

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
18 de febrero de 2010 (18.02.2010)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 2010/018290 A1**

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:  
C07K 1/14 (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/ES2009/070328
- (22) Fecha de presentación internacional:  
31 de julio de 2009 (31.07.2009)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:  
P200802393 7 de agosto de 2008 (07.08.2008) ES
- (71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US): UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI [ES/ES]; Avinguda del Països Catalans, 26, E-43007 Tarragona (ES). ICREA INSTITUCIO CATALANA DE RECERCA I ESTUDIS AVANÇATS [ES/ES]; Passeig Lluís Companys nº 23, E-08010 Barcelona (ES).
- (72) Inventores; e
- (75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): O'SULLIVAN, Ciara, Kathleen [IE/ES]; Avinguda del Països Catalans, 26, E-43007 Barcelona (ES). BERMUDO REDONDO, M<sup>a</sup>, Carmen [ES/ES]; Avinguda del Països Catalans, 26, E-43007 Tarragona (ES). KATAKIS, Ioannis [GR/ES]; Avinguda del Països Catalans, 26, E-43007 Tarragona (ES).
- (74) Mandatario: CARPINTERO LOPEZ, Mario; Alcalá, 35, E-28014 Madrid (ES).
- (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publicada:  
— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(54) Title: METHODS FOR REMOVING PROLAMINS FROM WHEAT THAT ARE TOXIC TO THOSE SUFFERING FROM COELIAC DISEASE

(54) Título: PROCEDIMIENTOS PARA LA EXTRACCIÓN DE PROLAMINAS TÓXICAS DEL GLUTEN EN CELIAQUÍA

(57) Abstract: The present invention relates to a composition for removing gliadins and glutenins, which are prolamins that are toxic to patients suffering from coeliac disease, contained in heat-processed and non-heat-processed foods. The composition of the invention comprises a reducing agent for irreversible reduction of disulphide bridges and a solvent with a high boiling point and/or high dielectric constant in a buffer with a pH between 4 and 9. The invention also relates to the method for removing gluten (gliadins and glutenins) from food products, which is compatible with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), that allows detection of hydrolyzed and non-hydrolyzed gluten (gliadins and glutenins). Lastly, the invention relates to a kit for implementing said method.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a una composición para la extracción del contenido en gliadinas y gluteninas, prolaminas tóxicas en celiacía, de alimentos procesados y no procesados por calor. La composición de la invención consiste en un agente reductor para la reducción irreversible de puentes de disulfuro y un disolvente con alto punto de ebullición y/o alta constante dieléctrica, en un tampón con un pH entre 4 y 9. Asimismo, se contempla el procedimiento para extraer el gluten (gliadinas y gluteninas) de productos alimenticios, compatible con un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA), que permite detectar el gluten hidrolizado y no hidrolizado (gliadinas y gluteninas). Finalmente, la invención contempla un kit para llevar a cabo el procedimiento citado.



WO 2010/018290 A1

## PROCEDIMIENTOS PARA LA EXTRACCIÓN DE PROLAMINAS TÓXICAS DEL GLUTEN EN CELIAQUÍA

### **CAMPO DE LA INVENCION**

5

Esta invención se refiere de forma general al análisis de alimentos, procesados y no procesados por calor, para determinar su contenido en gluten (gliadinas y gluteninas), y más específicamente a un procedimiento para extraer el gluten (gliadinas y gluteninas) de productos alimenticios, compatible con un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), que permite detectar el gluten hidrolizado y no hidrolizado (gliadinas y gluteninas).

10

### **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

15

La celiacía es una enfermedad inflamatoria del intestino delgado superior y resulta de la ingestión de gluten en individuos genéticamente susceptibles, siendo la única enteropatía inducida por nutrientes que dura toda la vida.

20

La celiacía se desencadena en individuos susceptibles por la ingestión de prolaminas de gluten de trigo, cebada, centeno y posiblemente avena, lo que provoca cambios histológicos en la mucosa del intestino delgado, conduciendo a un síndrome de intolerancia [1]. Se conoce desde 1953 que la afección se agrava cuando los pacientes comen alimentos que contienen harina de trigo y que anteriormente también estaban implicados el centeno y la cebada, un cruce artificial entre trigo y centeno, denominado triticale y, posiblemente, la avena. El único tratamiento para la celiacía es una dieta estricta sin gluten. Cuanto menos sigan los individuos esta dieta, mayor es la posibilidad de desarrollar malnutrición y otras complicaciones. Sin embargo, todos los problemas revierten cuando se establece una dieta estricta sin gluten [2].

