

Universidad Nacional del Litoral
Facultad de Ingeniería Química
Facultad de Ciencias Veterinarias



CARRERA
ESPECIALIZACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
DE LA LECHE Y LOS PRODUCTOS LÁCTEOS

"ENFERMEDAD CELÍACA Y APTITUD DE PRODUCTOS LÁCTEOS"

Lic. Diego S. Cazzaniga A.

Trabajo Final Integrador para optar al título
ESPECIALISTA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LA LECHE
Y LOS PRODUCTOS LÁCTEOS

Tutora: Dra. Carina V. Bergamini (INLAIN-UNL-CONICET)

Santa Fe, febrero de 2013

Agradecimientos

Al INTI-Lácteos por haberme facilitado los medios materiales necesarios para la realización de la parte experimental y el tiempo dispensado en el cursado de la Especialización.

Al Servicio de Referencia de INTI por haberme capacitado en la utilización de la biblioteca virtual para la búsqueda bibliográfica.

Al INLAIN , en especial a su cuerpo directivo y docente, por haberme brindado los conocimientos científicos y tecnológicos que permiten establecer una comunicación más fluida con el profesional de la industria láctea, a través de un lenguaje común.

A la Dra. Carina V. Bergamini por su acompañamiento en la concreción de este trabajo y por la calidad de sus correcciones.

(A Dios, sobre todas las cosas)

A mi hija, Micaela.

A mis compañeros de trabajo de INTI-Lácteos.

(En memoria de mi padre)

INDICE

<i>ABREVIATURAS Y SIGLAS</i>	5
<i>RESUMEN</i>	7
<i>INTRODUCCIÓN</i>	9
<i>OBJETIVOS</i>	11
<i>METODOLOGÍA</i>	13
<i>CAPÍTULO 1</i>	14
<i>ENFERMEDAD CELÍACA</i>	14
1- <i>¿Qué es la celiacía?</i>	15
2- <i>Caracterización del gluten</i>	16
2.1- <i>Toxicidad del gluten de TACC</i>	17
3- <i>Clasificación y manifestaciones clínicas de la celiacía</i>	20
4- <i>Diagnóstico</i>	21
5- <i>Epidemiología de la enfermedad</i>	22
5.1 - <i>Prevalencia en Argentina</i>	23
6- <i>Factores determinantes en el desarrollo de la enfermedad</i>	23
6.1 - <i>Factor genético</i>	23
6.2 - <i>Factores ambientales</i>	24
7- <i>Tratamiento de la enfermedad</i>	26
8- <i>Terapias alternativas - los grandes desafíos</i>	27
8.1 - <i>Detoxificación del gluten de TACC</i>	27
8.2 - <i>Cereales genéticamente modificados</i>	29
8.3 - <i>Bloqueo de zonulina e inhibición de la IL-15 y de la tTG</i>	30
8.4 - <i>Desarrollo de vacunas</i>	30
8.5 - <i>La acción de probióticos sobre el epitelio intestinal</i>	30
9- <i>Tolerancia al gluten</i>	31
10 - <i>Discusión</i>	31
<i>CAPÍTULO 2</i>	33
<i>ALIMENTOS PARA CELÍACOS. PRODUCTOS LÁCTEOS</i>	33
1 - <i>Celiacía y adquisición de alimentos aptos</i>	34

1.1 - La importancia de la lectura del rótulo de un alimento.....	35
1.2 - La cantidad máxima tolerable de gluten por un celíaco – Límite umbral	36
2 - Legislación sobre alimentos libres de gluten	37
2.1 - Argentina.....	37
2.2 - Unión Europea.....	41
2.3 - Estados Unidos.....	42
3 - El Listado de Alimentos Libres de Gluten	43
4 - El consumo de productos lácteos en la dieta libre de gluten de un celíaco.....	45
4.1- Productos lácteos aptos, cuestionados y prohibidos	47
5 - Aditivos e ingredientes permitidos para la industria láctea como posibles fuente de gluten de TACC	56
5.1 - Almidones y derivados	56
5.2 - Inulina y FOS (fructoligosacáridos).....	58
5.3 - Cultivos microbianos y enzimas liofilizados o micro-encapsulados.....	58
5.4 - Leche en polvo (como ingrediente)	60
5.5 - Fermentos de <i>Penicillium roqueforti</i>	60
5.6 - Jarabes de glucosa y maltodextrinas	60
5.7 - Colorante caramelo	61
5.8 - Aromatizantes/saborizantes.....	62
5.9 - Gelatina y glutamatos	62
6 - Usos específicos de almidones y derivados en la industria láctea argentina	63
6.1 - Productos lácteos que admiten almidones y/o derivados	64
6.2 - Productos lácteos (o de base láctea) observables	66
7 - Buenas prácticas de manufactura (BPM) y prevención de contaminación cruzada	68
7.1- Materias primas (ingredientes) y aditivos	69
7.2- Control de procesos y de equipos	70
7.3- Instalaciones.....	71
7.4- Envasado y Etiquetado	72
7.5- Higiene.....	72
7.6- Capacitación del personal.....	73
8 - Discusión	73
CAPÍTULO 3.....	76

<i>MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE TRAZAS DE GLUTEN DE TACC EN ALIMENTOS</i>	76
1- Requisitos de los métodos de análisis	77
2 - Clasificación de los métodos de análisis	77
2.1 -Basados en la detección de proteínas	78
2.2 -Basados en la detección de ADN	91
3 - Ventajas y desventajas de los distintos métodos	91
4 - Aplicaciones de los sistemas inmunológicos y no-inmunológicos para el análisis de gluten en alimentos	93
5 - Limitaciones y consideraciones de las técnicas inmunológicas para la determinación de gluten de TACC	93
5.1- Extracción de la muestra	94
5.2- El polimorfismo de las prolaminas tóxicas.....	98
5.3- El material de referencia utilizado para la cuantificación del gluten.....	99
6- Sistemas de ELISA para el análisis de alimentos libres de gluten utilizados en Argentina y laboratorios homologados	100
7 – Bioingeniería y detección de gluten de TACC	102
7.1- Biosensores	102
7.2- Sistemas lab-on-a-chip.....	103
8 – La contaminación de la muestra y las Buenas Prácticas de Laboratorio	104
9 - Discusión	105
CAPÍTULO 4	108
<i>PARTE EXPERIMENTAL: ANÁLISIS DE GLUTEN EN PRODUCTOS LÁCTEOS E INSUMOS</i>	108
1 - Introducción	109
2 - Objetivos	110
2.1 - Objetivo general	110
2.2 - Objetivos específicos.....	110
3 - Materiales y métodos	110
3.1- Prueba de desempeño de productos lácteos en cuanto al cumplimiento de la condición “libre de gluten”	110
3.2 - Detección de gluten de TCC en yogures elaborados con la adición de almidón.....	114
4- Resultados	118

4.1 - Prueba de desempeño de productos lácteos en cuanto al cumplimiento de la condición “libre de gluten”	118
4.2 - Detección de gluten en yogures elaborados con la adición de almidón.	125
5 - Conclusiones	126
<i>CONCLUSIONES FINALES.....</i>	<i>128</i>
<i>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</i>	<i>130</i>

ABREVIATURAS Y SIGLAS

- AC: Anticuerpo(s)
- ACELA: Asistencia al Celíaco de Argentina
- ALG: Alimento Libre de Gluten
- ANMAT: Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica
- AOAC: Association of Analytical Communities
- ASSAL: Agencia Santafesina de Seguridad Alimentaria
- BAL: Bacterias Ácido-Lácticas
- BPL: Buenas Prácticas de Laboratorio
- BPM: Buenas Prácticas de Manufactura
- CAA: Código Alimentario Argentino
- CERELA: Centro de Referencia de Lactobacilos – Argentina
- CONAL: Comisión Nacional de Alimentos
- DLG: Dieta Libre de Gluten
- DOP: Denominación de Origen Protegida
- EC: Enfermedad Celíaca
- EFSA: European Food Safety Authority
- ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
- ELONA: Enzyme-linked Oligonucleotide Assay
- EPA: European Patent Application
- FDA: Food and Drug Administration
- GFCO: Gluten-Free Certification Organization
- GSFA: General Standard for Food Additives
- IMM: Institut für Mikrotechnik Mainz
- INAL: Instituto Nacional de Alimentos
- INTI: Instituto Nacional de Tecnología Industrial
- IRMM: Institute for Reference Materials and Measurements
- LC: Límite de Cuantificación
- LD: Límite de Detección
- MALDI-TOF: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight

NIST: National Institute of Standards and Technology

NSFI: National Starch Food Innovation

PCR: Polymerase Chain Reaction

PCR-RT: PCR en Tiempo Real

PLLG: Producto(s) Lácteo(s) Libre de Gluten

POES: Procedimientos Operativos Estandarizados de Saneamiento

RENAPRA: Red Nacional de Protección de Alimentos

RNPA: Registro Nacional de Producto Alimenticio

SAGyP: Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca

SPReI: Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos

TACC: Trigo, Avena, Cebada y Centeno

TCC: Trigo, Cebada y Centeno.

TFI: Trabajo Final Integrador

WGPAT: Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity

WIPO: World Intellectual Property Organization

RESUMEN

La celiaquía es considerada la enfermedad intestinal crónica más frecuente, siendo actualmente el único tratamiento para su control, una alimentación exenta de gluten de trigo, avena, cebada y centeno (TACC) de por vida.

Esta enfermedad se caracteriza porque el factor tóxico, unas proteínas llamadas prolaminas y que se encuentran en el gluten del TACC, induce una respuesta anormal del sistema inmune de personas genéticamente predispuestas, lo que conduce a una atrofia de las vellosidades intestinales con un síndrome de malabsorción de nutrientes, desnutrición y propensión al desarrollo de linfomas malignos. Suprimido el TACC de la dieta del celíaco, la función intestinal se restituye normalmente.

Es así que el celíaco debe nutrirse de alimentos naturalmente exentos de gluten, como ser carnes, leche, vegetales, frutas y cereales no TACC, lo cual no quita que pueda consumir alimentos procesados, dentro de los cuales se hallan los lácteos, para cumplimentar una nutrición equilibrada. De allí que lo más difícil sea conseguir alimentos que garanticen la ausencia de gluten en su composición y que estén rotulados como tales.

Dentro de los productos lácteos y mezclas alimenticias hechas a base de ingredientes lácteos, se encuentra una variedad amplia de productos aptos (leche, ciertos quesos, manteca, crema) pero también, algunos son cuestionados en su inocuidad y otros, directamente están prohibidos en la dieta de un celíaco. Todo depende del tipo de ingredientes que conformen su rótulo y cuáles de ellos pueden ser fuentes sospechosas de contener gluten de TACC, como para introducirlo involuntariamente en las líneas de producción (contaminación cruzada). Por esto, las buenas prácticas de manufactura y el compromiso de la empresa láctea de generar alimentos libres de gluten seguros, es una responsabilidad que debe estar documentada y que involucra no sólo al elaborador sino también, a los proveedores de insumos e ingredientes.

En nuestro país, la reglamentación es estricta y sólo se certifica oficialmente la condición de “libre de gluten de TACC” de un alimento, cuando el mismo contiene menos de 10 mg gluten/ kg de alimento.

Actualmente los métodos de detección/cuantificación de trazas de gluten de TACC están orientados a los enzimoensayos, siendo uno de éstos el que se recomienda en el Codex Alimentarius para el control de alimentos para celíacos. Pero estas técnicas, si bien son de alta sensibilidad, pueden dar resultados falsos positivos y falsos negativos. Todo depende de cómo se apliquen en virtud de la naturaleza de la matriz alimenticia que se analice, del tipo de procesamiento tecnológico que recibió el alimento y de los cuidados que se tengan a la hora de realizar las determinaciones a fin de evitar contaminaciones indeseadas. Afortunadamente, la matriz láctea no trae inconvenientes desde el punto de vista analítico.

En el presente TFI, se utilizó un kit comercial basado en la inmunocromatografía de flujo lateral para realizar un *screening* de presencia de gluten de TCC en diferentes productos lácteos e insumos. En este estudio, se verificó que muchos alimentos lácteos que se expenden en el mercado dan resultado negativo a la detección analítica pero carecen en su rótulo de la certificación de “libre de gluten”. La implementación de BPM y POES, en una industria láctea, para poder garantizar adecuados procesos de elaboración sin riesgos de contaminación cruzada con gluten en las líneas de elaboración, y el compromiso de las empresas alimenticias en la obtención del certificado de “libre de gluten” para sus productos, redundaría a favor de una ampliación de la oferta de alimentos seguros para un celíaco.

INTRODUCCIÓN

El siguiente Trabajo Final Integrador (TFI) aborda la problemática de la enfermedad celíaca y la aptitud de alimentos procesados, con un enfoque amplio en los productos lácteos. En su desarrollo se vincularon aspectos clínicos, nutricionales, tecnológicos, de buenas prácticas de manufactura (BPM), toxicológicos, analíticos y legales de modo tal de conformar un documento que posibilite al lector, no sólo conocer algo más acerca de esta enfermedad que, día a día, crece en prevalencia en la población mundial, sino también saber cómo elaborar y controlar las materias primas, ingredientes y aditivos para dar origen a un producto lácteo libre de gluten (PLLG), inocuo para el celíaco y en el marco de las reglamentaciones vigentes.

La enfermedad celíaca es un trastorno autoinmune de origen alimentario, caracterizado por la intolerancia irreversible a proteínas del gluten de trigo, avena, cebada y centeno (TACC), llamadas *prolaminas*, las que lesionan el epitelio intestinal de las personas genéticamente predispuestas, generando una mala absorción y utilización de nutrientes y, en el peor de los casos, el desarrollo de linfomas malignos (ANMAT, 2006).

Para controlar esta patología y restituir la funcionalidad intestinal, el tratamiento consiste en una dieta estricta absolutamente libre de proteínas tóxicas a lo largo de toda la vida, para lo cual se deberá prestar especial atención a todos los alimentos ingeridos ya que el gluten tóxico no sólo está en el TACC sino también en otros productos donde se incorporan ingredientes o aditivos derivados de dichos cereales.

En los últimos años se ha verificado un aumento en el uso industrial de las proteínas de trigo en productos procesados ya sea como fuente de proteínas vegetales o como sustituto de las proteínas animales para reducir costos. Por otro lado, el almidón de trigo, que también se utiliza en muchos alimentos como espesante y en medicamentos como excipiente, puede contener gluten y su concentración va a depender de ciertas características del proceso con el cual se obtuvo (González y col., 2007). Tal es el caso de yogures saborizados y postres lácteos que pueden contener alguna fuente de gluten vinculada a espesantes/gelificantes, colorantes y edulcorantes. Lo mismo puede suceder con algunos quesos untables y cremas ácidas dietéticas donde

el agregado de modificadores de textura para la obtención de las características organolépticas deseadas, puede implicar la incorporación de aditivos con gluten oculto. Además, dentro de un marco legal, la incorporación en productos lácteos de ingredientes y/o aditivos no permitidos, produce un efecto doble: por un lado constituye una adulteración y, por el otro, un riesgo sanitario, en este caso, para el celíaco (Association Canadienne de la Maladie Coeliaque, 2009).

Desde el punto de vista analítico, existen muchas técnicas para la detección y cuantificación de gluten. Para tal fin, la preferencia internacional en el análisis de las prolaminas tóxicas está orientada hacia los enzimoimmunoensayos, tipo ELISA, dada su alta sensibilidad, selectividad y fiabilidad (Denery-Papini y col., 1999). Los métodos rápidos para el análisis de gluten, como la inmunocromatografía de flujo lateral, constituyen una herramienta eficaz para la industria ya que permiten obtener resultados cualitativos confiables, y, además, la ejecución de los mismos es muy rápida y no requiere de personal calificado. Asimismo pueden emplearse de un modo adecuado para controlar grado de limpieza a nivel de líneas de producción y puntos críticos donde pueda ser posible una contaminación cruzada con gluten.

OBJETIVOS

Objetivo general

Realizar una revisión bibliográfica exhaustiva sobre la problemática de la enfermedad celíaca, las metodologías utilizadas en el análisis de gluten de TACC en los distintos alimentos y las posibles fuentes ocultas de gluten de TACC que pueden ser introducidas en productos lácteos a través de aditivos e ingredientes. Realizar un *screening* de detección de gluten en productos lácteos e insumos para incorporar dicha determinación a la Oferta Tecnológica de INTI-Lácteos.

Objetivos particulares

1- Conocer qué es la enfermedad celíaca, los factores de predisposición, su prevalencia y los avances en su tratamiento.

2- Conocer la legislación nacional e internacional de alimentos libres de gluten y profundizar el estudio sobre la aptitud de alimentos para celíacos, en especial, la de productos lácteos, tomando como base los requisitos establecidos en el Código Alimentario Argentino para la elaboración de los mismos y analizar las recomendaciones de las asociaciones de celíacos en cuanto a su consumo seguro. Proponer y redactar recomendaciones para la elaboración segura de PLLG en virtud de las propuestas afines de la ANMAT para productos alimenticios procesados en general.

3- Investigar cuáles son las técnicas referenciales y disponibles para el análisis de gluten en alimentos, conocer sus ventajas y desventajas, sus limitaciones, su campo de aplicación y las consideraciones metodológicas pertinentes, con hincapié en el conocimiento de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), necesarias para asegurar la calidad analítica de los resultados.

4- Realizar un *screening* de detección de gluten en alimentos lácteos del mercado (con o sin declaración de libre de gluten de TACC) y en yogures elaborados a escala laboratorio, adicionados de almidón de trigo y maíz, a través de un método de inmunocromatografía de flujo lateral. Incorporar dicha determinación a la Oferta Tecnológica de INTI-Lácteos.

METODOLOGÍA

El presente TFI se organizó en cuatro capítulos que responden a los distintos objetivos particulares planteados. Para los tres primeros se realizó una búsqueda bibliográfica sobre la temática, mediante el acceso a fuentes de información nacionales e internacionales, mientras que en el cuarto se aplicó uno de los métodos de detección de gluten para el análisis, tanto de alimentos lácteos comerciales como elaborados a escala laboratorio. Cabe aclarar que la parte experimental, que compone el capítulo 4, no estaba incluida en la presentación de la planificación del presente TFI, y la idea de su incorporación surgió con posterioridad, durante el desarrollo del mismo.

Respecto de la búsqueda bibliográfica, se analizaron los números más recientes de las publicaciones periódicas internacionales indizadas que se encuentran accesibles en línea, ya sea a través de suscripciones específicas, de la biblioteca electrónica del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva (<http://biblioteca.mincyt.gov.ar>) o de las fuentes de información dirigidas a ciencias de los alimentos que poseen tanto el INLAIN como INTI-Lácteos (www-biblio.inti.gov.ar), en sus respectivas bibliotecas. También se recopiló información de empresas comerciales proveedoras de kits para la determinación de gluten.

Respecto de la parte experimental, en INTI-Lácteos, mediante un concurso de precios, se seleccionó un kit de bajo límite de detección para el análisis de gluten en alimentos por inmunocromatografía de flujo lateral. La empresa ganadora ofreció una capacitación presencial para el uso correcto del material suministrado. El kit adquirido fue utilizado para el análisis de gluten en diversos productos lácteos, declarados o no exentos de gluten de TACC, los que fueron tomados directamente de estanterías de hipermercados, supermercados y almacenes. Asimismo, se analizaron muestras de ingredientes e insumos lácteos, que fueron solicitados a empresas proveedoras de la industria láctea. Además del gluten de TACC, los productos se analizaron en cuanto a la presencia de almidón para verificar contaminaciones cruzadas o adulteraciones con este ingrediente cuyo uso se ha incrementado en la industria alimenticia en general. Finalmente, el kit de detección de gluten también fue aplicado a yogures elaborados a escala laboratorio con la adición de almidones de trigo y/o de maíz.

CAPÍTULO 1
ENFERMEDAD CELÍACA

1- ¿Qué es la celiacía?

La celiacía, o enfermedad celíaca (EC), es un trastorno autoinmune de origen alimentario que se caracteriza por generar, en personas genéticamente predispuestas, una respuesta anormal del sistema inmunológico hacia un grupo de proteínas vegetales denominadas *prolaminas*. Estas proteínas se encuentran en el gluten del trigo, de todas las especies de *Triticum*, incluyendo espelta y kamut, trigo duro, cebada, centeno, avena, y en todas sus variedades cruzadas. Se trata de una enteropatía de sensibilidad al gluten. Esta situación condiciona la aparición de lesiones severas de la mucosa intestinal, cuya consecuencia es la atrofia de las vellosidades del intestino delgado, por lo que se establecen defectos en la absorción y utilización de nutrientes (proteínas, grasas, hidratos de carbono, sales minerales y vitaminas) (ANMAT, 2006). Consecuentemente, se evidencian cuadros de anemia, fatiga crónica, pérdida de peso, retardo en el crecimiento, diarreas, osteoporosis y una mayor predisposición al desarrollo de linfomas malignos, en cuyo caso, el riesgo de mortalidad se duplica y se sextuplica en pacientes no tratados. Los síntomas clínicos pueden manifestarse tanto en la niñez como en la adultez pero en la mayoría de los casos no se presenta ningún síntoma o éstos son atípicos, lo cual dificulta el diagnóstico precoz (Dewar y col., 2004; Pérez y col., 2008).

Esta patología, de carácter crónico, requiere de un tratamiento inmediato con el fin de recuperar la funcionalidad intestinal y evitar las complicaciones a largo plazo derivadas del consumo de proteínas tóxicas. El tratamiento de la enfermedad consiste en una dieta estricta absolutamente libre de prolaminas de trigo, avena, cebada y centeno (TACC) a lo largo de toda la vida, para lo cual se deberá prestar especial atención a todos los alimentos ingeridos (Ciclitira y Moodie, 2003; Green y Cellier, 2007). Es muy importante tener en cuenta que el gluten no sólo está presente en alimentos cuyo componente principal son los cereales antes mencionados, sino también en muchos otros productos donde se incorporan ingredientes o aditivos derivados de dichos cereales.

2- Caracterización del gluten

Los granos de cereales poseen tres constituyentes fundamentales que se separan por molienda. Ellos son: el *salvado* (14,5%), el *germen* (2,5 %) y el *endospermo* (83%); éste último, formado por almidón y proteínas. Dentro de los granos, la matriz proteica del endospermo separa los gránulos de almidón (figura 1).

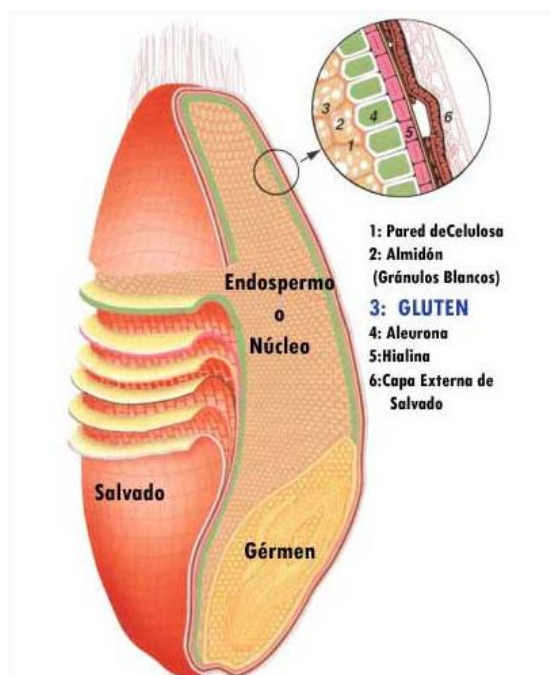


Figura 1. Estructura de un grano de trigo (fuente: Veggiemeat, 2012)

Osborne (1907) clasificó las proteínas del endospermo, según su solubilidad relativa en distintos solventes, de la siguiente manera:

- ☞ **albúminas:** solubles en agua,
- ☞ **globulinas:** solubles en solución salina (NaCl),
- ☞ **prolaminas:** solubles en etanol (40-70%),
- ☞ **glutelinas:** solubles en ácidos y álcalis.

El **GLUTEN** es el conjunto de proteínas insolubles en agua y en NaCl 0,5M que constituye el principal complejo proteico presente en los cereales. Según su solubilidad en etanol 40-70%, está compuesto por dos fracciones:

- **prolaminas** → solubles; de peso molecular medio (subunidad ω) y bajo (subunidades α/β y γ)
- **glutelinas** → insolubles; de peso molecular alto (subunidades x e y) y bajo.

La función biológica conocida de estas proteínas es ser sillares de almacenamiento de los cereales (proteínas de reserva). Cuando el grano de cereal madura, el gluten pierde su estructura original para formar una matriz continua en la que se incrustan los gránulos de almidón, dentro del endospermo. En el trigo, las proteínas totales constituyen el 12% de los sólidos totales, y se dividen en proteínas del gluten y no-gluten¹ (Van Der Borgh y col., 2005). Tecnológicamente, las proteínas del gluten juegan un rol determinante en la calidad panificadora única del trigo, confiriendo a la masa capacidad de absorción de agua, cohesividad, viscosidad y elasticidad (Ciclitira y col., 2005; Wieser, 2007). Reciben distintos nombres según sea el cereal del que derivan (tabla 1).

Tabla 1. Denominación de prolaminas y glutelinas de los cereales responsables de la celiacía (Osborne, 1907).

Cereal	Prolaminas	Glutelinas
<i>Trigo</i>	Gliadinas	Gluteninas
<i>Centeno</i>	Secalinas	Secalininas
<i>Cebada</i>	Hordeínas	Hordeninas
<i>Avena</i>	Aveninas	Avenalinas

2.1- Toxicidad del gluten de TACC

Los granos de trigo, cebada, centeno, avena, maíz, arroz, sorgo y otras especies vegetales, pertenecen a la familia botánica de las *gramíneas* y contienen gluten en sus granos. Hoy en día se acepta que la toxicidad del gluten para los celíacos está contenida en todas las fracciones α , β , γ y ω de las gliadinas y en las prolaminas homólogas de cebada y centeno (avena es un caso particular a tratar más adelante). La ω -gliadina

¹ Las proteínas no-gluten forman entre el 15-20% del total de proteínas del trigo (Van Der Borgh y col., 2005).

demonstró ser la más resistente a la desnaturalización por calor. Por otro lado, investigaciones recientes revelaron que los hidrolizados de gluteninas de bajo peso molecular contienen también restos tóxicos para los celíacos. Las prolaminas de sorgo, arroz y maíz son inocuas para los celíacos, es decir, no resultan tóxicas porque no presentan homología con la estructura de las prolaminas de TACC (Denery-Papini y col., 1999).

Las prolaminas de trigo, centeno y cebada son similares dada la relación botánica entre dichas especies, lo que no sucede con la avena porque, si bien es una gramínea, no pertenece a la misma tribu botánica y, además, su contenido en prolaminas (aveninas) es mucho más bajo, lo que la hace menos toxicogénica (Wieser, 2007). La tabla 2 muestra las diferencias proporcionales entre los contenidos de proteínas y prolaminas de los cereales involucrados en la celiacía.

Tabla 2. Contenido de proteínas y prolaminas en los granos de cereales (Calvo, 2003).

Cereal	Prolaminas	Proteínas (%)	Prolaminas (%)
Trigo	Gliadinas	10 – 15	4,7 – 7,5
Centeno	Secalinas	9 – 14	3,0 – 7,0
Cebada	Hordeínas	10 – 14	3,5 – 7,0
Avena	Aveninas	8 – 14	0,8 – 2,1

a) Péptidos tóxicos

El gluten es la única de todas las proteínas dietarias con aproximadamente el 15% de prolina y el 35% de glutamina. Debido al alto contenido de estos dos aminoácidos, nunca es posible una proteólisis completa del gluten por medio de las enzimas gástricas y pancreáticas, lo que conduce a una acumulación en la superficie del intestino delgado de oligopéptidos tóxicos para los celíacos. Uno de ellos, el péptido 33-mer (residuos 57-89), deriva de una región de la α -gliadina con alta cantidad de residuos de prolina, siendo el más inmunotóxico en celíacos, lo cual fue demostrado en pruebas *in vitro* e *in vivo*. Las regiones con epítomos² tóxicos aparecen en forma repetida en todas las subunidades de gliadinas y están conservadas en las distintas variedades de trigo, cebada y centeno, mientras que no se encuentran en la avena (Morón y col., 2008b).

² Epítomo es una secuencia específica en una macromolécula antigénica que forma una superficie de unión sobre la que se enlaza un anticuerpo dando origen a un complejo antígeno-anticuerpo (Male y col., 2007).

Día a día siguen caracterizándose más péptidos tóxicos de las distintas fracciones de prolaminas de TACC, extendiéndose también los estudios a las subunidades de glutelinas, aunque en este caso la toxicidad para celíacos se manifiesta en epítomos con dominios secuenciales diferentes a los de las prolaminas (Wieser y Koehler, 2008). En virtud de estos hallazgos se llegó a determinar que aproximadamente sólo el 10 % de todo el gluten, dependiendo del tipo de cereal, origina péptidos tóxicos. De esta manera, el desarrollo de los métodos de detección de trazas de estos contaminantes en alimentos procesados se centra en la capacidad de cuantificar estos péptidos y no la totalidad del gluten, lo que permitiría evaluar en forma más precisa la toxicidad verdadera de un alimento sospechado de contenerlo (Morón y col., 2008a).

b) Toxicidad de la avena

Varios estudios se han realizado en Europa y en Estados Unidos para evaluar el potencial tóxico de la avena para un celíaco. Por un lado, existen investigaciones que revelaron que cuando se agregó avena a una dieta libre de gluten (DLG), la misma fue bien tolerada por la mayoría de los niños y adultos celíacos, no registrándose síntomas abdominales ni modificaciones en la arquitectura del epitelio intestinal. Además, hubo una lenta normalización serológica y muchas de las personas que se sometieron a los ensayos continuaron ingiriendo posteriormente avena. Sin embargo, algunos pacientes adultos mostraron intolerancia y desarrollo de atrofia intestinal, hechos que se atribuyeron al efecto tóxico de un péptido propio de la avena, similar pero no idéntico a los péptidos de TCC (Ciclitira y col., 2005). Esta escasa o nula toxicidad de la avena para la mayoría de los celíacos puede ser atribuida al hecho que la misma presenta un contenido mucho más bajo tanto de prolaminas como de glutelinas si se compara con el trigo, cebada y centeno (Morón y col., 2008b).

Por lo tanto, la avena parece ser segura para su uso alimenticio en la mayoría de los pacientes con EC pero su inclusión en una DLG está limitada por la contaminación potencial con gluten tóxico durante la molienda y el procesamiento. En Estados Unidos y Canadá existen hoy en día instalaciones especiales para procesar avena, con controladores en línea para evitar la contaminación con prolaminas tóxicas y garantizar su pureza (Niewinski, 2008).

3- Clasificación y manifestaciones clínicas de la celiacía

La EC se presenta generalmente en los primeros años de vida, aunque puede no ser diagnosticada hasta la edad adulta, presentándose inclusive en forma asintomática, lo que despierta baja sospecha clínica. Los síntomas en la primera infancia suelen ser: evacuaciones blandas que progresan a diarreas varias veces al día, flatulencias, pérdida o falta de ganancia de peso, crecimiento lento. En niños más grandes y adolescentes aparecen esporádicamente síntomas extraintestinales y que pueden contribuir a la sospecha de la enfermedad; éstos son: anemia, estatura baja y síntomas neurológicos. En adultos se manifiesta con diarrea que puede o no estar acompañada de distensión abdominal, aunque en los últimos 10 años estas manifestaciones fueron menores al 50 %, aumentando los síntomas extraintestinales asociados a la mala absorción de nutrientes como ser hipocalcemia, hipoproteïnemia, anemia y elevado nivel de enzimas hepáticas (Green y Cellier, 2007).

El hecho que la enfermedad se presente con distintos síntomas, e incluso, sin ellos, hizo que se la clasificara de la siguiente manera (Rostom y col., 2006):

EC sintomática

- EC clásica: cursa con síntomas gastrointestinales;
- EC atípica: cursa con síntomas no-gastrointestinales;

EC asintomática:

- EC silente: sin síntomas a pesar de existir una lesión intestinal, y pueden tener marcadores serológicos (anticuerpos) positivos;
- EC latente: sin síntomas ni lesión de la mucosa intestinal, aunque puede haber un aumento de los linfocitos intraepiteliales.

Por último, existe una variante de presentación conocida como *celiacía refractaria*, con lesión de la mucosa intestinal, que resulta en la mayoría de los casos irreversible, puesto que estos pacientes no manifiestan una recuperación del epitelio intestinal, aún siendo sometidos a una DLG. Las complicaciones más severas de la misma conducen al desarrollo de linfomas de células-T con una tasa de mortalidad muy alta.

3.1 - La teoría del “iceberg”

En 1991, Richard Logan modelizó la epidemiología de la celiaquía a través de su teoría del “iceberg” por medio de la cual, todo lo que está por encima de la “línea de agua”, es decir, la punta del iceberg, representaría a la población celíaca diagnosticada (EC clásica/atípica) y toda la masa de hielo sumergida, sería la población celíaca no diagnosticada (celíacos silentes/latentes) (figura2). Con este modelo se intenta explicar que lo que “se ve” de la patología representa una pequeña proporción de lo que realmente existe. El tamaño total del iceberg, que representa la prevalencia, es más o menos igual a nivel mundial. Sólo varía la posición de la “línea de agua” de un continente a otro, la que se modificará en el tiempo a medida que más casos sean diagnosticados, inducidos por un aumento de las sospechas clínicas particulares (sobre todo, en parientes de primer y segundo grado) o como resultado del incremento de estudios epidemiológicos a nivel mundial (Bai y col., 2010).

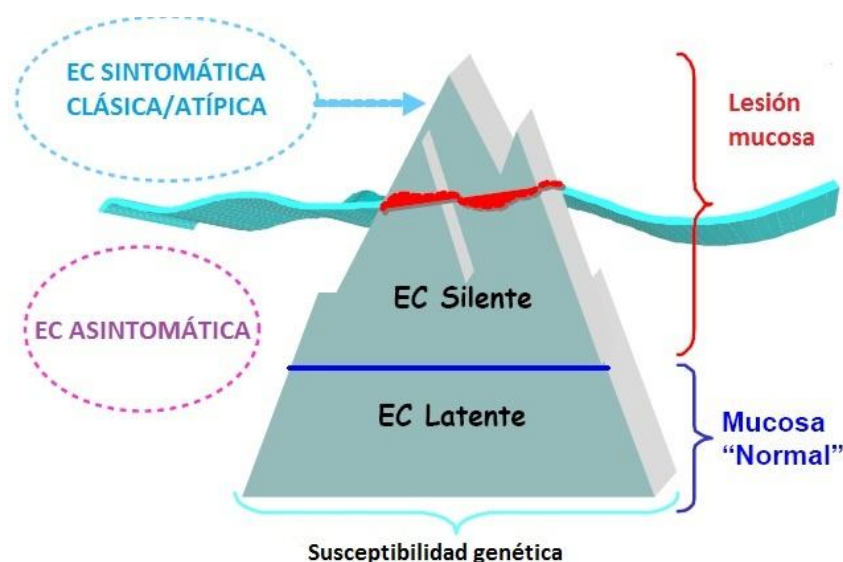


Figura 2. La teoría del iceberg en la EC (fuente: Ribes Koninckx, 2010).

4- Diagnóstico

La EC es una patología que requiere de un alto índice de sospecha clínica, principalmente en aquellos países con gran consumo de cereales en la dieta (Heredia y col., 2007). En general se manifiesta a edades entre 1 y 5 años en los niños, entre los 20 y 40 años en las mujeres y a edades mayores en los hombres (Ortiz, 2005). No obstante, muchos pacientes aún hoy permanecen sin ser diagnosticados debido a la

inespecificidad de síntomas con los que se manifiesta (Asociación de Celíacos de Madrid, 2005).

Ante la sospecha, los tests serológicos de anticuerpos específicos: anti-endomisio (AAEm), antitransglutaminasa tisular (AtTG) y anti-gliadina (AAg) se utilizan inicialmente como monitoreo no invasivo, siendo los dos primeros los de mayor aceptación y uso por su alta sensibilidad y especificidad (Heredia y col., 2007). No obstante, no existe un análisis clínico único mediante el cual se pueda diagnosticar EC en un individuo. Además, las serologías no dan los mismos resultados a distintas edades, ya que esto dependerá del grado de atrofia vellositaria de la persona al momento del análisis. Por eso, el patrón de oro para su diagnóstico es la biopsia de intestino delgado que confirma los resultados positivos de las pruebas de laboratorio clínico (Niewinski, 2008). Las pruebas serológicas también son utilizadas como monitoreo y respuesta a una DLG (Heredia y col., 2007).

5- Epidemiología de la enfermedad

Muchos de los datos de prevalencia de la celiacía vienen de estudios en países europeos donde se creía era más frecuente su aparición. Pero con el paso de los años, a medida que se fue sabiendo más sobre ella y se fueron desarrollando métodos serológicos de alta sensibilidad y especificidad para detectar los anticuerpos involucrados, sumado a la confirmación con biopsia intestinal, los estudios de prevalencia fueron incrementándose y sus valores, cambiando. Hoy es conocido que la EC es una afección común no sólo en todos los países de Europa y en aquellos con población de ascendencia europea, sino también en Sudamérica, Estados Unidos, Norte de África y Asia, con excepción de China y Japón (Rostom y col., 2006; Green y Cellier, 2007; Niewinski, 2008).

