



Red Nacional de Laboratorios
Oficiales de Análisis de Alimentos

DETERMINACIÓN DE GLUTEN EN ALIMENTOS PARA CELÍACOS

DETERMINACIÓN DE GLUTEN EN ALIMENTOS PARA CELÍACOS

INDICE

1 – Objetivo	2
2 – Alcance	2
3 – Desarrollo	2
4 – Anexo	8



DETERMINACIÓN DE GLUTEN EN ALIMENTOS PARA CELÍACOS

1.0. Objetivo

Determinación de gluten en alimentos para celíacos.

2.0. Alcance

Este método analítico permite la determinación de fracciones de gliadina provenientes de trigo y de las correspondientes prolaminas de cebada y centeno por enzima inmunoensayo (ELISA) y su expresión como gluten en muestras de alimentos.

El ensayo se basa en una reacción antígeno-anticuerpo. La gliadina se une a los anticuerpos específicos que recubren las celdas de la microplaca dando lugar a la formación de un complejo antígeno-anticuerpo. Los componentes de la muestra no fijados por los anticuerpos son removidos de las celdas por lavado. La gliadina fijada es detectada por un anticuerpo conjugado a peroxidasa (conjugado de la enzima). Luego se agrega el sustrato de la enzima (urea peroxidasa) y el cromógeno (tetrametilbencidina) que desarrolla un color azul. La adición del reactivo stop cambia este último a color amarillo que se mide espectrofotométricamente a 450 nm.

El uso de harina de trigo y gluten en productos alimenticios es muy común dada su estabilidad térmica y sus efectos beneficiosos en la textura, retención de humedad y sabor de los alimentos. El gluten es una mezcla proteica de prolaminas y glutelinas presentes en el trigo, el centeno y la cebada.

La enfermedad celíaca es una intolerancia permanente al gluten que genera un daño en el intestino delgado y que es reversible si el gluten se evita en la dieta.

El Código Alimentario Argentino, capítulo XVII artículo 1383, define a los "*alimentos libres de gluten*" como aquellos con un contenido de gluten que no supere los 10 mg/Kg.

3.0. Desarrollo

3.1. Aparatos y Materiales:

- 3.1.1. Frascos de vidrio con tapa a rosca de 10 ml y 50 ml
- 3.1.2. Espátulas
- 3.1.3. Probetas de 25 y 100 ml
- 3.1.4. Pipetas graduadas de 5 y 10 ml
- 3.1.5. Pipetas automáticas de 2-20 μ l, 20-200 μ l y 100-1000 μ l.
- 3.1.6. Pipetas automáticas repetitivas.
- 3.1.7. Film autoadherente.
- 3.1.8. Vasos de precipitados de 100 y 250 ml.
- 3.1.9. Erlenmeyers de 500 ml.
- 3.1.10. Gradillas, para tubos *Eppendorf*.
- 3.1.11. Tubos tipo safe lock de 1,5 ml, *Eppendorf* o similar.
- 3.1.12. Lector de Elisa tipo *Packard SpectraCount Microplate Photometer* o similar.
- 3.1.13. Agitador tipo *vortex*
- 3.1.14. Balanza analítica

DETERMINACIÓN DE GLUTEN EN ALIMENTOS PARA CELÍACOS

- 3.1.15. Heladera (4 - 8°C)
- 3.1.16. Freezer (-15 a -20°C).
- 3.1.17. Centrífuga con rotor para tubos de *ependorf* de 1,5 ml
- 3.1.18. Homogeneizador
- 3.1.19. Baño de agua termostático con agitador mecánico de movimiento horizontal