25

30

El gluten es el contenido en proteínas del trigo, centeno, avena, cebada y maíz, y puede dividirse en glutenina y gliadina (fracción soluble en alcohol). Las gluteninas son insolubles en agua o alcohol pero pueden volverse solubles una vez que se reducen los puentes disulfuro intercatenarios. Pueden dividirse adicionalmente en fracciones de alto peso molecular (HMW) y bajo peso molecular (LMW) y la gliadina puede subdividirse en fracciones  $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\omega$ , en base a sus secuencias de aminoácidos N-terminales. Las proteínas correspondientes en centeno, cebada y avena se conocen como secalinas, hordeínas y aveninas,

35

respectivamente.

Los pacientes celíacos presentan un amplio rango de sensibilidad a la ingestión de gluten, con manifestaciones clínicas a cantidades mínimas de gliadina observadas [3]. Por consiguiente, para certificar productos sin gluten, es obligatorio el uso de ensayos altamente sensibles. La Unión Europea, la Organización Mundial de la Salud y el Codex Alimentarius exigen una medición fiable de la prolamina del trigo, la gliadina (así como de las prolaminas de otros cereales), más que de todas las proteínas derivadas del trigo, que incluyen albúminas, globulinas y proteínas de los gránulos de almidón [4].

Un problema importante en la producción de materias primas "sin gluten", y en la producción de alimento sin gluten, es la contaminación durante el procesado. Con bastante frecuencia, ingredientes y productos que comenzaron su vida libres de gluten, se contaminan y se vuelven peligrosos para el consumo en personas celíacas.

Los límites oficiales descritos en el Codex Draft Revised Standard (Norma revisada del borrador del código) (2000) son de 20 ppm para los productos alimenticios libres de gluten por naturaleza, 200 ppm para productos alimenticios que se han convertido en libres de gluten, productos alimenticios sólidos a base de materia seca y productos alimenticios líquidos partiendo de la base del producto original. El progreso en el desarrollo de un procedimiento fiable de análisis para determinar el gluten es difícil.

Los kits disponibles actualmente para la medición del gluten:

- son ensayos tipo sándwich indirectos que llevan mucho tiempo [5-8],
- no pueden detectar la gliadina de manera equivalente en los diversos cereales [5, 7],
- no son específicos para la gliadina tóxica en la celiaquía [8, 9],
- no detectan las formas hidrolizadas de gliadina [6, 10] y
- se destruyen por los agentes reductores empleados comúnmente en la extracción del gluten del alimento (que desnaturalizan anticuerpos y marcadores enzimáticos) [7, 10].

Por tanto, a lo largo de los últimos años no ha existido un procedimiento fiable para medir el contenido en gluten de artículos alimenticios.

En la actualidad, el gluten se mide mediante procedimientos dependientes de epítomos, tales como ELISA, que usan anticuerpos monoclonales o policlonales. Una técnica ELISA útil para cuantificar el contenido en gluten de productos alimenticios se describe en Bermudo *et al* (2005) (64).

Tradicionalmente, se creía que la fracción de gliadina del gluten de trigo era la tóxica. Existía poca información concerniente a las gluteninas, debido a las dificultades en su separación y purificación. Pruebas recientes sugieren que ciertos péptidos de la glutenina y subunidades de las gluteninas recombinantes pueden estimular las células T del intestino delgado celíaco aisladas *in vitro* [17]. La consecuencia es que éstas son tóxicas *in vivo*. Sin embargo, los datos *in vivo* están restringidos en la actualidad a un artículo [18]. Este estudio mostraba un efecto tóxico *in vivo* en 4 de 4 pacientes celíacos expuestos a una mezcla de cuatro subunidades de glutenina de alto peso molecular (HMW). En la actualidad hay pocos datos disponibles concernientes a la toxicidad de las gluteninas de bajo peso molecular, sin embargo debe considerarse como posible que estas proteínas sean también tóxicas.

Las gliadinas se extraen fácilmente de productos alimenticios crudos usando etanol, pero esto da como resultado sólo una extracción conjunta de un pequeño porcentaje de gluteninas, y se requiere una extracción más intensa que implica el uso de agentes reductores para solubilizar las gluteninas. Esto se debe a que las gluteninas son polímeros que no se extraen fácilmente hasta que se rompen los puentes disulfuro intercatenarios. Además, estas condiciones se requieren también para la extracción de gliadinas y gluteninas de alimentos cocinados. Cuando se calientan las gliadinas, las moléculas de azufre presentes en las gliadinas alfa y gamma, pero no en las omega, forman puentes disulfuro, de modo que la mayoría de las gliadinas se convierten en polímeros con los mismos problemas de solubilidad que las gluteninas. De modo que los procedimientos rutinarios para la extracción de gluten de productos alimenticios procesados por calor se basan en el uso de alcoholes, tales como etanol y propanol mezclados con agentes reductores tales como mercaptoetanol, ditiotreitól, agentes disociantes tales como urea, dodecilsulfato de sodio, clorhidrato de guanidina y mezclas de estos. Las composiciones resultantes usadas para la extracción son tóxicas, inflamables, inestables y tienen un olor acre.