En general se estima que esta enfermedad afecta al 1% de la población mundial, entre niños y adultos (Green y Cellier, 2007). Una mayor prevalencia de EC se encuentra entre aquellas personas con predisposición familiar, y además está asociada con enfermedades autoinmunes, como la artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Addison, diabetes tipo I, neuropatía IgA, enfermedad tiroidea autoinmune, hepatitis crónica activa, y con otras patologías como el Síndrome de Down y la fibrosis quística, entre otras (Lara Alcántara y col., 2002).

5.1 - Prevalencia en Argentina

El primer estudio de prevalencia de la EC hecho en Sudamérica, se llevó a cabo en la Unidad de Soporte Nutricional y Enfermedades Malabsortivas del Hospital de La Plata, entre 1998 y 2000, lo que permitió diagnosticar la celiacía en 1 cada 167 personas sanas, donde un 70% de las personas no había tenido ningún tipo de sintomatología (Ortiz, 2005). Con el paso del tiempo y motivados por el hecho que gran parte de nuestra población tiene un origen europeo, los estudios de prevalencia siguieron incrementándose, con hincapié en la población infantil. Un estudio llevado a cabo entre 2008-2009 sobre una población de entre 3 y 16 años, arrojó una prevalencia estimada parcial de 1,48%, es decir 1:67 (810 casos analizados, 12 positivos) (Estudio multicéntrico, 2008-2009).

6- Factores determinantes en el desarrollo de la enfermedad

La celiacía es considerada una enfermedad multifactorial; es el resultado de la interacción entre factores genéticos expresados en la mucosa intestinal y la respuesta inmune por una parte, y factores ambientales y culturales, como el consumo de trigo en cantidades impensables para la especie humana hace no más de 5000 años (Cueto Rúa y col., 2006). Es decir, se necesita un individuo genéticamente predispuesto y que consuma TACC para el desarrollo de la misma, pero aún así la patología puede no manifestarse hasta que un “factor disparador” inicia la respuesta anormal del sistema inmune con la consecuente inflamación y lesión del epitelio intestinal. De esta manera, diversos factores genéticos y ambientales participan en los mecanismos inmunológicos que predisponen al desarrollo y evolución de la enfermedad (Asociación de Celíacos de Madrid, 2005).

6.1 - Factor genético

En el cromosoma 6 existe un grupo de genes que conforman el “complejo mayor de histocompatibilidad”. Su función es captar sustancias extrañas en el organismo y presentárselas a las células específicas encargadas de la defensa del cuerpo. Los que se hallan en las células del sistema inmune son denominados HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR, que en general reconocen como extraños a antígenos externos al organismo, como

microorganismos y proteínas. Se ha demostrado que la predisposición genética hacia el desarrollo de la enfermedad celíaca se asocia con la presencia de dos grupos genéticos del complejo mayor de histocompatibilidad: HLA-DQ2 y HLA-DQ8. El grupo HLA-DQ2 se encuentra en el 80-90% de los pacientes celíacos, mientras que el resto presenta el HLA-DQ8 (Crivelli, 2009). Sin embargo, aproximadamente un 30% de la población general es DQ2 pero menos del 2 % tienen EC declarada; de allí que los genes que codifican HLA-DQ2 y/o DQ8 sean necesarios pero no suficientes para el desarrollo de la enfermedad (Ribes Koninckx, 2010). La transglutaminasa tisular (tTG) es el autoantígeno de la celiaquía, hecho demostrado científicamente en 1997. La actividad deaminasa de esta enzima genera péptidos de gliadina, de alta carga negativa, lo que aumenta su afinidad a las moléculas DQ2/DQ8 y la posibilidad de desencadenamiento de la enfermedad. Por lo tanto, el desarrollo de la enfermedad está condicionado al tipo de alelos HLA que posea un individuo y a la afinidad de los péptidos de gluten por estas moléculas (Asociación de Celíacos de Madrid, 2005).

6.2 - Factores ambientales

Pueden clasificarse en factores dietéticos y no dietéticos, que se detallan a continuación.

a) Dietéticos

El gluten y la edad de introducción en la dieta: En el aparato digestivo humano, las proteínas son hidrolizadas enzimáticamente para generar péptidos y aminoácidos que luego son absorbidos como nutrientes a nivel intestinal. El alto contenido de prolina y glutamina le confiere a las prolaminas de TACC resistencia a la proteólisis gastrointestinal. De esta forma, grandes péptidos llegan a la superficie de las vellosidades intestinales sin ser previamente desdoblados. Esto sucede tanto en individuos sanos como en celíacos, con la diferencia que, en estos últimos, la manifestación de la enfermedad involucra una variación en la permeabilidad del tejido epitelial que hace que estos péptidos lo penetren, desencadenándose la respuesta inmune anormal. Otros péptidos derivados también del gluten de TACC pueden colaborar en el desarrollo de la enfermedad activando directamente unas sustancias llamadas interleukinas (en especial la IL-15) que promueven la acumulación de linfocitos y desatan una cascada de reacciones autoinmunes a nivel de las vellosidades intestinales que conduce a su atrofia (Van Heel y West, 2006; Green y Cellier, 2007). Se ha

demostrado que los niveles de zonulina, una proteína que modula la permeabilidad intestinal, se hallan incrementados en pacientes celíacos (Niewinski, 2008; Wieser y Koehler, 2008).

Se ha comprobado que niños expuestos al gluten a través de cereales, en pequeñas cantidades, entre los 4 y 6 meses de edad tienen un menor riesgo de desarrollar la enfermedad que los niños expuestos antes o después de este período de tiempo (Niewinski, 2008). Introducirlo antes de los cuatro meses multiplica por cinco el riesgo de desarrollar la enfermedad, mientras que después de los 6 meses sería tarde para facilitar una inmunización oral (Asociación de Celíacos de Madrid, 2008a).

Lactancia materna: Durante los seis primeros meses de vida, el sistema inmune humano no está completamente formado y es en este período donde los niños se benefician del efecto inmunoprotector de la leche materna, más aún, en aquellos con propensión genética. Además, la IgA de la leche materna no sólo tiene una especificidad de anticuerpo contra patógenos comunes respiratorios e intestinales, sino también contra las proteínas de la leche de vaca y del gluten (Friedman y Zeiger, 2005; Hopman y col., 2008a). Se estima que una prolongación de la misma durante dos meses más, luego de los seis meses, estimularía más aún la inmunización oral y disminuiría el riesgo de desarrollo de la enfermedad celíaca (Akobeng y col., 2006). Sin embargo, este punto sigue estando en discusión en la comunidad científica pues no se puede determinar fehacientemente si la lactancia materna previene la EC en personas predispuestas genéticamente o sólo retrasa su debut (Asociación de Celíacos de Madrid, 2005).

En 1998, un estudio realizado en la Universidad Nacional de La Plata, reveló la presencia de altos niveles de gliadinas no degradadas y de inmunocomplejos gliadinas/IgA-antigliadinas en calostro, leche y suero de madres lactantes sanas, no hallándose ninguna correlación entre los resultados obtenidos y la ingesta de gluten de las madres. Los resultados obtenidos fueron más altos que los arrojados por otros estudios similares a nivel mundial (Chirido y col., 1998). Un estudio llevado a cabo en Holanda, en 2005, llegó a conclusiones similares tras haber analizado leche materna de madres sometidas y no sometidas a una dieta libre de gluten. La presencia de gluten se determinó por métodos inmunológicos, dosando gliadinas y gluteninas en la leche materna. Los resultados mostraron presencia de péptidos tóxicos, tanto de gliadinas como de gluteninas, estimulantes de células del sistema inmune a nivel del epitelio intestinal (células T), en la leche materna de madres que siguieron una dieta con y sin

gluten. La conclusión de este grupo de trabajo fue que los recién nacidos están expuestos a pequeños niveles de gluten vía leche materna, aún antes de introducirlo a través de otros alimentos en base a cereales, y que este hecho oficia como mecanismo para la inducción de tolerancia oral al gluten. De alguna manera se intentó buscar una explicación al hecho que aparezcan prolaminas tóxicas en la leche de madres que llevaron a cabo una dieta libre de gluten durante la experiencia. En este caso los resultados de las cuantificaciones fueron más bajos que los correspondientes a las prolaminas tóxicas presentes en la leche materna de mujeres que no hicieron una dieta libre de gluten. Una de las conclusiones a este hecho supuso que las madres no cumplieron estrictamente la dieta libre de gluten en el período de ensayo, hecho que no se pudo comprobar. Otra hipótesis es que exista reactividad cruzada de los anticuerpos específicos con péptidos de secuencias similares a las del gluten ya que este hecho fue demostrado con anticuerpos antigliadinas humanos y una proteína neuronal rica en prolina y glutamina, llamada sinapsina I. No obstante, será relevante que futuras experiencias con leche materna logren caracterizar e identificar con precisión cuáles son los péptidos de gluten presentes en la leche materna (Hopman y col., 2008a).

b) No dietéticos

Infecciones: Las infecciones por rotavirus son una de las principales causas de gastroenteritis aguda en niños. Un estudio prospectivo realizado en Colorado, Estados Unidos, publicado en 2006, proporcionó el primer indicio de que una elevada frecuencia de las infecciones por rotavirus puede incrementar el riesgo de desarrollo de la enfermedad celíaca en niños genéticamente predispuestos (Stene y col., 2006).

Estrés: Situaciones de estrés vinculadas a un embarazo o al mismo postparto, las cirugías abdominales y los episodios de gastroenterocolitis severos y prolongados pueden desencadenar la celiaquía o agravar la ya existente (Ortiz, 2005).

7- Tratamiento de la enfermedad

No existen medicamentos específicos para la celiaquía hasta la actualidad. El único tratamiento es la exclusión del gluten de TACC a través de una DLG. Este tratamiento es de por vida porque es la única manera de lograr la recuperación de la mucosa intestinal, la corrección de deficiencias nutricionales y la normalización clínica.

La dieta debe ser muy estricta y basada en la educación alimentaria puesto que pequeños desarreglos (consumo esporádico de prolaminas tóxicas) puede ocasionar trastornos clínicos, biológicos y/o histológicos y hasta predisponer al desarrollo de procesos neoplásicos malignos (Ortiz, 2005).

No es tan sencillo como parece realizar una dieta sin gluten ya que, debido a las características que el mismo da a los alimentos (consistencia, sabor, etc.), es añadido con mucha frecuencia a alimentos de fabricación industrial, siendo por ello siempre preferible los alimentos naturales frente a los manufacturados industrialmente. Por ello, resulta imprescindible leer las etiquetas y eliminar de la dieta de un celíaco todo alimento que contenga harinas y/o almidones de TACC, malta y fibra de TACC (Calvo, 2003).

8- Terapias alternativas - los grandes desafíos

Dilucidar el mapa completo de genes involucrados en el desencadenamiento de la EC junto al estudio de tratamientos alternativos para la misma, constituyen los desafíos actuales de las distintas líneas de investigación mundial. Al respecto, existen grupos de trabajo en muchos países que pretenden encarar el tema desde dos enfoques:

- ☞ por un lado, la modificación del agente externo desencadenante de la celiacía: el gluten de TACC (detoxificación del gluten) y;
- ☞ por otro lado, la modificación de la respuesta inmune frente al gluten.

8.1 - Detoxificación del gluten de TACC

La detoxificación significa aplicar un método tal que las secuencias tóxicas presentes en las prolaminas responsables del desencadenamiento de la enfermedad celíaca sean degradadas a fragmentos más pequeños (péptidos) atóxicos. Las distintas opciones pueden involucrar:

a) Detoxificación por digestión ácida

El tratamiento ácido y en caliente del gluten, a 90°C y por 3 horas, produce desamidación de los residuos tóxicos, con aumento de su solubilidad y sin proteólisis

significativa. Este gluten desamidado induce cambios en la inmunorreactividad de los anticuerpos IgA involucrados en la celiacía, además de reducir su actividad citotóxica sobre líneas celulares de adenocarcinoma de colon humano (Berti y col., 2007).

b) Detoxificación por hidrólisis enzimática específica

Se sabe que algunas propilendopeptidasas, obtenidas a partir de bacterias, hongos y cereales germinados (trigo, cebada y centeno) son capaces de hidrolizar los péptidos tóxicos del gluten. Los estudios están canalizados a desarrollar comprimidos de estas enzimas para su administración oral a celíacos, de modo tal de degradar cualquier traza de gluten tóxico presente en el alimento que ingiere, aunque las mismas deberían ser resistentes a las enzimas gástricas. Por otro lado, se está investigando también utilizar con el mismo objetivo estas enzimas en los mismos productos destinados a la alimentación de celíacos (Van Heel y West, 2006; Wieser y Koehler, 2008). Al respecto, se ha demostrado que dos propil endopeptidasas (PEP), una bacteriana y la otra fúngica, pueden degradar el gluten haciéndolo no reactivo con sitios HLA-DQ2 y HLA-DQ8 (*in vitro*) pero, en el caso de la bacteriana, no resistiría la barrera gástrica del estómago. Ninguna de las dos tiene pruebas clínicas aún. Por otro lado, la EP-B2 es una endoproteasa cisteínica que se activa en la germinación de los granos de cereales, produciendo la hidrólisis del gluten en pequeños péptidos, no reactivos con HLA-DQ2 ni HLA-DQ8, y en aminoácidos libres. Demostró ser resistente a las enzimas gástricas y está siendo estudiada para su suministro oral con la dieta de los celíacos (Stepniak y Koning, 2006)

c) Detoxificación por acción de bacterias ácido-lácticas (BAL)

Varios trabajos han sido llevados a cabo con el objetivo de aislar BAL y estudiar la capacidad de su batería enzimática proteolítica para detoxificar gluten. Gerez y colaboradores, del Centro de Referencia para Lactobacilos – Argentina (CERELA), en 2008, estudiaron la actividad proteolítica de *Lactobacillus plantarum* CRL 775 y *Pediococcus pentosaceus* CRL 792 (aisladas de masas fermentadas para panificación), sobre péptidos celíaco-tóxicos de las α -gliadinas, entre ellos, el 33-mer, uno de los más perjudiciales. En las condiciones de ensayo se determinó que cepas de *L. plantarum*, luego de 2 horas de incubación, pueden degradar más del 60% de las fracciones tóxicas 31-43 y 62-75 de las α -gliadinas mientras que ninguna de las cepas pudo hidrolizar el péptido 33-mer por sí solas. Sin embargo, ambas cepas en forma conjunta pudieron

hidrolizar el péptido en 8 horas. Ninguna de las especies bacterianas aisladas y estudiadas son de aplicación actual en la industria láctea (Gerez y col., 2008).

Otro estudio llevado a cabo con bacterias probióticas en 2005, buscó desarrollar una masa fermentada para pan donde el gluten estuviese degradado por acción proteolítica de dichas bacterias. Se utilizó la preparación liofilizada probiótica VSL#3 compuesta de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Bifidobacterium breve*, *B. longum* y *B. infantis*, que fue agregada a la masa hecha con harina de trigo en una concentración de 10^9 UFC/ml y se dejó fermentar largo tiempo. Como testigo se hizo una acidificación química de masa de harina de trigo. Luego de un tiempo se extrajeron las gliadinas hidrolizadas y se analizaron por western-blot R5, llegándose a la conclusión que esta mezcla de cepas es capaz de hidrolizar completamente los péptidos celíacos-tóxicos 33-mer y el fragmento 62-75. Además los fragmentos peptídicos productos de la proteólisis no estimularon células del sistema inmune involucradas en la celiarquía (De Angelis y col., 2006).

Si bien las bacterias lácticas desarrollan en muchos sustratos (leche, carnes, masas de panificación, etc.), su capacidad de proteolizar el gluten de TACC es y seguirá siendo objeto de estudio para obtener panes aptos para celíacos. Por lo pronto, las investigaciones obtienen resultados favorables para muchas cepas de ellas pero deberá estudiarse la factibilidad de aplicación a escala industrial y si las que son óptimas en sus funciones de degradación del gluten en masas fermentadas, pueden serlo en el gluten potencialmente presente en otras materias primas, como leche y carnes.

8.2 - Cereales genéticamente modificados

La modificación de las proteínas tóxicas para los celíacos, mediante ingeniería genética o a través de una selección de variantes naturales, es una de las propuestas para crear cereales seguros para dichas personas. Sin embargo, la obtención de variedades de trigo que no tuvieran epítomos tóxicos es todo un desafío pues implica de antemano que se deban conocer en forma completa las secuencias inmunotóxicas para un celíaco, lo que aún no se ha sido dilucidado, para luego constatar su eliminación en alguna variedad del cereal producida en forma transgénica (Asociación de Celíacos de Madrid, 2005). En este contexto, se han identificado algunas variantes naturales de trigo que contienen menor cantidad de prolaminas con epítomos tóxicos y se ha ensayado el uso

del ARN de interferencia como una técnica promisoría para silenciar genes que codifican la síntesis de gluten tóxico (Wieser y Koehler, 2008).

8.3 - Bloqueo de zonulina e inhibición de la IL-15 y de la tTG

La zonulina regula la permeabilidad de las células del intestino delgado, por lo que el uso de inhibidores de la misma sería una estrategia para disminuir el ingreso de proteínas tóxicas a las células intestinales en los celíacos (Weiser y Koehler, 2008). Un grupo de investigación de Estados Unidos está desarrollando un medicamento oral antagonista del receptor de la zonulina (Asociación de Celíacos de Madrid, 2008b).

La IL-15 y la tTG intervienen en el mecanismo de la patogénesis de la EC. La inhibición de la IL-15 mediante el uso de anticuerpos monoclonales constituye otro de los métodos de bloqueo de la respuesta inmune en un celíaco y está siendo estudiada (Calvo, 2003). En el caso de tTG las investigaciones tienen un cierto grado de complejidad ya que esta enzima tiene varios roles biológicos por lo que su inhibición puede traer efectos adversos impredecibles (Wieser y Koehler, 2008).

8.4 - Desarrollo de vacunas

En la actualidad, otro de los estudios dirigidos a la inmunorregulación de la respuesta inmune al gluten para conseguir un tratamiento en los celíacos es el desarrollo de vacunas, que se halla en etapa de experimentación. Así por ejemplo, se han desarrollado péptidos sintéticos de gluten modificados puntualmente en alguna parte de las secuencias tóxicas de modo tal que la afinidad por los genes HLA se mantenga pero la respuesta a las células T a estos péptidos sea minimizada, logrando de esta manera una modulación favorable de la respuesta inmune (Calvo, 2003; Wieser y Koehler, 2008).

8.5 - La acción de probióticos sobre el epitelio intestinal

Lindfors y colaboradores, en 2008, realizaron estudios *in vitro* para investigar la capacidad de *Lactobacillus fermentum* y *Bifidobacterium lactis* de inhibir los efectos tóxicos de las gliadinas en el intestino delgado humano. Para ello, se estudió la permeabilidad intestinal y el porcentaje de desarrollo de repliegues en membranas celulares inducido por gliadinas, entre otros parámetros. *B. lactis* fue capaz de inhibir la acción de péptidos de gliadinas sobre células intestinales en forma dependiente de la concentración. *L. fermentum* tuvo el mismo comportamiento pero con un efecto menor.

La conclusión del estudio fue que *B. lactis*, en forma viable, sería capaz de detener la acción tóxica de los péptidos celíaco-tóxicos, a altas concentraciones, pudiendo ser así un potencial suplemento dietario para el tratamiento de la celiacía (Lindfors y col., 2008).

9- Tolerancia al gluten

Existen estudios, llevados a cabo en Holanda y en Francia, que han observado la falta de signos y síntomas de EC y pruebas histológicas e inmunológicas normales en pacientes celíacos que, 20 años después de haber sido diagnosticados y luego de llevar una DLG, han re-introducido el gluten en sus dietas durante un período prolongado. Hopman y colaboradores, en 2008, sugirieron que estos pacientes podrían haber desarrollado una tolerancia al gluten luego de la re-introducción de esta proteína tóxica a la dieta. Estos investigadores también establecieron que esta tolerancia podría tener una relación con características genéticas como el genotipo HLA, ya que uno de los dos pacientes que mostró tolerancia al gluten era DQ2/DQ8 negativo. Las investigaciones ahora se centran en analizar el mecanismo de la tolerancia para determinar si la misma es permanente o se trata de un “largo período de latencia”. El avance en estos estudios permitirá determinar, en cada caso particular, si una supuesta tolerancia puede conducir a la eliminación prudencial y sistemática de la DLG en dichas personas (Matysiak-Budnik y col., 2007; Hopman y col., 2008b).

10 – Discusión

La celiacía es una patología gastrointestinal multifactorial, con predisposición genética, caracterizada por una hipersensibilidad al gluten de TACC. Tiene como característica principal que, no ingiriéndose TACC, la funcionalidad del intestino se restablece completamente, siendo una DLG la única terapia que evita el avance de la enfermedad y que permite la recuperación del paciente pero no es la cura de la misma. De allí que el tratamiento deba efectuarse de por vida.

Prevalece en aproximadamente un 1% de la población mundial y su sintomatología suele confundirse con la de otras enfermedades gastrointestinales con lo

cual la sospecha de una EC debe estar siempre presente en el profesional de la salud ya que tiene por característica estar “silenciada”, a veces, por muchos años hasta que un factor disparador desencadena una reacción autoinmune que atrofia las vellosidades intestinales, conduciendo a la mala absorción de nutrientes y, en el peor de los casos, al desarrollo de linfomas malignos. Comúnmente los síntomas pueden aparecer tanto en la infancia como en la adultez de las personas.

Entre los factores ambientales que predisponen a su aparición, la lactancia materna es controversial pues no se ha llegado a dilucidar aún si previene la EC o retrasa su debut en personas con antecedentes genéticos. Estudios específicos demostraron que a través de la leche materna se puede aportar al recién nacido IgA específica contra el gluten pero también se puede suministrar al bebé péptidos tóxicos de gliadinas y gluteninas, provenientes de madres sanas que no ingirieron gluten, como demostraron trabajos hecho en Holanda y en nuestro país. Uno de los estudios sugiere que en el dosaje de dichos péptidos celiaco-tóxicos, en leche materna, pudo haber una interferencia analítica asociada a una proteína neuronal rica en prolina y glutamina, llamada sinapsina I.

Cualquier terapia alternativa propuesta hasta el momento para curarla o tratarla, ya sea detoxificando el gluten o bloqueando a las sustancias del organismo que producen la autoinmunidad, si bien son prometedoras, están en fase experimental. Sólo una DLG garantiza su control ya que aún hoy no se conoce a ciencia cierta los mecanismos de su patogénesis ni la totalidad de los péptidos del gluten de TACC involucrados en la EC pues sólo los más celiaco-tóxicos han sido caracterizados.

CAPÍTULO 2

ALIMENTOS PARA CELÍACOS.

PRODUCTOS LÁCTEOS

1 - Celiacúa y adquisición de alimentos aptos

La nutrición de los celíacos tiene una importancia mucho mayor que la que tiene en otras enfermedades, ya que la alimentación correcta constituye, por sí misma, la base del tratamiento (Ortiz, 2005). Como el síndrome de malabsorción es el problema fundamental de un celíaco no tratado, la DLG debe garantizar la corrección de las faltas de calcio, hierro, vitaminas y fibras. Aún así, se ha determinado en Estados Unidos que más del 50% de mujeres celíacas que realizan una DLG presentan carencias de estos nutrientes por lo que sus dietas deben ser reforzadas en los mismos (Niewinski, 2008). El reemplazo en las fórmulas alimentarias de TACC (o algunos de sus derivados como ser harinas y/o almidones) por algún cereal apto, normalmente implica quitar una fuente muy importante de fibra dietaria, cuya reincorporación en los productos viene siendo tema de investigación de muchos grupos de trabajo (Gallagher y col., 2004).

Los problemas más frecuentes que condicionan la adquisición de productos procesados acordes a una DLG son los siguientes:

- 1) El mercado de productos alimenticios aptos para celíacos es limitado y la mayoría son caros puesto que son elaborados con tecnologías y formulaciones especiales para reemplazar un ingrediente que contiene TACC por otro que no lo contiene. Sin embargo, existen países como Inglaterra, Suecia, Holanda, Italia, Nueva Zelanda y Finlandia donde los gobiernos subsidian empresas que elaboran estos productos (Green y Cellier, 2007).
- 2) Más de la mitad de los productos alimenticios manufacturados contienen gluten de TACC, aún cuando es transferido en cantidades de trazas a la matriz alimenticia a través de espesantes, aglutinantes o gelificantes, lo que conlleva a la ingesta involuntaria del tóxico por parte del celíaco. De hecho, cualquier alimento procesado cuyo análisis arroje un contenido de gluten de TACC menor a 20 ppm puede ser rotulado como “exento de gluten”, de acuerdo a las normativas de la Unión Europea (UE) y de los Estados Unidos (USA), lo cual no constituye una garantía de que no lo contenga (Morón y col., 2008c). Éste suele ser uno de los motivos a los que se atribuye la falta de respuesta favorable en la recuperación de la mucosa intestinal de algunos celíacos bajo tratamiento (Ciclitira y Moodie, 2003), lo cual obliga a los nutricionistas a revisar los alimentos consumidos por el paciente para asegurar el cumplimiento de la DLG y descartar una posible

celiaquía refractaria o enfermedades con clínica e histología similar (Heredia y col., 2007; Asociación de Celíacos de Madrid, 2008b).

El cuadro 1 presenta una serie de productos que pueden contener gluten de TACC en su formulación (ANMAT, 2006). Al respecto, lo que compete a productos lácteos, se desarrollará más adelante en este trabajo.

Cuadro 1. Productos de mercado que pueden contener TACC (ANMAT, 2006).

Productos que pueden contener cereales TACC como aditivos	Función que cumple el aditivo TACC
Fiambres, embutidos y patés	Función ligante. Logro de productos homogéneos
Mayonesa, ketchup y mostaza	Espesante
Chicles, caramelos, confites, chocolates, turrónes	Gelificante como medio de unión de ingredientes
Dulces y mermeladas	Gelificante
Té, yerba mate y otras hierbas aromáticas (orégano, perejil, etc.)	Acelerador del proceso de secado
Jugos de frutas	Espesante y estabilizante
Productos enlatados en puré (tomate, choclo y otros)	Espesante y gelificante
Pasta dental	Espesante
Medicamentos	Excipiente

1.1 - La importancia de la lectura del rótulo de un alimento

El rótulo de cualquier tipo de alimento envasado debe brindar información completa y correcta sobre la composición cuali-cuantitativa del producto. Cuando un celíaco elija algún alimento apto para su nutrición, no debería adquirir ninguno cuyo listado de ingredientes sea dudoso, sobre todo, si carece de la indicación del cereal de procedencia. Al respecto, la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) recomienda que no se compren alimentos en cuyos rótulos figuren los siguientes ingredientes, sin la indicación del cereal de origen. A saber (ANMAT, 2006):

- Almidón,
- Almidones modificados,
- Amiláceos,
- Cereales,
- Espesantes,

- Fécula,
- Gluten,
- Harina,
- Proteína,
- Proteína vegetal,
- Hidrolizado de proteína,
- Sémola-cereales,
- Fibra,
- Espesantes,
- Sémola,
- Extracto de malta,
- Levadura,
- Extracto de levadura,
- Especies y aromas.

1.2 - La cantidad máxima tolerable de gluten por un celíaco – Límite umbral

La sensibilidad clínica al gluten difiere considerablemente entre pacientes: algunos toleran trazas en sus dietas y otros, cantidades mayores. Sin embargo, algunos estudios clínicos sugirieron que una ingesta diaria de hasta 50 mg de gluten sería seguro y bien tolerado por la mayoría de los pacientes. Hay que tener en cuenta que la ingesta normal de gluten por parte de un individuo sano está en el rango de 13 g por día (Ciclitira y col., 2005).

Dado que existen distintos niveles de tolerancia al gluten entre los enfermos celíacos, la cantidad de ingesta máxima no dañina no puede ser establecida de manera generalizada. Por lo tanto, es necesario desarrollar métodos de detección de gluten en alimentos con una alta sensibilidad y que permitan detectar pequeñas cantidades del mismo, con el fin de asegurar que los enfermos celíacos puedan llevar una dieta totalmente exenta de gluten, sin el consumo involuntario de pequeñas cantidades del mismo que puedan producir lesiones de sus vellosidades intestinales (Morón y col., 2008c).

No obstante, si se pretende establecer un límite, éste dependerá no sólo de la dosis tóxica mínima sino también de la cantidad de productos especiales consumidos por los celíacos de distintas partes del mundo. Un estudio realizado en Europa en el año 2006 mostró resultados interesantes al respecto. Por medio de las asociaciones de celíacos, se

distribuyeron cartillas con tablas a completar donde ellos debían colocar todos los alimentos que consumían durante 10 días, especificando el peso ingerido en cada comida. Se llevó a cabo en dos países típicamente mediterráneos (Italia y España) y dos países nórdicos (Noruega y Alemania). Los resultados obtenidos evidenciaron que, en los cuatro países, el producto “libre de gluten” más consumido era pan (siendo doblemente consumido en países nórdicos). Los países mediterráneos mostraron un consumo de una variedad más amplia de alimentos “libres de gluten”, siendo las pastas las de mayor consumo en Italia. La diferencia de hábitos alimenticios entre los celíacos de países nórdicos y mediterráneos no estuvo en la cantidad total de productos “libres del gluten” ingerida sino en el tipo de alimentos consumidos. Además, se observaron exposiciones a cantidades bastante altas de gluten diariamente, por lo que se sugirió continuar con las revisiones de los límites de exposición dietarios (Gibert y col., 2006).

Las estimaciones basadas en encuestas de hábitos nutricionales son una herramienta poderosa para establecer un valor umbral de referencia y así redefinir los límites del contenido de gluten en los productos alimenticios aptos para celíacos. En virtud de muchos trabajos de investigación realizados, un valor límite de 20 mg gluten/kg producto parece ser suficientemente seguro para la mayoría de los celíacos. La aprobación de un valor más bajo para aumentar la seguridad en la dieta parece ser el camino por el cual se está yendo, habida cuenta que puede haber negligencias en la ingesta y coexistir individuos con mayor sensibilidad al gluten (Martín Esteban y col., 2010).

2 - Legislación sobre alimentos libres de gluten

A nivel mundial, existen diferencias en los niveles máximos permisibles de gluten de TACC para declarar a un alimento exento del mismo. A continuación se detallan los aspectos más importantes de la normativa de Argentina, Unión Europea y Estados Unidos.

2.1 - Argentina

a) La Ley Nacional 26.588

El Ministerio de Salud de la Nación, mediante Decreto 528/2011, reglamentó la Ley N° 26.588 que 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. Dicha ley no sólo ampara al celíaco en cuanto a la atención y tratamiento médico de su enfermedad sino que también fija qué organismos oficiales intervendrán en la aplicación de la misma. Así, establece que la Comisión Nacional de Alimentos (CONAL) será la institución donde se consensuará y se definirán las características y condiciones que deben reunir los alimentos; ésto es, por ejemplo, determinar cuál será la cantidad máxima de gluten de TACC que pueda llegar a contener un alimento como para ser declarado “libre de gluten”, lo que permitirá asesorar al Ministerio de Salud en el dictado de normas adecuadas. Además, fija que la ANMAT, por medio del Instituto Nacional de Alimentos (INAL), será el organismo encargado de autorizar, registrar, controlar y fiscalizar la calidad y sanidad de los alimentos incluyendo los suplementos dietarios, así como los materiales en contacto con los alimentos, en coordinación con las jurisdicciones sanitarias federales y sus delegaciones (ANMAT, 2012d).

b) Respecto a las indicaciones del Código Alimentario Argentino (CAA): alimentos “libres de gluten” y rotulado

Por resolución conjunta de la Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos y Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación, (SPReI y SAGyP), N° 131/2011 y N° 414/2011 y dada la reglamentación de la Ley 26.588, se procedió a modificar el artículo 1383 del capítulo XVII del CAA sobre Alimentos de Régimen o dietéticos, que comprende a los alimentos para celíacos e incorporar el artículo 1383 bis. Dada la importancia de ambos artículos respecto de las características que debe reunir cualquier alimento para ser admitido y declarado, según nuestra legislación nacional, como “libre de gluten”, a continuación se transcriben ambos:

•Artículo 1383 - (Resolución Conjunta SPReI y SAGyP N° 131/2011 y N° 414/2011)
Se entiende por “alimento libre de gluten” el que está preparado únicamente con ingredientes que por su origen natural y por la aplicación de buenas prácticas de elaboración —que impidan la contaminación cruzada— no contiene prolaminas procedentes del trigo, de todas las especies de *Triticum*, como la escaña común (*Triticum spelta* L.), kamut (*Triticum polonicum* L.), de trigo duro, centeno, cebada, avena ni de sus variedades cruzadas. El contenido de gluten no podrá superar el máximo de **10mg/kg**. Para comprobar la condición de libre de gluten deberá utilizarse metodología analítica

basada en la Norma Codex Stan 118-79 (revisada en 2008) enzimoimmunoensayo ELISA R5 Méndez y toda aquella que la Autoridad Sanitaria Nacional evalúe y acepte.

Estos productos se rotularán con la denominación del producto que se trate seguido de la indicación “libre de gluten” debiendo incluir además la leyenda “Sin TACC” en las proximidades de la denominación del producto con caracteres de buen realce, tamaño y visibilidad.

A los efectos de la inclusión en el rótulo de la leyenda “Sin TACC”, la elaboración de los productos deberá cumplir con las exigencias del presente Código para alimentos libres de gluten.

Para la aprobación de los alimentos libres de gluten, los elaboradores y/o importadores deberán presentar ante la Autoridad Sanitaria de su jurisdicción: análisis que avalen la condición de “libre de gluten” otorgado por un organismo oficial o entidad con reconocimiento oficial y un programa de buenas prácticas de fabricación, con el fin de asegurar la no contaminación con derivados de trigo, avena, cebada y centeno en los procesos, desde la recepción de las materias primas hasta la comercialización del producto final.

• **Artículo 1383 bis - (Resolución Conjunta SPReI y SAGyP N° 201/2011 y N° 649/2011)**

Los productos alimenticios “Libres de Gluten” que se comercialicen en el país deben llevar, obligatoriamente impreso en sus envases o envoltorios, de modo claramente visible, el símbolo que figura a continuación y que consiste en un círculo con una barra cruzada sobre tres espigas y la leyenda “Sin T.A.C.C.” en la barra admitiendo dos variantes:

- a) A color: círculo con una barra cruzada rojos (pantone - RGB255-0-0) sobre tres espigas dibujadas en negro con granos amarillos (pantone - RGB255-255) en un fondo blanco y la leyenda “Sin T.A.C.C.”.
- b) En blanco y negro: círculo y barra cruzada negros sobre tres espigas dibujadas en negro con granos blancos en un fondo blanco y la leyenda “Sin T.A.C.C.”.

Las figuras 1a y 1b muestran la simbología identificatoria obligatoria que en nuestro país deben llevar incorporada en sus rótulos los productos alimenticios aprobados por su condición de “libres de gluten”. No obstante, además de los símbolos obligatorios, se permite además la inclusión en los productos alimenticios de simbología facultativa

(no obligatoria) propuesta por la Asociación Celíaca Argentina o por ACELA (Asistencia al Celíaco de la Argentina) (ANMAT, 2012e).



Figura 1a. Simbología obligatoria en Argentina para productos “libres de gluten”
(fuente: ANMAT, 2012e).



Figura 1b. Simbología facultativa en Argentina para productos “libres de gluten”
(fuente: ANMAT, 2012e).

c) Situación en la provincia de Santa Fe

Mediante la sanción de la Ley Provincial 13190, Santa Fe adhiere a la Ley Nacional 26.588, a partir de septiembre de 2011. Cabe destacar que la Ley Provincial en su artículo 4° obliga a todos los alimentos elaborados en el territorio de la provincia a llevar la indicación de “contiene o no contiene gluten”. Ésto la diferencia de la ley nacional que sólo se limita a reglamentar los alimentos que por su condición sean “libres

de gluten”. En nuestra provincia, el organismo oficial de contralor en este tema es la Agencia Santafesina de Seguridad Alimentaria (ASSAL) (BOSF, 2011). En la página web de esta institución (www.assal.gov.ar) se ha habilitado un banner denominado “productos sin T.A.C.C.” donde aparece un listado oficial de alimentos libres de gluten autorizados y el cual está disponible al público en general. Al respecto, si un elaborador, produce un alimento que contiene gluten y desea expresarlo en su rótulo, podría ampararse en el artículo 235-séptimo, del capítulo V del CAA, que reglamenta el rotulado de alergenitos alimentarios. El gluten, no sólo es factor causante de la celiacuía sino que también puede producir reacciones alérgicas al TACC en personas predispuestas, por mecanismos inmunológicos diferentes a los de la EC. Sin embargo, es importante saber que, por Resolución Conjunta SPReI N° 106/2011 y SAGyP N° 297/2011 está transitoriamente suspendida la aplicación de la Resolución Conjunta SPReI N° 57/2010 y SAGyP N° 548/2010, que reglamenta el artículo 235-séptimo, hasta tanto la CONAL elabore una propuesta de adecuación del mismo (ANMAT, 2012h).