3.2. Reactivos:

- 3.2.1. Kit de inmunoensayo para el análisis cuantitativo de gliadinas y prolaminas correspondientes, *R-Biopharm AG Ridascreen* (Art. No.: R7001).
- 3.2.2. *Microtiter plate*. (12 tiras con 8 celdas o pocillos removibles cada una). Cada celda está revestida con anticuerpos anti-gliadina.
- 3.2.3. *Standards* de gliadina (1,3 ml c/u), 0 ppb, 5 ppb, 10 ppb, 20 ppb, 40 ppb, 80ppb, gliadina en solución acuosa, lista para usar.
- 3.2.4. Conjugado (1,2 ml), concentrado. Anticuerpo conjugado a peroxidasa (tapa roja).
- 3.2.5. Sustrato (7 ml). Contiene urea peroxidasa (tapa verde).
- 3.2.6. Cromógeno (7 ml). Contiene tetrametilbencidina (tapa azul).
- 3.2.7. Solución stop (14 ml). Contiene ácido sulfúrico 1N (tapa amarilla).
- 3.2.8. Solución diluyente (60 ml). Concentrada 5 X (tapa blanca).
- 3.2.9. Solución de lavado (100 ml). Concentrada 10X (tapa marrón).
- 3.2.10. *Cocktail solution*, Art. No R7006, (105 ml).
- 3.2.11. Agua bidestilada.
- 3.2.12. Etanol absoluto p.a.
- 3.2.13. Leche en polvo descremada.
- 3.2.14. *Fish* gelatina marca *Sigma*, Order No G-7765.
- 3.2.15. *Polyvinylpyrrolidone* marca *Sigma*, Order No PVP 10.
- 3.2.16. Solución de etanol 60%: Agregar 150ml de etanol absoluto a 100 ml de agua bidestilada.
- 3.2.17. Solución de etanol 80%: Agregar 120ml de etanol absoluto a 30 ml de agua bidestilada.
- 3.2.18. Solución *fish* gelatina: Disolver cuidadosamente 11,1 ml de *fish* gelatina y 2 g de polivinilpirrolidona en 20ml de agua bidestilada llevar a 40 ml, luego agregar 60 ml de etanol. Conservar a temperatura ambiente (20 - 25°C), la solución es estable por 3 ó 4 semanas. Mezclar muy bien antes de usar.

3.3. Patrones y Material de Referencia.

- 3.3.1. El material de los *standards* del *kit RIDASCREEN* fue calibrado por el *Prolamin Working Group* con sede en Bélgica.
- 3.3.2. Tanto los patrones como los materiales de referencia deben indicar en su certificado la pureza o concentración, así como fecha de preparación y de vencimiento.

3.4. Preparación y Conservación de la Muestra Preanálisis

- 3.4.1. Las muestras recibidas deben conservarse en freezer, heladera o a temperatura ambiente según corresponda.

DETERMINACIÓN DE GLUTEN EN ALIMENTOS PARA CELÍACOS

- 3.4.2. Trazas de cereales en el aire y equipos sucios pueden provocar que el ensayo se contamine, por lo tanto se requiere:
- ✓ El uso de guantes
 - ✓ Limpiar las superficies, los viales de vidrio, mezcladores y otros equipos con etanol 60%.
 - ✓ Preparar las muestras en un laboratorio separado de donde vaya a efectuarse el procedimiento de Elisa.

3.5. Procedimiento de extracción

- 3.5.1. Alimentos no calentados a más de 90°C: Tratar con etanol 60%.
- 3.5.2. Alimentos fluidos (por ej. crema, salsas): Mezclar 1 ml de la muestra con 9 ml de etanol 60%.
- 3.5.3. Alimentos en polvo (por ej. harinas): Pesar 0,3g de muestra representativa y agregar 3 ml de etanol 60%.
- 3.5.4. Alimentos en sólidos (por ej. alfajor): Pesar 5 g ó una unidad y moler, tomar 0,3 g de muestra representativa y agregar 3 ml de etanol 60%
- 3.5.5. Alimentos no homogéneos (por ej. hamburguesas, embutidos): Moler una unidad, tomar 2 g y agregar 20 ml de etanol 60%, homogeneizar
- 3.5.6. Agitar por 30 minutos.
- 3.5.7. Centrifugar 10 minutos a 8000 rpm a temperatura ambiente.
- 3.5.8. Diluir el sobrenadante 1:50 (1+49) con diluyente de muestra, por ej. 20 µl sobrenadante + 980 µl de diluyente de muestra.
- 3.5.9. Usar 100 µl por celda durante el ensayo.
- 3.5.10. **Muestras positivas: repetir con solución Cocktail y seguir el procedimiento como en 3.7.4.**

3.6. Alimentos que contienen taninos como chocolate, café o cocoa: Con solución *Fish*

- 3.6.1. Preparar la solución *fish* - gelatina
- 3.6.2. Pesar 1 g de muestra bien molida y homogeneizada
- 3.6.3. Agregar 10 ml de solución *fish* gelatina
- 3.6.4. Homogeneizar en *Vortex* por 30 seg
- 3.6.5. Colocar en el *shaker* por 1 hora
- 3.6.6. Centrifugar 10 minutos a 8000 rpm a temperatura ambiente.
- 3.6.7. Diluir el sobrenadante 1:50 (1+49) con diluyente de muestra, por ej. 20 µl sobrenadante + 980 µl de diluyente de muestra.
- 3.6.8. **Muestras positivas: repetir con solución Cocktail y seguir el procedimiento como en 3.7.4 con el agregado de 0.25g de leche en polvo descremada.**

3.7. Alimentos calentados a más de 90°C o que contengan soja: Con solución *Cocktail*

- 3.7.1. Muestras líquidas: Pipetear 0.25 ml de la muestra y agregar 2.5 ml de la solución *cocktail*, cerrar el vial y mezclar bien.
- 3.7.2. Muestras sólidas: Pesar 0.25 g de una muestra representativa y agregar 2.5 ml de la solución *Cocktail*, cerrar el vial y mezclar bien.