Por tanto, a la luz del descubrimiento reciente de que las gluteninas HMW también agravan la celiaquía, es esencial tener un protocolo universal que pueda usarse para extraer gliadinas y gluteninas de alimentos crudos y procesados.

Se han llevado a cabo diversos protocolos de extracción para la extracción de gliadinas y gluteninas de productos alimenticios. Se ha usado comúnmente etanol, al 50-70% v/v [19-27] y propanol, al 50-70% v/v [24-33] para la extracción de gliadinas. También se ha usado cloruro de litio para la extracción de gliadinas [34],

así como dimetilsulfóxido (DMSO) [27, 35, 36] y dimetilformamida [27, 37]. Siguiendo el protocolo de Osborne, que implica la extracción secuencial de las diferentes proteínas presentes en el gluten, se han extraído gluteninas con agentes reductores, tales como mercaptoetanol (al 1-2% p/v) [27, 31, 38] y ditiotreitól (al 0,1-2% p/v) [24, 25, 28, 30, 32, 33, 39-43], ácido acético (al 0,7% p/v) [31, 33, 44] y agentes disociantes tales como urea (2-8 M) [27, 32, 37, 41], clorhidrato de guanidina (2-6 M) [45] y SDS (al 1-2%) [45, 46]. Básicamente, los procedimientos de extracción usados eran los mismos, que implicaban agitación rápida con vórtex y un periodo de extracción (que oscila entre 15 minutos y 120 minutos), seguido de centrifugación (durante un periodo de 15 minutos a 60 minutos), normalmente a temperatura ambiente, aunque hay algunos informes en los que se eleva la temperatura hasta 60°C [28, 31, 41, 43]. En las extracciones se empleó un tampón, como Tris(hidroximetil)aminometano (Tris) (0,05 M-0,08 M, pH 7,5-8,0), tampón borato (0,05 M, pH 8,5) o tampón fosfato de sodio (0,05 M), a pH 7,8.

Diversos informes han detallado el uso de una mezcla de agentes reductores y agentes disociantes. En un ejemplo, se usó tampón Tris más un agente disociante (urea 8M, clorhidrato de guanidina 6M o SDS al 2% p/v) ajustado hasta pH 7,5 con ácido nítrico para la extracción de gluteninas [19]. Las gluteninas se redujeron entonces con 2-mercaptoetanol al 5% p/v o ditiotreitól al 0,1% p/v durante 2 horas a temperatura ambiente. En otro ejemplo, se usó propanol al 50% v/v para extraer gliadinas, seguido de una mezcla de propanol al 50% v/v, urea 2M y ditiotreitól al 1% p/v en tampón Tris (pH 7,5) – extrayendo en un formato gradual por medio de ciclos de 2 minutos de agitación con vórtex, 10-20 minutos de agitación magnética y 15 minutos de centrifugación [32]. También se extrajeron gluteninas usando una mezcla de mercaptoetanol (al 2% p/v) y urea (2-8M) en tampón borato (pH 8,5), llevándose a cabo la extracción durante 60 minutos a temperatura ambiente seguido de 20 minutos de centrifugación [38]. En un procedimiento alternativo, se empleó una mezcla de agentes reductores y disociantes, que comprende urea 9,2M con ditiotreitól al 1,5% p/v, y se solubilizaron granos en esta mezcla durante la noche y posteriormente se centrifugaron durante 2 horas [47].

Adicionalmente, Wieser *et al* (1998) describieron un ensayo para evaluar la capacidad de extracción de proteínas de gluten en muestras de alimentos no procesados y procesados. Los autores de este artículo demuestran que para una extracción exhaustiva y completa de gliadinas de las muestras procesadas, es necesario usar un agente reductor y aumentar la temperatura. Usando estas

disoluciones, también demostraron la extracción conjunta de gluteninas y gliadinas [50]. En otro artículo de los mismos autores, se describe una composición para la extracción de gluteninas, que usa DTT, urea y propanol al 50% v/v, en tampón Tris-HCl (pH 7,5) [51]. Nicolas *et al* describen un protocolo en el que extraen  
5 secuencialmente las diversas proteínas encontradas en el gluten y para la extracción de gluteninas usan una mezcla de un agente disociante (SDS), un agente reductor (mercaptoetanol) en tampón tetraborato, pH 8,5 [53]. Huebner *et al* describen una extracción secuencial de gliadinas (usando 2 extracciones con etanol al 70% v/v) seguido de gluteninas (extraídas usando una mezcla de DTT y urea, o  
10 DTT y una combinación de urea y clorhidrato de guanidina, en tampón PBS, pH 7,7 [54]. Mamone *et al* describen la detección de gliadinas y gluteninas extraídas de diferentes variedades de trigo usando cromatografía de líquidos y espectrometría de masas por electropulverización. Para ello, se extraen las gliadinas con etanol al 70% y se extraen las gluteninas en 3 etapas usando una disolución de Tris-HCl,  
15 DTT, urea y propanol al 50% v/v, pH 7,5. También incluyen un procedimiento de reducción al que se expone posteriormente la fracción de glutenina durante 2 horas a 37°C, en el que la mezcla de extracción consiste en clorhidrato de guanidina, EDTA, DTT en tampón Tris-HCl, pH 7,5 [55].