2.2 - Unión Europea

La Comisión de las Comunidades Europeas, en 2009, fijó un Reglamento por el cual acepta la definición de “exento de gluten” que en 2008 se estableció en el *Codex Alimentarius* (Codex Stan 118-1979, revisado en 2008) y adopta los valores límites de gluten de TACC que allí se fijaron, aplicables desde enero de 2012. Estos límites están en permanente revisión y determinan dos niveles para el contenido de gluten (Martín Esteban y col., 2010), a saber:

I-Alimentos exentos de gluten

- a) están constituidos por, o son elaborados con, uno o más ingredientes que no contienen trigo (es decir, todas las especies de *Triticum* como trigo duro, espelta y kamut), cebada, centeno, avena, o sus variedades híbridas, y cuyo contenido en gluten no sobrepase los **20 mg de gluten/kg** en total (20 ppm de gluten), medidos en los alimentos tal como se venden o distribuyen al consumidor; o
- b) están constituidos por, o son elaborados con, uno o más ingredientes procedentes de trigo (es decir, todas las especies de *Triticum* como trigo duro, espelta y kamut), cebada, centeno, avena o sus variedades híbridas, que han sido

procesados de forma especial para eliminar el gluten hasta un nivel que no sobrepase los 20 mg de gluten/kg en total (20 ppm de gluten), medidos en los alimentos tal como se venden o distribuyen al consumidor.

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

están constituidos por, o son elaborados con, uno o más ingredientes procedentes de trigo (es decir, todas las especies de *Triticum* como trigo duro, espelta y kamut), cebada, centeno, avena o sus variedades híbridas, que han sido procesados de forma especial para eliminar el gluten a un nivel comprendido entre **20 mg/kg** y **100 mg/kg** en total (20 ppm y 100 ppm, respectivamente), medidos en los alimentos tal como se venden o distribuyen al consumidor.

En el etiquetado de alimentos comprendidos en el inciso I, debe figurar “exento de gluten” cerca del nombre del producto, y en aquellos alimentos comprendidos en el inciso II, debe figurar la leyenda “con contenido reducido en gluten”.

Dado que muchos celíacos toleran bien pequeñas cantidades de avena en su dieta, la norma tiene en cuenta que cuando este cereal forme parte de alguna formulación alimenticia, debe estar tratado de modo tal de garantizar la ausencia de contaminación con trigo, cebada o centeno, y su contenido de gluten no deberá sobrepasar las 20 ppm (Diario Oficial de la UE, 2009 a y b).

2.3 - Estados Unidos

En enero de 2007, la Food and Drug Administration (FDA) propuso definir un etiquetado voluntario con la denominación “libre de gluten” para significar que todo alimento que lo lleve en su rótulo no contiene:

- Ingredientes provenientes de “granos prohibidos”, es decir, trigo (trigo duro, espelta, kamut), cebada, centeno o de sus híbridos;
- Ingredientes derivados de granos prohibidos y que no han sido procesados para eliminar el gluten;

- Ingredientes derivados de granos prohibidos y que han sido procesados para eliminar el gluten si su uso resulta en la presencia de 20 ppm o más de gluten en el alimento;
- 20 ppm o más de gluten.

Un alimento que contiene avena sólo podrá llevar en su rótulo la declaración “libre de gluten” si contiene menos de 20 ppm de gluten. Por otro lado, un alimento que no contiene gluten naturalmente, sólo podrá llevar la declaración “libre de gluten” aclarando que todos los alimentos del mismo tipo no lo contienen (ej: leche) (FDA, 2007).

En este país, la Gluten-Free Certification Organization (GFCO), dependiente del Gluten Intolerance Group, es quien se encarga de dar una certificación voluntaria de “libre de gluten” a las empresas que deseen dar esta condición a sus productos alimenticios, la que luego queda impresa en el rótulo por medio del logo institucional que así lo acredita. Cabe destacar que la GFCO, como servicio independiente, no sólo chequea el contenido de gluten de los alimentos para garantizar su ausencia, sino también es capaz de supervisar las líneas de producción en base a estándares de calidad definidos, de modo tal de llevar confianza y seguridad al consumidor (GFCO, 2009).

3 - El Listado de Alimentos Libres de Gluten

En nuestro país, el INAL-ANMAT elabora y publica el Listado Integrado de Alimentos Libres de Gluten (ALG). Esta información tan importante para el celíaco se publica una vez al año y se modifica bimestralmente. La presentación del listado consta principalmente de grupos de alimentos libres de gluten autorizados para su comercialización en Argentina. Además posee información complementaria muy importante tanto para el celíaco como para el elaborador de alimentos exentos de gluten. Respecto de los alimentos aptos se indica: denominación del producto de venta, la marca, el RNPA (Registro Nacional de Producto Alimenticio), organismo que otorga el RNPA, y la fecha de ingreso al mismo. Además, en dicho listado se incorporan las bajas, indicándose: el producto, la marca, la empresa elaboradora, la fecha de baja y el motivo. Este listado está disponible al público en general en el portal del INAL-ANMAT

(www.anmat.gov.ar) como “Listado Integrado de ALG (Ley 26.588)” y cuenta con mucha información importante para el celíaco (ANMAT, 2012i).

Comparando las distintas categorías de alimentos libres de gluten del listado, los productos lácteos y aquellos elaborados con ingredientes lácteos son los que presentan la mayor variedad. El cuadro 1 muestra los productos comprendidos en ambas categorías de alimentos.

Cuadro 1. Listado de productos lácteos y alimentos con ingredientes de origen lácteo “libres de gluten” (ANMAT, 2012i).

Categoría de alimento	Tipos de productos
Alimentos lácteos	Cremas, leches fluidas, leches en polvo, leches fermentadas, yogures, mantecas, quesos, dulces de leche.
Alimentos con ingredientes de origen lácteo	Alimentos para lactantes y niños en primera infancia, sueros lácteos, postres, flanes y helados listos para consumir y en polvo.

De los alimentos analizados por INAL, entre 2003 y 2008, se evidenció una tendencia a la baja en la cantidad de productos que dieron positivo el resultado de gluten de TACC. En la figura 2 se presentan los resultados obtenidos en dicho período. Estos datos pueden ser un indicador de un mayor control por parte de las empresas de la calidad de los insumos empleados en la elaboración de alimentos aptos para celíacos, como parte de una estrategia de ganancia de mercado (Tomchinsky, 2008).

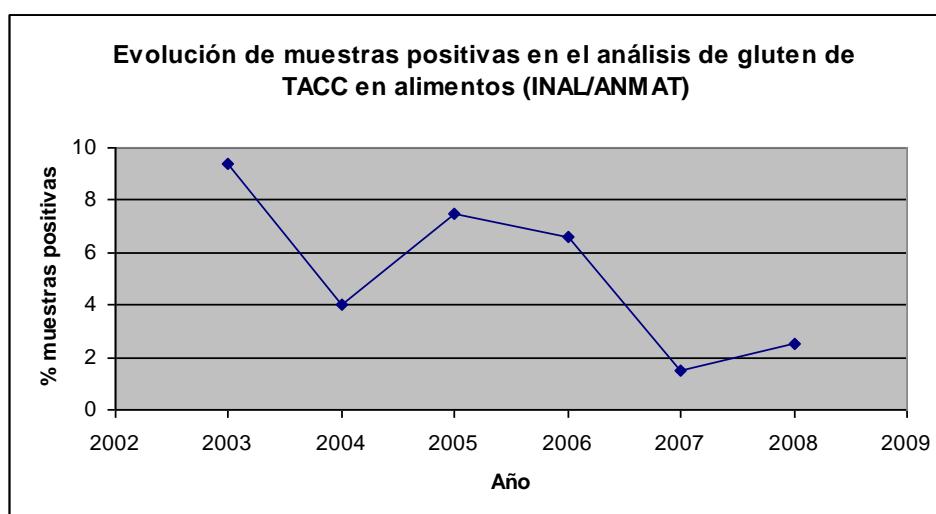


Figura 2. Porcentaje de muestras de alimentos analizadas en INAL en el período 2003-2008 que dieron positivo el análisis de gluten (fuente: Tomchinsky, 2008).

Por otro lado, muchas asociaciones de celíacos en el mundo elaboran sus propios listados de alimentos libres de gluten, dando las recomendaciones inherentes a cada caso, como así también restringiendo el consumo de alimentos dudosos y prohibiendo el de otros. Cabe destacar que la información brindada, ya sea por organismos oficiales como por asociaciones celíacas, es de vital importancia para los pacientes a la hora de seleccionar qué productos aptos comprar. No obstante, existen asociaciones de celíacos, como la belga, la cual no publica listados de alimentos autorizados ni prohibidos aludiendo que resulta materialmente imposible hacerlo dada la alta cantidad y variedad de alimentos en el mercado del país y que sus formulaciones son dinámicas, es decir, varían frecuentemente por lo que, si un producto alimenticio hoy no contiene gluten, mañana sí puede tenerlo. Además sostiene que muchos listados internacionales presentan información imprecisa y que la educación del celíaco se basa en aprender a decodificar rótulos por medio de la lectura concisa, sin ajustarse estrictamente a lo que remite un listado de alimentos permitidos (Société Belge de la Coeliaquie, 2009).

4 - El consumo de productos lácteos en la dieta libre de gluten de un celíaco

La leche y sus derivados juegan un rol muy importante en la alimentación de la población en general. A través de la leche materna, en el primer año de vida, el ser humano recibe todos los macronutrientes necesarios para comenzar a crecer, además de inmunoglobulinas, vitaminas y otros compuestos beneficiosos. Con el transcurso de los años, la leche de vaca y sus derivados siguen contribuyendo en el desarrollo del hombre, a la vez que toma una importancia fundamental en la prevención de la osteopenia, sobre todo, en la tercera edad. Cabe destacar que la leche de vaca y la de cabra son las que presentan la distribución más equilibrada de sus tres componentes fundamentales: proteínas, grasa y lactosa (Alais, 2003).

El consumo de productos lácteos por un celíaco en tratamiento con una DLG debe estar asociado a una lectura exhaustiva del rótulo del alimento y de toda la información vinculada a su elaboración para que no queden dudas de su inocuidad. No obstante, en los últimos años se ha visto que una pequeña población de celíacos que siguen una DLG, presentan síntomas gastrointestinales típicos de la celiacía al ingerir leche. En este sentido, Dekking y col. (2009) demostraron que esta situación no se debe a la presencia de péptidos celiaco-tóxicos ya que verificaron la ausencia de los mismos en leche cruda

de vaca (raza Holstein). Para ello, fueron agregando al alimento del ganado hecho a base de maíz, cantidades crecientes de trigo hasta llegar a una ración compuesta por 100% de este último cereal. La leche obtenida del ordeño luego de tres días de esta dieta no presentó gluten ni péptidos de trigo. Se hizo además un control positivo, agregando estándares de α y γ -gliadinas (aprox. 1 $\mu\text{g/mL}$) a las muestras, dando positivo el ensayo de detección con alta recuperación (Dekking y col., 2009).

Por otro lado, hay que tener en cuenta que una patología crónica intestinal que cursa con atrofia no suele evidenciar intolerancia a la lactosa, aunque sí puede acompañarse de deficiencia de actividad lactasa y, mediante las pruebas diagnósticas, comprobarse malabsorción de lactosa. Esta deficiencia de lactasa suele ser transitoria, hasta que desaparezca la causa productora de atrofia y los enterocitos recuperen todo su potencial enzimático, consiguiéndose la integridad de la mucosa intestinal. La enfermedad celíaca se comporta de esta forma, ya que prácticamente todos los celíacos, en el momento del diagnóstico tienen deficiencia de disacaridasas. Sin embargo, prácticamente ninguno de ellos presenta síntomas de intolerancia (0,3%), siendo por ello una excepción la indicación de retirar la lactosa de la dieta (Asociación de Celíacos de Madrid, 2008a). Sólo el 5% de los niños celíacos presentan intolerancia a la lactosa al inicio del tratamiento por lo que este disacárido debería retirarse temporalmente de la dieta cuando haya cuadros de diarreas (Ortiz, 2005).

Por último, la presencia de síntomas gastrointestinales luego del consumo de leche por parte de pacientes celíacos que siguen una DLG ha sido atribuida por algunos investigadores a una cierta sensibilidad a las proteínas de la leche, en particular a las caseínas (Kristjánsson y col., 2007). En este sentido, Cabrera-Chávez y Calderón de la Barca (2009) establecieron que la falta de normalización intestinal en estos casos parece estar vinculada con una reactividad específica de anticuerpos IgA, antigliadinas, hacia secuencias de aminoácidos de la α y β caseínas que muestran homología con epítomos tóxicos de las gliadinas del trigo. Por lo tanto, si un celíaco bajo tratamiento remite los signos de la enfermedad al consumir leche, debería sospecharse de intolerancia a las α y β caseínas bovinas (Cabrera-Chávez y Calderón de la Barca, 2009).

4.1- Productos lácteos aptos, cuestionados y prohibidos

a) Aptos

Es muy importante que un celíaco siga una DLG lo más variada posible y con un aporte importante de alimentos naturales como ser: frutas y hortalizas, carnes, leche, pescados y todo cereal libre de TACC. De esta forma, la reposición de nutrientes se logra a través de alimentos naturalmente libres de gluten, frescos, libres de conservantes y con tratamientos mínimos que no alteren su calidad como producto natural. En tal sentido, dentro de los productos lácteos permitidos se encuentran aquellos en los que no existe agregado de aditivo alguno o bien, los que se agreguen, no introducen trazas de gluten de TACC, como ser leche fluida entera, parcialmente descremada o descremada, pasteurizada (HTST), esterilizada (UAT), leches concentradas (azucaradas o no), yogur natural, crema, manteca y algunos quesos (Association Française Des Intolérants Au Gluten, 2009).

Es importante destacar que el CAA, en su capítulo VIII (Alimentos Lácteos), deja expresado que en todo producto lácteo que se necesite incorporar ingredientes opcionales de origen proteico, deberán ser solamente caseínas y/o caseinatos alimenticios, leche en polvo y proteínas lácteas, no permitiéndose la incorporación de proteínas vegetales (ANMAT, 2012a).

b) Cuestionados

En esta categoría se hace referencia a los productos lácteos más críticos en cuanto a si pueden o no contener trazas de gluten de TACC en su formulación. Son productos cuya materia prima, naturalmente libre de gluten de TACC, es adicionada de distintos ingredientes y aditivos, muchos de los cuales pueden contener pequeñas cantidades de gluten de TACC (gluten oculto) y que pueden pasar al producto por contaminación cruzada. Si un ingrediente aportara gluten de TACC a un producto lácteo, el efecto de dilución en el producto final debe ser garantizado por estudios analíticos de modo tal que la concentración final del tóxico esté dentro de los valores permitidos por la legislación. Sin embargo, lo ideal sería reemplazar ese ingrediente por otro que garantice la inocuidad del producto para un celíaco. Cabe destacar que muchos de los productos lácteos que más abajo se detallan como cuestionados, lo son para algunas asociaciones de celíacos del mundo y para otras, están directamente prohibidos o bien, están permitidos, siempre que lleven la indicación de “libre de gluten” en su rótulo (Associazione Italiana Celiachia,

2008, Association Canadienne de la Maladie Coelique, 2009, Association Française Des Intolérants Au Gluten, 2009). Dentro de los productos lácteos cuestionados se encuentran:

Manteca “light” y cremas ácidas

En la manteca “light” se reemplaza parte de la materia grasa por almidones y/o gelificantes que le confieren al producto una textura y untuosidad similares a las de la manteca tradicional, por lo tanto debe tener una declaración certificada de “libre de gluten” que lo habilite como apto para el consumo por parte de un celíaco (Associazione Italiana Celiachia, 2008). Lo mismo sucede con las cremas ácidas que pueden contener almidones o féculas modificados (Association Canadienne de la Maladie Coelique, 2009).

Yogures con agregados

Todo yogur rotulado como “natural” es apto para un celíaco ya que sólo está fabricado con leche y fermentos lácticos vivos, siempre y cuando la ausencia de contaminación cruzada esté garantizada. En los yogures con agregados de frutas, cereales, aromas, sabores, almidones o algún otro espesante/estabilizante, debe estar certificada la ausencia de gluten de TACC (Associazione Italiana Celiachia, 2008).

Leches aromatizadas y preparaciones industriales a base de leche

Dado que productos tales como leches chocolatadas, leches saborizadas y productos a base de leche como flanes, cremas, postres lácteos y helados admiten espesantes y/o gelificantes, algunos de los cuales pueden contener trazas de gluten (almidones nativos o modificados), deben estrictamente llevar en su rótulo la certificación del fabricante de que el producto es apto para celíacos (Association Française Des Intolérants Au Gluten, 2009).

Quesos

En los quesos, a medida que en su formulación se incorporan otros ingredientes, además de la leche, cultivos lácticos, coagulante y sal, la aptitud debe ser analizada caso por caso.

√ Quesos fundidos, feteados, en porciones, untables, salsas a base de quesos, postres de quesos

Los quesos fundidos, feteados, en porciones, untables y postres de quesos pueden contener espesantes, gelificantes y aromatizantes, y por lo tanto estos productos están prohibidos para su consumo por un celíaco, excepto que lleven la certificación de “libre

de gluten” que asegure su inocuidad (Association Canadienne de la Maladie Coelique, 2009; ANMAT, 2006).

√ *Mozzarella*

La mozzarella es un queso de pasta hilada que admite como ingrediente opcional leche en polvo (ANMAT, 2012a). Sin embargo, en Italia, sobre una producción de este queso, se detectó la presencia de gluten de TACC, lo que llevó a una investigación más profunda del tema, constatándose que el origen del mismo fue debido a una adulteración que se llevó a cabo en el producto por el agregado fraudulento de sustituto lácteo para alimentación animal (Associazione Italiana Celiachia, 2008). Los sustitutos lácteos o lacto-reemplazadores para alimentación vacuna son productos en polvo que, reconstituidos, simulan a la leche natural y se suministra a los terneros. La composición estándar de un sustituto lácteo es: 25 % de proteínas, 15% de grasas, 53% de carbohidratos y un 7% de cenizas. Las materias primas más utilizadas consisten en productos lácteos como la leche descremada en polvo alterada por sobrecalentamiento, no apta para consumo humano, suero de quesería deshidratado, concentrados proteicos de pescado y de soja, proteínas de trigo, etc. Asimismo, también se admiten sustancias amiláceas en su formulación (Garzón Quinteros, 2008).

√ *Quesos de corteza feculada o similares*

Antiguamente, en nuestro país, el queso Cuartirolo, de masa blanda algo elástica y de corto estacionamiento, era recubierto con fécula de maíz para contribuir a la formación de una delgada corteza característica (figura 3). Actualmente el formato de comercialización de este queso es en envase termoplástico envasado al vacío. No obstante, el CAA en sus artículos 621 (queso cuartirolo) y 622 (queso cremoso), inciso c, no hace ninguna aclaración respecto a la posibilidad de adición o no de féculas en la superficie de estos quesos; simplemente aclara que la misma debe ser entera, de consistencia adecuada, lisa o rugosa (ANMAT, 2012a). Hoy, si alguna empresa los elaborase de ambas formas (con recubrimiento de fécula o envasado al vacío sin fécula) debería tener un estricto control de la calidad del material amiláceo utilizado para asegurar ausencia de gluten de TACC y evitar contaminaciones cruzadas en las líneas de producción (Deibel y col., 1997).



Figura 3. Queso Cuartirolo argentino (fuente: INTI-Lácteos, 2012)

√ *Quesos madurados con hongos*

Hasta el 2000, el queso Gorgonzola en Italia era considerado no apto para celíacos ya que el hongo empleado en la elaboración (*Penicillium roqueforti*) era previamente cultivado y desarrollado sobre pan. En el mismo período, y para dilucidar el problema, se llevó a cabo una investigación conjunta entre la Università degli Studi di Milano, el Centro Studi Latte- Consiglio Nazionale Ricerche (CNR) (Milano) y la Associazione Italiana Celiachia, por la cual se cuantificó el gluten contenido en dos muestras distintas de fermentos comerciales de cepas de *P. roqueforti*, utilizado en la elaboración de gorgonzola, y que fueron provistos en suspensión acuosa. La determinación se hizo vía un ensayo inmunoenzimático de ELISA, basado en el método de Skerrit y Hill, y para las dos muestras se obtuvieron los valores de 107 y 137 mg de gluten/kg de suspensión (107 ppm y 137 ppm), respectivamente. Asumiendo un rendimiento caseario del 10%, sobre 1000 kg de leche adicionada de 20 mL de suspensión del hongo donde todo el micelio queda en cuajada, se calculó un contenido de gluten en los 100 kg finales de queso de 0,0274 mg de gluten/kg (0,0274 ppm). Este valor está muy por debajo del límite admitido en la UE de 20 ppm de gluten para considerar a un alimento exento (Iametti y col, 2000).

Actualmente, todas las muestras de las distintas variedades de quesos analizadas en ámbitos universitarios en Italia, no contienen gluten detectable y el listado de quesos aptos incluye quesos blandos (Mascarpone, Caprino, Tomino, Mozzarella, Cottage, Crescenza, Feta), quesos semiduros (Montasio, Fontal, Caciocavallo, Fontina), quesos duros (Grana-Padano, Parmigiano-Reggiano, Provolone, Cheddar, Emmental) y quesos madurados por hongos (Camembert, Brie, Taleggio, Gorgonzola). En el listado de alimentos aptos también se incluye la ricotta (Associazione Italiana Celiachia, 2008).

La legislación internacional tiende a ser cada vez menos permisiva en la cantidad de gluten presente en los alimentos aptos para celíacos. En este sentido, la industria láctea especializada en la elaboración de quesos azules está preocupada en eliminar toda posibilidad de contaminación con gluten de TACC de sus productos, más allá de los bajos niveles detectados del mismo en las suspensiones del hongo para la elaboración de queso Gorgonzola. De esta manera, se han desarrollado nuevos cultivos de hongos y levaduras sobre medios especiales carentes de gluten. Existen al menos dos patentes que así lo demuestran para hongos de los géneros *Penicillium*. Estos fermentos fueron desarrollados sobre medios de cultivo en base a arroz (blanco o integral), aunque también se vio que pueden desarrollar perfectamente sobre maíz o papa, todos no tóxicos para celíacos, aunque el arroz resulta ser más barato. A su vez, y para evitar posibles contaminaciones cruzadas con eventuales trazas de gluten presentes en el medio de cultivo, una de las patentes, trata al producto final con proteasas capaces de desdoblar gluten. En la masa del queso muestran la misma actividad biológica y capacidad de desarrollo de color verde-azulado, junto a un desarrollo de flavour similar a la lograda con los cultivos fúngicos tradicionales. Se ha visto que estos nuevos sustratos, además de no contener gluten tóxico, permiten una esporulación acelerada del *P. roqueforti* junto a procesos de separación de esporos-biomasa-sustrato mucho más eficientes que los utilizados en los medios que contenían pan. Estos nuevos cultivos son útiles para reemplazar a aquellos que introducían una contaminación cruzada con gluten en la masa del queso, aunque los valores del tóxico habían demostrado estar muy por debajo de los límites de aceptación en los estudios llevados a cabo en Italia. El listado de quesos azules al cual se adecúan incluye: Gorgonzola (Italia), Roquefort, Bresse-Blue, Blue d'Auvergne y Sassenage (Francia), Stilton (Inglaterra), Danablu (Dinamarca), Cabrales (España) y Bluecheese (USA) (Mogna y col., 2007; Mora y Pintus, 2008).

√ *Imitaciones de quesos: su utilización como ingrediente*

Desde hace unas décadas, las imitaciones de quesos, o sustitutos de quesos, están logrando una ubicación cada vez mayor en el mercado alimenticio, sobre todo en Estados Unidos. En su elaboración se mezclan los constituyentes individuales y se reemplaza parcial o totalmente las caseínas y la grasa láctea por análogos de origen vegetal, como ser proteína de soja, de maní y aceites vegetales. Otra práctica es el reemplazo de estos macro-componentes por almidones nativos, almidones resistentes o pregelatinizados hasta un 10-12%, siendo una de las imitaciones más comercializada, la mozzarella utilizada en

la elaboración industrial de pizzas, las que son de alto consumo en los países del primer mundo. Son una competencia en crecimiento para los quesos tradicionales, en su uso como ingrediente de otros alimentos y a nivel de consumo público, pero encuentra ciertos obstáculos por la falta de leyes que los regulen y otorguen una rotulación clara de los mismos a fin de evitar confusiones en la población general y, específicamente, en la población celíaca puesto que admiten agregado de almidones (Bachmann, 2001; Noronha y col., 2008, Montesinos-Herrero y col., 2006).

Una de las formas novedosas en que se expende el queso es en forma de hebras. Esta capacidad (*shreddability* en inglés) en queso cheddar puede ser mejorada si durante la elaboración del producto se añaden hidrocoloides de β -glucanos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que estos compuestos se obtienen de la avena, la cual puede estar contaminada con TCC (Konuklar y col., 2004).

Leche y fórmulas especiales en polvo

El CAA, en el capítulo VIII: Alimentos lácteos, indica que en la elaboración de leche en polvo para consumo humano (artículo 567) sólo se admite leche y, como aditivos, únicamente, lecitina (como emulsionante) para elaboración de leche en polvo instantánea (en una proporción máxima de 5 g/kg) y antihumectantes para la utilización restringida a leche en polvo a ser utilizada en máquinas de venta automática. Sin embargo, existe una tendencia a agregar otros componentes, como ser azúcar, en cuyo caso se rotulan como “alimento a base de leche en polvo”, puesto que no correspondería a la definición de leche en polvo que da el CAA (ANMAT, 2012a).

La leche en polvo y otros productos de similar presentación son objeto de adulteraciones con derivados de cereales TACC para aumentar el peso de los productos, añadiendo un elemento de bajo costo (ANMAT, 2006). Sin embargo, muchas fórmulas especiales en polvo pueden incluir almidones como ingredientes, y hay bibliografía técnica específica que indica cómo debe prepararse el mismo y en qué parte del proceso añadirlo (Westergaard, 2004). Si la empresa comparte líneas productivas para ambos (leche en polvo y fórmulas infantiles en polvo) debe asegurarse una correcta sanitización de maquinarias para evitar contaminaciones cruzadas.

c) Prohibidos

Estos productos no son comercializados en nuestro país, salvo en cantidades reducidas como productos de importación, y no son aptos para celíacos ya que contienen cereales prohibidos para ellos en su formulación.

√ *Leche malteada*

Es un polvo que se obtuvo por primera vez por evaporación a 140 °C, y bajo vacío, de leche entera, adicionada de malta de cebada y harina de trigo. Es popular en Estados Unidos y tal vez haya sido la precursora de las fórmulas infantiles en polvo, aunque se pensó también en ella como un producto para personas debilitadas y ancianos. Fue introducida en el mercado por James y William Horlick, quienes fundaron Horlicks en Chicago en el año 1873, siendo la primera planta elaboradora del producto, patentado diez años después. Inicialmente la llamaron “Diastoid” y luego, “leche malteada”. La malta de cebada le otorga un ligero sabor dulce. Dado su alto contenido energético, se popularizó además como ingrediente de batidos (mezcla batida de leche malteada reconstituida y crema helada) y los exploradores comenzaron a llevarla consigo en sus viajes por el mundo dada sus cualidades nutricionales, poco peso y por ser un producto no perecedero (Wisconsin Historical Society, 2004; Crowell, 1994). En las figuras 3a y 3b se presentan imágenes de estos productos.



Figura 3a



Figura 3b

Figura 3. a) Primera fórmula infantil en polvo a base de leche y cebada, elaborada por Horlicks (1950-1952). **b)** Leche malteada en polvo, tal como se comercializa hoy en Estados Unidos (fuente: Wisconsin Historical Society, 2004; Crowell, 1994).

√ “Kishk”: mezcla seca de cereales y leche fermentada

“Kishk” involucra una amplia gama de mezclas secas de cereales y yogur, de consumo popular en Medio Oriente. En términos generales, Kishk hace referencia a un alimento seco a base de yogur y trigo (variedad burgol) o harina de trigo. El modo tradicional de preparación comprende en hervir en agua por una hora granos grandes de trigo burgol los que luego se secan al sol por 24 horas, se rehidradan con agua al 20% y se muelen; por otro lado, se realiza la fermentación láctica de leche hervida y enfriada usando yogur como starter (“laban” en su lengua original); luego el yogur producido se va agregando al molido de trigo burgol en una relación 1:4 (trigo:yogur), por más de 6 días, a 35°C, amasando diariamente la mezcla para que se hidraten los granos de trigo; se agrega sal al 6% y se troza formando esferas que se secan al sol por 6-7 días en plataformas o bandejas de hormigón, y finalmente se muele y envasa el polvo obtenido. Los países de mayor consumo son Irak, Turquía y Líbano, sobre todo en el área rural y nómada, ya que los patrones de consumo de alimentos en las zonas urbanas de estos países está cambiando. En su forma seca (polvo), constituye base de muchos platos en Medio Oriente (salsas, sopas, aderezos, etc.). Se está buscando producir este alimento fermentado y disecado utilizando otros cereales y legumbres como ser arroz, maíz, garbanzo, soja y sus harinas, de modo tal que redundaría en un beneficio para los celíacos de esas latitudes (Tamime y col., 1995). Las figuras 4a y 4b muestran el kishk en sus versiones seca e hidratada.



Figura 4a



Figura 4b

Figura 4. a) Kishk (o “Kashk”) en polvo. b) Kishk rehidratado

(fuente: Kamal, 2012)

√ Queso “Fol-Epi”

En Francia, está prohibido el queso “Fol-Epi” (nombre que se traduce “trigo silvestre”) como alimento para celíacos, ya que es un queso de la familia de los emmentales franceses del valle del Loira, cuya corteza se recubre con harina tostada y lleva dibujada la espiga de trigo (figura 5). Se hace con leche pasteurizada y se presenta en piezas de 3 kg (Association Francaise des Intolérants au Gluten, 2009; Mundo Quesos, 2012).



Figura 5a



Figura 5b

Figuras 5 a y b. Queso “Fol-Epi” con corteza de harina tostada

(fuente: La Fromagerie, 2012)

√ Quesos madurados con cereales

Este tipo de quesos, con DOP, existen en algunos países de Europa donde se los sigue elaborando de un modo artesanal y ecológico. Luego de su proceso de maduración, se les hace un “curado” cubriéndolos por un cierto tiempo con granos de cereales, entre ellos, el centeno y la cebada. Tal es el caso de los quesos: del Peregrino (de vaca, España), Terrincho Velho (de oveja, Portugal) y Montiermo (de oveja, España). De esta manera, la corteza se cubre de mohos que le otorgan a los quesos sabores a frutos secos. Estos quesos no son aptos para celíacos (Mundo Quesos, 2012; Delgado García, 2012). Las figuras 6a, 6b y 6c muestran imágenes de estos quesos.



Figura 6a. Queso del Peregrino
(curado en cebada)
(fuente: Xanceda, 2012)



Figura 6b. Queso Terrincho Velho (curado en centeno)
(fuente: Monte-Mel, 2012)



Figura 6c. Queso Montiermo
(curado en centeno)
(fuente: Delgado García, 2012)

5 - Aditivos e ingredientes permitidos para la industria láctea como posibles fuente de gluten de TACC

La industria láctea, como ocurre en otras áreas de la industria alimenticia, no está exenta al uso de aditivos con el objetivo de mejorar las propiedades nutricionales, fisicoquímicas, sensoriales y la capacidad de conservación de los alimentos, así como contribuir a la mejora de las formulaciones proporcionando, en muchos casos, soluciones a problemas tecnológicos específicos. El uso de aditivos en la industria de los alimentos está contemplado y regulado a nivel internacional a través del Codex Alimentarius y de reglamentaciones de alcance internacional, nacional y regional que no siempre son homogéneas en cuanto a inclusión, exigencias y/o límites de incorporación; de allí que la industria láctea exportadora debe conocer y satisfacer siempre los requisitos específicos establecidos en otros países (Andrich, 1994).

Los aditivos comúnmente utilizados en la industria láctea son:

Modificadores/reguladores de textura: emulsificantes, estabilizantes, espesantes, gelificantes.

Modificadores/intensificadores de sabor y aroma: saborizantes, aromatizantes, exaltadores, edulcorantes.

Modificadores de color: colorantes, blanqueadores.

Micronutrientes: vitaminas, minerales, aminoácidos, ácidos grasos.

Modificadores/reguladores químicos: acidificantes, alcalinizantes, reguladores de pH, secuestrantes, enzimas.

Con otra funcionalidad: antiaglomerantes, antiespumantes, dispersantes, humectantes.

5.1 - Almidones y derivados

El uso de los almidones fue creciendo junto al desarrollo de la industria alimenticia a tal punto que en los procesos en los que hoy se utilizan y los productos que se consumen serían impensados sin su incorporación en la formulación ya que muchas de las características de las presentaciones finales, tales como textura, dureza, brillo y suavidad, son el resultado de su interacción con la matriz alimenticia. Además, la tendencia actual de los consumidores a elegir alimentos lo más naturales posibles y hasta con un toque “gourmet” hace que día a día surjan almidones con propiedades específicas para satisfacer esa demanda que se verá reflejada en las características del producto

alimenticio al que se añadirá y que deberán ser lo más parecidas posibles a los productos caseros asociados en cuanto a sabor, sensación en la boca (*mouthfeel*) y apariencia. Las principales materias primas para la obtención de almidones nativos son la papa, la tapioca, el maíz y el trigo. Dado que en su forma natural la mayoría resiste mal el calentamiento prolongado, con un descenso muy marcado de la viscosidad, es que se los modifica químicamente, generándose otro tipo de retículos para que mantengan la viscosidad a altas temperaturas e incluso mejoren sus propiedades de gel (NSFI, 2008).

La palabra “modificado” hace referencia a una alteración química y/o física del almidón con el objeto de mejorar las propiedades reológicas del alimento al que se agrega pero no implica un cambio en la estructura de las proteínas tóxicas que pueda contener. Por lo tanto, los almidones modificados de TACC siguen siendo igualmente dañinos para el celíaco, no así, los de maíz, papa, arroz o mandioca. No obstante, siempre existe riesgo de contaminación cruzada con almidones de TACC ya que las empresas elaboradoras procesan distintos tipos de almidones dentro del mismo establecimiento. La ley en Europa impone que todo aquel alimento que contiene almidones debe indicar además, entre paréntesis, la especie botánica de la que deriva (Associazione Italiana Celiachia, 2008).

Uno de los almidones más producidos a nivel mundial para su uso como modificador de textura es el de maíz, a partir de la molienda de sus granos, el cual es además inocuo para un celíaco. Por otro lado, el almidón de trigo se obtiene principalmente como producto secundario de la obtención de gluten cuyo mercado internacional crece diariamente por sus propiedades nutritivas y tecnológicas. De esta manera, el proceso comienza a partir de harinas de trigo de bajo grado de extracción, en lugar del grano entero. Se hace una masa con harina y agua, con lo cual el gluten del trigo se hidrata y forma una masa muy cohesiva, que tenderá a unirse consigo mismo, permaneciendo en piezas grandes. Una vez formada la masa, se lava el gluten, y el almidón arrastrado por el agua se separa mediante cribas y se seca. Otros procesos alternativos incluyen centrifugados (en ciclones) de la mezcla líquida de harina y gluten para separarlos por diferencia de densidades, y luego secarlos. La producción de almidón de maíz da granos de tipo A (lenticulares, pequeños y esféricos) mientras que la de almidón de trigo da granos de tipo B (pequeños y lesionados), lo que determina diferencia de calidad y precios de los mismos para sus usos específicos (Ellis y col., 1998a).

La producción mundial de trigo en 2001 fue de 600 millones de toneladas. El crecimiento de la industria del gluten y del almidón de trigo hizo que, por ejemplo, en 2000, 8 millones de toneladas de trigo se destinaran a la producción de 4 millones de

toneladas de almidón de trigo. Sin embargo, obtener almidón de trigo totalmente exento de proteínas es casi un imposible ya que se sabe que en los procesos normalmente utilizados para la obtención de gluten, la hidratación es una parte necesaria del mismo que produce fuerzas de cohesión muy potentes entre las unidades de gluten en sí y con el almidón (interacciones hidrofóbicas), lo que dificulta la separación final. Este hecho se acentúa con el envejecimiento de la harina de la cual se parte. Según el proceso de obtención del almidón de trigo, la concentración de proteínas en el producto final puede oscilar desde 0,6 y 4,0% (Van Der Borgh y col., 2005). Sin embargo, en Italia, país de alto consumo de hidratos de carbonos (pastas, pizzas), se expende almidón de trigo apto para celíaco, al cual se le ha eliminado el gluten a menos de 20 ppm gracias al avance de los procesos de refinado del espesante y están autorizados por el Ministerio de Salud (Associazione Italiana Celiachia, 2008).