DETERMINACIÓN DE GLUTEN EN ALIMENTOS PARA CELÍACOS

- 3.7.3. Muestras no homogéneas: En este tipo de matrices la gliadina podría no estar distribuida uniformemente, por lo tanto: Pesar 50 g y homogeneizar
- 3.7.4. Pesar 0.25 g de la muestra homogeneizada y agregar 2.5 ml de la solución cocktail, cerrar el vial y mezclar bien.
Incubar 40 min a 50°C.
- 3.7.5. Dejar enfriar y luego mezclar con 7,5 ml de etanol 80%.
- 3.7.6. Tapar el vial y agitar por 1 h. a temperatura ambiente.
- 3.7.7. Centrifugar 10 min a por lo menos 8000 rpm.
- 3.7.8. Diluir el sobrenadante 1:12,5 (1 + 11,5 / 100 µl + 1,15 ml) con diluyente de muestra.
- 3.7.9. Usar 100 µl por celda durante el ensayo.

NOTA 1: La solución *Cocktail* contiene mercaptoetanol, por lo tanto se recomienda trabajar bajo campana

NOTA 2: Cada muestra homogeneizada se procesará por duplicado, al final del tratamiento de extracción se sembrarán dos celdas por cada uno.

3.8. Implementación del Test:

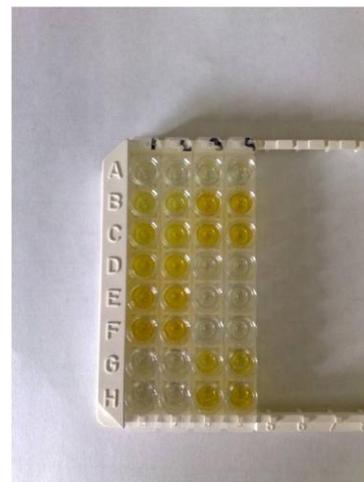
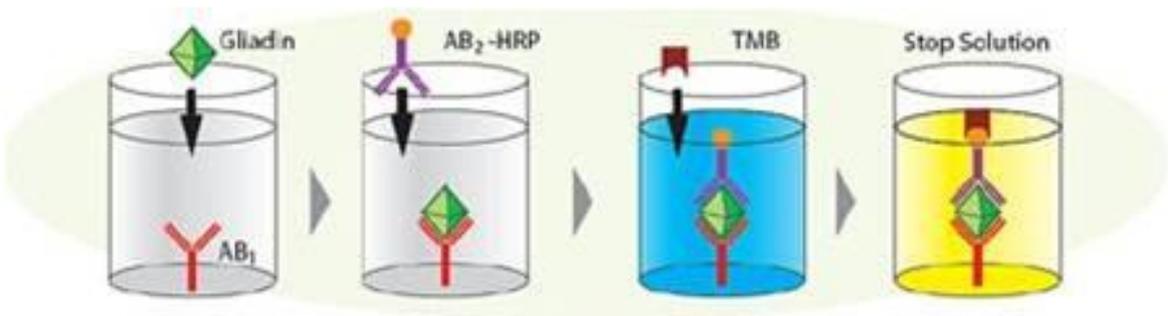
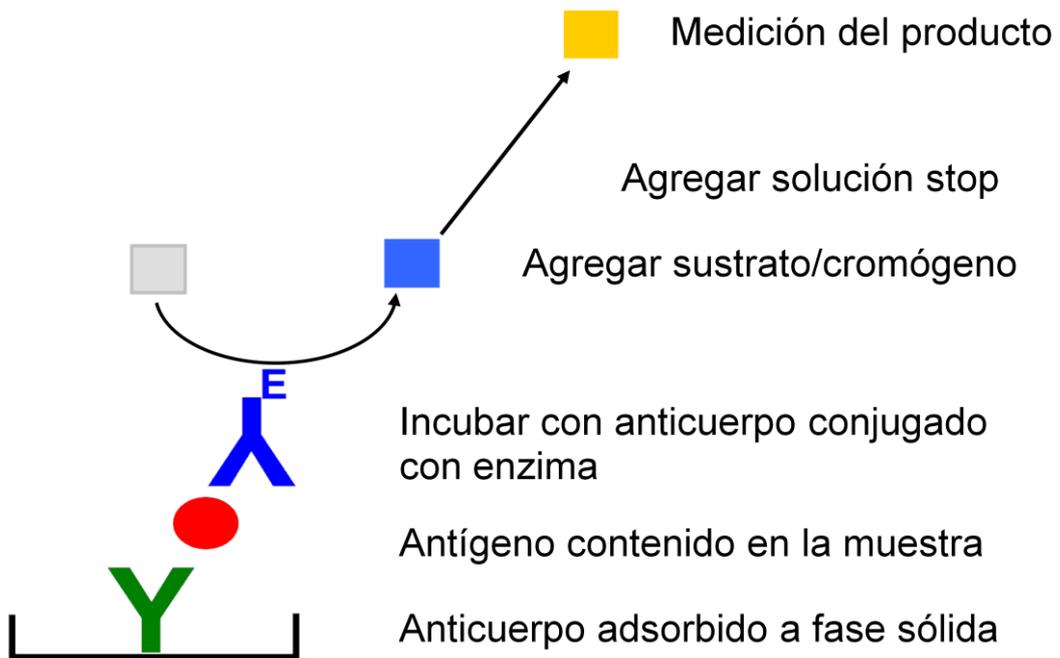
- 3.8.1. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente.
- 3.8.2. Acondicionar y diluir los reactivos concentrados, sólo en las proporciones que van a ser utilizadas
- 3.8.3. No dejar que las celdas se sequen durante el tiempo de trabajo.
- 3.8.4. La reproducibilidad dependerá fundamentalmente de la manera en la que se realiza el lavado de las celdas. Se deberán seguir cuidadosamente las recomendaciones referentes al lavado.
- 3.8.5. La temperatura de incubación es un punto crítico. Mantener entre 20 y 25°C.
- 3.8.6. Evitar la luz directa durante las incubaciones. Se recomienda cubrir la placa.
- 3.8.7. Conjugado: El conjugado se provee en forma concentrada. Como tiene una estabilidad limitada, solo se debe reconstituir la cantidad a ser usada. Antes de pipetear, el conjugado deber ser agitado cuidadosamente. Para reconstituirlo, el concentrado debe ser diluido 1:11 (1+10) con agua bidestilada (ejemplo: para dos tiras, 200 µl de conjugado concentrado + 2 ml de agua bidestilada).
