pocillos en el soporte para que todos los estándares y muestras se procesen por suplicado.
2. Pipeteamos 100 microlitros de muestra ya diluida y de estándar por suplicado e incubamos 30 minutos a temperatura ambiente.
3. Vertemos el líquido de los pocillos y golpeamos el soporte en papel absorbente. Llenamos los micro pocillos con 250 microlitros de tampón de lavado y vertemos el líquido como antes (realizamos el paso de lavado 3 veces).
4. Pipeteamos 100 microlitros de conjugado diluido en cada pocillo e incubamos 30 minutos a temperatura ambiente.
5. Vertemos el líquido de los pocillos y golpeamos el soporte en papel absorbente. Llenamos los micro pocillos con 250 microlitros de tampón de lavado y vertemos el líquido como antes (realizamos el paso de lavado 3 veces).
6. Pipeteamos 50 microlitro de sustrato y 50 microlitros de cromógeno en cada pocillo, agitamos la placa manualmente e incubamos en oscuridad.
7. Pipeteamos 100 microlitros de solución de parada en cada pocillo, agitamos la placa manualmente y medimos la absorbancia a 450 nanómetros.

4.2 Resultados y discusión

La encuesta fue realizada en 15 panaderías, sin embargo, solo 7 de ellas respondieron. De estas 7, solo 2 tenían pan sin gluten: Natural repostería y Caprichusco. Natural repostería es un obrador especializado en la elaboración de cocinados sin gluten y Caprichusco es una tienda especializada en la venta de alimentos libres de gluten. El personal de ambos negocios nos informó que son las dos únicas panaderías en León que tienen pan sin gluten, excluyendo la venta de pan industrial de los supermercados. Además, el pan en ambos sitios es el mismo, ya que se elabora en Natural repostería y este es repartido también a Caprichusco. Por todo ello, obtuvimos únicamente información sobre este pan, en concreto a cerca de las barras y hogazas vendidas en ambas panaderías. A continuación, se muestra la encuesta realizada y las respuestas obtenidas.

ENCUESTA (Caprichusco y Natural repostería)

Pan sin gluten: Sí

Enfoque utilizado para estar libre de gluten (utilización de almidón, harinas de legumbres, sorgo, proteínas sin gluten, productos lácteos...)

Utilización de un panificable básico al que se añaden diferentes cereales y harinas certificadas libres de gluten.

- Barra: Almidón de maíz, goma saturada, silium, huevo, levadura, sal, agua, dextrosa y enzima transglutaminasa. En la figura 6 observamos un corte transversal de esta barra.



Figura 6. Corte transversal de la barra de pan de Natural repostería.

- Hogaza: Almidón de maíz, goma saturada, silium, huevo, levadura, sal, agua, dextrosa, enzima transglutaminasa, proteína de patata, harina de sorgo y harina de mijo. Observamos un corte de esta hogaza en la figura 7.



Figura 7. Corte transversal de la hogaza de Natural repostería

¿Tienen alguna inspección para comprobar que está libre de gluten?

Poseen harinas certificadas libres de gluten

Masa madre/pan rápido

Pan rápido en ambos casos.

Unidades vendidas diariamente:

Caprichusco: 7 unidades.

Natural repostería: 50 unidades los días de diario y 75/100 los fines de semana.

A parte de las panaderías analizamos pan industrial de dos supermercados; Mercadona y Alimerka. Los ingredientes de estos panes son los siguientes:

- Hogaza del Mercadona : Agua, almidón de maíz, almidón de tapioca, jarabe de arroz, harina de arroz, aceite de girasol, levadura, azúcar, harina de trigo sarraceno, fibra vegetal, harina de mijo, harina de quinoa, masa madre de arroz inactiva, proteína de arroz, sal y espesantes. En la figura 8 se observa un corte de esta hogaza.

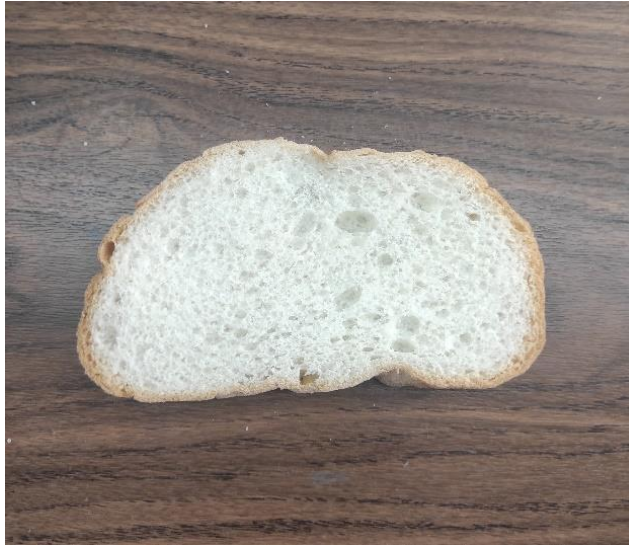


Figura 8. Rebanada de hogaza del Mercadona

- Barra del Alimerka: Agua, almidón de maíz, harina de arroz, levadura, harina de maíz, azúcar, sal, estabilizante y gasificante. Observamos un corte de la barra en la figura 9.