La principal fuente de incorporación de gluten de TACC en un producto lácteo, sería el almidón de trigo, puesto que no se lo puede eliminar totalmente de él, o algún tipo de almidón que haya sufrido una contaminación cruzada con trigo.

5.2 - Inulina y FOS (fructooligosacáridos)

La incorporación de fibra alimentaria a los alimentos está contemplada en el capítulo XVII: Alimentos de Régimen o dietéticos, del CAA (artículos: 1385 y 1386) y comprende polisacáridos no almidón, pectinas, almidón resistente, inulina, oligofructosa, polidextrosa, maltodextrinas resistentes, fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS) y transgalactooligosacáridos (TOS) (ANMAT, 2012e).

La forma comercial de inulina y FOS se extrae de las raíces de la achicoria (*Cichorium intybus*), que contiene entre 15-20% de inulina y 5-10% de FOS, pero también se pueden obtener sintéticamente a partir del azúcar. Sin embargo, en la naturaleza existen otras fuentes vegetales de inulina y de FOS que son la cebolla, la banana, ajo y trigo (Niness, 1999; Kip y col., 2006; Tárrega y Costell, 2006).

5.3 - Cultivos microbianos y enzimas liofilizados o micro-encapsulados

Existen varias formas de producir fermentos de bacterias lácticas para su utilización en la industria láctea. Una de las maneras de obtener fermentos liofilizados es realizar una incubación de los cultivos bacterianos en caldos apropiados para producir biomasa. Luego, ésta se centrifuga, se lava y resuspende en un medio de protección (crio-protector) formulado especialmente para cada tipo de microorganismo, para reducir la

pérdida de viabilidad (por daño estructural y fisiológico), como consecuencia del proceso de liofilización. Estas sustancias protegen al pellet bacteriano antes de congelarlo e incluyen leche descremada, suero equino, mezclas de suero, extracto de levadura, peptonas, polioles (glicerol), aminoácidos y azúcares (lactosa, glucosa, sacarosa), mejorándose el efecto protector de la leche por el agregado de solutos tales como ácido ascórbico, tiourea o glutamato de sodio (Damario, 2011). El extracto de levadura está prohibido en la alimentación de un celíaco pues puede contener restos de cebada del sustrato de origen y, de esta manera, si es utilizado como agente crio-protector de cultivos liofilizados, debería estar indicado en el rótulo del envase de las cepas.

En los últimos tiempos, la técnica de micro-encapsulación de sustancias y/o microorganismos para un determinado uso en la industria alimenticia, viene siendo una práctica que ha dado origen a muchos trabajos de investigación respecto de la performance de la técnica en sí y de los diferentes polímeros utilizados para tal fin. Así por ejemplo, se han hecho estudios para microencapsular enzimas para una potencial aplicación en la maduración acelerada de quesos, con matrices formadas por mezclas de alginatos y otros polímeros, como ser, almidones y poli-L-lisina (Anjani y col., 2007). La microencapsulación de microorganismos, al ser introducidos en una matriz o sistema de pared, tiene como objetivo mejorar su viabilidad (conservación) y protegerlos de otros compuestos presentes en un alimento. Específicamente, la de bacterias probióticas por secado spray, no sólo las conserva sino también mejora su posterior distribución selectiva en el tracto intestinal, vehiculizadas por un alimento. Así varios “carriers” han sido ensayados, a escala piloto, a saber: leche descremada, leche descremada más almidón y leche descremada más suero en polvo (Páez, 2011). Otros materiales han sido reportados también como vehículos de micro-encapsulación; éstos son: aceites hidrogenados, ceras, maltodextrinas y gomas. Todos proporcionan una encapsulación uniforme (Caicedo Cipagauta, 2010). La industrialización de esta técnica con el objeto de preservar sustancias y microorganismos para su uso posterior en la industria alimenticia, posibilita la utilización de distintas matrices, entre las que los almidones de diferente naturaleza pueden ser utilizados. El CAA, en el capítulo XVI: Correctivos y Coadyuvantes (artículo 1262), establece que “las enzimas o fermentos deberán presentarse en perfecto estado de conservación, libres de cualquier sustancia tóxica y de gérmenes patógenos; adicionados o no de un vehículo apto para la alimentación (azúcares, cloruro de sodio) u otro previamente autorizado por la autoridad sanitaria nacional” (ANMAT, 2012f).

5.4 - Leche en polvo (como ingrediente)

Para requesón y algunos quesos como ser: Mozzarella, Goya, Prato, Tilsit, Tandil, Tybo, Danbo, Pategrás sándwich, Azul, Cottage, el CAA permite el agregado de leche en polvo como ingrediente optativo. Debido a que la misma es un producto que puede expendirse a granel y en el cual se han detectado adulteraciones, el mismo debería tener un certificado adjunto de “libre de gluten de TACC” para asegurar su inocuidad para un celíaco. Es importante destacar que existe la posibilidad de contaminación cruzada de leche en polvo con almidones, si se comparten líneas con la producción de fórmulas infantiles que admiten almidones. En este caso, la implementación de BPM es un recurso importante a la hora de controlar eventos no deseados en la temática (Westergaard, 2004).

5.5 - Fermentos de *Penicillium roqueforti*

Como se comentó oportunamente en este trabajo, hasta el año 2000 el queso Gorgonzola en Italia era considerado no apto para celíacos ya que el hongo empleado en la elaboración (*Penicillium roqueforti*) era previamente cultivado y desarrollado sobre pan. Estudios llevados a cabo en ese país demostraron que la presencia de restos de gluten de TACC en dicho queso, cuando sufre una contaminación cruzada por aporte de dicho fermento, está muy por debajo de la cantidad máxima permitida de prolaminas tóxicas en la UE en un alimento para ser declarado exento de gluten (< 20 ppm de gluten). Sin embargo, a pesar de estos resultados, las industrias elaboradoras de cultivos microbianos iniciadores y secundarios, igualmente buscaron desarrollar nuevos medios de cultivo en base a cereales atóxicos para los celíacos como ser: arroz, maíz o papa, para el desarrollo de las esporas de hongos utilizados en la maduración de quesos azules, lográndose patentar varias formulaciones aptas para su uso en la industria láctea (Mogna y col., 2007; Mora y Pintus, 2008). No obstante, ante la duda o ausencia de certificación que garantice la ausencia de gluten de TACC en los fermentos secundarios fúngicos, se debe realizar un control de calidad de los mismos.

5.6 - Jarabes de glucosa y maltodextrinas

Estos productos se obtienen de la hidrólisis de almidones. Como los almidones son polímeros de glucosa, el grado de hidrólisis de los mismos determina los compuestos a obtener: maltodextrinas, maltosa, dextrosa, jarabe de glucosa, etc. Todos estos azúcares

entran en la composición de muchos alimentos, bebidas y helados (Associazione Italiana Celiachia, 2008).

La UE, en 2007, a través de la Directiva 2007/68/CE (anexo III bis), excluyó del listado de ingredientes y sustancias alimentarias alergénicas ciertos productos derivados de cereales con gluten por considerar que el proceso de obtención de los mismos garantiza la ausencia de péptidos tóxicos para los celíacos, teniendo en cuenta el límite determinado por la European Food Safety Authority (EFSA) para las materias primas de los cuales derivan. Estos ingredientes son (Diario Oficial de la Unión Europea, 2007):

- 1 - Jarabes de glucosa a base de trigo, incluida la dextrosa,
- 2 - Maltodextrinas a base de trigo,
- 3 - Jarabes de glucosa a base de cebada,
- 4 - Cereales utilizados en destilados para licores.

No obstante, la Directiva da a entender que, para jarabes de glucosa a base de trigo (incluida la dextrosa), utilizados como edulcorantes, y para maltodextrinas a base de trigo, además de cualquier producto derivado, la exclusión se admite siempre y cuando “sea improbable” un aumento de la toxicidad de la sustancia para los estándares de aceptación prefijados en el Codex Alimentarius. Probablemente esto derive de un estudio realizado por la misma EFSA, en 2004, quien reveló que maltodextrinas provenientes de almidón de trigo contenían entre 1 y 40 ppm de gliadinas residuales, analizadas por espectrometría de masas y por ELISA. Tradicionalmente las maltodextrinas, utilizadas en alimentación como humectantes, espesantes, ligantes y estabilizantes, se obtenían exclusivamente por hidrólisis del almidón de maíz. Hoy se produce también a partir de otros polisacáridos como ser el almidón de trigo, centeno, plátano y yuca (EFSA, 2004).

De usarse estos aditivos en productos lácteos, los mismos deberían ser expendidos con certificado de aptitud o bien ser previamente controlados, antes de su uso, para corroborar ausencia de gluten de TACC.

5.7 - Colorante caramelo

Existen cuatro variedades de colorante caramelo denominados I, II, III y IV, según sea el proceso de obtención del cual deriven. Todos se obtienen por tratamiento térmico (caramelización) de carbohidratos, entre los que se encuentran azúcar invertido, sacarosa, jarabe de glucosa y dextrosa. Un posible aporte de gluten de TACC por parte de colorante caramelo que condicione su uso en la industria láctea, sólo se justificaría por transferencia del mismo con la materia prima utilizada, como ser jarabe de glucosa o dextrosa que a su

vez provenga de un almidón contaminado con trigo. No obstante, no se evidencian estudios que cuestionen la inocuidad de este colorante (intolerancia y/o alergenidad) (EFSA, 2011). El CAA, en el capítulo XVI: Correctivos y Coadyuvantes (artículo 1324), admite el uso de los cuatro tipos de colorante caramelo siempre que provengan de las materias primas antes citadas. Los colorantes normalmente se comercializan disueltos en diferentes solventes. El artículo 1326 expresa algo a tener en cuenta: “Se admiten los siguientes diluyentes cuya presencia debe encontrarse permitida en los alimentos para los cuales se destinan los colorantes referidos: aceites y/o grasas comestibles, agua, alginatos, almidones, azúcar, cera de abejas, cloruro de sodio, dextrinas, dextrosa, etanol, féculas, gelatinas, glicerol, lactosa, parafina sólida, pectinas, propilenglicol y sorbitol”. Además aclara que: “Estos productos se rotularán: "...en ... al...", llenando los espacios en blanco con el nombre del colorante (o los nombres en el caso de mezclas), el diluyente y la concentración del colorante (no menor al 60% p/p), respectivamente (ANMAT, 2012f). Esto significa que en la formulación de un producto lácteo que lleve este colorante, es importante revisar qué diluyente (vehículo) acompaña al mismo puesto que, en su presentación en polvo, puede estar soportado en féculas y almidones, como se indica en el CAA.

5.8 - Aromatizantes/saborizantes

Si bien no hay pruebas directas de que algún aromatizante/saborizante pueda ser perjudicial para un celíaco, sí es importante saber que el CAA, en el capítulo XVIII: Aditivos Alimentarios (artículo 1400), permite el uso como diluyente/vehículo de los mismos a dextrinas, dextrosas y maltodextrinas (ANMAT, 2012g).

5.9 - Gelatina y glutamatos

La UE reglamentó en 2004 la producción de gelatina grado alimenticio, admitiendo en su elaboración sólo huesos animales, piel de rumiantes de cría, tendones y ligamentos de éstos y piel y espinas de pescados, adjuntando además los lineamientos para su elaboración. Por lo tanto, por su origen de producto naturalmente libre de gluten es apto para celíacos pero no queda exento de una eventual contaminación cruzada (Associazione Italiana Celiachia, 2008).

Las sales del ácido glutámico son utilizadas en la industria alimentaria como exaltadores del sabor. Este ácido se obtiene industrialmente por fermentación bacteriana de un sustrato constituido por azúcares, melazas o almidones. El producto final se separa

por filtración y se somete a una serie de purificaciones y sucesivas cristalizaciones hasta obtener un polvo blanco. El proceso excluye la posible presencia de gluten en el producto terminado (Associazione Italiana Celiachia, 2008).

6 - Usos específicos de almidones y derivados en la industria láctea argentina

En el capítulo VIII del CAA (Alimentos Lácteos) se indica específicamente en qué productos se podrá agregar almidones nativos y/o modificados como gelificantes, para algunos casos, y espesante/estabilizante, para otros, según sea la viscosidad deseada en el producto terminado. Un listado extenso de otros modificadores de textura está también detallado entre los que se encuentran: carragenatos iota y kappa, alginatos, ágar, pectinas y gelatina que se obtienen de algas, cáscaras de frutas, huesos y cueros, en cuyo caso, la presencia de gluten de TACC, por naturaleza y proceso productivo, es prácticamente improbable. Además aclara que de utilizarse ingredientes opcionales que no formen parte de la base láctea, excepto el agua, solos o combinados, no deberán superar el 30% (m/m) del producto final y los almidones o almidones modificados no deberán superar diferentes límites de acuerdo al producto que se trate, que varían entre 0,5 a 3% (m/m). Actualmente el CAA no exige indicar el nombre de la especie botánica de la cual provienen los almidones nativos y/o modificados en el listado de ingredientes del rótulo. Sin embargo, algunas empresas lo hacen, lo cual es de gran ayuda para el celíaco a la hora de elegir un producto adecuado a su dieta (ANMAT, 2012a).

Para hacer una comparación del uso de almidones y/o féculas en la industria cárnica, en el capítulo VI del CAA, dedicado a productos cárneos y afines (artículo 323), se autoriza el uso de sustancias amiláceas en chacinados (salchichas crudas o cocidas, hamburguesas, fiambres crudos o cocidos, etc.) en las siguientes concentraciones (ANMAT, 2012b):

- chacinados frescos: máximo 5%;
- chacinados secos: máximo 3%;
- chacinados cocidos: máximo 10 %.

Esto demuestra que en la industria cárnica el uso de sustancias amiláceas no sólo está permitido sino que es casi generalizado, a excepción de algunos productos para los cuales se prohíbe expresamente su utilización con detección negativa de almidón.

6.1 - Productos lácteos que admiten almidones y/o derivados

Según nuestro CAA, para la industria láctea, la incorporación expresa de almidones nativos y/o modificados como modificadores de textura y de otros ingredientes derivados del procesamiento de almidones (edulcorantes, colorantes), está acotada a los siguientes productos:

a) Leches fermentadas:

En el artículo 576 del CAA, se define como leches fermentadas a: yogur, leche cultivada, leche acidófila, kefir, kumys y cuajada, para los que se admiten el agregado de ingredientes opcionales no lácteos, entre los que se encuentran maltodextrinas, almidones y/o almidones modificados en una concentración que no supere el 1 % (m/m) en el producto final. Se añaden con el objeto de retener el agua liberada por retracción del coágulo ácido y proporcionar textura cremosa o gelificada (en yogur firme). Asimismo, se permite el agregado de las cuatro variedades de colorante caramelo, entre otros, de aromatizantes/saborizantes permitidos y de glúcidos autorizados como endulzantes (Andrich, 1994; ANMAT 2012a).

En el caso del kefir y del kumys, en su elaboración se utilizan “granos de kefir”. En relación a este producto, existen trabajos documentados que describen el desarrollo de una bebida sustituta a base de suero y saborizantes, fermentada con gránulos de kefir soportados en gluten o materiales celulósicos (Athanasiadis y col., 2004).

b) Dulce de leche:

En su artículo 592, el CAA declara que el dulce de leche puede contener como ingrediente opcional almidón o almidones modificados en una proporción no superior a 0,5 g/ 100 ml de leche y la sacarosa puede ser sustituida por mono y disacáridos en un máximo de 40% (m/m). El dulce de leche heladero admite colorante caramelo (ANMAT, 2012a).

c) Quesos:

⇒ De muy alta humedad procesados térmicamente:

El CAA, en el artículo 622, define al queso cremoso como queso de alta y muy alta humedad que contiene un mínimo de 50% de materia grasa en base seca y no admite

para su elaboración el agregado de almidones, por lo tanto, su detección en el producto indicaría un fraude o adulteración. Sin embargo sí permite el agregado de almidones modificados, como espesante/estabilizante, en quesos de muy alta humedad tratados térmicamente, es decir, aquellos quesos procesados a altas temperaturas que se obtienen por mezcla de uno o varios quesos, y que en su elaboración puede agregarse además otros aditivos. Incluye a quesos cremosos procesados, quesos fundidos o reelaborados y quesos para untar. En este caso, la adición de almidones u otros espesantes/estabilizantes permite aumentar la retención de agua (controlar la sinéresis), lograr texturas especiales y contribuir a mantener la consistencia semisólida en caliente sin limitar el poder de cobertura (Andrich, 1994; INTI, 2011). Al respecto, el Reglamento Técnico Mercosur de Identidad y Calidad de Queso Procesado Fundido o Procesado Pasteurizado y Queso Procesado Fundido sometido a tratamiento térmico de UAT (Mercosur/GMC/Res. N° 134/96) especifica que en ese tipo de quesos, la concentración de almidones o almidones modificados no superará el 3% (m/m) en el producto final (ANMAT, 2012a).

⇒ Quesos fundidos o procesados en polvo:

Son los quesos obtenidos por fusión y deshidratación de la mezcla de una o más variedades de queso, que se utilizan generalmente como ingredientes de otros alimentos procesados. El Reglamento Técnico Mercosur de Identidad y Calidad de Queso en Polvo (Mercosur/GMC/Res. N° 136/96), incorporado al CAA, permite la adición de almidones o almidones modificados, no superando el 3% (m/m) en el producto final. Es importante considerar que los quesos en polvo no son quesos rallados, en los cuales no se admite el agregado de almidones (ANMAT, 2012a).

d) Polvos o mezclas para preparar postres o postres helados:

Son los productos en forma pulverulenta y que por dispersión en agua y/o leche, con o sin el agregado de edulcorantes nutritivos, huevos o yema, permiten la obtención de las preparaciones correspondientes (flan, postre-cremoso, helados). Pueden estar hechos a base de harinas, almidones, féculas o sus mezclas y, en el caso de polvos para preparar helados, llevarán almidones, féculas o sus mezclas y dextrinas. Admiten dextrosa y jarabe de glucosa o sus mezclas como edulcorantes y colorante caramelo, entre otros aditivos. Estos productos no están incluidos en el capítulo VIII, del CAA, de alimentos lácteos, si no, en el capítulo X: Alimentos Azucarados (artículos 818 y 818bis, CAA). Además no

suelen ser alimentos elaborados en una industria láctea. Se los considera aquí por contener en su composición ingredientes lácteos como ser: leche en polvo, crema en polvo y caseinatos (ANMAT, 2012c).

e) Postres lácteos:

El Codex General Standard for Food Additives (GSFA) es la parte del Codex Alimentarius que reglamenta los aditivos alimentarios. La categoría de alimentos 01.7 incluye a los postres lácteos, a los que define como alimentos a base de leche listo para su consumo y mezclas para postres, aromatizados. En esta categoría ingresan: budines, yogur aromatizado o con fruta, dulces y golosinas lácteas congeladas y rellenos a base de leche, helados, mousses, dulce de leche y dulces a base de leches tradicionales, típicos de algunos países de Asia como el *khoa* (dulce de leche de vaca o búfala concentrada mediante cocción), el *chhena* (dulce de leche de vaca o búfala coaguladas mediante cocción y agregado de ácido cítrico, málico o láctico) y otros productos como *peda*, *burfee*, *torta de leche*, *gulab jamun*, *rasgulla*, *rasmalai* y *basundi* (estos últimos originarios de India). Para estos productos se indican los ingredientes autorizados (espesantes, colorantes, edulcorantes, saborizantes, exaltadores de sabor), dentro de los cuales, algunos pueden no ser aptos para formular lácteos para celíacos. A saber: almidones tratados con enzimas, almidones modificados, agar, gelatina, colorante caramelo tipo I, polidextrosas, dextrinas de almidón tostado y glutamatos. No figura en el listado de ingredientes para postres lácteos el jarabe de glucosa pero sí los jarabes de maltitol, poliglicitol y sorbitol, que normalmente se sintetizan a partir del jarabe de glucosa, proveniente de la hidrólisis de almidones (Codex Alimentarius, 2011).

Los postres lácteos (tipo caseros) tales como flanes y budines utilizan huevos o bases almidonosas como gelificantes. En su elaboración industrial se ha reemplazado totalmente el huevo y, en forma parcial, el almidón, comercializándose listos para consumir. Se usan carragenatos tipo iota y kappa por su poder de interacción con las proteínas lácteas y para budines se sigue usando almidones (especialmente, de maíz tipo “waxy”) al 1,5-2,5% el cual debe ser seleccionado de modo tal de minimizar la sinéresis (Andrich, 1994; Alais, 2003).

6.2 - Productos lácteos (o de base láctea) observables

Para los siguientes productos, queda indicado en los artículos del CAA en que los mencionan, el uso de modificadores de texturas, edulcorantes y colorantes, todos

permitidos, pero sin hacer alusión directa al uso de almidones nativos y/o modificados. No obstante varias marcas comerciales incluyen almidones modificados en este tipo de alimentos, declarándolos en sus rótulos. El uso de maltodextrinas es frecuente, sobre todo en leche en polvo y leche UAT modificadas para fines específicos.

a) Leches saborizadas y/o aromatizadas:

Tanto para leches aromatizadas y/o saborizadas como para leche chocolatada (artículos 562bis y 562tris, respectivamente), el CAA admite el agregado de espesantes y/o estabilizantes en una proporción no mayor a 5,0 g/kg (m/m), de edulcorantes y colorantes autorizados. Aclara que, una vez elaborados, no deben contener menos de 90%, ni menos del 85% de leche o leche reconstituida, para leches saborizadas y/o aromatizadas y para leche chocolatada, respectivamente (entera, descremada o parcialmente descremada) (ANMAT, 2012a).

b) Productos para lactantes y niños de corta edad:

En el capítulo XVII del CAA: Alimentos de régimen o dietéticos (artículos 1344, 1346, 1346 bis, 1347 bis, 1353 y 1359), están reglamentados los alimentos para lactantes y niños en la primera infancia que incluyen: leches maternizadas, leches modificadas, harinas dietéticas y preparados en base a vegetales, carne, hígado, huevos, frutas, que puedan presentarse en forma de pasta, polvo o puré. Las empresas involucradas en su elaboración deben tener la Dirección Técnica de un profesional universitario autorizado, como así también un estricto control de las materias primas, productos en proceso y productos terminados. El CAA exige que para la fabricación de cada tipo de alimento para lactantes y niños en primera infancia se sigan las normas establecidas para su equivalente codificado, excepto las modificaciones introducidas inherentes a su carácter dietético o de régimen y en lo particular a las que en cada caso se exijan, adecuándose los ingredientes utilizados a la edad del niño para el cual se formulan. De allí que admita el empleo de los aditivos autorizados para los alimentos correspondientes ya definidos en el CAA en las cantidades máximas establecidas, salvo en las excepciones previstas. Aclara que las harinas dietéticas deben tener como destino adaptar la alimentación del lactante a la de primera infancia y acepta como ingredientes de las mismas harinas de cereales o legumbres, materias amiláceas o sus derivados (dextrinas, maltosa, etc.), con el agregado de otros alimentos como leche en polvo, huevo en polvo, grasas alimenticias, glúcidos, minerales, vitaminas, proteínas y sometidos a tratamientos especiales para hacerlas más

digeribles (ANMAT, 2012e). En todo caso, ante la adquisición de un producto de este tipo, deberá leerse estrictamente la composición declarada en el rótulo, constatándose la declaración de libre de gluten y, ante la duda y previo al consumo, consultar al profesional de la salud correspondiente.

7 - Buenas prácticas de manufactura (BPM) y prevención de contaminación cruzada

Todas las estrategias puestas en juego en una industria láctea para determinar fuentes potenciales de gluten de TACC y establecer controles apropiados para prevenir su introducción en un producto lácteo libre de gluten (PLLG), deben estar enmarcadas dentro de un plan estratégico de la empresa. En el contexto de una industria láctea, *contaminación cruzada* es el proceso mediante el cual un PLLG pierde ese status debido a que entra en contacto con una sustancia, o mezcla de ellas, que no es libre de gluten, pudiendo ocasionar síntomas severos en personas celíacas al consumir el producto. De esta manera, documentar y validar Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) resulta fundamental para que la elaboración de un PLLG origine un alimento inocuo (Deibel y col., 1997; ANMAT, 2012j).

Si una industria láctea decide encaminarse a la certificación de sus productos como “libre de gluten”, previo a la planificación de la gestión, es conveniente que realice un estado de situación, por ejemplo, enviando los alimentos lácteos que desea rotular como exentos de gluten, a un laboratorio acreditado en el análisis de modo tal de tener una visión del grado de contaminación (o no) con gluten que tienen sus productos y, a partir de allí, ejecutar las medidas preventivas y ajustes de los procesos que lo ameriten a fin de eliminar riesgos (La Raíz SA, 2009b).

El establecimiento de un programa de BPM para PLLG implica contar con procedimientos e instructivos estandarizados y registros de las operaciones que se realizan en la firma para garantizar y documentar así las Buenas Prácticas. En este sentido, las medidas preventivas y estrategias de acción estarán siempre orientadas a minimizar riesgos de contaminación con gluten ligados a:

- Materias primas (ingredientes) y aditivos,
- Control de procesos y de equipos,
- Instalaciones,
- Envasado y Etiquetado,

- Higiene,
- Capacitación del personal.

7.1- Materias primas (ingredientes) y aditivos

Cuando el gluten ingresa a un producto alimenticio a través de ingredientes y/o aditivos, no sólo se contamina el producto sino también la línea de producción. Los ingredientes compuestos son los que requieren mayor observación por ser multi-componentes y es necesaria siempre una comunicación y cooperación fluida con los proveedores (Deibel y col., 1997; FEPALE, 2012a). Las materias primas utilizadas en la producción, manipulación y transformación de PLLG no deben contener gluten ni estar elaboradas a partir de éste. Para tal fin debe asegurarse:

- Trabajar sólo con proveedores que tengan implementado un sistema para prevenir y controlar la contaminación con gluten.
- Pedir certificado de análisis que respalde la condición sin TACC de las materias primas.
- Solicitar notificación previa de cualquier cambio en las formulaciones de los proveedores.
- En el caso de cambiar de proveedor, es preciso realizarle una auditoría exhaustiva para evaluar sus medidas de control y análisis como garantía de que la materia prima es libre de gluten.
- Transporte: Nunca deberán ir partidas de producto sin gluten en el mismo transporte con otras partidas convencionales a no ser que estén perfectamente cerradas, envasadas, embaladas y etiquetadas.
- Trazabilidad: El productor debe disponer de un procedimiento de trazabilidad donde se detalle la definición del lote, el sistema de codificación establecido, los registros que intervienen en el control y las responsabilidades establecidas. Los productos deben ser trazables desde el origen de sus materias primas hasta el cliente al que son expedidos, sin que se produzcan discontinuidades de la información en la producción, manipulación o en el almacenamiento.
- Toda preparación se identificará de manera que, en caso de ser necesario sea trazable con los ingredientes que la componen.

- Durante el almacenamiento, se debe mantener fehacientemente separados e identificados los productos con TACC de aquellos sin TACC (ANMAT-RENAPRA, 2008).

7.2- Control de procesos y de equipos

Como regla general, al elaborar PLLG y productos lácteos con gluten, utilizando la misma línea de producción, el producto que contiene gluten debe elaborarse luego del que no lo contiene para disminuir el riesgo de contaminación cruzada. En esta instancia, el riesgo de contaminación por polvo suspendido es mínimo y las instalaciones, ropas y equipos se encuentran completamente limpios. Este criterio también facilita la sanitización de equipos entre alimentos producidos. Es una buena práctica la identificación de utensilios y equipos exclusivos para uso sin TACC con colores diferentes o sectorización efectiva (Deibel y col., 1997; ANMAT-RENAPRA, 2008). Como recomendaciones generales se pueden indicar:

- Proteja adecuadamente las líneas de proceso para evitar contaminación cruzada durante las operaciones y al finalizar las mismas. Es importante cubrir las cintas transportadoras para evitar caídas de material procesado de una a otra. Sistemas de producción contenidos, encapsulados, protegidos o encerrados y sin entrecruzamientos son ideales cuando se manipulan PLLG.
- Coloque a los equipos de dosificación que contengan ingredientes con gluten sistemas de bloqueo automático cuando en la línea se pase de elaborar un producto con gluten a otro que no los contendrá.
- Es fundamental tener bien identificado cada producto alimenticio con su línea de elaboración, sobre todo si se utilizan válvulas de tres vías por las que circulan o intercambian.
- La primera cantidad de producto sin gluten que salga de las líneas de producción no se considera como tal y se elimina o se comercializa como producto convencional.
- Si se realizan actividades de diseño de nuevos productos especiales sin gluten, se deben llevar a cabo controles de su seguridad, además de estudiar y documentar adecuadamente los puntos críticos de su proceso de obtención en el flujograma (ANMAT, 2012j).
- Debe existir un tratamiento preestablecido para los productos no conformes. Cuando se detecte una contaminación por gluten de una partida, o lote de producto

sin gluten dentro de la propia industria, que provoque el no cumplimiento, la partida deberá identificarse físicamente como “partida contaminada” y abandonar su ubicación en la zona de productos sin gluten en el menor tiempo posible. Este lote deberá pasar inmediatamente a ser tratado como convencional (con gluten) y registrarse este hecho.

- Las herramientas de mantenimiento utilizadas en áreas de materias primas y productos terminados pueden ser fuentes de contaminación cruzada con gluten si no se limpian convenientemente. Para evitarlo, se aconseja marcar con colores diferentes las utilizadas para cada sector (Deibel y col., 1997; ANMAT-RENAPRA, 2008).
- Con respecto al reprocesado, los sistemas de re-alimentación deberían ser en lo posible exclusivos de un producto. El reprocesado de alimentos debe ser auditado periódicamente para asegurar que el mismo es correctamente ejecutado e identificado (Deibel y col., 1997).

7.3- Instalaciones

Cuando sea posible, deben dedicarse plantas /ambientes/ sistemas / líneas exclusivos para la elaboración de productos sin TACC. Caso contrario, se debe trabajar con especial énfasis en la “separación física” como medio de minimizar la contaminación cruzada. Se recomienda:

- Las paredes y suelos deben ser diseñados, construidos, acabados y mantenidos para evitar la acumulación de suciedad, reducir la condensación, la aparición de moho y facilitar su limpieza.
- El movimiento del aire, asociado a la humedad ambiental y las partículas en suspensión, en las salas de elaboración, es un factor que se debe tener bajo control. Los sistemas de ventilación (natural o forzada) deberán ser diseñados y construidos de tal forma que el aire no fluya desde áreas con gluten a áreas sin gluten. A saber: con conductos o extractores eólicos acoplados a mangas, extracción localizada mediante campanas, sistemas de filtros acoplados a los sistemas de ventilación (ANMAT, 2012j).
- Para PLLG, deben utilizarse equipos, platos, moldes, superficies en contacto directo durante el preparado, separados y debidamente identificados de aquellos que se utilizan para los productos lácteos que contienen gluten. Si ésto no fuera

posible, debe existir una limpieza rigurosa y minuciosa de las superficies, previo a su uso.

- Monitorear el mantenimiento del equipamiento, el sistema de ventilación y control de polvo (ANMAT-RENAPRA, 2008).

7.4- Envasado y Etiquetado

Toda materia prima, ingrediente y producto en proceso que sea alojado en tanques, tambores o cualquier tipo de contenedor para luego ser agregado a la línea de producción, debe estar correctamente identificado y nunca debe ser re-utilizado cuando se destina a un producto en particular, a menos que haya un protocolo de limpieza aprobado y documentado que así lo permita (Deibel y col., 1997).

El etiquetado adecuado de un PLLG es el principal medio para informar al consumidor acerca de la presencia potencial de gluten. El material de envasado de un PLLG que esté en contacto directo con el alimento debería ser testeado para asegurar que no contenga ninguna sustancia tóxica para los celíacos, por ejemplo, envases biodegradables en cuya composición se encuentren polímeros de celulosa obtenidos de trigo (ANMAT-RENAPRA, 2008).

7.5- Higiene

La higiene o sanitización es un aspecto de suma importancia en todos los establecimientos elaboradores de alimentos libres de gluten. Para tal fin:

- Debe contarse con Procedimientos Operativos Estandarizados de Saneamiento (POES) y debe existir un responsable de su implementación.
- Todo el personal, incluidos los de contratación temporaria, debe estar entrenado y sensibilizado en la temática.
- Los agentes químicos, mecánicos y métodos de limpieza seleccionados deben ser los adecuados a las condiciones particulares del establecimiento (limpieza seca o húmeda). Así por ejemplo, se debe minimizar el uso de aire a presión como método de limpieza porque favorece la contaminación con trazas de gluten entre sectores. En caso de contaminación de superficies se aconseja removerla con una solución de etanol acuoso al 60 % (v/v) (La Raíz SA, 2009a).
- Se debe verificar la higiene de las instalaciones y equipos con sistemas analíticos de detección rápida de trazas de gluten, como ser, las tiras reactivas basadas en la inmunocromatografía de flujo lateral. Algunos equipos deben ser desarmados y

limpiados manualmente para luego ser nuevamente ensamblados. Una inspección visual de la correcta limpieza siempre es necesaria (Deibel y col., 1997; ANMAT-RENAPRA, 2008).

7.6- Capacitación del personal

Los programas de formación de personal son las herramientas más efectivas para prevenir contaminaciones accidentales con gluten, ya que permiten la toma de conciencia de los empleados sobre la importancia de la prevención para la elaboración de alimentos seguros. Debe tenerse bien presente que un PLLG puede contaminarse a través de las manos, ropas, aire y superficies de trabajo que contenga residuos de gluten. La capacitación debería incluir:

- Conocimiento general sobre la celiaquía y su relación con la presencia de gluten en alimentos.
- Procedimientos para el control y la prevención de la contaminación con gluten (lavado de manos, prácticas de manipulación, ropas).
- Documentación (registros) adecuada en la línea de proceso.
- Todos los empleados del establecimiento, incluso los temporarios, deben recibir entrenamiento en la temática. Esta capacitación debe documentarse.
- El entrenamiento debe realizarse previo al inicio de sus funciones en el establecimiento y revisar conceptos periódicamente (Deibel y col., 1997; ANMAT-RENAPRA, 2008).

8 - Discusión

Cuando la EC está declarada, el paciente debe iniciar una DLG de por vida para lo cual debe ingerir alimentos naturalmente libres de gluten de TACC (carne, leche, frutas, hortalizas y cereales aptos). En caso de consumir alimentos procesados, la verificación de la composición, con una buena lectura del rótulo, debe transformarse en práctica obligada. Como límite umbral, para no tener efectos adversos, el celíaco no debería ingerir por día más de 50 mg de gluten de TACC.

La legislación internacional no es homogénea en cuanto a la cantidad máxima de gluten tolerable en un alimento para poder ser rotulado como “exento o libre” del mismo pues no todos los celíacos son igualmente sensibles a esa cantidad. Parece ser que hasta

20 mg gluten/kg de producto sería admisible pero existe controversias en UE y USA con este valor pues se lo considera un límite alto, según pruebas clínicas. De allí que un valor de 10 mg gluten/kg de alimento, como tiene nuestro país, es un límite que da mayor margen de seguridad al producto alimenticio que se inscribe como apto para celíacos.

Respecto de los productos lácteos aptos, aquellos que no admiten otros ingredientes que no sean leche, o al menos, alguno cuyo origen garantice la ausencia de trazas de TACC, pueden ser consumidos en forma segura e incluyen: leche fluida entera, parcialmente descremada o descremada, pasteurizada (HTST), esterilizada (UAT), leches concentradas (azucaradas o no), yogur natural, crema, manteca y algunos quesos. A medida que un producto lácteo, en su proceso de elaboración, comienza a incluir más ingredientes, mayores son las posibilidades de incorporar una o varias fuentes potenciales de gluten de TACC.

Hace una década, se cuestionaba el uso del *Penicillium roqueforti* como cultivo para la elaboración de quesos azules pues se obtenía a partir de pan. Un estudio hecho en Italia reveló que lo que puede aportar de prolaminas tóxicas al producto lácteo final está muy por debajo del valor umbral admitido para un alimento libre de gluten. De allí que en ese país, los quesos madurados con hongos son considerados aptos y los fermentos de los mismos ya son fabricados sobre cereales no TACC.

Una atención especial debe tenerse con las imitaciones de quesos, donde se reemplazan caseínas y materia grasa por otras proteínas (por ejemplo, de soja), aceites vegetales y almidones. Estos productos están ganando mercado pues son más baratos que los quesos tradicionales y, organolépticamente, son muy parecidos a éstos. Su uso como ingrediente de otros alimentos y a nivel de consumo público crece pero encuentra ciertos obstáculos por la falta de leyes que los regulen y otorguen una rotulación clara de los mismos a fin de evitar confusiones en la población general y, específicamente, en la población celíaca, quien necesita de alimentos seguros. No obstante, el CAA, en el capítulo VIII (Alimentos Lácteos) reglamenta que las fuentes proteicas que se usen como ingredientes opcionales deben ser solamente de origen lácteo, de modo tal que la genuinidad del producto quede garantizada.