- 3.8.8. Buffer de lavado: El buffer se provee en forma concentrada, por lo tanto deber ser diluido 1:10 (1+9) con agua bidestilada (ejemplo: 100 ml de buffer concentrado + 900 ml de agua bidestilada). El buffer diluido es estable entre los 2 y los 8°C por cuatro semanas. Antes de la dilución disolver los cristales que pudieran haberse formado en un baño de agua a 37°C.
- 3.8.9. Buffer para diluir las muestras: El buffer se provee en forma concentrada, por lo tanto solo debe ser diluida 1:5 (1+4) con agua bidestilada (ejemplo: 7 ml de buffer concentrado + 28 ml de agua bidestilada), son suficientes para diluir diez muestras.

DETERMINACIÓN DE GLUTEN EN ALIMENTOS PARA CELÍACOS

3.9. Procedimiento:

- 3.9.1. Insertar la cantidad necesaria de celdas en el soporte tanto para las muestras, los *standards* y sus duplicados. Registrar la posición de las muestras y los *standards*.
- 3.9.2. Colocar 100 μ l de cada standard o muestra preparada en celdas por duplicado
- 3.9.3. Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) en oscuridad.
- 3.9.4. Eliminar el líquido de las celdas, dando vuelta la placa rápidamente con golpes sobre un papel absorbente para eliminar completamente el líquido de las celdas.
- 3.9.5. Realizar tres lavados sucesivos con el *buffer* de lavado eliminando el líquido con golpes sobre papel absorbente entre cada lavado.
- 3.9.6. Eliminar las burbujas que queden en las celdas. Agregar 100 μ l del conjugado diluído a cada celda e incubar por 30 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) en oscuridad.
- 3.9.7. Remover el líquido de la placa y realizar los tres lavados como se indicó anteriormente.
- 3.9.8. Agregar 50 μ l de sustrato y 50 μ l de cromógeno a cada celda.
- 3.9.9. Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) en oscuridad.
- 3.9.10. Agregar 100 μ l de la Solución *Stop*.
- 3.9.11. Leer absorbancia a 450 nm dentro de la media hora de agregada la Solución *Stop*.