Una publicación reciente implica la extracción con mercaptoetanol al 2% p/v  
20 y clorhidrato de guanidina 2 M durante 40 minutos a 50°C, seguido de una agitación rápida con vórtex y 1 hora de incubación a temperatura ambiente, y, finalmente, centrifugación [48]. El contenido de esta publicación es el objetivo de la patente ES 2182698 [49]. Dicha invención describe una composición que incluye un agente reductor, (por ejemplo, mercaptoetanol, DTT), un agente disociante (por ejemplo,  
25 clorhidrato de guanidina, SDS), en un tampón (PBS, Tris), de pH entre 7 y 8. Esta composición es útil para la extracción de gluten a partir de alimentos procesados y no procesados. La muestra de alimento se incuba con esta composición durante un periodo de tiempo que varía entre 30 y 60 minutos, a una temperatura entre 37°C y 50°C. Entonces se enfría la disolución hasta temperatura ambiente y se incuba con  
30 etanol (al 50-70% v/v).

Sin embargo, el documento ES 2182698 todavía no resuelve el problema en su totalidad por los siguientes motivos:

- Inconveniencia de uso: los agentes reductores, mercaptoetanol o DTT, reivindicados en el documento ES 2182698 son agentes tóxicos, nocivos  
35 y de olor acre, considerados no convenientes para su uso a diario por muchos usuarios.

- Las altas concentraciones en la invención reivindicada en el documento ES 2182698 afectan a la actividad de las enzimas marcadoras del ELISA y por tanto hacen imposible su uso en algunos tipos de ELISA, particularmente el uso de ensayos de competición para la detección de hidrolizados.
- Fiabilidad: parece que el procedimiento declarado en el documento ES 2182698 podría ser un patrón con el que comparar otros procedimientos; sin embargo no extrae de manera exhaustiva todo el gluten (gliadinas y gluteninas).
- La detección de hidrolizados de gluten ha demostrado ser, en general, insatisfactoria debido principalmente al hecho de que los hidrolizados peptídicos pequeños se reconocen mediante captura pero no mediante anticuerpos de detección posteriores, debido al impedimento estérico, requiriendo por tanto el uso de un ensayo competitivo en el que el marcador enzimático entre en contacto directo con el tampón de extracción, necesitando por tanto el uso de un tampón de extracción compatible.

Por consiguiente, no existen procedimientos fiables para la medición y extracción conjunta de prolaminas tóxicas en la celiaquía (gliadinas y gluteninas) en ambas formas, hidrolizada y no hidrolizada, en ambos procesados y no procesados por calor.

Algunos documentos recientes detallan otros protocolos de extracción. Una patente reciente, WO2007/104825, se refiere a un procedimiento para la extracción de gluten de productos alimenticios procesados por calor, que usa una composición constituida por una mezcla de un agente reductor (mercaptoetanol, DTT y mezclas de estos), y un agente desnaturizante (SDS, detergentes no iónicos tales como Tween, y mezclas de estos), en un tampón de pH 7-8. El protocolo consiste en mezclar e incubar la muestra a una temperatura de 30-70°C, durante 10-60 minutos, enfriando hasta temperatura ambiente. Los fragmentos desnaturizados y reducidos se disuelven en etanol (al 50-70% v/v), se centrifugan y el gluten extraído permanece en el sobrenadante [56]. Hurkman *et al*, extrajeron las diversas proteínas de la harina usando una mezcla de urea (2 M), glicerol (al 10% v/v), DTT (65 mM) en tampón Tris-HCl, pH 8,0 [57]. Dupont *et al* comparan diferentes procedimientos para la extracción secuencial de gliadinas y gluteninas, empleando propanol al 50% v/v, para extraer las gliadinas, y propanol al 50% v/v mezclado con DTT 25 mM para extraer las gluteninas. En ambos casos el tampón usado es Tris-

HCl, pH 8 [58].

Además, para ciertas muestras de alimento, es necesario realizar una etapa de desengrasado antes de la extracción de gluten (gliadinas y gluteninas). Informes previos indican el uso de éter de petróleo [22] o butanol [21] como agentes desengrasantes, con los que se mezclan las muestras durante 15 minutos, seguido de centrifugación durante 10 minutos.