La reglamentación nacional alimentaria, permite la adición de almidones en la formulación de algunos lácteos y en cantidades variables, dependiendo del producto, con un valor máximo del 3% en peso, en el producto final. Sin embargo el CAA no obliga a rotular un producto lácteo al cual se ha agregado un almidón, con el nombre de la especie

botánica de la cual deriva. De hacerlo, esto redundaría en una ayuda importante para el celíaco, preocupado por la aptitud de los alimentos que ingiere.

Respecto del almidón de trigo, resulta imposible eliminar completamente las gliadinas del mismo y su utilización está prohibida, en muchos países, en alimentos para celíacos. No sucede lo mismo con otros aditivos, como ser, jarabe de glucosa, colorante caramelo o cualquier otro que sea manufacturado con cereales y se consideran aptos para su uso en la elaboración de alimentos para celíacos. De todos modos, debe prestarse siempre atención a la composición de estas sustancias pues no siempre son puras, es decir, se expenden en forma de mezclas. Además, es importante conocer los vehículos, soportes o matrices que acompañan al principio activo a partir de un certificado que, asimismo, avale su condición de libre de gluten.

La aplicación de BPM y POES, en una industria láctea, es fundamental para la elaboración de PLLG y tener así bajo control el riesgo de contaminación cruzada con gluten de TACC. Al respecto, toda sectorización física de salas donde puedan llegar a manipularse ingredientes con o sin gluten es vital para evitar su potencial ingreso a productos para celíacos, como así también, la protección o cubrimiento adecuado de todo equipo de uso en la línea de producción tendiente a evitar depósitos de material en suspensión susceptible de contener gluten de TACC. Si ningún método de sectorización funciona y es alto el peligro de ingreso de gluten por alguna vía en la línea de proceso, lo más aconsejable es separarla completamente del resto de líneas de producción.

CAPÍTULO 3

MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN Y

CUANTIFICACIÓN DE TRAZAS DE

GLUTEN DE TACC EN ALIMENTOS

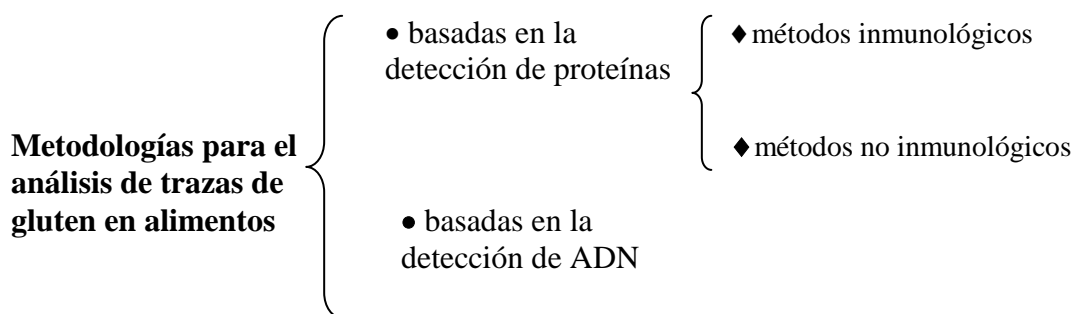
1- Requisitos de los métodos de análisis

Dado que el objetivo de los métodos de análisis de gluten de TACC en un alimento destinado a la alimentación de un celíaco, es determinar cantidades muy pequeñas (trazas), los mismos deberán satisfacer los siguientes requisitos (González y col., 2007; Wieser y Koehler, 2008):

- ☞ *Exactitud y amplio alcance* ⇨ cuantificar lo más cerca posible al contenido real de gluten y ser aplicable en todo tipo de alimento producido bajo diferentes condiciones tecnológicas;
- ☞ *Alta recuperación analítica* ⇨ extraer completamente las prolaminas tóxicas del alimento;
- ☞ *Sensibilidad* ⇨ detectar gluten a los valores internacionales propuestos como seguros, o menos, siempre en el orden de las ppm;
- ☞ *Selectividad (o especificidad)* ⇨ detectar exclusivamente gluten tóxico;
- ☞ *Fiabilidad* ⇨ ser reproducible en distintos laboratorios;
- ☞ *Bajo costo* ⇨ optimizar gastos de reactivos y utilizar equipos no costosos;
- ☞ *Rapidez* ⇨ posibilitar la realización de muchos análisis por día;
- ☞ *Validez* ⇨ estar validado frente a un material de referencia certificado.

2 - Clasificación de los métodos de análisis

Una forma básica de clasificarlos es la siguiente:



2.1 -Basados en la detección de proteínas

Los métodos basados en la detección de proteínas, se dividen en dos grupos: inmunológicos y no inmunológicos.

a) Métodos inmunológicos

La utilización de anticuerpos para detectar fracciones tóxicas del gluten constituye una herramienta eficaz pero aún no están claramente identificadas todas las fracciones nocivas implicadas en la enfermedad celíaca. Por lo tanto, obtener anticuerpos de elevada calidad y especificidad para tal fin sigue siendo un reto para el desarrollo de los métodos inmunológicos (Martín Esteban y col., 2010).

a1) Método de ELISA:

Dentro de los métodos inmunológicos, el más clásico y quizá el más aplicado para la determinación de trazas de gluten es el *inmunoenzimático ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)*. Éste se basa en el principio inmunológico del reconocimiento y unión de los anticuerpos (AC) a moléculas que reconocen como extrañas (antígenos). En este caso, el antígeno es el gluten al cual se unen los anticuerpos reconociendo fragmentos o secuencias específicas de aminoácidos presentes en el mismo. Es adecuado para el análisis de rutina por la rapidez de aplicación y por su alta sensibilidad, siempre que se encuentre garantizada la integridad de las proteínas a detectar en el alimento (que no estén desnaturalizadas) y que el anticuerpo utilizado sea el adecuado. Caso contrario puede dar lugar a falsos negativos. Además, pueden producirse falsos positivos por reacción con especies químicas estrechamente relacionadas. De todos modos, estos métodos son los más utilizados en la actualidad para la determinación de trazas de gluten de TCC (Martín Esteban y col., 2010).

Sistemas de ELISA disponibles para el análisis de gluten:

Los dos sistemas de ELISA más ensayados y comercializados en formato de kits para la detección de trazas de gluten de TACC son los del *tipo sándwich y competitivo*.

A continuación se detallan algunas características básicas de los mismos.

Cuadro 1. Comparación entre ELISA Sándwich y ELISA competitivo (Thompson y Méndez, 2008; Wieser y Koehler, 2008).

	ELISA SÁNDWICH	ELISA COMPETITIVO
Principio del método	El antígeno (gluten) queda “atrapado” entre un AC de captura fijado (sobre un pocillo de la placa) y otro AC de detección marcado con una enzima. Al producirse la unión, dicha enzima comienza a catalizar una reacción colorimétrica directamente proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra.	Un AC no marcado se inmoviliza (sobre un pocillo de la placa) y una cantidad fija y constante de antígeno (gluten) marcado enzimáticamente se agrega junto con el antígeno extraído de la muestra. De esta manera, se produce una competencia entre ambos (antígeno de la muestra y antígeno marcado con enzima) por un número limitado de sitios de enlace presentes en el AC fijado. En este caso, a mayor concentración de gluten en la muestra, menor será la intensidad del color generado por la reacción enzimática del AC con el antígeno marcado.
Uso	Se aplica cuando la molécula del antígeno (gluten) es grande, es decir, tiene una estructura química tal que asegura la presencia de al menos <u>dos epítomos</u> , uno para la reacción con el AC fijado y otro para el enlace con el AC marcado enzimáticamente (AC conjugado).	Es útil para detectar pequeños péptidos en alimentos que contienen gluten hidrolizado, cuyas estructuras químicas garantizan la presencia de al menos <u>un epítomo</u> .
Tipo de alimentos y aditivos en los que se aplica el método	Cualquier tipo de alimento y aditivo donde el gluten presente no esté hidrolizado (cárnicos, lácteos, pastelería, cereales, harinas, pescados, alimentos infantiles).	Todo alimento y aditivo donde el gluten esté hidrolizado (dextrinas, maltodextrinas, jarabe de glucosa, almidones modificados, cervezas, fórmulas infantiles).

Las figuras 1 y 2 ilustran el sistema de ELISA Sándwich.

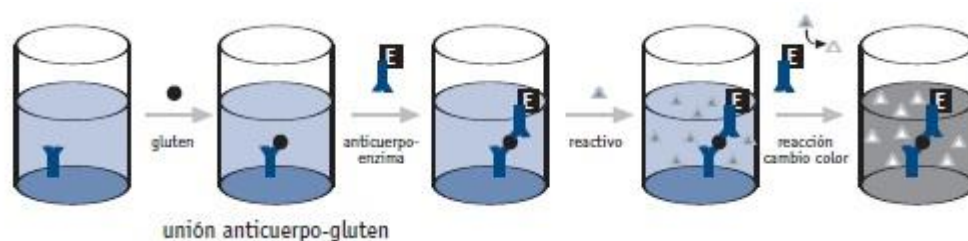


Figura 1. Ensayo inmunoenzimático ELISA tipo sándwich. El anticuerpo (en azul) se encuentra adherido al fondo del tubo de reacción. Cuando se añade la muestra, las moléculas de gluten (en negro) se unen al anticuerpo. A continuación, se incorpora un nuevo anticuerpo unido a una enzima y al añadir el reactivo final, la enzima cataliza la reacción de formación de un producto coloreado en la mezcla (fuente: González y col., 2007).

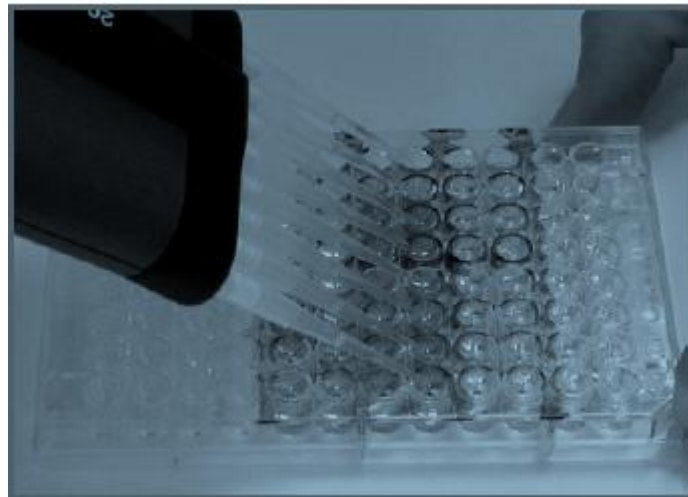


Figura 2. Realización de un ensayo ELISA sobre placa de 96 pocillos (fuente: González y col., 2007).

Evolución histórica de los métodos de análisis por ELISA para la detección de gluten:

Desde sus comienzos, el enzimoimmunoensayo utilizó anticuerpos policlonales. Éstos se producen a partir del suero sanguíneo de animales (inmunización) y su producción no puede estandarizarse. Poseen distinto grado de especificidad y la probabilidad de reacción cruzada es mayor ya que se produce una mezcla de anticuerpos reactivos a distintos sitios antigénicos de la molécula utilizada en la inmunización, lo que aumenta la posibilidad de reacción con otras moléculas relacionadas, conduciendo a resultados falsos positivos. Los anticuerpos monoclonales, desarrollados con posterioridad, reconocen sólo un epítipo de un antígeno y cualquier hecho que haga cambiar la estructura del mismo (desnaturalización, desdoblamiento, agregación, formación de productos de reacción de Maillard, etc.) hará que el anticuerpo no lo reconozca, lo cual aumenta su especificidad, afinidad y disminuye la probabilidad de reacción cruzada con otras sustancias antigénicas. Las características físicas, químicas e inmunológicas de los anticuerpos monoclonales son constantes e idénticas entre distintos lotes (Hefle y col., 2006).

Los primeros métodos de ELISA para la detección de gluten fueron desarrollados con anticuerpos policlonales frente al conjunto de prolaminas del trigo. A partir de 1990 comienzan a aparecer sistemas basados en anticuerpos monoclonales que elevaron la especificidad y sensibilidad de la detección. Los que se detallan a continuación fueron validados y llevados a formatos de kits (Martín Esteban y col., 2010).

◆ Sistema de ELISA de Skerritt y Hill (1990)

Se trata de un ELISA sándwich que utiliza un AC monoclonal contra ω -gliadinas (que representan un bajo porcentaje del total de gliadinas) siendo poco sensible a las ω -prolaminas correspondientes a cebada y avena. Una ventaja de este método es que los AC son dirigidos a las ω -gliadinas, que son proteínas termoestables por lo que su extracción e inmunoreactividad son poco afectadas por la cocción del alimento. De este modo, esta técnica puede ser aplicada a alimentos calentados, utilizando simplemente una extracción con alcohol al 40%. El método es cultivo-dependiente debido a que hay diferentes proporciones de ω -gliadinas en las distintas variedades, y aún dentro de una misma variedad. De esta manera, esta metodología puede sub- o sobreestimar el contenido de gluten dependiendo de la composición del producto con respecto al estándar (material de referencia) utilizado. La sensibilidad oscila entre 20-160 ppm de gluten, según lo especificado por los distintos fabricantes de los kits comerciales. El ELISA de Skerritt y Hill cuenta con estudios colaborativos en los que se evaluó su performance en el análisis de trazas de gluten. Uno de ellos, desarrollado en 1991 sobre una gama de ingredientes y productos alimenticios, entre los que no se encontraban productos lácteos, arrojó como resultado que el método es cuantitativo para el análisis de cereales y productos derivados (almidones, harinas, galletas, mezclas para panificación libres de gluten) (desviación estándar relativa y reproducibilidad del 16-22% y 24-33% respectivamente) pero es semicuantitativo para productos cárnicos procesados (desviación estándar relativa y reproducibilidad del 26% y 46-56% respectivamente). La técnica no produjo falsos positivos y los falsos negativos que se obtuvieron se debieron al uso de un sistema de extracción “modificado” en alimentos que contenían taninos. El método fue patentado y oportunamente fue adoptado como Método I por la Association of Analytical Communities (AOAC) para la determinación de gluten de trigo en alimentos (Skerritt y col., 1990; Skerritt y col., 1991; Denery-Papini y col., 1999; Thompson y Méndez, 2008; Wieser y Koehler, 2008).

◆ Sistema de ELISA-R5 (2003)

El grupo de trabajo del Dr. Méndez desarrolló en el año 2003, en España, un método de ELISA sándwich para la determinación de trazas de gluten de TCC en alimentos procesados o no, térmicamente. En 2006 fue propuesto por la Comisión del Codex Alimentarius como Método Tipo I y adoptado como tal en 2008, luego de haber sido

probado a través de un estudio colaborativo, organizado por el Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity (WGPAT), en el que participaron 20 laboratorios, habiéndose analizado 12 muestras diferentes de alimentos con distintas concentraciones de gliadinas (0-168 ppm) (Codex Alimentarius, 2008; Méndez y col., 2005)³.

El sistema de ELISA creado por este grupo de trabajo, utiliza un AC doble monoclonal, que denominaron R5, el cual reacciona con el epítipo celíaco-tóxico estable al calor y a la hidrólisis, QQPFP (glutamina, glutamina, prolina, fenilalanina, prolina), por lo que se puede utilizar para el análisis de alimentos procesados por temperatura. Este epítipo es de aparición frecuente y conservada en α , γ y ω - gliadinas, hordeínas y secalinas, pero no se encuentra en avena. Se sabe que este sistema de ELISA detecta también las fracciones QQQFP, LQPFP, QLFPF y reconoce el fragmento proteico residual-33 (33-mer), altamente celíaco-tóxico. La ventaja de esta técnica es su bajo límite de detección (3 ppm de gluten), su alta especificidad (no presenta reacción cruzada con maíz, arroz ni avena), su buena reproducibilidad y repetibilidad. Puede sobrestimar el contenido de prolaminas de cebadas, según sea el material de referencia que se utilice en la cuantificación. En 2011, recibió la categorización de Método de Primera Acción por la AOAC (Valdés y col., 2003, Thompson y Méndez, 2008; AOAC, 2011).

El método de ELISA-R5 Sándwich dará resultados erróneos por defecto o directamente falsos negativos si se aplica a alimentos que contienen gluten hidrolizado. Para solucionar este inconveniente, Méndez y colaboradores, en 2005, desarrollaron un ELISA-R5 competitivo para el análisis de gluten parcialmente hidrolizado. En su desarrollo se utilizó por primera vez el material de referencia europeo IRMM-480, el cual se sometió a un proceso de hidrólisis enzimática con una mezcla de pepsina y tripsina para generar un nuevo patrón compuesto por los péptidos de las gliadinas, hordeínas y secalinas del material de referencia original. Se comparó la performance del nuevo sistema de ELISA frente al ELISA-R5 sándwich, obteniéndose con el formato competitivo recuperaciones del 90-96 %. El método cuenta con validación interna por distintas empresas que lo comercializan y fue ensayado fundamentalmente en cervezas y jarabes obtenidos por hidrólisis de almidones (Méndez Cormán y col., 2006; R-Biopharm, 2011 a,b).

³ En esta ocasión dos empresas desarrollaron cada una un kit comercial de ELISA basado en el AC-R5. De esta manera se buscó validar el método cuya robustez fue analizada en el estudio colaborativo. La repetibilidad fue del 13-25%, con un kit, y del 11-22%, en el otro. La reproducibilidad fue del 23-47%, en uno, y del 25-33% en el otro.

◆ ELISA específico contra el péptido 33-mer:

Actualmente existe una tendencia a desarrollar métodos de ELISA para la detección en alimentos de las fracciones peptídicas más celíaco-tóxicas. Morón y col., en 2008, desarrollaron los anticuerpos monoclonales específicos A1 y G12 contra una de ellas: el péptido 33-mer. Lo sorprendente del estudio es que estos anticuerpos no sólo detectan péptidos de prolaminas de trigo, cebada y centeno, sino también de avena. Éstos no tienen reactividad cruzada con péptidos no-tóxicos y los avances en las investigaciones posibilitaron crear un sistema de ELISA sándwich y competitivo basado en el anticuerpo G12 y llevarlo a formato kits, como tal, y al de tiras reactivas (límite de detección < 3 ppm de gluten). En este proyecto fue de vital importancia la participación de una empresa española que no sólo ha fabricado los kits para su comercialización sino que también produjo un sistema de análisis de gluten de TACC en alimentos, adaptado para su uso domiciliario (en formato de tiras reactivas), para detectar gluten en un rango de 10-20 ppm. De esta forma, la población celíaca cuenta con una metodología analítica aplicable en sus hogares para controlar la ausencia de gluten en los alimentos que consume (Morón y col., 2008b; Comino y col., 2011, Biomedal, 2012).

A modo de síntesis, en el cuadro 2 se detallan las diferencias claves entre el método de Skerritt y Hill (ELISA ω -gliadina), el de Méndez (ELISA-R5) y el de Morón y col. (ELISA-G12).

Cuadro 2. Comparación entre los métodos de ELISA tipo sándwich de Skerritt-Hill, el de Méndez y el de Morón y col. para la detección y cuantificación de gluten en alimentos (Thompson y Méndez, 2008; AOAC, 2011; Biomedal 2012)

	Método de Skerritt-Hill ELISA ω-gliadina	Método de Méndez ELISA R5	Método de Morón y col., ELISA G12
Especificidad	Anticuerpo monoclonal contra la fracción ω -gliadina del trigo.	Anticuerpo monoclonal contra la fracción QPFP presente en gliadinas (trigo), hordeínas (cebada) y secalinas (centeno).	Anticuerpo monoclonal G12 contra el péptido celíaco-tóxico 33-mer.
Límite de cuantificación	150 ppm de gluten (método oficial N° 991.19 de la AOAC).	5 ppm de gluten (método tipo I – Codex Alimentarius ⁴ ; método de Primera Acción AOAC)	LD: 4 ppm de gluten.

⁴ La Comisión del Codex Alimentarius clasifica los métodos analíticos en tres tipos: Tipo I, II y III. Los métodos Tipo I ofrecen el mayor grado de fiabilidad en lo que respecta a la cuantificación e identificación de la estructura del analito. Se denominan, a veces, métodos de referencia (González y col., 2007).

Aplicación	Cuantificación de gluten en alimentos tratados y no tratados térmicamente.	Cuantificación de gluten en alimentos tratados y no tratados térmicamente.	Cuantificación de gluten en alimentos tratados y no tratados térmicamente.
Método de extracción	Etanol al 40 %.	Cóctel de extracción (mezcla de sustancias reductoras y disgregantes).	Cóctel de extracción (BES+) (mezcla de sustancias reductoras y disgregantes).
Fortalezas	La fracción ω -gliadina no se desnaturaliza con el calentamiento, por lo que puede cuantificar gluten nativo o modificado térmicamente. Fue llevado a formato de kit.	La fracción QQFPF es resistente al calor, por lo que puede cuantificar gluten nativo o modificado térmicamente. El método reconoce la fracción en trigo, cebada y centeno. Fue llevado a formato de kit.	Detecta la fracción tóxica 33-mer derivada de trigo, cebada, centeno y avena. Al ser muy baja la presencia de este péptido en avena, puede permitir seleccionar cultivares aptos para celíacos. Fue llevado a formato de kit y para uso domiciliario. La versión en tiras inmunocromatográficas puede anexar lector óptico para cuantificación semi-automática de las mismas.
Inconvenientes	Subestima el contenido de prolaminas de cebada en alimentos contaminados con este cereal. Mide sólo la fracción ω -gliadina, variable entre 6 – 20% en trigo. No cuantifica gluten hidrolizado.	Puede sobreestimar prolaminas de cebada en alimentos contaminados con las mismas. No cuantifica gluten hidrolizado.	No tiene aún reconocimiento AOAC.

a2) Western Blot o Inmunoblotting:

Este método confirmatorio consta de varias etapas: primero se realiza una separación electroforética de las proteínas de la muestra, luego se hace una transferencia de las mismas con una inmovilización sobre membranas sintéticas (*blotting*), y por último se realiza la reacción con los anticuerpos específicos. Las técnicas de difusión en gel y la inmunoelectroforesis fueron las primeras en aplicarse para la identificación de

proteínas de trigo en alimentos declarados libres de gluten (Wieser y Koehler, 2008). Por su especificidad, proporciona más información cualitativa y cuantitativa que la técnica de ELISA en sí pero cuenta con la desventaja que requiere de mayor formación y especialización para llevarlo a cabo. Tiene un límite de cuantificación de 8 ppm de gluten en alimentos. Existe un sistema semicuantitativo de *western blot* basado en el anticuerpo R5, desarrollado para confirmar presencia de gluten intacto o hidrolizado, con una sensibilidad de 5 – 10 ppm de gluten (Aguirre, 2006; González y col., 2007; Martín Esteban y col., 2010). La figura 3 esquematiza el sistema de *western blot*.

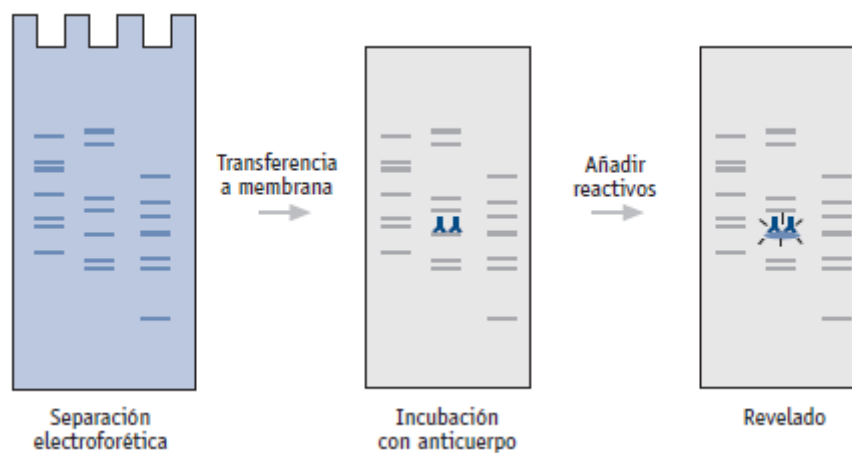


Figura 3. *Western blot* o *immunoblotting* (fuente: González y col., 2007).

a3) Inmunocromatografía de flujo lateral (o laminar):

En los últimos años se ha incrementado el uso de tiras o varillas inmunocromatográficas para la detección de gluten de TCC. Estos dispositivos toman la base de los ensayos de *immunoblotting*, incorporando un medio de inmunomigración formado por membranas microporosas de nitrocelulosa o nylon a las que se les da formato de tiras. Sobre dichas membranas y en distintos sitios se adhieren inmunorreactivos sobre los que va pasando un fluido en ascenso a alta velocidad que contiene un extracto de la muestra en análisis (Van Herwijnen, 2006).

Este sistema es de manejo sencillo, muy rápido (en un solo paso) y con bajos límites de detección pero sólo brinda información de tipo cualitativa por la poca precisión que posee y su mayor utilidad es como método de *screening* sobre materias primas y productos poco procesados, sin descartar la posibilidad de aparición de

interferencias analíticas cuando se aplica a alimentos de composición compleja o muy procesados (Martín Esteban y col., 2010).

La amplia difusión de la inmunocromatografía de flujo lateral se debe a las siguientes razones (Van Herwijnen, 2006):

- 1 - Por su rapidez de reacción puede aportar una información inmediata en la línea de producción respecto de contaminaciones, posibilitando que grandes volúmenes de alimentos sean mal rotulados.
- 2 - Puede ser aplicada por personal no calificado sin un entrenamiento exhaustivo más que los asociados a las buenas prácticas de laboratorio que ameritan su uso adecuado.
- 3 - Puede aplicarse a muestreos continuos en línea, en las aguas de lavados y efluentes, en sala de preparación de aditivos e ingredientes y sobre los equipos (hisopados de superficies).
- 4 - Las tiras vienen envasadas individualmente lo que facilita su uso y conservación.

Componentes de un dispositivo de inmunocromatografía de flujo lateral

Consta de cinco componentes básicos (figura 4):

- 1.- Filtro de muestra:** es de naturaleza similar al papel y su función es retener componentes sólidos de la muestra y tamponarla luego del pretratamiento/extracción.
- 2.- Almohadilla del conjugado:** contiene al AC conjugado (posee unida una enzima) y marcado con látex, carbón u oro, formando partículas de tamaños que van de 5-200 nm.
- 3.- Membrana:** es el fondo que se distribuye en toda la tira; normalmente es de nylon o nitrocelulosa pegado a un soporte de polietileno, poliestireno o polipropileno; por sus microporos asciende por capilaridad la mezcla líquida hasta las zonas de reacción (línea test y de control) donde ciertos componentes quedan retenidos dando origen a una reacción colorimétrica.
- 4.- Reservorio (almohadilla o filtro de absorción):** su única función es absorber el líquido al final de la cromatografía; normalmente se hace en celulosa con alto poder de absorción lo que hace que la mezcla siga fluyendo en ascenso por la membrana de nitrocelulosa.
- 5.- Líneas de test y de control:** tienen adheridos (inmovilizados) los AC de reacción sobre la superficie de nitrocelulosa; esto se hace con un equipo especial que dispensa un volumen preciso por mm^2 .

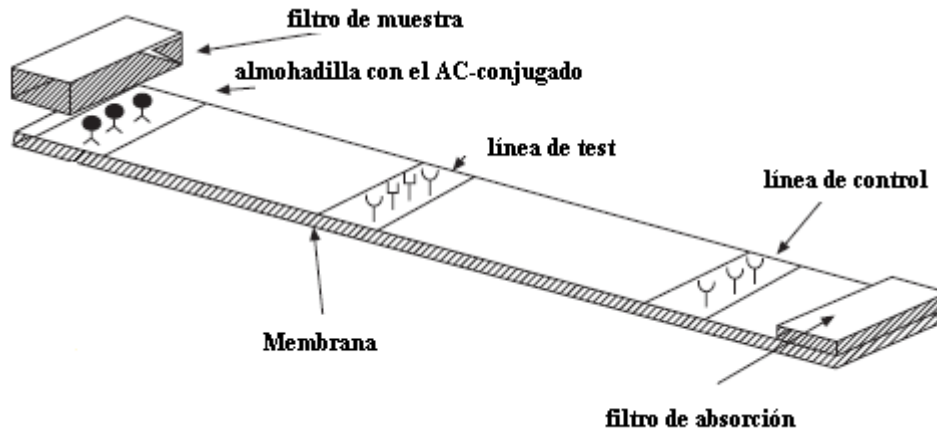


Figura 4. Componentes de un dispositivo de inmunocromatografía de flujo lateral en un paso (fuente: Van Herwijnen, 2006).

Mecanismo de la corrida de una muestra:

Cuando un extracto de la muestra conteniendo el analito fluye ascendiendo por la tira, primero reacciona con el AC-conjugado formando un complejo que sigue migrando. Al llegar a la “línea de test” este complejo reacciona con otro anticuerpo inmobilizado, el cual, normalmente no compite con el mismo epítopo que el AC-conjugado ni por epítopos vecinos. Este AC captura el complejo y da una reacción de color proporcional a la cantidad de analito en la muestra.

Para asegurar que el proceso de migración culminó en la forma prevista, existe una “línea de control” que tiene inmobilizado un AC anti-AC-conjugado; cuando el remanente de extracto migra hasta esa zona, se produce una nueva captura del AC-conjugado pero esta vez por un AC contra el mismo inmobilizado en esa zona, generándose otra reacción de color diferente a la de la “línea de test”. La figura 5 ejemplifica una tira reactiva donde se efectúa la siembra del antígeno (gluten) y el resultado que se obtiene al final de la corrida inmunocromatográfica, en este caso, con resultado positivo.

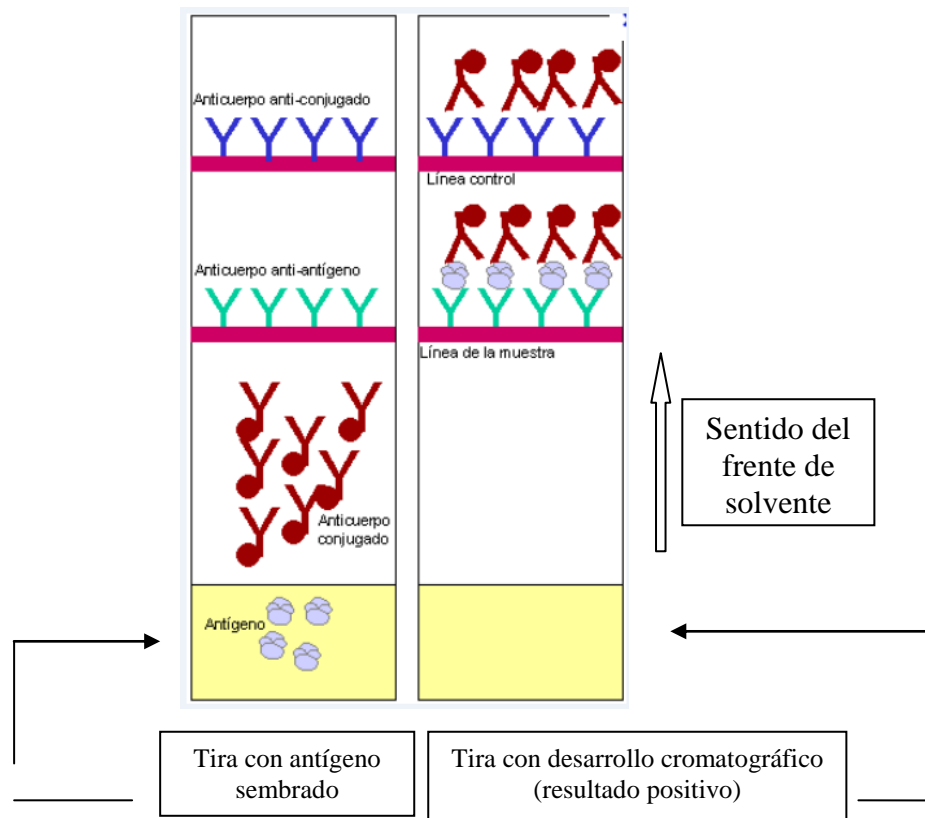


Figura 5. Esquematación simbólica de los elementos de una tira inmunocromatográfica “sembrada” y del resultado obtenido (positivo) por reacción antígeno-anticuerpo, luego de la corrida. (fuente: Alonso y col., 2005)

Macroscópicamente, los resultados cualitativos que se obtienen son (figura 6):

- **Resultado positivo:** dos líneas coloreadas visibles de distinto tono;
- **Resultado negativo:** sólo la línea control queda visiblemente coloreada;
- **Resultado inválido:** ambas líneas no se hacen visibles o sólo aparece la línea de test (línea de la muestra) visible.

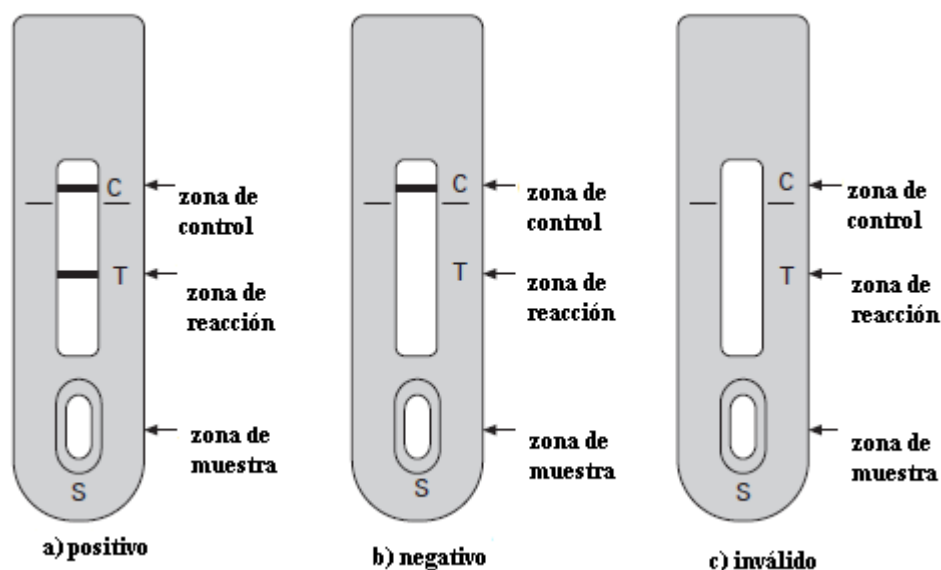


Figura 6. Resultados que se pueden obtener en una cromatografía de flujo lateral en un paso (fuente: Van Herwijnen, 2006).

Límites de detección de los métodos inmunológicos para el análisis de trazas de gluten

A modo referencial se presenta en la siguiente tabla los límites de detección y cuantificación de los métodos inmunológicos basados en el análisis de proteínas, para la determinación de trazas de gluten:

Tabla 1. Límites de detección de los métodos inmunológicos de gluten (Martín Esteban y col., 2010)

Métodos de detección de gluten	Límite de detección (ppm de gluten)	Límite de cuantificación (ppm de gluten)
ELISA Sándwich (anticuerpo- R5)	3,0	5,0
Otros ELISA Sándwich con otros anticuerpos	-	3,0 – 10,0
Tiras inmunocromatográficas	2,0 – 4,0	-
Western Blot	-	8,0

b) Métodos no inmunológicos

Comprenden varias metodologías de análisis de proteínas, entre ellas:

- Espectrometría de masas MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight): consiste en una ionización de la muestra por medio de láser y la detección de los iones con un detector de masas.
- Cromatografía de líquidos-espectrometría de masas, cuyas aplicaciones en la separación, detección y cuantificación de péptidos y proteínas de una matriz alimenticia han encontrado un adecuado nivel de adaptación para el análisis de gluten de TACC.

Ambos métodos cuentan con la ventaja que no utilizan anticuerpos específicos frente a prolaminas tóxicas y se basan en la comparación de los perfiles de las proteínas extraídas del alimento contra los perfiles característicos (espectros de masas) de las prolaminas extraídas de los estándares de cereales. En este caso, los equipos utilizados son costosos y no cualquier laboratorio puede acceder a ellos, siendo compleja la elaboración de bibliotecas de espectros y la calibración de los mismos. La metodología de MALDI-TOF, por ejemplo, es incompatible con algunos ingredientes alimentarios. Los métodos no inmunológicos sólo justifican su ejecución cuando es necesario confirmar los resultados de un ELISA (Aguirre, 2006; González y col., 2007; Martín Esteban y col., 2010).

La figura 7 muestra los espectros de masas MALDI-TOF de un estándar de gliadinas y de un producto contaminado con trigo.