Figura 9. Corte transversal de la barra del Alimerka.

- Bollo del Alimerka: Agua, almidón de maíz, masa madre (Harina de arroz y agua), almidón de tapioca, jarabe de arroz, aceite de girasol, semillas de lino, fibra vegetal, proteína de patata, levadura, azúcar, sal, espesante y emulgentes. Observamos un corte de este bollo en la figura 10.



Figura 10. Corte transversal del bollo de pan del Alimerka.

En la figura 11 observamos una imagen de todos los panes utilizados para realizar nuestro análisis.



Figura 11. Panes utilizados para la cuantificación del gluten antes de su homogenización. (De izquierda a derecha: Hogaza de Mercadona, barra de Natural repostería, Hogaza de Natural repostería, barra de Alimerka, bollo de Alimerka).

En la figura 12 observamos ya las muestras homogenizadas.

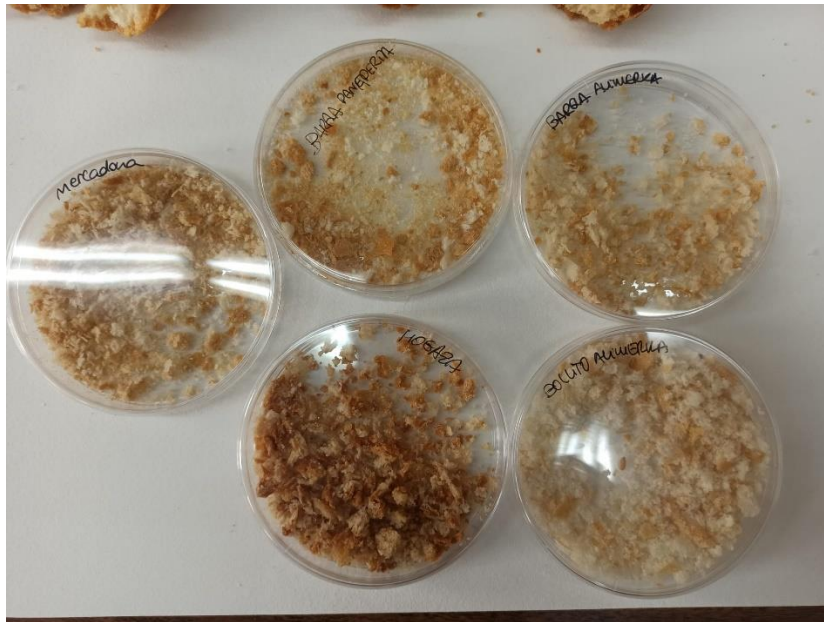


Figura 12. Muestras homogenizadas para la extracción del gluten.

En el laboratorio se han obtenido los siguientes resultados, los cuales podemos observar en la tabla 2.

Tabla 2. Concentración de los estándares y absorbancia de cada uno de ellos.

Concentración	Absorbancia
0	0
5	0,37
10	0,73
20	1,22
40	1,6
80	1,8

En el Kit la concentración de los estándares llegaba a 80 ng/ml, pero como la absorbancia de los panes analizados es muy inferior a la absorbancia de las concentraciones altas del Kit, para realizar la recta patrón utilizamos solo las concentraciones de 0 ng/ml, 5ng/ml, 10 ng/ml y 20 ng/ml ya que con las dos últimas concentraciones como observamos en la tabla se perdía bastante linealidad en la recta patrón, y así podemos obtener una recta con una R elevada (0,9877) que nos proporciona datos más precisos. Vemos en la figura 13 la recta patrón obtenida.