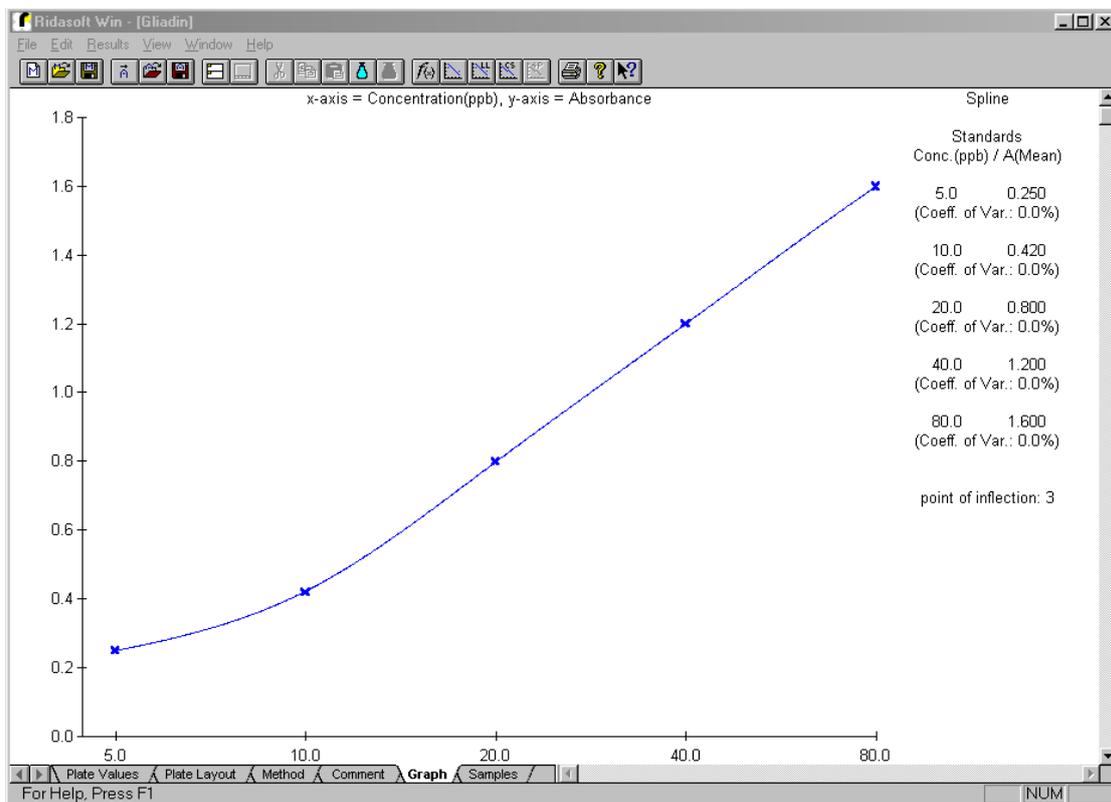
DETERMINACIÓN DE GLUTEN EN ALIMENTOS PARA CELÍACOS



DETERMINACIÓN DE GLUTEN EN ALIMENTOS PARA CELÍACOS

3.10. Resultados:

- 3.10.1. Los valores de absorbancia obtenidos de los *standards* y muestras son ingresados en un sistema de coordenadas sobre un gráfico semilogarítmico vs la concentración de gliadina en $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb).
- 3.10.2. El valor de la absorbancia del *standard* 1 (0 ppb) debería ser menor a 0,15 a 450 nm (valores superiores muestran un lavado insuficiente ó contaminación).
- 3.10.3. Para obtener la concentración de gluten en $\mu\text{g}/\text{kg}$ de una muestra, la concentración leída en la curva debe ser multiplicada por su factor de dilución correspondiente. Cuando se trabaja de acuerdo a lo establecido, el factor de dilución será 500.
- 3.10.4. Se estima que solo un 50% del gluten está como gliadina. Por lo tanto, la concentración calculada debe ser nuevamente multiplicada por 2.
- 3.10.5. Por ejemplo: $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ de gliadina corresponden a $10 \mu\text{g}/\text{kg} \times 500 \times 2 = 10.000 \mu\text{g}/\text{kg} = 10 \text{ mg}/\text{kg} = 10 \text{ ppm}$ de gluten, 0.001% de gluten respectivamente.



4.0. Anexo

Anexo 1 – Esquema del Procedimiento

DETERMINACIÓN DE GLUTEN EN ALIMENTOS PARA CELÍACOS

ANEXO 1 – ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO