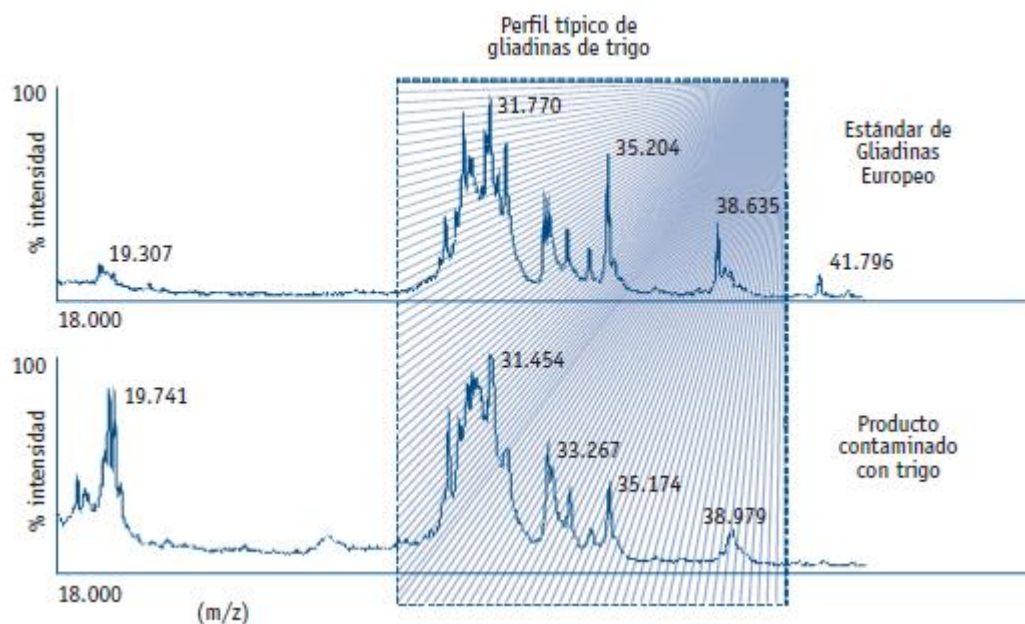


Figura 7. Ejemplo de espectros de masas MALDI-TOF aplicado al análisis de gliadinas en alimentos. El de arriba corresponde a un material de referencia europeo de gliadinas y, el de abajo, es el correspondiente a un alimento contaminado con trigo. Los picos de mayor altura corresponden a las gliadinas del trigo (fuente: González y col., 2007).

2.2 -Basados en la detección de ADN

Existen técnicas de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR: del inglés: *Polymerase Chain Reaction*) desarrolladas para detectar ADN intacto, o pequeñas porciones, implicado en la codificación de gluten de TACC. Cuando un alimento que contiene gluten ha sido procesado o tratado fisicoquímicamente, puede producirse la desnaturalización o degradación del mismo, por lo que su detección directa puede verse afectada. Por el contrario, si bien el ADN puede sufrir fragmentaciones durante el procesamiento del alimento, las mismas pueden igualmente ser detectadas, salvo degradaciones muy extensas en las cuales, si la porción de ADN es muy pequeña, el tamaño del fragmento amplificado no dará un resultado adecuado. Es importante considerar que en estas metodologías sólo se detecta el ADN que codifica proteínas de TACC pero se desconoce la integridad y funcionalidad de las mismas ya que no se sabe qué grado de traducción a prolamina tóxica tiene el ADN analizado (Martín Esteban y col., 2010).

Los desarrollos en PCR al respecto, involucran técnicas cuali y cuantitativas, algunas de las cuales fueron llevadas a formatos de kits comerciales. Por ejemplo, por PCR-RT (Real Time: Tiempo Real), se puede detectar y cuantificar ADN de trigo, cebada, centeno o la suma de los tres con una sensibilidad equivalente a 5 – 10 ppm (Aguirre, 2006).

En 2009, un grupo de investigadores de India, desarrollaron un método de PCR para la detección de ADN de gluteninas (glutelinas del trigo), como complemento de los métodos inmunoquímicos para el control del etiquetado de alimentos “libres de gluten” (Debnath y col., 2009). Es importante recordar que las glutelinas, que junto con las prolaminas forman la fracción “gluten” de los cereales, también tienen implicancia en el desarrollo de la celiaquía.

3 - Ventajas y desventajas de los distintos métodos

En el siguiente cuadro se resumen los puntos fuertes y débiles de las técnicas descritas para el análisis de trazas de gluten de TACC en alimentos.

Cuadro 3. Puntos fuertes y débiles de las técnicas de análisis de trazas de gluten de TACC en alimentos (González y col., 2007; Wieser y Koehler., 2008).

TÉCNICA	PUNTOS FUERTES	PUNTOS DÉBILES
<i>Ensayo inmunoenzimático ELISA</i>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Simple realización y rapidez de ejecución (~ 2 horas). ✓ Económica, versátil y robusta. ✓ Alta sensibilidad. ✓ Detección por dispositivos ópticos. ✓ Ausencia de reacciones cruzadas con prolaminas no tóxicas de maíz o arroz. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Posibilidad de falsos negativos por desnaturalización proteica. ✓ Posibilidad de reacciones cruzadas con proteínas estrechamente relacionadas.
<i>Western Blot</i>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Discriminación entre gluten de TCC. ✓ Especificidad. ✓ Sensibilidad (5-10 ppm). ✓ Valor confirmatorio. ✓ Aplicable para el análisis de alimentos crudos y procesados. ✓ Detección de proteínas insolubles. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Lentitud (~ 48 horas). ✓ Necesidad de personal especializado para el análisis.
<i>PCR</i>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Alta sensibilidad en la detección de ADN lo que la habilita como herramienta de análisis complementario a los inmunoensayos. ✓ Identificación de la especie que aporta gluten. Muy útil para el estudio de una posible contaminación cruzada en la cadena de producción. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Necesidad de tiempo y personal calificado para el análisis. ✓ Detección indirecta de gluten (no cuantifica gluten sino ADN que codifica gluten). ✓ No se cuenta con materiales de referencia específicos de ADN de las prolaminas tóxicas para la calibración de los equipos.
<i>Espectrometría de Masas MALDI-TOF</i>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Rapidez de análisis (minutos). ✓ Simple manipulación de la muestra ✓ Reproducibilidad. ✓ Precisión. ✓ Identificación de la especie que aporta gluten a partir de los espectros de masas correspondientes. ✓ Los agentes reductores usados en la extracción de la muestra no interfieren en el análisis. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Instrumentación compleja y necesidad de instalaciones amplias. ✓ Equipos costosos. ✓ Compleja calibración del equipo.
<i>Cromatografía de líquidos</i>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Alta capacidad de separación de proteínas y péptidos derivados del gluten. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Largos tiempos de análisis. ✓ Automatización dificultosa para el procesado de muchas muestras.

4 - Aplicaciones de los sistemas inmunológicos y no-inmunológicos para el análisis de gluten en alimentos

Según el tipo de alimento y la necesidad de hacer un análisis cuantitativo o confirmatorio, las técnicas disponibles tienen distinto grado de aplicación (cuadro 4). Nótese que los métodos confirmatorios (Western Blot R-5, MALDI-TOF y PCR) son los más apropiados para el análisis de la mayoría de los alimentos mientras que las técnicas cuantitativas basadas en enzimoensayos tienen sus restricciones según sea el tipo de alimento a analizar.

Cuadro 4. Campos de aplicación de los métodos inmunológicos y no inmunológicos más utilizados para el análisis de gluten en alimentos (Aguirre, 2006).

TIPO ALIMENTO	CUANTITATIVAS			CONFIRMATORIAS		
	Elisa R5 Sandwich	Elisa R5 Competitivo	Elisa Avena	Western Blot R5	Maldi-Tof	PCR
Cereales	●	●	●	●	●	●
Avenas	●	●	●	●	●	●
Harinas	●	●	●	●	●	●
Almidones	●	●	●	●	●	●
Siropes	●	●	●	●	●	●
Condimentos	●	●	●	●	●	●
Cármicos	●	●	●	●	●	●
Pescados	●	●	●	●	●	●
Lácteos	●	(*)	●	●	●	●
Pastelería	●	●	●	●	●	●
Panadería	●	●	●	●	●	●
Cereales desayuno	●	●	●	●	●	●
Cervezas	●	●	●	●	●	●
Alimentos infantiles	●	●	●	●	●	●

● Apropiado ● No es el más indicado ● No apropiado

Nota: ELISA-Avena, es el método de ELISA-R5 adaptado para el análisis de avena. Detecta contaminación cruzada con TCC. (*) No es apropiado para lácteos en general pero sí, para fórmulas infantiles de base láctea que contemplen el uso de ingredientes hidrolizados en alta proporción donde el gluten pueda estar desdoblado.

5 - Limitaciones y consideraciones de las técnicas inmunológicas para la determinación de gluten de TACC

La inmunoquímica se presenta como una herramienta eficaz para el control de contaminaciones alimentarias asociadas a alérgenos alimentarios, dando métodos de alta

sensibilidad y especificidad, con etapas simples de extracción y purificación, siendo más baratos y rápidos que otros métodos no inmunoquímicos. Sin embargo, es importante tener en cuenta que estos métodos también presentan algunas limitaciones que se deben considerar al interpretar los resultados. En particular, ningún método de ELISA para el control de alimentos libres de gluten ha sido validado en pruebas clínicas como un indicador de toxicidad del alimento en pacientes celíacos. Tampoco es sencillo realizar predicciones de la misma en base a resultados analíticos ya que no se ha estudiado la relación entre los resultados del ELISA con la toxicidad del alimento. Estos métodos detectan una determinada fracción peptídica tóxica del gluten de alta repetición en las prolaminas de las diferentes especies botánicas pero no detectan todas las fracciones conocidas que dañan al celíaco. Por lo tanto, a la fecha es posible determinar presencia/ausencia de gluten con los ELISA pero no la “carga tóxica total” del alimento que garantice su inocuidad. Por último, los procesos tecnológicos pueden modificar la solubilidad y toxicidad tanto de las prolaminas como de las glutelinas. Si bien las prolaminas de TACC son más tóxicas que las glutelinas, éstas no dejan de serlo y pueden estar también presentes en los alimentos. Los enzimoimmunoensayos desarrollados hasta el momento son reactivos contra prolaminas, no contra glutelinas, con lo cual un alimento puede arrojar ausencia de gluten en el análisis y nada se podrá afirmar respecto del contenido de glutelinas lo que no es ninguna garantía de inocuidad alimentaria para el celíaco (Kahlenberg y col., 2006; Lester, 2008; Wieser y Koehler, 2008).

De esta manera, existen algunas consideraciones específicas que deben ser necesariamente tenidas en cuenta a la hora de aplicar un enzimoimmunoensayo para la detección/cuantificación de prolaminas tóxicas de TACC en alimentos procesados. Los factores más importantes que influyen en esta determinación son:

- La extracción de la muestra,
- El polimorfismo de las prolaminas tóxicas,
- El material de referencia utilizado para la cuantificación del gluten,

5.1- Extracción de la muestra

Para obtener una buena recuperación en la extracción del gluten de TACC y minimizar las interferencias en el método de análisis, se debe tener una alta solubilidad del analito y la mínima cantidad posible de sustancias co-extraíbles que puedan interferir en el ensayo. Estos parámetros dependen en mayor o menor grado de:

- a- la matriz de la muestra,
- b- el proceso tecnológico empleado en la elaboración del alimento, y
- c- el solvente de extracción del analito.

a) Efecto matriz

La matriz de la muestra, es decir, lo que acompaña al analito en el alimento, influye en el grado de detección y puede dar lugar a reacciones cruzadas. Por ejemplo, se sabe que ciertas proteínas presentes en el exterior de los gránulos de almidón pueden generar reacciones cruzadas con AC específicos del gluten, conduciendo a falsos positivos. Asimismo, los polifenoles (de té, café, cacao) disminuyen la recuperación de prolaminas en las extracciones por lo que se debe agregar caseína (que compite por la unión con los polifenoles) o urea en los ensayos (Denery-Papini y col., 1999).

Las prolaminas presentes en los alimentos que contienen gluten pueden interactuar entre sí y con los componentes de la matriz a través de enlaces covalentes y no covalentes. Estos vínculos son, en mayor o menor grado, afectados por los procesos tecnológicos puestos en juego en su elaboración y, además, dependen de la clase de gliadina presente. En este sentido, α , β y γ - gliadinas del trigo poseen residuos de cisteína a través de los cuales establecen puentes disulfuros, lo cual no sucede con ω -gliadinas (Doña y col., 2008).

b) Efecto del procesamiento

Los procesos tecnológicos aplicados durante la elaboración de alimentos, tales como tratamientos térmicos (calentamiento, cocción, secado), extrusión, purificación de materias primas, hidrólisis parciales por acción enzimática o química, etc., pueden influir en la solubilidad del gluten, dificultando su extracción (Denery-Papini y col., 1999).

En general, los tratamientos térmicos conducen a la desnaturalización proteica, la que puede afectar de diferente forma a los epítomos tóxicos, llevando, o no, a una disminución de su toxicidad. En este sentido, un efecto particular puede verificarse de acuerdo a la continuidad o discontinuidad de la secuencia tóxica de aminoácidos y al grado de apertura de las cadenas polipeptídicas a causa del efecto térmico. Este hecho hace que los AC no reaccionen con ellos de la misma forma o directamente no lleguen a reconocerlos, lo cual analíticamente hablando, puede conducir a falsos negativos o a la subestimación de la concentración del analito. En este sentido, Rumbo y colaboradores,

en 1996, confirmaron que los tratamientos térmicos producen agregaciones de α , β y γ gliadinas. La formación de estos agregados, favorecida por altas temperaturas, la presencia de agua y de puentes disulfuro (S-S), disminuye la solubilidad de estas proteínas, con extracciones dificultosas y bajas recuperaciones, provocándose una pérdida de reactividad inmunoquímica. De esta manera, el conocimiento de la historia térmica de un alimento es crucial en la selección del inmunoensayo para el control de gliadinas y en la interpretación de los resultados, ya que el tratamiento térmico puede generar sub- o sobreestimación de los mismos (Rumbo y col., 1996; Rumbo y col., 2001; Pérez Cabrejas, 2008).

La figura 8 muestra los agregados que se forman entre los monómeros de prolaminas por efecto de la temperatura, los cuales pueden ser disgregados por una solución cocktail de extracción, como se describirá a continuación.

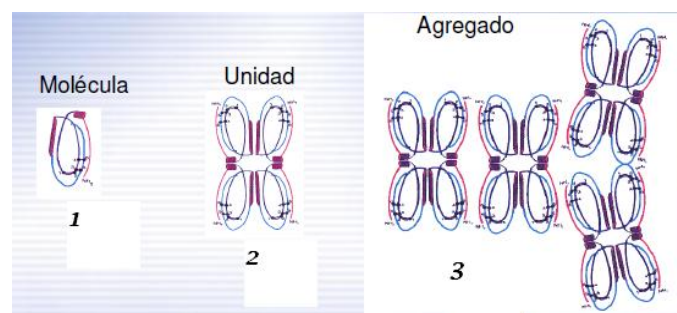


Figura 8. 1: Modelo tridimensional de α -gliadina; 2: Unidad monomérica de α -gliadina; 3: Agregados de monómeros de α -gliadina formados por efecto de la temperatura ($T > 90\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Tomchinsky, 2008).

c) Solvente de extracción

Dado que las prolaminas y glutelinas son insolubles en agua, los solventes de extracción deben contener necesariamente mezclas de etanol en agua (normalmente, etanol/agua al 60%). Sin embargo, al momento de la detección con AC, todos los extractos deben estar diluidos ya que, de lo contrario, la inmunorreactividad se vería afectada. Por otro lado, y como ya fue mencionado, si el material a analizar es un alimento tratado térmicamente, la solubilidad de las prolaminas en una mezcla alcohólica de etanol-agua al 60% baja notablemente por formación de agregados de α , β y γ -prolaminas, de modo que en el extracto obtenido prevalecen las ω -prolaminas que son más termoestables (Rumbo y col., 1996; Denery-Papini y col., 1999).

García y col. (2005) demostraron que la combinación de una solución acuosa de etanol con otra solución constituida por 2-mercaptoetanol (agente reductor de puentes

disulfuros) y guanidina (agente desagregante), llamada solución cocktail de extracción, permitió una recuperación completa de prolaminas y glutelinas en alimentos tratados o no térmicamente, no afectando a los ACs utilizados en la determinación luego de la dilución del extracto. Sin embargo, Doña y col. (2008) confirmaron estudios anteriores que afirmaban que, si bien la adición de agentes reductores y desagregantes en el solvente de extracción incrementa la recuperación de gliadinas, su utilización también puede presentar problemas. En efecto, estos agentes pueden ocasionar cambios en la conformación de antígenos y anticuerpos mono y/o policlonales utilizados en la determinación (fundamentalmente en las zonas de reconocimientos antígeno/anticuerpo) e interferencias analíticas, aún diluyendo cien veces el extracto del analito, lo que conduce a una reducción en la capacidad de cuantificación real del ensayo. Cuanto mayor es la concentración de dichos agentes reductores y desagregantes presentes en el cocktail de extracción (por ejemplo: etanol acuoso al 60% con 2-mercaptoetanol al 2% y cloruro de guanidonio 2M), más se acentúan los cambios conformacionales. Por otro lado, si la cuantificación se realiza contra estándares sin el agregado de estos agentes, la interacción antígeno/anticuerpo de las prolaminas de las muestras no serán equivalentes a las de los estándares que se empleen en la curva de calibración, viéndose así afectado el resultado final. De esta manera, a pesar de que los agentes reductores/desagregantes son de uso común en distintos kits comerciales para la determinación de gluten, se debe tener en cuenta los efectos negativos documentados de los mismos si se presentan problemas de cuantificación. Asimismo, muchas veces no se conocen los procesos tecnológicos a los que estuvo sometido el alimento (tratamiento térmico, hidrólisis, etc.) ni su composición exacta, por lo que es difícil saber si se debe utilizar o no el cocktail de extracción. Se sabe además que cuando se usa este cocktail para extraer gluten de trigo en alimentos contaminados, el mismo extrae muy bien las gliadinas pero no extrae las glutelinas, de las que actualmente se sabe que son también inductoras de celiaquía. Estos cócteles no se utilizan para la extracción de prolaminas hidrolizadas empleando ELISA competitivo, sino que actualmente se usa sólo la mezcla etanol/agua al 60%. Sin embargo, Thompson y col. (2008) afirmaron que el etanol 60% genera altas recuperaciones cuando con él se extraen alimentos e ingredientes hidrolizados, con tratamiento térmico bajo (ejemplo: cervezas, malta y jarabes de glucosa provenientes de almidón de trigo) para ser analizados por ELISA-R5 competitivo. No obstante, sostienen que para alimentos hidrolizados y con tratamiento térmico alto (ejemplo: cereales para desayuno, fórmulas infantiles), la extracción sólo con etanol 60% puede

no dar buenas recuperaciones, y por lo tanto se debería desarrollar un cóctel de extracción compatible con el ELISA-R5 competitivo. La eficiencia de estas soluciones debería verificarse a través de estudios colaborativos e interlaboratorios sobre materiales de referencia certificados, lo que permitiría homogeneizar esta parte del análisis, en el marco de buenas prácticas de laboratorio (García y col., 2005; Doña y col., 2008; Thompson y Méndez, 2008).

5.2- El polimorfismo de las prolaminas tóxicas

El hecho de que el gluten puede presentar polimorfismo entre especies y aún entre variedades de una misma especie de cereal, determina la importancia de asegurar que los epítomos detectados por los anticuerpos sean representativos de las prolaminas totales y estén bien conservados entre diferentes variedades de cereal. Si esto no es así, la capacidad de detección de los AC disminuye. Ellis y col. (1998b), demostraron que las curvas de calibrado realizadas con estándares de gliadinas de tres variedades distintas de trigo fueron paralelas pero no estaban superpuestas, lo que produce variaciones en el cálculo del contenido de gliadinas. De esta manera, el contenido de gluten de TACC en los alimentos, determinado con un test de ELISA, puede variar sustancialmente en función del origen y tipo de gliadina utilizada en la calibración, como así también del tipo de método de ELISA empleado en el análisis (Denery-Papini y col., 1999).

En este sentido, el WGPAT preparó un material de referencia destinado a un uso colectivo a partir de 28 cultivos diferentes de trigo europeo. La composición en gliadina del nuevo material fue determinada por todos los métodos existentes, inmunológicos y no-inmunológicos, y su estabilidad fue también analizada. De esta forma se cumplió con una de las premisas del Codex Alimentarius que sugería que el “patrón de oro” sea preparado por un solo laboratorio, bajo condiciones estrictamente estandarizadas, de modo tal de proporcionar un material homogéneo de contenido de gliadinas y/o gluten perfectamente conocidos para todo laboratorio que lo requiera en sus procesos de calibración. Dicho material fue proporcionado al Instituto de Materiales y Medidas de Referencia de la Unión Europea (IRMM, del inglés: Institute for Reference Materials and Measurements) como material candidato para la preparación de un material de referencia certificado. Este estándar, denominado IRMM-480 cumplió con varios de los criterios necesarios para ser definido como material de referencia (alto contenido proteico, alta solubilidad, homogeneidad, estabilidad fisicoquímica e inmunoquímica,

adecuada reactividad con diferentes sistemas de ELISA) y además mostró tener una reactividad similar a las gliadinas de otras fuentes confirmando su aplicabilidad universal. Sin embargo, el mismo no fue finalmente aceptado como material de referencia porque no alcanzó a reunir todas las condiciones óptimas para su certificación (Codex Alimentarius, 2003; Van Eckert y col., 2006; Wieser y Koehler, 2008).

Paralelamente, el NIST (National Institute of Standards and Technology) ha desarrollado también sus propios materiales de referencia certificados, destinados a la calibración de equipos que determinan componentes mayoritarios y minoritarios de harinas y productos derivados. Los mismos pueden utilizarse también para calibrar sistemas de ELISA destinados al análisis de gluten de TACC. El listado comprende los siguientes materiales de referencia: SRM-1567a (harina de trigo), RM-8418 (gluten de trigo), RM-8436, 8437, 8438 y 8441a (distintos tipos de harina de trigo) (Ihnat, 1994).

El desarrollo de un buen material de referencia de valor certificado para calibrar equipos y controlar la performance de los métodos de ELISA para la detección/cuantificación de trazas de gluten de TACC, o de gliadinas, sigue siendo un desafío puesto que su estabilidad en el tiempo debe ser garantizada para obtener resultados analíticos confiables (Martín Esteban y col., 2010).

5.3- El material de referencia utilizado para la cuantificación del gluten

Debe considerarse que varios de los enzimoimmunoensayos desarrollados hasta el momento toman como patrón una prolamina tóxica nativa específica para referenciar el contenido de gluten de TCC de un alimento. Sin embargo, el contenido de trazas de TCC en un alimento está lejos de ser exclusivamente debido a la prolamina utilizada como patrón de ensayo. Por esta razón, es debatible si un método de detección en el que se utiliza únicamente un estándar de gliadina es capaz de detectar toxicidad del alimento. Es más, para calcular “gluten total” en un alimento se debe multiplicar por 2 el valor obtenido en la determinación ya que se asume que el gluten está formado por un 50% de prolaminas y un 50% de glutelinas. Hoy se sabe que el gluten de trigo contienen α , β , γ y ω -gliadinas más gluteninas de alto y bajo peso molecular en una relación 65:35, y esta relación no es la misma para hordeínas, secalinas y aveninas. Además, cualquier alimento puede contener trazas de cualquiera de los cuatro cereales, o los mismos cuatro cereales mezclados. En el siguiente cuadro se muestra cómo varía la exactitud del cálculo del contenido de gluten en alimentos contaminados con cebada

cuando se aplican diferentes métodos de ELISA frente a diferentes materiales de referencia (Lester, 2008; Thompson y Méndez, 2008; Weiser y Koehler, 2008).

Cuadro 5. Evaluación del contenido de gluten en alimentos contaminados solamente con cebada, utilizando distintos métodos de ELISA (Thompson y Méndez, 2008).

MÉTODO	EXACTITUD DEL RESULTADO
ELISA ω -gliadinas	Contenido de cebada subestimado (4-8% de reactividad cruzada de este método para cebada)
ELISA-R5 sándwich utilizando un patrón de gliadinas y multiplicando los resultados por 2 (protocolo de referencia).	Contenido de cebada sobrestimado en un factor de 2,4 a 2,6.
ELISA-R5 sándwich utilizando un patrón de gliadinas y no multiplicando los resultados por 2.	Contenido de cebada sobrestimado en un factor de 1,2 a 1,3.
ELISA-R5 sándwich utilizando un patrón de hordeínas.	Contenido de cebada exacto.

6 - Sistemas de ELISA para el análisis de alimentos libres de gluten utilizados en Argentina y laboratorios homologados

En el artículo 1383 del capítulo XVII del CAA sobre Alimentos de Régimen o dietéticos, donde están contemplados los alimentos libres de gluten, queda establecido que para el control de los mismos deberá utilizarse la metodología analítica basada en la Norma Codex Stan 118-79 (revisada en 2008) enzimoimmunoensayo ELISA R5 Méndez y toda aquella que la autoridad sanitaria nacional evalúe y acepte (ANMAT, 2012e). En el cuadro 6 se lista los laboratorios reconocidos actualmente por la autoridad sanitaria nacional.

Cuadro 6. Laboratorios homologados en Argentina para el análisis de alimentos para celíacos y método de análisis empleado (Chirido y col., 1995; ANMAT-RENAPRA, 2008; García Gordo, 2009; R-Biopharm, 2011b).

LABORATORIO/ENTIDAD/(UBICACIÓN)	METODOLOGÍA ANALÍTICA EMPLEADA
<p>Cátedra de Inmunología de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP) (La Plata)</p>	<p>Enzimoimmunoensayo competitivo con anticuerpos policlonales. Patentado. Es el ensayo más sensible hasta la actualidad y presenta un límite de detección (LD) de 1ppm de gliadinas (1 mg gliadinas/kg) equivalente a 2 ppm de gluten (2 mg gluten/kg) y es apto para una amplia gama de alimentos sometidos a procesos térmicos, sin mostrar reacción cruzada con prolaminas no-tóxicas (Chirido y col., 1995).</p>
<p>Laboratorio Central Salud Pública (LC), Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires (La Plata)</p>	<p>Idem anterior. Implementada como metodología oficial en la Provincia de Buenos Aires por Resolución N° 4370/2000.</p>
<p>Instituto Nacional de Alimentos (INAL) (Capital Federal)</p>	<p>Enzimoimmunoensayo comercial (Kit Ridascreen® Gliadin), con límite de cuantificación (LC) de 5 ppm de gluten (5 mg gluten/kg) (R-Biopharm, 2011b).</p>
<p>Agencia Santafesina de Seguridad Alimentaria (ASSAL), Ministerio de Salud de la Provincia de Santa Fe (Santa Fe)</p>	<p>Idem anterior.</p>
<p>Centro de Excelencia en Productos y Procesos Córdoba (CEPROCOR), Agencia Córdoba Ciencia S.E (Santa María de Punilla – Córdoba)</p>	<p>Idem anterior.</p>

7 – Bioingeniería y detección de gluten de TACC

7.1- Biosensores

La integración de sistemas electrónicos de control de parámetros físicos y químicos a los procesos de producción de alimentos fue siempre un desafío científico y tecnológico. Su incorporación en puntos críticos de la cadena productiva permitió optimizar las elaboraciones y mantener un nivel de estandarización constante. Estos sistemas se vienen utilizando desde hace varios años en sectores tecnológicamente avanzados como el farmacéutico y el medioambiental, pero paulatinamente su uso se ha ido transfiriendo a otros ámbitos. En particular, en el sector productivo agroalimentario, se están añadiendo estos sistemas de control a las líneas de procesos. Los *biosensores* son dispositivos que contienen elementos de reconocimiento biológico (enzimas, ácidos nucleicos, anticuerpos) que, al interactuar con un analito de la muestra, producen una señal que puede ser procesada dentro del mismo sistema y que es proporcional a la concentración o actividad biológica de la sustancia controlada. Es importante destacar que ya existen biosensores para el reconocimiento de gluten de TACC (González y col., 2007).

Como dispositivos de análisis y control, las principales ventajas del uso de biosensores son:

- ☞ pretratamiento innecesario de muestras,
- ☞ manejo sencillo,
- ☞ análisis en tiempo real,
- ☞ automatizables, miniaturizables y portátiles,
- ☞ capacidad multianálisis.

A pesar del alto número de publicaciones científicas y patentes de invención que se registran en relación a biosensores, la salida al mercado agroalimentario ha sido lenta debido a una serie de obstáculos relacionados con las características del propio mercado (no reconocimiento por parte de la legislación, inercia tecnológica, capacidad de absorción, etc.). No obstante, en los últimos años, se han podido solventar las dificultades técnicas de su aplicación a la industria alimenticia gracias al desarrollo de distintas tecnologías de diseño y construcción de estos dispositivos, lo que facilitó su adaptación a dicho sector industrial. Las aplicaciones actuales de los biosensores en el campo agroalimentario se orientan específicamente a la seguridad y calidad alimentaria

y al control de procesos con el objeto de garantizar la trazabilidad de los productos alimenticios manufacturados (González Rumayor y col., 2005).

En 2008, en Alemania, el Institut für Mikrotechnik Mainz (IMM) desarrolló un biosensor con formato de chip para la detección de gluten en alimentos. El elemento de reconocimiento biológico inmovilizado de este biosensor es un oligonucleótido unido a una enzima capaz de enlazarse a las proteínas del gluten (ELONA: Enzyme-linked oligonucleotide assays) y, luego de una reacción enzimática, emitir fluorescencia o una señal electroquímica. Su utilidad a escala industrial debe ser aún validada (Arendt y Dal Bello, 2008).

7.2- Sistemas *lab-on-a-chip*

Estos novedosos sistemas constituyen verdaderos laboratorios en un chip hecho de polímeros descartables. Su diseño está basado en la tecnología microfluídica cuyo fundamento es el control y manipulación precisa de micro o nanolitros de líquidos en espacios muy pequeños, los que se movilizan por acción de campos magnéticos y fenómenos de presión a través de canales y capilares microscópicos (sistemas automatizables y miniaturizables). El análisis de gluten ya está adaptado e incluye las operaciones de extracción y detección dentro del mismo chip, con un tiempo promedio de ensayo de quince minutos. Son de manejo sencillo pero poseen alto costo (González y col., 2007). En la figura 9 se presenta un esquema de este dispositivo.

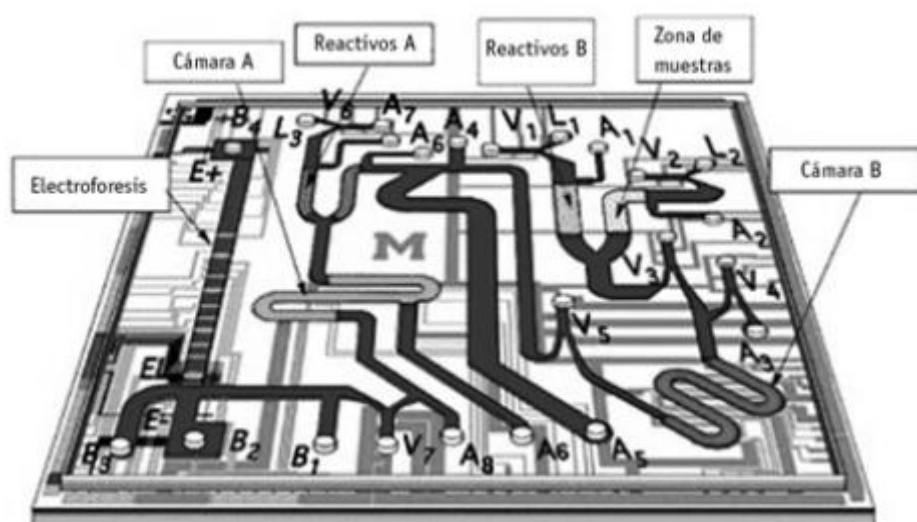


Figura 9. Ejemplo de un *lab-on-a-chip* donde se visualizan las zonas de muestras, de reactivos, cámaras y zona de análisis, en este caso, por electroforesis (González y col., 2007).

Recientemente se ha desarrollado un sistema *lab-on-a-chip* para el microanálisis de gluten en alimentos procesados y materias primas. La detección se realiza utilizando un biosensor incorporado, constituido por un anticuerpo sensible al gluten y marcado para emitir fluorescencia (fluoroimmunoensayo), lo que la hace altamente sensible (LD: 4,1 ng/mL de gliadina). Este nuevo diseño presenta la ventaja que permite realizar cinco ensayos en paralelo (cinco canales) (Mairal y col., 2009).

8 – La contaminación de la muestra y las Buenas Prácticas de Laboratorio

Las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) en la determinación de trazas de gluten en alimentos, implica principalmente cumplir con requisitos y recaudos, tal como se indica en el cuadro 7, a fin de evitar contaminaciones cruzadas de las muestras que llegan al ámbito del laboratorio y de las que están ya en proceso de análisis.

Cuadro 7. Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) para el análisis de trazas de gluten en alimentos (Pérez Cabrejas, 2008; La Raíz SA, 2009a).

<p>Laboratorio</p>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Contar con una habitación exclusiva para realizar el ensayo, alejada de zonas de acceso y de todo material pulverulento susceptible de contener gluten. ✓ Permitir el ingreso sólo del personal autorizado para realizar el ensayo. ✓ Limpiar las superficies donde se apoyarán muestras y elementos de análisis con etanol al 60%. ✓ Previo al análisis y como rutina de control, realizar un hisopado exploratorio de la mesada con tiras reactivas sensibles al gluten. ✓ Evitar uso de escobas para la limpieza de suelos en el área de análisis a fin de no levantar polvillo.
<p>Equipamiento de laboratorio</p>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Contar con elementos de laboratorio adecuados y de uso exclusivo. ✓ Contar con micropipetas con tips descartables. ✓ Contar con tubos de ensayo de tapa a rosca. ✓ Mantener limpios con etanol al 60% todos los elementos de laboratorio. ✓ Disponer de un lugar específico para los mismos, donde no se acumule polvo.

<p>Extracción de la muestra</p>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Procurar que el muestreo sea representativo, en envase limpio y adecuado. ✓ Homogeneizar convenientemente la muestra antes del análisis. ✓ Identificar y almacenar correctamente la muestra hasta el análisis.
<p>Analista</p>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Procurar que el personal sea capacitado para la realización del análisis. ✓ Evitar entrar en contacto con alimentos con gluten horas previas a la realización del ensayo. ✓ Lavar manos con alcohol al 60% antes de comenzar la determinación y realizar un hisopado en las mismas con tiras reactivas sensibles al gluten para asegurar su correcta higienización.

9 - Discusión

Todas las metodologías descritas son útiles para el análisis de gluten en alimentos. La elección de una de ellas dependerá fundamentalmente de la adecuación de la matriz alimentaria al método elegido, de la sensibilidad requerida, si se busca realizar una cuantificación o un *screening*, del estado en que se encuentra el gluten (hidrolizado o no por los tratamientos tecnológicos aplicados) que dificulten o imposibiliten su detección directa, y si la necesidad de confirmación del analito justifica la instalación de equipos costosos en el laboratorio de una industria alimenticia (cromatógrafos, espectrómetros).

Actualmente, los enzimoimmunoensayos son los métodos de elección para el análisis de trazas de gluten, siendo específicamente el método de ELISA-R5 (Méndez) el recomendado por el Codex Alimentarius puesto que el mismo ha sido validado. En general, los enzimoimmunoensayos tienen alta sensibilidad y especificidad, son de ejecución simple y rápida, no presentan reactividad cruzada con prolaminas no-tóxicas pero cuentan con la desventaja que pueden dar falsos negativos por desnaturalización proteica del analito por los tratamientos aplicados y reacciones cruzadas con proteínas emparentadas. Por lo tanto, su aplicación para el análisis de un determinado alimento implica un conocimiento profundo de la composición del mismo y de la historia de la muestra de modo de asegurar un resultado. Asimismo, es fundamental disponer de un único material de referencia certificado para lograr una cuantificación exacta del

contenido de gluten, y obtener de esta manera homogeneidad en los resultados analíticos. La utilización de diferentes estándares en la calibración lleva a la obtención de resultados diferentes. Como método cuantitativo para el análisis de productos lácteos, aplica el ELISA-R5 sándwich mientras que para fórmulas infantiles puede utilizarse tanto éste como el ELISA-R5 competitivo, recomendado cuando en el alimento existen ingredientes químicamente modificados o hidrolizados, como ciertos almidones o los jarabes obtenidos a partir de almidones.

En general, los kits para inmunocromatografía de flujo lateral de gluten son más económicos que los kits de ELISA. Los primeros ofrecen una técnica de ejecución rápida, en un solo paso pero los resultados son sólo cualitativos mientras que los segundos, si bien son parte de técnicas un poco más laboriosas, cuentan con la ventaja que dan resultados cuali/cuantitativos exactos y cuentan con reconocimiento de la AOAC (método analítico tipo I).

Lamentablemente los métodos de ELISA para el análisis de gluten no han sido clínicamente testeados pues no se conocen con exactitud todos los fragmentos tóxicos responsables del desencadenamiento de la enfermedad celíaca; sólo se conocen aquellos de máxima toxicidad frente a los cuales se desarrollaron las diferentes variantes de la técnica.

En este estudio bibliográfico no se han encontrado objeciones respecto a la aplicabilidad de los métodos desarrollados para el análisis de productos lácteos. La técnica de ELISA-R5 sándwich puede ser utilizada en la matriz láctea sin inconvenientes. Igualmente, al adquirir un kit con esta técnica, debe siempre seguirse con atención las recomendaciones del proveedor. Para resultados más exactos, el ELISA-R5 competitivo aplica mejor en fórmulas infantiles de base láctea que contemplan el uso de ingredientes hidrolizados en alta proporción donde el gluten pueda estar desdoblado.