Los agentes reductores usados en los procedimientos de extracción conocidos, tales como 2-mercaptoetanol y ditioneitol, son agentes reductores que contienen grupos sulfhidrilo que tienden a oxidarse y perder rápidamente su potencia y por tanto no son adecuados para el almacenamiento a largo plazo. Además presentan otras desventajas como la baja capacidad de reducción a pH alto y bajo, así como su toxicidad y mal olor [60].

La Tris(2-carboxietil)fosfina, TCEP, es un reductor identificado recientemente que se ha observado que proporciona una reducción altamente estable y eficaz de tioles de proteínas [59]. Una publicación reciente ha dado una idea general de la posibilidad de usar la TCEP soluble en agua como una alternativa atractiva a DTT y 2-ME [61]. Se ha demostrado que la TCEP es un mejor reductor que el DTT en medios neutros, ácidos y alcalinos [62]. La TCEP ha mostrado ser también un agente protector mucho más seguro para los compuestos de tiol en presencia de iones metálicos que el DTT y adicionalmente actúa como reductor y agente alquilante, eliminando por tanto la necesidad de agentes alquilantes tales como vinilpiridina.

Los alcoholes usados rutinariamente para la extracción de gliadinas, tales como etanol, tienen puntos de ebullición bajos, limitando por tanto la temperatura que puede aplicarse durante la extracción.

A la luz de los inconvenientes derivados de los procedimientos de extracción de gluten actuales, los autores de la presente invención han llevado a cabo un estudio de investigación a fondo para encontrar un procedimiento fiable para la extracción simultánea de gliadinas y gluteninas en alimentos procesados y no procesados.

Como resultado de dichos estudios, los autores han descubierto sorprendentemente que el uso de una composición constituida por un disolvente con alto punto de ebullición (superior a 100°C) y/o alta constante dieléctrica, en comparación con otros disolventes, mezclada con un agente que puede proporcionar la reducción irreversible de grupos disulfuro, en tampón a pH 4-9, llevándose a cabo la extracción a más de 50°C durante una duración de más de 2

minutos, facilita la disolución del gluten (gliadinas y gluteninas), dejando que se determine cuantitativamente el contenido en gluten (gliadinas y gluteninas) en bebidas y alimentos procesados por calor y no procesados por calor. No se requiere el uso de un agente disociante.

5 En base a estos avances, la presente invención es un procedimiento mucho más simplificado para la extracción simultánea de gliadinas y gluteninas a partir de alimentos crudos y procesados. La invención se basa en el uso de disolventes de altos puntos de ebullición y/o altas constantes dieléctricas, lo que facilita la aplicación de temperaturas elevadas durante el procedimiento de extracción, eliminando la necesidad del uso de un agente disociante.

10 Las características de la composición de la invención permiten llevar a cabo un procedimiento de extracción de gliadinas y gluteninas compatible con ELISA, lo que permite la extracción simultánea rápida y fiable del gluten (gliadinas y gluteninas) a partir de muestras de alimento no procesado y procesado por calor, y la detección de dicho gluten (gliadinas y gluteninas) en ambas formas, no hidrolizada e hidrolizada.

15 La composición de la invención para la extracción simultánea de gluten (gliadina y glutenina) de productos alimenticios no procesados y procesados por calor, presenta múltiples ventajas en comparación con aquellas composiciones usadas en el estado de la técnica. Así, esta composición no tiene mal olor y es respetuosa con el medio ambiente, a diferencia de los olores acres de los agentes reductores y disociantes usados en los procedimientos rutinarios.

20 Adicionalmente, la composición para la extracción de gluten (gliadina y glutenina) de ambos productos alimenticios, no procesados y procesados por calor, presenta una mayor estabilidad en almacenamiento, en comparación con cualquiera de las composiciones usadas rutinariamente a base de etanol o propanol, con cualquiera de los agentes reductores mercaptoetanol, ditiotreitól, y/o agentes disociantes urea, clorhidrato de guanidina, dodecilsulfato de sodio y mezclas de agentes disociantes y reductores con diferentes alcoholes.

30

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

35 **Figura 1.** Resumen de las variables estudiadas para la dilucidación del protocolo de extracción óptimo. C: Composición a estudiar: 1.25 ml de disolvente al x% v/v en x mM de tampón x, pH x con x% p/v de agente reductor x.

**Figura 2.** Extracción de prolaminas en presencia de diferentes disolventes

(al 60% v/v): extracción secuencial de gliadina (a) y glutenina (b), y extracción conjunta de gliadinas y gluteninas (c), las dos últimas en presencia de TCEP al 1% p/v. Las barras de error representan la DER de 6 extracciones llevadas a cabo en paralelo.

5           **Figura 3.** Electroforesis en gel de gliadinas y gluteninas extraídas usando diferentes disolventes al 60% v/v a) etanol y glicerol; b) propanol, DMSO, DMF, en presencia de TCEP al 1% p/v. Se llevaron a cabo cuatro extracciones tal como se muestra en los electroferogramas en gel.

10           **Figura 4.** Extracción conjunta frente a extracción secuencial de proteínas de gluten.

**Figura 5.** Efecto de la temperatura sobre la capacidad de extracción de las proteínas de gluten.

**Figura 6.** Extracción conjunta de proteínas de gluten en presencia de agentes reductores (TCEP, DTT) en glicerol al 60% v/v. (M: muestra)

15           **Figura 7.** Uso de agentes disociantes. (a) Ensayo que compara clorhidrato de guanidina o urea (1, 3 y 5 M) con glicerol al 60% con TCEP al 0,1% p/v en HEPES, pH 7,4 con glicerol al 60% con TCEP al 0,1% p/v en HEPES, pH 7,4 (b) Visualización del resultado en gel de electroforesis.

20           **Figura 8** (a) Electroforesis de diferentes agentes desengrasantes usados para someter a prueba su efecto sobre la extracción de las proteínas de gluten, (b) Extracción y detección de Bradford de proteína en harina sin desengrasado (No D), con desengrasado añadiendo inmediatamente la disolución de extracción tras la etapa de extracción con desengrasado sin secar la muestra (D+DS ext); sin desengrasado tras 24 horas (No D (24)); y desengrasado añadiendo disolución de extracción 24 horas más tarde, es decir, secando la muestra durante 24 h (D+Ds ext (24 h)).

25           **Figura 9.** Estudios de estabilidad de una disolución de extracción que incluye DTT (barra negra), TCEP (gris) o mercaptoetanol (blanca). 300 días de almacenamiento a temperatura ambiente (TA), 4°C y 37°C.

30           **Figura 10.** Compatibilidad de la composición de la invención con a) ensayos tipo sándwich y b) ensayos ELISA competitivos usando un anticuerpo frente al supuesto epítipo inmunodominante. Los resultados normalizados se presentan con B/Bo representando el valor de absorbancia obtenido a concentraciones específicas normalizado mediante la absorbancia obtenida a concentración cero.

35           **Figura 11.** Análisis de electroforesis en gel de gluten extraído a temperatura ambiente usando TCEP al 0,1% p/v en glicerol al 60% v/v con tampón HEPES 50

mM, pH 7 para (a) muestras no procesadas por calor (harina de trigo que contiene gluten cruda) y (b) muestras procesadas por calor ("base de pizza").

**Figura 12.** Gluten extraído en cada extracción a partir de muestras no procesadas por calor ("harina") y muestras procesadas por calor ("base de pizza"), llevándose a cabo la extracción a temperatura ambiente (i) o a 85°C (ii), con la cantidad extraída observada visualmente usando electroforesis (a) y representada por medio de cantidades absolutas (b).

**Figura 13.** Comparación de la extracción de proteínas de gluten usando (A) etanol al 60%, mercaptoetanol 250 mM, clorhidrato de guanidina 2 M, llevándose a cabo la extracción a temperatura ambiente; (B) etanol al 60%, mercaptoetanol 250 mM, clorhidrato de guanidina 2 M, llevándose a cabo la extracción a 60°C; (C) protocolo inventado (PI), extracción 1 (D) protocolo inventado (PI), extracción 2. a) gel de electroforesis y b) análisis de Bradford.

#### OBJETIVO DE LA INVENCION

Un objetivo principal de la invención se refiere a una composición constituida por un agente para la reducción irreversible de agentes de disulfuro y un disolvente con alto punto de ebullición y/o altas constantes dieléctricas en un tampón con un pH entre 4 y 9.

Otro objetivo de la invención es el procedimiento para la extracción simultánea de gliadinas y gluteninas, de muestras de alimento, procesado o no procesado por calor, de manera que sea compatible con ELISA, que comprende extraer el contenido en gliadinas y gluteninas en presencia de la composición definida en la presente invención, siendo la invención altamente reproducible, permitiendo una determinación cuantitativa del gluten extraído.

Finalmente, un tercer objetivo de la invención se refiere a un kit para cuantificar el contenido en gliadinas y gluteninas de muestras de alimento, procesados por calor y no procesados por calor, que comprende dicha composición.

#### DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una composición ("composición de la invención"), que consiste en un agente para la reducción irreversible de puentes disulfuro y un disolvente con alto punto de ebullición y/o alta constante dieléctrica, en una disolución tampón con un pH comprendido entre 4 y 9, tal como HEPES,

Tris-HCl, PBS, etc.