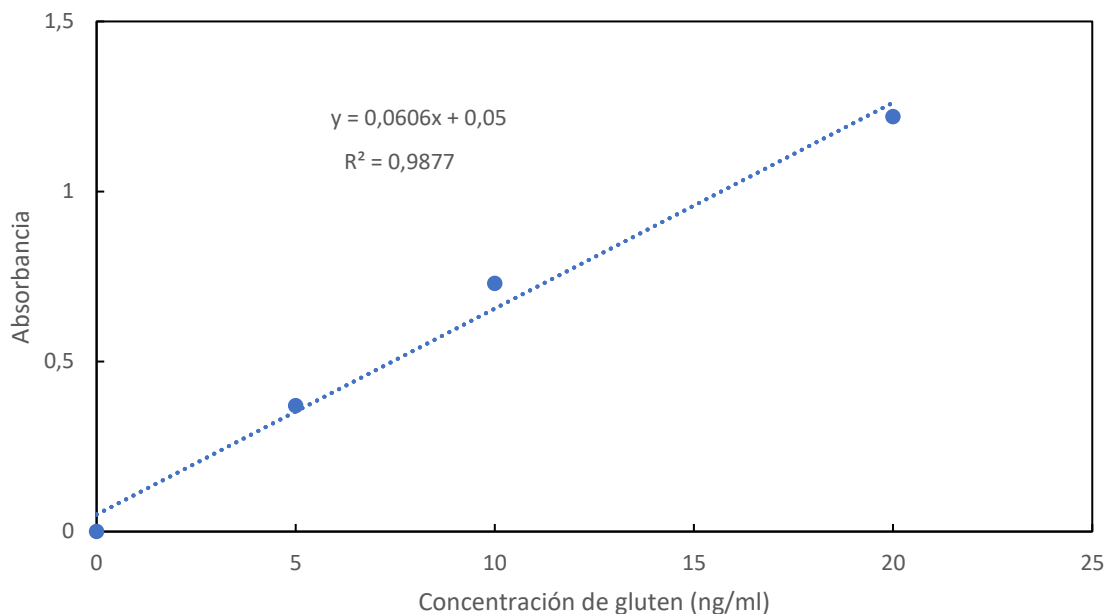


Figura 13. Recta patrón que representa la absorbancia con respecto a la concentración de gluten en ng/ml, obtenida de los estándares presentes en el kit ELISA.

La recta patrón presenta una buena linealidad con una R de 0,9877 que nos permite obtener unos resultados bastante precisos.

Tabla 3. Panes analizados junto con su absorbancia y concentración en ng/ml obtenidos de la ecuación de la recta patrón y en mg/kg.

Panes	Absorbancia	concentración (ng/ml)	Concentración en mg/kg
Mercadona	0	0	0
Pan panadería	0,027	0	0
Hogaza panadería	0,084	0,56	0
Pan Alimerka	0,045	0	0
Bollo Alimerka	0,18	2,1	0

Como observamos en la tabla 3 las concentraciones de los panes analizados obtenidas de la recta patrón son de 0 ng/ml en la mayoría de los casos y en las que son superiores continúan siendo muy bajas, de manera que al pasar estos datos a mg de gluten por kilogramo de alimento obtenemos 0 en todos los casos, resultados razonables y esperados en el trabajo.

5. Conclusiones

Con respecto al estudio legislativo hemos podido observar que existe un reglamento que, obliga a los diferentes establecimientos, como cárceles u hospitales, a tener al menos una

opción de comida libre de gluten, y además el reglamento establece que concentraciones máximas pueden contener los alimentos para ser consumidos por celíacos, además de unas etiquetas que permitan a estas personas identificar dichos alimentos.

Las metodologías para la extracción y cuantificación del gluten son diversas. En determinadas ocasiones puede ser más acertado utilizar unas u otras, pero sin duda los métodos más efectivos para la cuantificación son los Kits ELISA, tanto competitivo como Sándwich. Siendo de todos estos el más utilizado el ELISA R5 tipo sándwich, ya que es el más recomendado, por su alta fiabilidad y reproducibilidad.

Con los datos obtenidos de las encuestas podemos afirmar que los celíacos encuentran muchas dificultades a la hora de encontrar panes de buena calidad que no contengan gluten. Hemos podido comprobar que en la ciudad de León existen únicamente dos establecimientos en los cuales se pueden adquirir estos productos además de los supermercados. Otro problema encontrado es que los precios son muy altos. Comparando los precios de panes sin gluten y panes con gluten, se observó que el precio del pan sin gluten es tres veces superior en algunos casos que el precio del pan con gluten. Todo esto ha llevado a pensar en la posibilidad e incluso necesidad de regular estos precios a través de ayudas o propuestas del gobierno.

En cuanto a los resultados obtenidos del análisis en laboratorio, observamos que efectivamente el pan que se vende en Natural repostería, Mercadona y Alimerka es un pan libre de gluten, apto para el consumo de celíacos. Las concentraciones de gluten establecidas en España y también fuera del país son de 20 miligramos de gluten por cada kilogramo de alimento, cantidades muy superiores a los resultados obtenidos.

6. Bibliografía

Arendt, E. K. y Dal Bello, F. (2008) *Gluten-Free cereal products and beverages*. Departamento of food and nutritional science university college cork Ireland: Elsevier.

Briani, C., Samaroo, D. y Alaedini, A. (2008) "Celiac disease: From gluten to autoimmunity", *Autoimmunity Reviews*, 7, pp. 644–650.

Caio, G., Lungaro, L., Segata, N., Guarino, M., Zoli, G., Volta, U. y de Giorgio, R. (2020) "Effect of gluten-free diet on gut microbiota composition in patients with celiac disease and non-celiac gluten/wheat sensitivity", *Nutrients*, 12(1832), pp. 1–23.

Comisión Europea (2014) "Reglamento (UE) 828/2014 de la comisión del 30 de Julio de 2014 relativo a los requisitos para la transmisión de información a los consumidores sobre la ausencia o la presencia reducida de gluten en los alimentos" *Diario oficial de la Unión Europea, Serie L, 30 de Julio de 2014, (228)*, pp. 5-8.

Correa Parra, L., Villa Saldarriaga, M. P. y Forero Saldarriaga, S. (2021) "Dermatitis herpetiforme: manifestación específica de la enfermedad celiaca", *CES Medicina*, 35(3), pp. 272–283.

Culetu, A., Duta, D. E., Papageorgiou, M. y Varzakas, T. (2021) "The role of hydrocolloids in gluten-free bread and pasta; rheology, characteristics, staling and glycemic index", *Foods*, 10(3121), pp. 1-19.

Freeman, H. J. (2010) "Risk factors in familial forms of celiac disease", *World Journal of Gastroenterology*, 16(15), pp. 1828–1831.

García, E., Llorente, M., Hernando, A., Kieffer, R., Wieser, H. y Méndez, E. (2005) "Development of a general procedure for complete extraction of gliadins for heat processed and unheated foods.", *European journal of gastroenterology & hepatology*, 17(5), pp. 529–39.

García-Molina, M. D., Giménez, M. J., Sánchez-León, S. y Barro, F. (2019) "Gluten free wheat: Are we there?", *Nutrients*, 11(487). pp. 1-13 .

Halbmayr-Jech, E., Rogers, A., Don, C. y Prinster, M. (2015) "Gluten in rice flour and baked rice products by G12 Sandwich ELISA", *Journal of AOAC International*, 98(1), pp. 103–111.

Mujico Fernández, J. (2007) *Desarrollo de cuatro sistemas de PCR cuantitativa en tiempo-real para la cuantificación y caracterización de ADN de trigo, de cebada y de centeno en alimentos "sin-gluten" para celíacos: Nuevas técnicas en la analítica del gluten*. Tesis doctoral. Universidad autónoma de Madrid.

Kowalski, K., Mulak, A., Jasińska, M. y Paradowski, L. (2017) "Diagnostic challenges in celiac disease", *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. Wroclaw University of Medicine, 26(4), pp. 729–737.

Olivencia Palomar, M. P., Moreira, V. F., López, A. y Román, S. (2005) "Enfermedad celiaca", *Revista española de enfermedades digestivas*, 97(9), p. 672.

Real Delor, R. E. (2016) "Actualización en el diagnóstico de la enfermedad celiaca", *Anales de la Facultad de Medicina*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Vicerectorado de Investigación, 77(4), p. 397.

Rubin, J. E. y Crowe, S. E. (2020) "Celiac disease", *Annals of Internal Medicine*. American College of Physicians, 172(1), pp. 1–16.

Salanova, A. (2017) *Actualización en el diagnóstico de celiaquía*. Trabajo de fin de grado. Facultad de Medicina de la universidad de Zaragoza.

Scherf, K. A., Catassi, C., Chirido, F., Ciclitira, P. J., Feighery, C., Gianfrani, C., Koning, F., Lundin, K. E. A., Schuppan, D., Smulders, M. J. M., Tranquet, O., Troncone, R. y Koehler, P. (2020) "Recent Progress and Recommendations on Celiac Disease From the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity", *Frontiers in Nutrition*, 7(29), pp. 2-14.

Sciarini, L. S., Steffolani, M. E. y León, A. E. (2016) "El rol del gluten en la panificación y el desafío de prescindir de su aporte en la elaboración de pan", *Agriscientia*, 33(2), pp. 61–74.

Skendi, A., Papageorgiou, M. y Varzakas, T. (2021) "High protein substitutes for gluten in gluten-free bread", *Foods*, 10(1997), pp. 1-16.

Skerritt, J. H. y Hill, A. S. (1991) "Enzyme immunoassay for determination of gluten in foods: collaborative study", *Association of Official Analytical Chemists*, 74(2), pp. 257–264.