Es recomendado el uso de cócteles de extracción (mezclas de sustancias reductoras/desagregantes) en el tratamiento de las muestras de análisis cuando no se conoce la historia térmica del producto lácteo, ya que, de contener prolaminas tóxicas, éstas tienden a agregarse cuando son sometidas a altas temperaturas. La función del cóctel es desagregarlas para aumentar la recuperación analítica y evitar obtener resultados erróneos, sobre todo si el contenido de gluten está en los alrededores del LD del método.

El uso de nuevos dispositivos para la detección de gluten, como los *biosensores* y *lab-on-a-chip*, permite automatizar y miniaturizar tanto la extracción como la identificación del mismo en forma rápida y sencilla, dentro de la línea de producción, pero tienen alto costo.

CAPÍTULO 4

PARTE EXPERIMENTAL: ANÁLISIS DE

GLUTEN EN PRODUCTOS LÁCTEOS E

INSUMOS

1 - Introducción

Dando cumplimiento a la ley nacional 26.588, anualmente la ANMAT (a través del INAL) hace público y renueva un Listado Integrado de Alimentos Libres de Gluten el que, además, es actualizado bimestralmente. En este listado, no sólo se encuentra detallado el tipo de alimento autorizado, sino también, su nombre comercial y su RNPA, y está disponible en la web para la población en general y la celíaca, en particular. La información allí suministrada es complementada con las bajas que pueda haber en las distintas categorías de alimentos, las que se pueden producir ya sea por algún cambio de la formulación declarado por los fabricantes, o bien, por disposición de la autoridad sanitaria competente, debido a la detección del no cumplimiento de la condición de “libre de gluten” del alimento. En el peor de los casos, esto último puede derivar en apercibimiento y multa para la empresa productora, y retiro del lote del mercado (ANMAT, 2012i). Dentro de este listado se presentan muchas categorías de alimentos aptos siendo la correspondiente a los productos lácteos una de la más extensa y completas.

Los métodos inmunoenzimáticos de ELISA adaptados para el análisis de gluten ofrecen ventajas relacionadas con rapidez, sensibilidad, selectividad y bajo costo que los hace muy útiles a la hora de aplicarlos para un chequeo de rutina. Las nuevas versiones de estas técnicas involucran el uso de tiras reactivas, basadas en los mismos principios, a los que se acopla la cromatografía líquida de capa delgada, las que proporcionan datos cualitativos (y semi-cuantitativos) importantes a la hora de evaluar con celeridad la presencia o ausencia de trazas de gluten de TACC, ya sea en una materia prima, en un producto en proceso o en un alimento terminado.

Regularmente, el INTI hace “pruebas de desempeño” de distintos alimentos. Las mismas tienen como objetivo mantener informado al consumidor argentino sobre la adecuación de productos y servicios a los reglamentos y normas técnicas, otorgar asistencia técnica a las empresas para contribuir a una mejora continua de la calidad de sus productos y procesos, y colaborar en la aplicación del sistema regulatorio por parte del Estado, entre otros (INTI, 2011). En el presente trabajo se realizó una “prueba de desempeño” para evaluar la condición de libre de gluten de TCC de productos lácteos y de algunos insumos e ingredientes utilizados en su elaboración. Además, estas tiras fueron ensayadas en muestras de yogur elaborados a escala laboratorio con y sin la adición de diferentes almidones.

2 - Objetivos

2.1 - Objetivo general

Evaluar la utilización de tiras reactivas comerciales para la detección de gluten en productos lácteos y realizar un *screening* de su presencia en diversos productos lácteos del mercado y elaborados dentro de INTI-Lácteos.

2.2 - Objetivos específicos

1- Realizar una “*prueba de desempeño*” para evaluar la condición de libre de gluten de TCC de productos lácteos de venta al público, y de algunos insumos e ingredientes utilizados en su elaboración que podrían aportar gluten de TCC a las formulaciones.

2- Evaluar la utilización de tiras reactivas comerciales para la detección de gluten en yogures elaborados en INTI-Lácteos a escala laboratorio con la adición de distintos almidones.

3- Incorporar la metodología inmunocromatográfica estudiada a la Oferta Tecnológica de INTI-Lácteos, para el análisis de detección de gluten de TCC en productos e ingredientes lácteos.

3 - Materiales y métodos

3.1- Prueba de desempeño de productos lácteos en cuanto al cumplimiento de la condición “libre de gluten”

Se realizó un pequeño relevamiento de la situación actual de productos lácteos de góndola, incluidos en el Listado Integrado de Alimentos Libres de Gluten que publica la ANMAT, los cuales declaran la condición “libre de gluten” en su rótulo, de modo tal de verificar analíticamente dicha condición. Asimismo, se analizó la presencia de gluten en otros productos de base láctea del mercado que no están registrados en dicho listado, y se evaluó la presencia de almidón en todos los productos muestreados. Este trabajo fue

llevado a cabo en INTI-Lácteos sede Rafaela, a través de la presentación de un proyecto de trabajo preliminar, gestionado por la Lic. Mabel Fabro.

Para tal fin, se muestrearon productos lácteos de distintas bocas de expendios (almacenes, supermercados, hipermercados) haciendo hincapié en seleccionar una variedad que incluya algunos en los que se permite y otros en los que se prohíbe el agregado en su formulación de ingredientes tales como almidones modificados y/o nativos, como lo describe el CAA. Asimismo, el estudio en productos en los que no se admite la adición de almidones, la detección del mismo indicaría una contaminación cruzada o, en el peor de los casos, una adulteración.

Los productos fueron analizados en cuanto a la presencia de gluten de TCC, utilizando para tal fin tiras inmunocromatográficas Stick Gluten (Operón S.A.), que tienen una sensibilidad de 2 ppm. Esta metodología se basa en la reacción del anticuerpo monoclonal R5 con el gluten de trigo, cebada y centeno (TCC⁵). Se halla inmovilizado en una membrana (tira reactiva) y posee elevada afinidad y especificidad (Operón, 2009). Previamente al análisis de gluten de TCC en alimentos lácteos se realizaron controles de higiene personal mediante el análisis de detección de gluten en un hisopado de manos para evitar falsos positivos por contaminación.

Para la extracción del gluten de los productos muestreados, 1 g de muestra (sólida o líquida) se introdujo en un tubo de ensayo con tapón a rosca, al cual se le adicionaron 2,5 mL de tampón de extracción (provisto en el kit). El tubo se cerró y se selló con una película plástica auto-sellante parafinada (Parafilm®), se mezcló muy bien y se incubó en baño de agua, a 50 °C durante 40 minutos, con agitación manual periódica. Luego, el tubo se enfrió a temperatura ambiente, se le adicionaron 7,5 mL de etanol 80% (o hasta un volumen final de 10 mL, en el caso de muestras líquidas), se homogeneizó muy bien y se incubó 1 h a temperatura ambiente en agitador rotatorio. Se centrifugó 10 minutos a 3500 rpm (2500 g) a temperatura ambiente, y el sobrenadante fue utilizado para el análisis de detección de gluten. Para ello, los extractos obtenidos se diluyeron 1/10 en buffer fosfato salino en un tubo de ensayo. Se colocaron 200 µL de la dilución en tubos plásticos para la corrida inmunocromatográfica, se introdujo la tira reactiva y se leyeron los resultados a los 10 minutos exactos.

Paralelamente se realizó sobre los productos la detección de almidón, mediante la determinación cualitativa con solución de lugol (JAOAC, 1960). Aproximadamente 2 g

⁵ No se detecta avena con esta metodología.

de muestra, colocados en tubos de vidrio para centrífuga de 10 mL, fueron mezclados con agua bidestilada y llevados a ebullición por 2 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se centrifugó a 3500 rpm (2500 g). Sobre el líquido clarificado se adicionaron gotas de lugol. La aparición de color azul indicó presencia de almidón en las muestras.

Para ampliar el panorama exploratorio, se solicitaron a proveedores de insumos, algunos ingredientes utilizados en la industria láctea y sobre ellos se realizó también la determinación de gluten de TCC y la detección de almidón, en algunos casos.

Las figuras 1 a y b muestran esquemas del procedimiento de extracción y posibles resultados del análisis de trazas de gluten de TCC con el kit Stick Gluten de Operón S.A, utilizado en este trabajo.

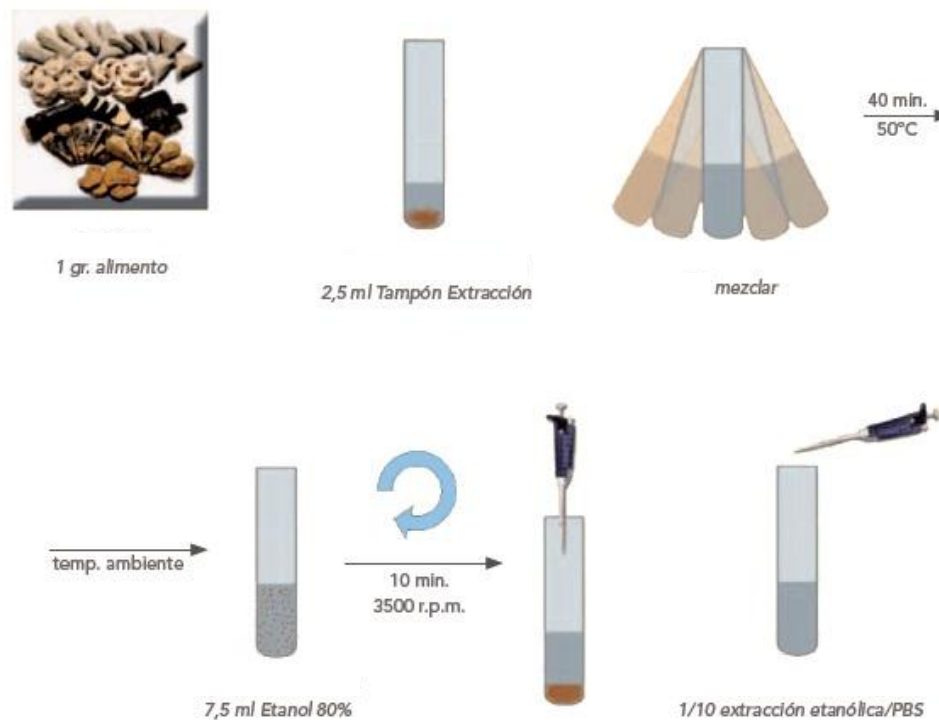


Figura 1a. Esquema del procedimiento de extracción de una muestra de alimento para la determinación de gluten de TCC (fuente: Operón, 2009).

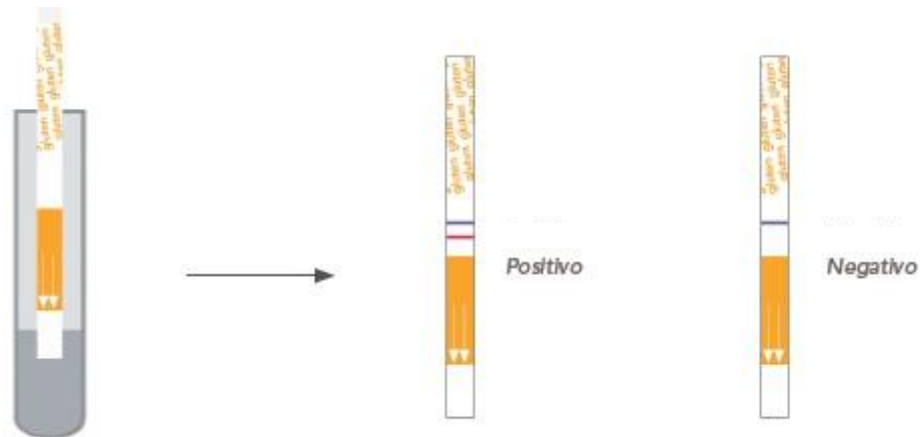


Figura 1b. Resultados posibles en el ensayo de detección de gluten de TCC por inmunocromatografía. (fuente: Operón, 2009).

En la figura 2 se muestran imágenes de los distintos pasos de la metodología de análisis de gluten de TCC con las tiras de inmunocromatografía y de almidón con el reactivo de lugol.

Figura 2. Detección de gluten de TCC con tiras reactivas basadas en el anticuerpo monoclonal R-5 y algunos resultados positivos de la detección de almidón.



Hisopado de manos previo al análisis de gluten de TCC en alimentos lácteos, para control de higiene personal.



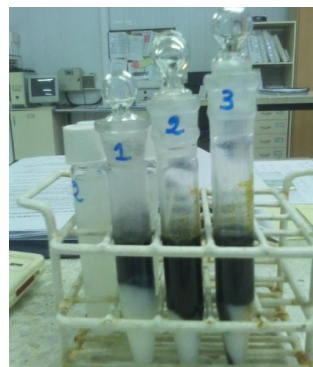
Incubación de las muestras con tampón de extracción, a 50 °C, por 40 minutos.



Centrifugación de muestras extraídas con etanol 80% para clarificación de sobrenadante (3500 rpm, 10 min.)



Corrida inmunocromatográfica de 3 muestras con resultado negativo en la detección de gluten de TCC (no aparece línea rosada). La línea azul debe aparecer siempre en cada desarrollo pues indica que el análisis fue óptimo, independientemente que la muestra contenga o no gluten de TCC.



Muestras con resultado positivo de la detección de almidón por el método del lugol.

3.2 - Detección de gluten de TCC en yogures elaborados con la adición de almidón.

Con el objetivo de corroborar si un yogur adicionado al 1% de almidón, es capaz de dar positivo el ensayo de detección de gluten de TCC a través de inmunocromatografía de flujo lateral, se realizaron elaboraciones de yogur semidescremado endulzado, a escala de laboratorio (Bylund, 1996; FEPALE, 2012b). En cada elaboración se hicieron 3 tipos de yogures con la misma técnica pero agregando distintos tipos de almidones al 1 % (m/m) en cada uno de ellos, a saber:

- ☞ Almidón de maíz,
- ☞ Mezcla de almidón de maíz y almidón de trigo (mezcla al 50 % m/m),
- ☞ Almidón de trigo.

Para cada elaboración, se resuspendieron 30 g de leche en polvo descremada, 10 g de almidón (de maíz, de maíz+trigo (mezcla al 50 % m/m) o de trigo) y 45 g de azúcar refinado en 200 g de leche fluida comercial parcialmente descremada ultrapasteurizada, utilizando licuadora de mano para homogeneizar la mezcla y romper grumos. Esta mezcla se agregó a 685 g de la misma leche fluida comercial, se homogeneizó y se realizó un tratamiento térmico de 95 °C - 5 minutos. Posteriormente, la mezcla se enfrió hasta 42°C, se adicionaron 30 g de yogur descremado y se incubó durante 4 h a (42 ± 1) °C. Luego de la incubación, la mezcla se enfrió rápidamente en baño de agua helada hasta aproximadamente 15 °C, y luego se almacenó en heladera a (6 ± 2) °C por 4 días.

A continuación se presenta el esquema de las elaboraciones de yogur realizadas. Las figuras posteriores muestran imágenes de las etapas del proceso a escala de laboratorio.

Esquema de proceso

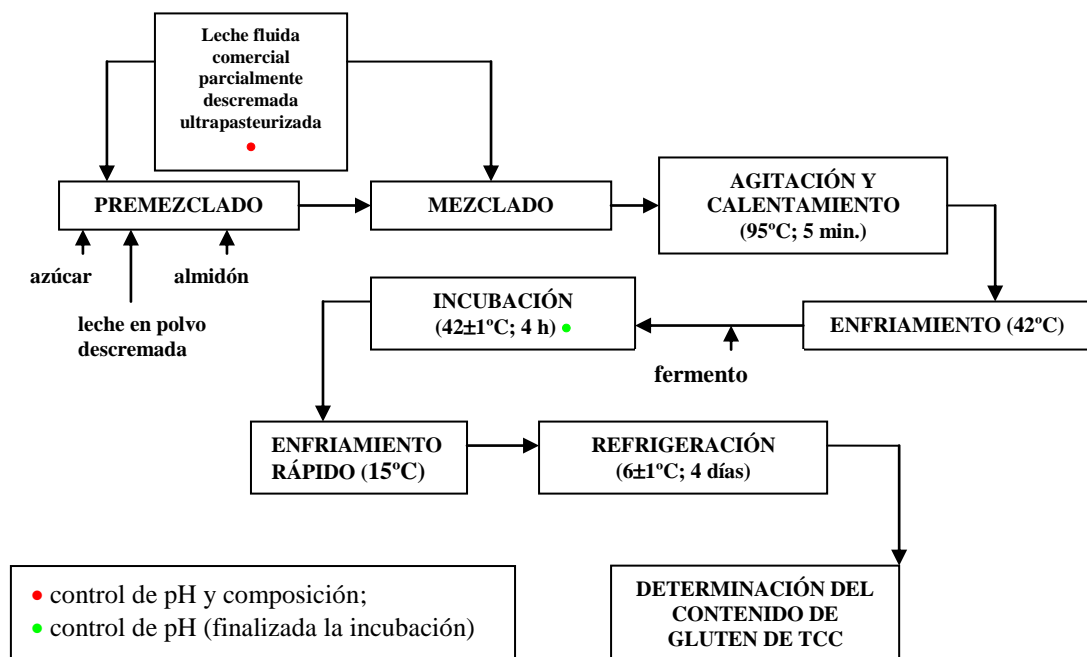
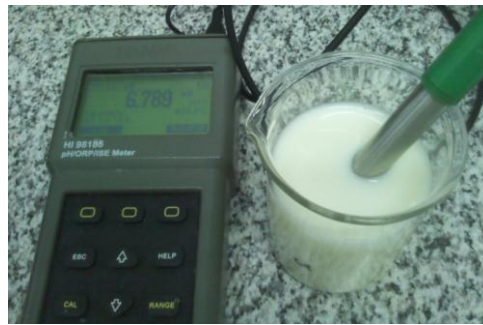


Figura 4. Etapas del proceso de elaboración de yogures a escala de laboratorio.



Medición de pH inicial de la leche fluida ultrapasteurizada



Agregado de aditivos a la premezcla



Homogeneizado de premezcla con licuadora de mano



Agitación y calentamiento de la mezcla final (premezcla + resto de leche fluida) (95 °C; 5 minutos) (tratamiento térmico)



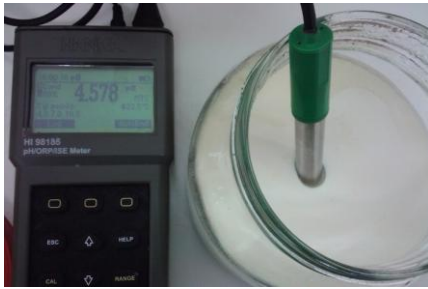
Enfriamiento a 42 °C



Agregado del fermento a la leche enfriada a 42 °C.



Incubación en estufa a (42±1)°C por 4 h



Medición de pH, finalizada la incubación



Enfriamiento rápido a 15 °C para posterior refrigeración a (6±1)°C por 4 días

Las figura 5 muestra la consistencia de los coágulos de los diferentes yogures elaborados.

Figura 5. Consistencia de los yogures elaborados.



Yogur adicionado de almidón de maíz



Yogur adicionado de mezcla de almidón de maíz+ almidón de trigo (50+50)



Yogur adicionado de almidón de trigo

Análisis

La composición inicial de la mezcla de partida fue analizada utilizando un Milkoscan S-50. Además, tanto en la mezcla de partida como en el producto final se realizaron mediciones de pH utilizando un pHmetro HANNA – HI – 98185 (pH/ORP/ISE Meter). En los productos terminados, se realizó el ensayo de detección de gluten de TCC utilizando las tiras reactivas Stick Gluten (Operón S.A.). Las extracciones fueron realizadas de acuerdo a la ficha técnica del proveedor de las tiras reactivas, como está descrito en el ítem 3.1.

Los almidones utilizados fueron controlados como insumos para verificar presencia/ausencia de gluten de TCC en la prueba de desempeño (ítem 3.1). Una muestra del almidón de trigo fue derivada a INTI-Frutas y Hortalizas (Centro Regional Cuyo) para la cuantificación del contenido de gluten.

4- Resultados

4.1 - Prueba de desempeño de productos lácteos en cuanto al cumplimiento de la condición “libre de gluten”

Los resultados del análisis de gluten y almidón en los productos seleccionados pueden visualizarse en la Tabla 1.

Tabla 1. PRUEBA DE DESEMPEÑO DE PRODUCTOS LÁCTEOS (condición libre del gluten)

Período de ensayo: 18/01/11 - 08/09/11

Nº muestra	Productos lácteos, agregados e insumos	Empresa elaboradora	¿Declara almidón?	¿Declara libre de gluten?	Reacción del lugol	Test de gluten de TCC
1	Leche de cabra en polvo (entera)	P	No	Sí	-	-
2	Queso port salut light	A	No	Sí	-	-
3	Queso port salut untable	B	No	Sí	-	-
4	Queso fundido untable c/ queso azul	B	No	Sí	-	-
5	Queso rallado light	B	No	Sí	-	-
6	Queso procesado untable c/ queso azul	Q	No	No	+	-
7	Queso procesado untable port salut	Q	No	No	+	-
8	Yogur descremado 0% sab. vainilla	C	Sí	Sí	d	-
9	Postre sab. vainilla c/ dulce de leche	D	Sí	Sí	d	-
10	Yogur entero endulzado sab. Vainilla + copos de maíz azuc.	E	Sí	Sí	+	-
11	Yogur entero batido endulzado+copos de maíz azuc.	D	Sí	No	+	-
12	Queso magro sin sal	B	No	Sí	-	-
13	Yogur descremado edulcorado sab. Vainilla	F	No	No	-	-
14	Top cereales (copos maíz, extracto de malta, arroz y trigo inflados)	F	No	No	+	+
15	Postre sab. vainilla	G	Sí	Sí	+	-
16	Arroz con leche light	C	No	Sí	+	-

17	Yogur endulzado c/pulpa manzana-banana	D	No	Sí	-	-
18	Flan dietético reducido en calorías sab. Vainilla c/ caramelo	E	Sí	Sí	+	-
19	Yogur descremado sabor vainilla +top (mix cereales)	F	No	No	+	+
20	Queso azul	E	No	Sí	-	-
21	Queso azul	H	No	Sí	-	-
22	Queso azul	I	No	Sí	-	-
23	Queso azul	J	No	Sí	-	-
24	Queso untable con queso azul	H	Sí	No	d	-
25	Queso untable con queso azul	J	No	Sí	-	-
26	Flan de huevos en polvo (tipo casero)	K	Sí	No	+	+
27	Polvo para preparar helado (sabor vainilla)	L	No	No	+	-
28	Polvo para preparar mousse (sabor dulce de leche)	M	Sí	No	+	-
29	Polvo para preparar postre instantáneo s/ chocolate	M	Sí	No	+	-
30	Yogur griego c/frutillas	G	Sí	Sí	+	-
31	Queso rallado	B	No	No	-	-
32	Crema no láctea para café	N	No	No	-	-
33	Capuccino instantáneo	O	Sí	No	+	-
34	Yogur dietético edulcorado	G	Sí	No	+	-
35	Producto alimenticio a base de leche "Crema 0%"	D	Sí	Sí	+	-
36	Dulce de leche tradicional	C	No	Sí	-	-
37	Dulce de leche repostero	C	No	Sí	-	-

38	Top Müsli (avena, maíz, azúcar, extracto malta, glucosa)	G	No	No	+	+
39	Yogur dietético edulcorado + Müsli	G	Sí	No	+	+
40	Dulce de leche 0%	G	Sí	Sí	+	-
41	Dulce de leche repostero	F	Sí	Sí	+	-
42	Alimento a base de azúcar y leche en polvo entera	Q	No	No	-	-
43	Fórmula infantil (1-3 años) (leche UAT modificada para niños)	D	No	Sí	-	-
44	Leche fluida UAT parcialmente descr. con fibra	D	No	Sí	-	-
45	Leche descremada + jugo de frutas (manzana), bajo en lactosa	G	No	Sí	-	-
46	Fórmula infantil (6-12 meses)	D	No	Sí	-	-
47	Queso cremoso	W	No	Sí	+	-
48	Cultivo líquido de esporas de <i>Penicillium roqueforti</i>	R	No	No	+	-
49	Avena arrollada instantánea	S	No	No	+	+
50	Arroz inflado	T	No	No	+	+
51	Almidón de trigo	U	No	No	+	+
52	Almidón de maíz	V	Sí	No	+	-

Referencias:

Para preservar el anonimato de la empresa elaboradora, se la identificó internamente con una letra, sin estar relacionada con su nombre real.

Almidón no declarado y detectado (desarrollo de coloración azul intenso).

d Desarrollo de coloración dudoso, no concordante con azul intenso.

La indicación “+” en la columna de productos, señala que hubo una mezcla de ambos componentes para el posterior análisis.

a) Contenido de almidón de las muestras

De las 52 muestras analizadas y que no declaraban presencia de almidón, 12 (doce) resultaron positivas. De las mismas, 7 (siete) muestras (almidón de trigo, arroz inflado, avena arrollada instantánea, top müsli, top cereales, arroz con leche Light y yogur descremado de vainilla mezclado con su top de cereales) ya lo contienen naturalmente y no se indica expresamente en el etiquetado. 4 (cuatro) muestras (queso procesado untable con queso azul, queso procesado port salut untable, polvo para preparar helado (sabor vainilla) y queso cremoso), no indicaban almidón en el etiquetado y dieron resultado positivo. La adición de almidón en estos últimos productos está permitida, excepto para el queso cremoso. La presencia de almidón en queso cremoso podría indicar una posible adulteración en el producto ya que el mismo puede utilizarse para aumentar rendimientos y mejorar la apariencia/textura de quesos de menor calidad. Por último, la muestra de cultivo líquido de esporas de *Penicillium roqueforti*, arrojó un resultado positivo de almidón.

3 (tres) muestras (yogur descremado 0% sabor vainilla, postre sabor vainilla con dulce de leche y queso untable con queso azul) declararon almidón en sus respectivos rótulos pero la coloración desarrollada con la prueba de lugol no se correspondió con el tono azul intenso que indica resultado positivo, de allí que se catalogó como “dudoso”, sólo para indicar la diferencia en la naturaleza de la coloración obtenida.

b) Contenido de gluten de TCC de las muestras:

De las 52 muestras analizadas, 8 (ocho) dieron resultado positivo a la detección de gluten de TCC por inmunocromatografía de flujo lateral, pero ninguna de ellas declaraba “libre de gluten” en el rótulo del producto. De estas 8 (ocho) muestras, 2 (dos) corresponden a cereales que normalmente pueden formar parte de los tops de yogures (arroz inflado y avena arrollada), 1 (una) es almidón de trigo, 2 (dos) fueron tops de cereales de yogures obtenidos del mercado (müsli y mezcla de cereales con extracto de malta), 2 (dos) fueron de dichos tops mezclados con los propios yogures (para ver si existía un efecto de dilución del gluten en el yogur) y 1 (una) sola muestra de distinta naturaleza composicional a las anteriores, dio positiva la determinación (flan de huevos en polvo – tipo casero).

De las 52 (cincuenta y dos) muestras analizadas, 29 (veintinueve) de ellas cumplen con la condición de libre de gluten que declaran en el rótulo, lo cual se refleja en la negatividad del resultado de la determinación.

Del mismo total de muestras, 13 (trece) productos lácteos (o de base láctea), más 2 (dos) insumos, cumplen con la condición de libre de gluten y no registran dicho estado en el rótulo (yogur entero batido endulzado+copos de maíz azuc., yogur descremado edulcorado sab. vainilla, yogur dietético edulcorado, queso procesado untable con queso azul, queso procesado untable port salut, queso rallado, queso untable con queso azul (x2), polvo para preparar mousse (sabor dulce de leche), polvo para preparar postre instantáneo s/ chocolate, crema no láctea para café, capuccino instantáneo, alimento a base de azúcar y leche en polvo entera, almidón de maíz y cultivo líquido de esporas de *Penicillium roqueforti*). De estos últimos resultados se deduce que la cantidad de productos aptos para celíacos en el mercado es más amplia que el rango de productos que declara la situación “libre de gluten” en su etiqueta.

De esta manera, un mayor compromiso en cuanto a la problemática de la celiacía de las empresas en general y lácteas en particular para conseguir para sus productos la calidad de “libre de gluten”, conduciría a ampliar el rango de productos disponibles para la población celíaca.

Cabe destacar que el análisis de los yogures que llevaban tops de cereales, por separado, arrojó resultado negativo en todos los casos lo que demuestra que ambas líneas de producción (la de los yogures y la de los tops) se hallan separadas sin probabilidad de inducir una contaminación cruzada.

Esta prueba de desempeño fue presentada en el “Encuentro de Primavera – 2011”, actividad que anualmente organiza INTI y en la cual se presentan los trabajos de Investigación, Desarrollo e Innovación llevados a cabo en la institución en el período en curso (Cazzaniga y col, 2011).

c) Cuantificación de una muestra con resultado positivo de gluten de TCC

De la muestra N° 26 (flan de huevo en polvo tipo casero) y N° 51 (almidón de trigo que se utilizó en las elaboraciones de yogures), cuyo resultado de la detección de gluten de TCC por inmunocromatografía de flujo lateral dio positivo, se enviaron

contra-muestras a INTI- Frutas y Hortalizas (Centro Regional Cuyo) sobre la que se cuantificó el contenido de gluten por el método de Chirido y colaboradores (1995). A continuación se presenta una copia del informe final con los resultados obtenidos.

INFORME DE ANÁLISIS

RUT Nº: 72/11

INFORME ÚNICO

Página 1 de 1

SOLICITANTE: *Empresa:* **INTI LACTEOS – SEDE RAFAELA**
Dirección: Ruta nacional 34 km. 227,6 (2300) Rafaela - Santa Fe
At.: Lic. Diego S. Cazzaniga A.


ANÁLISIS: *Descripción:* Determinación de gluten.
Realizado: 24/11/11

MUESTRAS: *Descripción:* Dos muestras identificadas como:
Identificación: Muestra Nº 1: Flan de huevo en polvo tipo casero
 Muestra Nº 2: Almidón de trigo
Recepción: 24/11/11
Muestreo: Muestra provista por el solicitante.

Las muestras y eventuales contra muestras se conservan en el laboratorio por un periodo de 15 días después de la fecha de informado, salvo muestras perecederas o muestras en las que el cliente notifique expresamente que sean devueltas.

RESULTADOS:

Determinación	Nº 1	Nº 2
Gluten, mg/kg	1,6	65
Límite de cuantificación: 1,5 mg de gluten/kg		
Método: Enzimoinmunoensayo ELISA Competitivo		

INTI - Cuyo
 ANALIZÓ


Nota: De acuerdo al art. 1383 del Código Alimentario Argentino, un alimento libre de gluten no podrá superar el contenido máximo de 10mg de gluten/Kg de alimento.

ANALIZÓ: Lic. Paula Fernández
INFORMADO: 24/11/11


 INTI - Frutas y Hortalizas.
 Lic. MIRTA N. PEDRAN
 Coordinadora de Servicios


 Ing. EDGAR GERORRIAT
 CENTRO REGIONAL Cuyo
 INTI Frutas y Hortalizas
 A/C. DIRECCION

Este informe no podrá ser reproducido parcialmente sin la escrita autorización del Laboratorio. Los resultados consignados se refieren exclusivamente a los elementos recibidos, el INTI y su Centro Regional Cuyo declinan toda responsabilidad por el uso indebido o incorrecto que se hiciera de este informe.





4.2 - Detección de gluten en yogures elaborados con la adición de almidón.

En la tabla 2 se resumen los parámetros iniciales de composición de la leche de partida utilizada en las elaboraciones y en la tabla 3 se muestran los resultados finales de pH y gluten obtenidos sobre los yogures.

Tabla 2. Composición de la leche de partida para la elaboración de los yogures.

	Promedio ± desviación estándar
pH	6,78 ± 0,01
Materia grasa %	1,58 ± 0,05
Proteínas totales %	3,12 ± 0,08
Sólidos no grasos %	8,55 ± 0,11

Tabla 3. pH y detección de gluten de los yogures elaborados

Parámetro	Primera elaboración			Segunda elaboración			Tercera elaboración		
	M	M+T	T	M	M+T	T	M	M+T	T
pH	4,50	4,39	4,58	4,51	4,53	4,59	4,51	4,58	4,58
Resultado detección de gluten de TCC	(-) 	(-)	(+) 	(-)	(-)	(+) 	(-)	(-)	(+) 

Yogures: M: con adición de almidón de maíz; M+T: con adición de una mezcla al 50% (p/p) de almidón de trigo y maíz; T: con adición de almidón de trigo.

En las 3 (tres) elaboraciones, la detección de gluten de TCC por inmunocromatografía de flujo lateral dio positivo en los yogures a los que se agregó

almidón de trigo como espesante y, negativo, en los que contenía almidón de maíz o mezcla. En el informe emitido por INTI-Frutas y Hortalizas (Centro Regional Cuyo), la cuantificación del gluten contenido en el almidón de trigo enviado para análisis y que se utilizó para la elaboración de los yogures a escala de laboratorio, arrojó un resultado de 65 ppm de gluten lo que daría como concentración final en el yogur adicionado con el mismo de 0,65 ppm de gluten. Este valor es inferior al límite de detección informado por el proveedor de las tiras reactivas, aunque el mismo declara en el protocolo del kit que puede presentarse una cierta coloración hasta una concentración de 0,5 ppm (Operón, 2009) lo cual es compatible con el débil color rosado desarrollado en los yogures con almidón de trigo.

Cabe destacar que el resultado negativo obtenido en los yogures adicionados de la mezcla de almidones (M+T) fue obtenido a los 10 minutos de desarrollada la cromatografía, como indica el protocolo del fabricante del kit. No obstante, luego de pasado dicho lapso, apareció un vestigio de tono rosado en la zona de reacción del gluten de TCC con el anticuerpo R5. El proveedor del kit indica expresamente que cualquier resultado, fuera de los 10 minutos debe ser tomado como inválido.

5 - Conclusiones

Respecto a la prueba de desempeño

En base a los resultados obtenidos en la “prueba de desempeño” en cuanto a la presencia de gluten en los productos lácteos analizados, se deduce que existe una cantidad importante de productos aptos para celíacos en el mercado, chequeados analíticamente, más allá de los que declaran su condición de “libres de gluten” en su rótulo. De esta manera, un mayor compromiso de las empresas por esta problemática conduciría a la obtención de la condición “libre de gluten” para una mayor gama de productos, lo que aumentaría la oferta alimenticia para la población celíaca. Desde el punto de vista de las empresas ante esta situación, es muy importante que las mismas tengan adecuados procesos de elaboración con la aplicación de BPM, de modo que se reduzcan los riesgos de contaminación cruzada con gluten en las líneas de elaboración.

Respecto a la capacidad de detección de las tiras reactivas

Las tiras reactivas mostraron una alta sensibilidad al gluten de TCC. Incluso son capaces de detectar gluten a concentraciones menores a su límite de detección declarado (LD: 2 ppm), como se detectó en la muestra de flan en polvo.

Respecto de la elaboración de yogures adicionados con almidones

La aplicación de la inmunocromatografía de flujo lateral al chequeo de yogures elaborados con distintos almidones, mostró que es posible detectar con las tiras reactivas la presencia de gluten en el yogur que contenía almidón de trigo al 1%, aún estando en una concentración menor al LD del método (LD: 2,0 ppm; contenido de gluten en el yogur calculado a partir del contenido cuantificado en el almidón de trigo: 0,65 ppm). No se verificaron interferencias analíticas de la matriz láctea durante la determinación de gluten.

El resultado negativo en el yogur adicionado de la mezcla (almidón de maíz + almidón de trigo) indica que es posible no detectar gluten de TCC en un alimento y las trazas del mismo estar presente en el producto. Este hecho justifica la demanda de la población celíaca a la comunidad científica de desarrollar métodos de detección con el mayor grado de sensibilidad posible a fin de contar con productos alimenticios procesados seguros para su DLG.