La composición de la invención permite la extracción conjunta de las prolaminas tóxicas en la celiacía (tanto gliadinas como gluteninas) de productos alimenticios no procesados y procesados por calor.

5 El agente que proporciona la reducción irreversible de grupos disulfuro es un agente reductor no tóxico, que no contiene grupos sulfhidrilo y por tanto no tiende a oxidarse, tal como tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP). La concentración de este agente reductor de grupos disulfuro que no contiene sulfhidrilo es ampliamente variable, requiriendo únicamente ser superior a 0,1 mM.

10 En una realización particular, el disolvente usado en la composición se selecciona de entre DMF, DMSO o glicerol, con una concentración comprendida entre el 30-70% v/v.

15 En otra realización particular, el agente reductor empleado es TCEP, el disolvente con alto punto de ebullición es DMSO, glicerol o DMF, y el tampón es HEPES o PBS, con un pH entre 4 y 9.

20 La composición de la invención es compatible con ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas competitivos (ELISA), que pueden detectar ambas formas, no hidrolizadas e hidrolizadas, de gluten (tanto gliadinas como gluteninas) y no tiene ningún efecto adverso sobre la cuantificación ELISA (competitivo o tipo sándwich) del contenido total en gluten tóxico en la celiacía de las muestras de alimento.

25 Otro aspecto principal de la invención se refiere a un procedimiento para la extracción simultánea, tanto de gliadinas como gluteninas, a partir de una muestra de alimento, procesado o no procesado por calor, denominado a partir de ahora "procedimiento de la invención", que comprende extraer el contenido en gluten (gliadina y gluteninas) de la muestra, en presencia de la composición de la invención.

30 En una realización particular, el procedimiento comprende a) mezclar la muestra de alimento con la composición de la invención, y b) incubar la mezcla resultante a una temperatura superior a 50°C, durante un periodo de tiempo superior a 2 minutos.

Este procedimiento permite ahorrar un tiempo considerable respecto a los procedimientos previamente descritos y no presenta diferencias en la capacidad de extracción, por lo que es adecuado como procedimiento de extracción combinada.

35 La muestra de alimento que va a analizarse se prepara mediante procedimientos rutinarios, cuando sea relevante. Se someten muestras de harina a

un procedimiento de muestreo representativo para garantizar la homogeneidad. Las muestras de alimento procesado se trituran, usando una mano de mortero y un mortero antes de la molienda, y la muestra triturada homogéneamente se pesa entonces de manera precisa.

5                   Posteriormente se introduce la composición de la invención en un tubo eppendorf, se cierra la tapa del tubo y se agita con vórtex durante un periodo de tiempo superior a 10 segundos. Entonces se deja reposar el tubo durante un periodo de tiempo superior a 10 segundos, antes de calentarse a una temperatura superior a 50°C, durante un periodo superior a 2 minutos, antes de centrifugarse a  
10                   una velocidad de un intervalo de al menos 3000 rpm, durante un periodo superior a 5 segundos. El sobrenadante, que contiene las gliadinas y gluteninas extraídas, se retira.

                    Una vez eliminado el sobrenadante, se vuelve a añadir opcionalmente la composición de la invención recién preparada y se repite el procedimiento descrito  
15                   anteriormente. Este procedimiento puede repetirse de dos a diez veces, hasta que se consigue la extracción completa de gluten (gliadinas y gluteninas).

                    En una realización particular, el procedimiento de la invención comprende el uso, durante la etapa de extracción, de un disolvente con alto punto de ebullición seleccionado entre DMSO, que tiene un punto de ebullición de 189°C, glicerol, que  
20                   tiene un punto de ebullición de 290°C, y DMF, que tiene un punto de ebullición de 153°C, permitiendo aplicar temperaturas elevadas (superiores a 50°C), facilitando y potenciando así la extracción del gluten (gliadinas y gluteninas).

                    En una realización particular, la extracción de gluten (gliadinas y gluteninas) se lleva a cabo con una disolución acuosa de DMSO, glicerol o DMF con TCEP, con una temperatura aplicada durante la extracción superior a 50°C, durante un  
25                   periodo de tiempo superior a 2 minutos.

                    La concentración de disolvente en la disolución acuosa puede variar dentro de un amplio intervalo y en una realización particular la disolución acuosa (de DMSO, glicerol o DMF) puede variar entre el 50% v/v y el 70% v/v.

30                   La concentración de TCEP en la disolución acuosa puede variar dentro de un amplio intervalo y en una realización particular la concentración de TCEP es superior a 0,1 mM.