CONCLUSIONES FINALES

Mediante el presente TFI se pudo analizar la situación actual de los productos lácteos, en nuestro país, en cuanto a su aptitud para ser consumidos por la población celíaca. Como alimentos procesados, los productos lácteos no dejan de tener en su composición varios ingredientes que hace que el consumidor y, fundamentalmente, el celíaco, se detenga a leer su rótulo con detenimiento a fin de adquirir un alimento seguro. Se ha constatado a través de la prueba de desempeño que existen en el mercado productos lácteos que no declaran almidones en su lista de ingredientes y que dan positiva la prueba del lugol, lo cual redundaría en un doble efecto, por un lado, para la población en general, de encontrarse con productos lácteos cuyos rótulos están incompletos o bien ser lisa y llanamente un alimento adulterado y, por otro, para la población celíaca, de contar con alimentos no seguros. La presencia de almidones en las formulaciones levanta siempre sospechas por la posibilidad de contaminación cruzada con TACC. Además, se ha verificado, a través del mismo estudio, que muchos alimentos lácteos que no están registrados como “libres de gluten” y que se expenden en el mercado, dan resultado negativo al test de gluten por inmunocromatografía de flujo lateral. Si estos alimentos fueran certificados en su condición como tales, posibilitarían que el celíaco tenga una mayor oferta de alimentos aptos para su DLG y, a la empresa, garantizar que sus elaboraciones se enmarcan dentro de las BPM que originan un PLLG. Por medio de la prueba experimental de elaboración de yogures adicionados con almidones al 1%, a nivel de laboratorio, se llegó a la conclusión que el almidón de trigo es altamente contaminante de un alimento a través del TACC y que niveles muy bajos del mismo pueden ser detectados por inmunocromatografía de flujo lateral. Aún así, se confirmó por el mismo método, que un resultado negativo del test no garantiza la ausencia de gluten de TACC en una muestra, habida cuenta del resultado obtenido con el yogur adicionado de almidón mezcla trigo+maíz (1+1).

El estudio de los enzimoimmunoensayos como técnicas de elección actuales para el análisis de trazas de gluten de TACC en alimentos, dejó como conclusión que poseen puntos fuertes y débiles que hacen que su utilización sea analizada en función de la matriz alimenticia acompañante y del proceso tecnológico que originó el alimento, puesto que, pueden dar resultados falsos positivos y falsos negativos, si no se ejecuta el ensayo correctamente por desconocimiento del tipo de muestra.

La búsqueda bibliográfica en la temática resultó provechosa en dos aspectos, por un lado, ver que la información disponible es muy abundante para alimentos en general y, por otro, que es escasa para productos lácteos en puntos específicos lo que llevó a generar información propia a través de una parte experimental para completar el presente TFI. Además, la revisión del CAA en el capítulo de Alimentos Lácteos, y en otros, colaboró a demostrar que los mismos son susceptibles de contener ingredientes para los cuales está documentado que por origen o por contaminación cruzada pueden llegar a contener trazas de gluten de TACC. Resultó provechoso poder aportar por este medio algunas premisas, estrategias e información reglamentaria que puede necesitar cualquier productor de la industria láctea para elaborar un PLLG, aplicando BPM y adecuados POES.

Por último, la prueba de desempeño resultó ser un medio de validación interna del kit de detección de gluten de TCC para su incorporación en la Oferta Tecnológica de INTI-Lácteos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre M J (2006). El papel de un laboratorio acreditado para el análisis de gluten. Presentación oral en la Jornada Técnica “Gestión del gluten en la industria alimentaria” - Barcelona, 24/10/2006.<http://www.puntalconsultores.com/fichas/docfichas/gluten/ponencias/IMBIOSIS-JornadaGlutenOct06.pdf>, Acceso: julio 2012.
- Akobeng A K, Ramanan A V, Buchan I, Heller R F (2006). Effect of breast-feeding on risk of coeliac disease: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Archives of Diseases Childhood* 91, 39–43.
- Alais C (2003). Ciencia de la Leche: Principios de Técnica Lechera, 4º edición, Reverté SA, Barcelona, España.
- Alonso C, Bartolomé R, Domínguez J, Matas L, Rabella N (2005). Protocolo 19: Técnicas rápidas de detección de antígeno. En: Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Editores: Cercenado E, Cantón R. <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap19.asp>. Acceso: julio 2012.
- Andrich O D (1994). Aditivos en productos lácteos: Emulsificantes, espesantes, gelificantes y estabilizantes. En: Ciencia y tecnología de los productos lácteos (pp. 356-383). *Medios Audiovisuales y Gráficos, CERIDE*, Santa Fe, Argentina.
- Anjani K, Kailasapathy K, Phillips M (2007). Microencapsulation of enzymes for potential application in acceleration of cheese ripening. *International Dairy Journal* 17, 79–86.
- ANMAT (2006). La enfermedad celíaca: Consideraciones generales y normativa vigente. Boletín para consumidores, N° 28, 1-4, http://www.anmat.gov.ar/webanmat/Publicaciones/Boletines/Consumidores/Boletin_Consumidores_28.pdf, acceso: agosto 2012.
- ANMAT (2012a). Código Alimentario Argentino. Capítulo VIII. Alimentos Lácteos. http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_VIII.pdf, acceso: junio 2012.
- ANMAT (2012b). Código Alimentario Argentino. Capítulo VI. Alimentos Cárneos y Afines. http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo_VI.pdf, acceso: junio 2012.
- ANMAT (2012c). Código Alimentario Argentino. Capítulo X. Alimentos Azucarados. http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo_X.pdf, acceso: junio 2012.
- ANMAT (2012d). Decreto Nacional 528/2011 de Reglamentación de la Ley N° 26.588, Ministerio de Salud de la Nación, http://www.anmat.gov.ar/webanmat/Legislacion/Alimentos/Decreto_528-2011.pdf, acceso: julio 2012.
- ANMAT (2012e). Código Alimentario Argentino. Capítulo XVII. Alimentos de Régimen o Dietéticos. http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_XVII.pdf, acceso: julio 2012.

- ANMAT (2012f). Código Alimentario Argentino. Capítulo XVI. Correctivos y Coadyuvantes.
http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_XVI.pdf, acceso: julio 2012.
- ANMAT (2012g). Código Alimentario Argentino. Capítulo XVIII. Aditivos Alimentarios.
http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_XVIII.pdf, acceso: julio 2012.
- ANMAT (2012h). Código Alimentario Argentino. Capítulo V: Normas para la rotulación y publicidad de los alimentos.
http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo_V.pdf, acceso: julio 2012.
- ANMAT (2012i). Listado Integrado de Alimentos Libres de Gluten. Ley 26.588, actualizado al 18 de julio de 2012, 1-99,
http://www.anmat.gov.ar/listados/Listado_de_Alimentos_Libres_de_Gluten_18_06_2012.pdf, acceso: agosto 2012 (la lista se renueva cada dos meses).
- ANMAT (2012j). Guía de Buenas Prácticas de Manufactura. Establecimientos Elaboradores de Alimentos Libres de Gluten. ANMAT-ALI-BPM-001-00 (borrador), 1-71, http://opinion_publica.anmat.gov.ar/proyectos/69.pdf, acceso: noviembre 2012.
- ANMAT-RENAPRA (2008). El boletín del Inspector Bromatológico, N° 13: Buenas Prácticas de Manufactura en establecimientos elaboradores de alimentos libres de gluten, 1-13.
- AOAC (2011). Association of Analytical Communities – Research Institute: Certificate of Performance TestedSM Status N° 120601 to *Ridascreen® Gliadin* manufactured by R-Biopharm, Darmstadt, Alemania.
- Arendt, E., Dal Bello, F. (2008). *Gluten-free cereal: Products and Beverages*. Academic Press. Estados Unidos.
- Asociación de Celíacos de Madrid (2005). Resumen del Congreso Internacional sobre Enfermedad Celíaca: De la Investigación básica a las perspectivas terapéuticas. Florencia, Italia, 1-2.
- Asociación de Celíacos de Madrid (2008a). Avances en la Investigación sobre la Enfermedad Celíaca. *Boletín: "Sin gluten"* (Dep. Legal: M-11398-1993, ISSN: 1136-0798), N° 76, 7-8.
- Asociación de Celíacos de Madrid (2008b). Resumen del Congreso Internacional sobre Enfermedad Celíaca de la Asociación Europea de Asociaciones de Celíacos. Génova, Italia, 1-3, acceso: mayo 2009.
- Association Canadienne de la Maladie Coeliaque (2009). Aliments demandant d'une attention particulière/Aliments à éviter.
<http://www.celiac.ca/index.php/franais/choix-alimentaires-pour-un-regime-sans-gluten/>, acceso: agosto 2009
- Association Française des Intolérants au Gluten (2009). Produits génériques autorisés/interdits, <http://www.afdiag.fr/la-dietetique/generalites-des-produits-autorises-et-interdits>, acceso: agosto 2009.
- Associazione Italiana Celiachia (2008). FAQ-Alimentazione, <http://www.celiachia.it/home/HomePage.aspx>, acceso: agosto 2008.
- Athanasiadis I, Paraskevopoulou A, Blekas G, Kiosseoglou V(2004). Development of a novel whey beverage by fermentation with kefir granules. Effect of various treatments. *Biotechnology Progress* 20 (4), 1091-1095.

- Bachmann H P (2001). Cheese analogues: a review. *International Dairy Journal* 11, 505–515.
- Bai J, Zeballos E, Fried M, Corazza G R, Schuppan D, Farthing M J G, Catassi C, Greco L, Cohen H, Krabshuis J H (2010). Guía práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: Enfermedad celíaca. *Gastroenterology Latinoamerican* 21 (1), 34-44.
- Berti C, Roncoroni L, Falini M L, Caramanico R, Dolfini E, Bardella M T, Elli L, Terrani C, Forlani F (2007). Celiac-Related Properties of Chemically and Enzymatically Modified Gluten Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 2482-2488.
- Biomedal (2012). Portal electrónico de Biomedal Diagnostic. <http://www.biomedal.com/bd/es/glutentox-pro.html>, acceso: mayo 2011.
- BOSF (2011). Boletín Oficial del Gobierno de Santa Fe. Ley Provincial 13190/2011. <http://gobierno.santafe.gov.ar/boletinoficial/template.php?mostrarmenu=SI&include=boletines/23-09-2011ley13190-2011.html&pdia=ultimo&dia=2011-0923&ptitulo=Bolet%EDn%20Oficial%20del%20viernes%2023%20de%20septiembre%20de%202011%20-%20Ley%20Provincial%2013190-2011%20-%20>, acceso: julio 2012.
- Bylund G (1996). Manual de Industrias Lácteas. *Madrid Vicente Ediciones*, Madrid, España.
- Cabrera-Chávez F, Calderón de la Barca A M (2009). Bovine milk intolerance in celiac disease is related to IgA reactivity to α - and β -caseins. *Nutrition* 25, 715-716.
- Caicedo Cipagauta Y M (2010). Estudio de la viabilidad de la incorporación de bacterias probióticas micro-encapsuladas en helados. Trabajo final Especialización en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia. Programa Interfacultades. Bogotá. <http://www.bdigital.unal.edu.co/2385/1/107372.2010.pdf>, 15. acceso: julio 2012.
- Calvo C (2003). Mesa Redonda: Enfermedad Celíaca en el siglo XXI - Tratamiento de la enfermedad celíaca. *Boletín de Pediatría*, 43 (185), 309-312.
- Cazzaniga D, Fabro M, Noseda Y, Giordano G, Junges O (2011). Relevamiento de trazas de gluten de trigo, cebada y centeno en productos lácteos aptos para celíacos. En: Libro de Resúmenes del Encuentro de Primavera 2011-10º encuentro INTI de presentación de trabajos. Sección 06: Mayor confiabilidad de productos (pp.214-215). http://www.inti.gob.ar/encuentros_11/pdf/libro_primavera_2011.pdf, acceso: julio 2012.
- Chirido F G, Añón M C, Fossati C A (1995). Optimization of a Competitive ELISA with Polyclonal Antibodies for Quantification of Prolamins in Foods. *Food & Agricultural Immunology* 7, 333-343.
- Chirido F G, Rumbo M, Añón M C, Fossati C A (1998). Presence of High Levels of Non-Degraded Gliadin in Breast Milk from Healthy Mothers. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 33, 1186-1192.
- Ciclitira P J, Ellis H J, Lundin K E A (2005). Gluten-free diet—what is toxic? *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 19 (3), 359-371.
- Ciclitira P J, Moodie S J (2003). Coeliac Disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 17 (2), 181-195.

- Codex Alimentarius (2003). Comité del Codex sobre Nutrición y Alimentos para Regímenes Especiales, 25^a reunión. Informe del Grupo de Trabajo sobre Análisis y Toxicidad de la Prolamina. CX/NFSDU 03-4. ftp://ftp.fao.org/codex/meetings/CCNFSDU/CCNFSDU25/nf03_04s.pdf, acceso: septiembre 2010.
- Codex Alimentarius (2008). Alinorm 08/31/26. Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias: Informe de la 29^a reunión del Comité del Codex sobre nutrición y alimentos para regímenes especiales. Alemania, 12-16 noviembre 2007, 1-93. <http://www.codexalimentarius.net/web/archives.jsp?lang=ES>. Acceso: junio 2008.
- Codex Alimentarius (2011). Información sobre la categoría de alimentos 01.7: Postres lácteos, 1-5, GSFA online, <http://www.codexalimentarius.net/gsaonline/foods/details.html?d-3586470-o=2&id=35&d-3586470-s=1&lang=es>, acceso: agosto 2012.
- Comino I, Real A, De Lorenzo A, Cornell H, López-Casado M A, Barro F, Lorite P, Torres M, Cebolla A, Sousa C (2011). Diversity in oat potential immunogenicity: basis for the selection of oat varieties with no toxicity in coeliac disease. *Gut* 60 (7) 915-922.
- Crivelli A (2009). Enfermedad Celíaca: genética y autoinmunidad. En: Mundo celíaco: difundir para concientizar, Centro de Difusión de la Celiaquía (CeDiCe), Año 3, N° 5, 4-5, http://www.cedice.com.ar/imagenes/revista/mundo_celiaco_5.pdf, acceso: febrero 2009.
- Crowell D (1994). The Horlick Mausoleum (Mound Cemetery), <http://www.rootsweb.ancestry.com/~wiracbio/zmound/horlickmau.htm>, acceso: mayo 2010.
- Cueto Rúa E A, Nanfíto G, Guzmán L (2006). La Enfermedad Celíaca. *Revista del Instituto Técnico para la Acreditación de Servicios de Salud* 8(3), 12-23.
- Damario R C (2011). Viabilidad de tres cepas de *Lactobacillus* spp. frente al proceso de liofilización. Aplicación del liofilizado como secuestrante de zearalenona. Tesis Licenciatura en Tecnología de los Alimentos. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires.
- De Angelis M., Rizzello C G, Fasano A, Clemente M G, De Simone C, Silano M, De Vincenzi M, Losito I, Gobbetti M (2006). VSL#3 probiotic preparation has the capacity to hydrolyze gliadin polypeptides responsible for celiac sprue. *Biochimica et Biophysica Acta* 1762 (1), 80-93.
- Debnath J, Martin A, Gowda L R (2009). A polymerase chain reaction directed to detect wheat glutenin: Implications for gluten-free labeling. *Food Research International* 42, 782-787.
- Deibel K, Trautman T, De Boom T, Sveum W, Dunaif G, Scott V, Bernard D (1997). A Comprehensive Approach to Reducing the Risk of Allergens in Foods. *Journal of Food Protection* 60 (4) 436-441.
- Dekking L, Koning F, Hosek D, Ondrak T, Taylor S L, Schroeder J W, Bauer M (2009). Intolerance of celiac disease patients to bovine milk is not due to the presence of T-cell stimulatory epitopes of gluten. *Nutrition* 25, 122-123.

- Delgado García P (2012). Portal de Montiermo: queso artesano casero/producto ecológico. <http://arribes.net/quesomontiermo/elqueso.html>, acceso: noviembre 2012.
- Denery-Papini S, Nicolas Y, Popineau Y (1999). Efficiency and limitations of immunochemical assays for the testing of gluten-free foods. *Journal of Cereal Science* 30, 121-131.
- Dewar D, Pereira S, Ciclitira P (2004). The pathogenesis of coeliac disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36, 17-24.
- Diario Oficial de la Unión Europea (2007). Directiva 2007/68/CE, L310/11-14. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:310:0011:0014:ES:PDF>, acceso: julio 2012.
- Diario Oficial de la Unión Europea (2009a). Reglamento (CE) N° 41/2009 de la Comisión sobre la composición y etiquetado de productos alimenticios apropiados para personas con intolerancia al gluten (L 16/3), 1-3, <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:016:0003:0005:ES:PDF>. Acceso: julio 2009.
- Diario Oficial de la Unión Europea (2009b). Corrección de errores del reglamento (CE) N° 41/2009. (L171/48),14, <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:171:0048:0051:ES:PDF>. Acceso: julio 2009.
- Doña V V, Fossati C A, Chirido F G (2008). Interference of denaturing and reducing agents on the antigen/antibody interaction. Impact on the performance of quantitative immunoassays in gliadin analysis. *European Food Research and Technology* 226, 591-602.
- EFSA (2004). Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to a notification from AAC on wheat-based maltodextrins pursuant to Article 6 paragraph 11 of Directive 2000/13/EC. *EFSA Journal* 127, 1-6.
- EFSA (2011). Scientific opinion on the re-evaluation of caramel colours (E-150 a, b, c, d) as food additives. *EFSA Journal* 9(3):2004, 18 y 55.
- Ellis R P, Cochrane M P, Dale M F, Duffus C M, Lynn A, Morrison I M, Prentice R D, Swanston J S, Tiller S A (1998a). Starch production and industrial use, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 77(3), 289-311.
- Ellis H, Rosen-Bronson S, O'Reilly N, Ciclitira P (1998b). Measurement of gluten using a monoclonal antibody to a coeliac toxic peptide of α -gliadin. *Gut* 43(2),190–195.
- Estudio multicéntrico (2008-2009). Prevalencia de Enfermedad Celíaca en Población Pediátrica Argentina. Comisión Nacional de Salud, Ciencia y Tecnología. Ministerio de Salud de la Nación. <http://www.saludinvestiga.org.ar/pdf/jornada-investigadores/exposiciones/material-01-12/Mora.ppt>, acceso: mayo 2009.
- FDA (2007). Proposed rule for food labeling: gluten-free labeling of food. (Docket N° 2005N-0279). *Federal Register* 72(14), 2795-2817, <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2007-01-23/html/E7-843.htm>, acceso: octubre 2008.
- FEPALÉ (2012a). Cuadernillo Bloque 4- Control de Calidad. Universidad de Santiago de Compostela (España) – Aula de Productos Lácteos. Curso con modalidad a distancia (e-learning) como parte del Programa Internacional Avanzado de Capacitación en Tecnología e Industrialización de la Leche –

- Red Latinoamericana de Capacitación para la Industria Láctea – RedLeche, del 14/05 al 10/06/12.
- FEPALÉ (2012b). Cuadernillo Bloque 2 – Tecnología de Fabricación de Yogur. Universidad de Santiago de Compostela (España) – Aula de Productos Lácteos. Curso con modalidad a distancia (e-learning) como parte del Programa Internacional Avanzado de Capacitación en Tecnología e Industrialización de la Leche - Red Latinoamericana de Capacitación para la Industria Láctea – RedLeche, del 14/05 al 10/06/12.
- Friedman N, Zeiger R S (2005). The role of breast-feeding in the development of allergies and asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 115(6), 1238-1248.
- Gallagher E, Gormley T R, Arendt E K (2004). Recent advances in the formulation of gluten-free cereal-based products. *Trends in Food Science & Technology* 15, 143-152.
- García E., Llorente M., Hernando A., Kieffer R., Wieser H., Méndez E. (2005). Development of a general procedure for complete extraction of gliadins for heat processed and anheated foods. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 17, 529-539.
- García Gordo M. (2009). Celiacuía: Investigación y Análisis del Mercado Celíaco Argentino ¿Qué compromiso tienen las principales marcas de supermercados, mercados de cercanía y las empresas alimentarias con el mercado celíaco en Argentina? Tesis de maestría en Dirección de Empresas. Universidad de Palermo, Graduate School of Business. http://issuu.com/minervagg/docs/tesis_minerva_garc_a_-_investigaci_n_y_an_lisis_de, acceso: septiembre 2012.
- Garzón Quinteros B (2008). Sustitutos lecheros en la alimentación de terneros. Sitio argentino de producción animal: Producción bovina de leche. Cría artificial de terneros. Monografía 131 (pp. 1- 20). http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_bovina_de_leche/cria_artificial/131-sustitutos.pdf, acceso: julio 2012.
- Gerez C L, Font de Valdez G, Rollán G C (2008). Functionality of lactic acid bacteria peptidase activities in the hydrolysis of gliadin-like fragments. *Letters in Applied Microbiology* 47, 427–432.
- GFCO (2009). Sitio web del Gluten-Free Certification Organization dependiente del Gluten Intolerance Group; <http://www.gfco.org> . Acceso: julio 2009.
- Gibert A, Espadaler M, Ángel Canela M, Sánchez A, Vaque C, Rafecas M (2006). Consumption of gluten-free products: should the threshold value for trace amounts of gluten be at 20, 100 or 200 ppm? *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 18 (11), 1187 – 1195.
- González J M, García E, Fernández J L, Gago L, Benit J (2007). Técnicas analíticas para la detección de gluten en alimentos. Informe de Vigilancia Tecnológica. Círculo de Innovación en Biotecnología (CIBT). Fundación para el Conocimiento madri+d, CEIM (pp. 1-81).
- González Rumayor V, García Iglesias E, Ruíz Galán O, Gago Cabezas L (2005). Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria. Informe de Vigilancia Tecnológica. Círculo de Innovación en Agroalimentación (CIAA).Fundación para el Conocimiento madri+d, CEIM, (pp. 1-119).
- Green P, Cellier C (2007). Celiac Disease – Medical Progress. *The New England Journal of Medicine* 357, 1731-1743.

- Hefle S, Yeung J, Helm R (2006). Chapter III: Antibodies. En: Koppelman S J, Hefle S L (Eds.). *Detecting allergens in Food. Part II. Types of detection method*. Woodhead Publishing Ltd. and CRC Press LLC, England, 72-76.
- Heredia P C, Castro P F, Palma H J (2007). Enfermedad celíaca del adulto. *Revista Médica de Chile* 135, 9, 1186-1194.
- Hopman E, Dekking L, Beelen F, Smoltsak N, de Vries S, Dooger L, Mearin L, Koning F (2008a). Presence of gluten proteins in breast milk: implications for the development of celiac disease. Capítulo 2 en: *Gluten intake and gluten-free diet in the Netherlands*, Tesis doctoral de Geertruida Dorothea Hopman, Universidad de Leiden, Países Bajos (pp. 17- 27), <https://openaccess.leidenuniv.nl/bitstream/1887/13118/1/Hopman+Gluten+thesis+310708.pdf>, acceso: febrero 2009.
- Hopman E, von Blomberg B, Batstra M, Morreau H, Dekker F, Koning F, Lamers C, Mearin M (2008b). Gluten tolerance in adult patients with celiac disease 20 years after diagnosis?. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 20, 423-429.
- Iametti S, Lodi R, Scafuri L, Bonomi F (2000). Determinazione del contenuto glutinico residuo in colture fungine utilizzate per la produzione di Gorgonzola. *Il Latte* 25 (10), 52-56.
- Ihnat M (1994). Characterization (certification) of three wheat flours and a wheat gluten reference material (NIST RM-8436, 8437, 8438 and 8418) for essential and toxic major, minor and trace element constituents. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 348, 468-473.
- INTI (2011). Informe del Programa Pruebas de Desempeño de Productos. Queso cremoso. http://www.inti.gov.ar/productos/pdf/informe_quesos_cremosos.pdf, acceso: julio, 2012.
- INTI-Lácteos (2012). Portal de Quesos Argentinos: queso cuartirolo. http://www.quesosargentinos.gov.ar/paginas/ficha_grafica.asp?id=7, acceso: agosto 2012.
- JAOAC (1960). Journal of Association of Analytical Communities, Method of Analysis 9th, Chapter 22: Grain and Stock Feeds, Starch, 22.047: In Condensed or Dried Milk Products – Qualitative Test (19) - Official, 290.
- Kahlenberg F, Sánchez D, Lachmann I, Tuckova L, Tlaskalova H, Méndez E, Mothes T (2006). Monoclonal antibody R5 for detection of putatively coeliac-toxic gliadin peptides. *European Food Research Technology* 222, 1-2.
- Kamal (2012). Portal de la firma Kamal: Distinctively Mediterranean: Kishk. <http://www.shopkamal.com/servlet/the-36/Kashk-or-Kishk-Powder/Detail>, acceso: agosto 2012.
- Kip P, Meyer D, Jellema R H (2006). Inulins improve sensory and textural properties of low-fat yoghurts. *International Dairy Journal* 16, 1098–1103.
- Konuklar G, Inglett G E, Warner K, Carriere C J (2004). Use of a β -glucan hydrocolloidal suspension in the manufacture of low-fat Cheddar cheeses: textural properties by instrumental methods and sensory panels. *Food Hydrocolloids* 18 (4), 535-545.
- Kristjánsson G, Venge P, Hällgren R (2007). Mucosal reactivity to cow's milk protein in coeliac disease. *Clinical and Experimental Immunology* 147, 449-455.

- La Fromagerie (2012). Portal de La Fromagerie Limitada: queso Fol-Épi, http://www.lafromagerie.cl/queso/fol_epi, acceso: agosto 2012.
- La Raíz SA (2009a). Stick gluten: kit de determinación rápida de residuos de gluten en alimentos para celíacos. Material bibliográfico provisto por la empresa La Raíz SA, Córdoba, Argentina.
- La Raíz SA (2009b). Gestión de industrias aptas para elaborar alimentos para celíacos. Material bibliográfico provisto por la empresa La Raíz SA, Córdoba, Argentina.
- Lara Alcántara J, Kulay Y, Sosa de López Maya O (2002). Enfermedad celíaca: Clínica y Diagnóstico. *Revista de Posgrado de la VIa Cátedra de Medicina* 113, 17-23.
- Lester D (2008). Gluten measurement and its relationship to food toxicity for celiac disease patients. *Plant Methods* 4 (26), 1-5.
- Lindfors K, Blomqvist T, Juuti-Uusitalo K, Stenman S, Venäläinen J, Mäki M, Kaukinen K (2008). Live probiotic *Bifidobacterium lactis* bacteria inhibit the toxic effects induced by wheat gliadin in epithelial cell culture. *Clinical & Experimental Immunology* 152(3), 552-558.
- Mairal T, Frese I, Llaudet E, Redondo C, Katakis I, Von Germar F, Drese K, O' Sullivan C (2009). Microfluorimeter with disposable polymer chip for detection of coeliac disease toxic gliadin. *Lab on a chip* 9 (24), 3535-3542.
- Male D, Brostoff J, Roth D B, Roitt I (2007). Inmunología. 7º edición, Elsevier, España.
- Martín Esteban M, Cacho Palomar J F, Cepeda Sáez A, Martín Bermudo F, Prieto Santos I (2010). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación con la enfermedad celíaca y los problemas que plantean las técnicas analíticas para el control del contenido de gluten de alimentos. *Revista del Comité Científico N° 12*, 63-78.
- Matysiak-Budnik T, Malamut G, de Serre N P, Grosdidier E, Segulier S, Brousse N, Caillat-Zucman S, Cerf-Bensussan N, Schmitz J, Cellier C (2007). Long-term follow-up of 61 coeliac patients diagnosed in childhood: evolution toward latency is possible on a normal diet. *Gut* 56(10),1379-1386.
- Méndez Cormán E, García Ortiz E., Ferre López S. (2006). ELISA competitivo para la detección de gluten hidrolizado y sus aplicaciones. WIPO Patent Application WO2006/051145-A1, PCT/ES2005/070025. <http://www.sumobrain.com/patents/wipo/Competitive-elisa-detection-gluten-hydrolysate/WO2006051145.html>. Acceso: septiembre 2010.
- Méndez E, Vela C, Immer U, Janssen F, Frederik W (2005). Report of a collaborative trial to investigate the performance of the R5 enzyme linked immunoassay to determinate gliadin in gluten-free food. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 17(10), 1053-1063.
- Mogna G, Strozzi G P, Bruno F (2007). Gluten-free blue-veined dairy products intended for persons affected by celiac disease. WIPO Patent Application WO/2007/054988. <http://patentscope.wipo.int/search/en/WO2007054988>, acceso: junio 2008.
- Monte-Mel (2012). Portal de Monte-Mel: queso terrincho velho. <http://www.monte-mel.com/es/quesos/16-queso-terrincho-velho-curado-en-centeno-con-tabla-de-cortar-en-madera.html>, acceso: noviembre 2012.

- Montesinos-Herrero C, Cottell D C, O’Riordan E D, O’Sullivan M (2006). Partial replacement of fat by functional fibre in imitation cheese: Effects on rheology and microstructure. *International Dairy Journal* 16, 910–919.
- Mora D, Pintus P (2008). A method for the preparation of *Penicillium* spores and the use of the latter in the food field. European Patent Application (EPA) EP 1-873-235-A1, Application number: 06425435.2. <http://www.patfr.com/download/EP1873235.pdf>, acceso: noviembre 2012.
- Morón B, Cebolla A, Manyani H, Álvarez-Maqueda M, Megías M, Thomas M.C, Carlos L M, Sousa C (2008a). Sensitive detection of cereal fractions that are toxic to celiac disease patients by using monoclonal antibodies to a main immunogenic wheat peptide. *The Journal of Chemical Nutrition* 87, 405-414.
- Morón B, Bethune M T, Comino I, Manyani H, Ferragud M, Carlos L M, Cebolla A, Khosla C, Sousa C (2008b). Toward the assessment of food toxicity for celiac patients: Characterization of monoclonal antibodies to a main immunogenic gluten peptide. *PloSOne* 3 (5), e2294, 1-13.
- Morón B, Cebolla A, Sousa, C (2008c). Detección de la fracción tóxica del gluten en alimentos, *Alimentaria: Investigación, Tecnología y Seguridad* 398, 73-75.
- Mundo Quesos (2012). Portal de Mundos Quesos: 2025 quesos. Fol-Epi. <http://www.mundoquesos.com/2009/05/folepi.html>, acceso: agosto 2012.
- Niewinski M (2008). Advances in Celiac Disease and Gluten-Free Diet. *Journal of the American Dietetic Association* 108 (4), 661-672.
- Niness K R (1999). Inulin and Oligofructose: What Are They? *Journal of Nutrition* 129 (7), 1402S-1406S.
- Noronha N, Duggan E, Ziegler G R, Stapleton J J, O’Riordan E D, O’Sullivan M (2008). Comparison of microscopy techniques for the examination of the microstructure of starch-containing imitation cheeses. *Food Research International* 41, 472–479.
- NSFI (2008). Procesamiento. Almidones a la vanguardia. *Industria Alimenticia @ para los Procesadores de Alimentos Latinoamericanos*, 30 abril 2008. <http://www.industriaalimenticia.com/articles/print/almidones-a-la-vanguardia>, acceso: abril 2012.
- Operón (2009). Informe Técnico de Stick Gluten – Test de detección de gluten en alimentos. (Rev. 4, 21-01-09), 1-25, Zaragoza, España.
- Ortiz M (2005). Enfermedad Celíaca: Investigación sobre características, avance y dieto-terapia actuales. *Las Tesinas de Belgrano* N° 188, 1-44, http://www.ub.edu.ar/investigaciones/tesinas/188_ortiz.pdf, acceso: mayo de 2009.
- Osborne T B (1907). The proteins of the wheat kernel. *Carnegie Institution Washington Publications* 84, 235-237.
- Páez R (2011). Aplicación de secado spray para conservación de bacterias probióticas. Material bibliográfico del curso de postgrado: Productos lácteos fermentados: tópicos de interés actual. Instituto de Lactología Industrial (UNL-CONICET). Facultad de Ingeniería Química – Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina. 28 de octubre 2011.
- Pérez Cabrejas M D (2008). Factores que influyen en la determinación de alérgenos en alimentos. Presentación en Seminario Internacional de Actualización en Alergias Alimentarias, Instituto Nacional del Tecnología Industrial (INTI) –

- Oficina Técnica de Cooperación (AECID) Embajada de España en Argentina, Buenos Aires, Argentina.
- Pérez E C, Sandoval M J, Schneider S E (2008). Importancia del diagnóstico precoz de la enfermedad celíaca. *Revista de Posgrado de la VIa Cátedra de Medicina* 178, 17-21.
- R-Biopharm (2011a). Validation Report of Ridascreen® Gliadin competitive, 2nd generation, R-Biopharm, Darmstadt, Alemania, 1-7.
- R-Biopharm (2011b). Background information of Ridascreen® Gliadin competitive, 2nd generation, R-Biopharm, Darmstadt, Alemania, 1-4.
- Ribes Koninckx, C. (2010). Enfermedad celíaca. Nuevos aspectos epidemiológicos, diagnósticos y terapéuticos. Servicio de Gastroenterología Pediátrica – Hospital La Fe - Valencia. 4º Reunión Científica de Pediatría APapCLM – Ciudad Real – España. <http://www.aepap.org/APapCLM/Documentos/almagro%202010%20enfermedad%20celiaca.pdf>, acceso: mayo 2012.
- Rostom A, Murray J A, Kagnoff M F (2006). American Gastroenterological Association (AGA) Institute Technical (2006): Review on the Diagnosis and Management of Celiac Disease. *Gastroenterology*, 131 (6), 1981-2002.
- Rumbo M, Chirido F, Fossatti C A, Añón M C (1996). Influence of thermal treatment of food on the immunochemical quantification of gliadin. *Food & Agricultural Immunology* 8, 195-203.
- Rumbo M, Chirido F, Fossatti C A, Añón M C (2001). Analysis of the effects of heat treatment on gliadin immunochemical quantification using a panel of anti-prolamín antibodies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 5719-5725.
- Skerritt J H, Hill A S (1990). Monoclonal Antibody Sandwich Enzyme Immunoassays for Determination of Gluten in Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 199Q, 38, 1771-1778.
- Skerritt J H, Hill A S (1991). Enzyme immunoassay for determination of gluten in foods: collaborative study. *Journal of Association Official of Analytical Chemists* 74:2, 257-264.
- Société Belge de la Coeliaquie (2009). Foire aux questions. Pourquoi ne trouve-t-on pas en Belgique de liste de produits autorisés et interdits? <http://www.sbc-asbl.be/index.php?p=faq2&idfaq=27>, acceso: septiembre 2009.
- Stene L C, Honeyman M C, Hoffenberg E J, Haas J E, Sokol R J, Emery L, Taki I, Norris J M, Erlich H A, Eisenbarth G S, Rewers M (2006). Rotavirus infection frequency and risk of celiac disease autoimmunity in early childhood: a longitudinal study. *American Journal of Gastroenterology* 101, 2333-2340.
- Stepniak D, Koning F (2006). Enzymatic gluten detoxification: the proof of the pudding is in the eating! *TRENDS in Biotechnology* 24, 10, 433-434.
- Tamime A. Y., O'Connor T. P (1995). Kishk-A Dried Fermented Milk/Cereal Mixture. *International Dairy Journal* 5, 109-128.
- Tárrega A, Costell E (2006). Effect of inulin addition on rheological and sensory properties of fat-free starch-based dairy desserts, *International Dairy Journal* 16, 1104–1112.
- Thompson T, Méndez E (2008). Commercial Assays to Assess Gluten Content of Gluten-Free Foods: Why They Are Not Created Equal. *Journal of the American Dietetic Association* 108, 1682-1687.

- Tomchinsky E (2008). Metodología analítica. Seminario sobre enfermedad celíaca. ANMAT-INAL, 25 de marzo 2008.
- Valdés I, García E, Llorente M, Méndez E (2003): Innovative approach to low-level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 15 (5),465-474.
- Van Der Borgh A, Goesaert H, Veraverbeke W S, Delcour J A (2005). Fractionation of wheat and wheat flour into starch and gluten: overview of the main processes and the factors involved. *Journal of Cereal Science* 4, 221–237.
- Van Eckert R, Berghofer E, Ciclitira J, Chirido F, Denery-Papini S, Ellis H J, Ferranti P, Goodwin P, Immer U, Mamone G, Méndez E, Mothes T, Novalin S, Osman A, Rumbo M, Stern M, Thorell L, Whim A, Wieser H (2006). Towards a new gliadin reference material–isolation and characterisation. *Journal of Cereal Science* 43, 331–341.
- Van Heel D A, West J (2006). Recent advances in celiac disease. *Gut-on line* 55, 1037-1046.
- Van Herwijnen R (2006). Chapter X: The use of lateral flow devices to detect food allergens. En: Koppelman S. J., Hefle S. L (Eds.). Detecting allergens in Food. Part II. Types of detection method. (pp. 175-181). Woodhead Publishing Ltd. and CRC Press LLC, England.
- Veggiemeat (2012): Página web de sustitutos de carne Veggiemeat. <http://www.veggimeat.com.mx/dudas-frecuentes/que-es-el-gluten-de-trigo>, acceso: junio 2012.
- Westergaard V (2004). Tecnología de la Leche en Polvo. Evaporación y Secado por Atomización. 5º edición. *Niro A/S*, Copenhagen, Dinamarca.
- Wieser H (2007). Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology* 24, 115-119.
- Wieser H, Koehler P (2008). The Biochemical Basis of Celiac Disease. *Cereal Chemistry* 85 (1), 1-13.
- Wisconsin Historical Society (2004). That's meat and drink to me. Wisconsin's malted milk story. <http://www.wisconsinhistory.org/museum/exhibits/horlicks/> acceso: mayo 2010.
- Xanceda (2012). Portal de Casa Grande de Xanceda: queso ecológico/queixo do peregrino ecológico curado en cebada. <http://www.casagrandexanceda.com/productos2.php?id=14>, acceso: noviembre 2012.