                    El procedimiento de extracción también es compatible con un procedimiento de desengrasado previo, antes de la etapa de extracción. En una realización  
35                   particular, la muestra de alimento se desengrasa mezclando con acetona, se separa por la acetona (centrifugando o filtrando), dejando posteriormente que la

acetona se evapore y usando inmediatamente esta muestra desengrasada para el procedimiento de extracción.

El procedimiento de la presente invención puede usarse para extraer las gliadinas y gluteninas contenidas en una muestra de alimento procesado o no procesado por calor, seguido de la cuantificación de estas prolaminas mediante ELISA. Por tanto, en una realización particular del procedimiento de la invención, tras la extracción se lleva a cabo una etapa de cuantificación de las gliadinas y gluteninas extraídas usando ELISA (por ejemplo, técnica tipo sándwich o ELISA competitivo).

En el procedimiento de la invención, el uso de glicerol, DMSO o DMF y TCEP permite la aplicación de una temperatura elevada, lo que a su vez facilita la ruptura completa de los puentes disulfuro que se encuentran en las gliadinas procesadas por calor y gluteninas. En la primera extracción, se rompen los puentes disulfuro y aproximadamente el 85% de los fragmentos producidos se disuelven en la composición de la invención. En la segunda extracción y siguientes, los fragmentos restantes se disuelven en la composición de la invención. Sistemáticamente se observa que el 85% del gluten total se extrae en la primera extracción y el 15% restante en extracciones posteriores y se ha establecido una base de factor de correlación con respecto a esta observación de modo que sólo se requiere una extracción para la cuantificación de las gliadinas totales y tóxicas en la celiacía.

Este procedimiento es adecuado para análisis de alimentos, particularmente para productos alimenticios concebidos para personas que padecen celiacía y puede aplicarse a una extracción basada en un microsistema y una detección biosensorial posterior.

Finalmente, otro aspecto principal de la presente invención se refiere a un kit que comprende la composición de la invención y además todos aquellos reactivos necesarios para realizar un ELISA para cuantificar el contenido en gliadinas y gluteninas de muestras de alimento, procesado y no procesado por calor. El kit usa ensayos de ELISA competitivos o bien tipo sándwich, con anticuerpos desarrollados directamente frente a las gluteninas HMW y el epítipo inmunodominante putativo de gliadina.

## EJEMPLOS

Se llevaron a cabo muchos experimentos previamente, dando como

resultado el procedimiento de la invención. En los ejemplos 1-4 se muestran diferentes realizaciones del procedimiento de la invención a muestras no tratadas por calor, tratadas por calor e hidrolizadas. En un trabajo de desarrollo inicial se cuantificó la proteína total extraída usando un ensayo de Bradford y se visualizó usando electroforesis en gel. Se muestra un resumen del esquema de extracción en la figura 1.

*Ensayo de Bradford:* Usando el kit Coomassie Plus Bradford de Pierce, se añadieron 150  $\mu$ l de extracto a 150  $\mu$ l de reactivo Coomassie Plus en un pocillo de microplacas y se mezclaron bien antes de incubar brevemente y medir la absorbancia a 560 nm. Se estimaron las concentraciones de proteínas mediante referencia a la absorbancia obtenida para una serie de diluciones de proteína convencionales, que varían entre 50  $\mu$ g/ml y 0  $\mu$ g/ml (patrón de gliadina para gliadinas y gluteninas, patrón de BSA para albúminas y globulinas), que se sometieron a ensayo junto con las muestras desconocidas.

*Electroforesis en gel:* Para la electroforesis se hicieron precipitar las muestras con la mitad del volumen de TCA al 30% p/v durante 1 h a 4°C. Tras centrifugación a 14000 rpm durante 10 minutos, se lavaron los residuos de muestra 3 veces con 200  $\mu$ l de acetona y se secaron a vacío (<2 h). Tras la reconstitución en 10-20  $\mu$ l de tampón de corrida SDS, se calentaron las muestras hasta 95°C durante 5-8 minutos. Se cargaron las muestras en geles desnaturalizantes de acrilamida (resolución al 12%, concentrados al 4% preparados en tampón Tris-SDS pH 8,8 y pH 6,8, respectivamente) preparadas en tampón Tris-SDS pH 6,5. Se hicieron pasar los geles en el mismo tampón Tris-SDS pH 8,3 en un equipo de electroforesis en agarosa Sub-cell GT de BioRad a temperatura ambiente (aplicando una constante de 100-120 V para el gel 10 V/cm). Se llevó a cabo una tinción mediante la inmersión de los geles en BioSafe Coomassie (BioRad). Se tomaron imágenes de los geles usando un analizador de imágenes GelDoc™ EQ (BioRad).

En un primer experimento, los autores de la invención compararon los diferentes disolventes (al 60% v/v) para determinar la capacidad de extracción de las proteínas de gluten a temperatura ambiente (figura 2). La figura muestra los valores obtenidos para cada disolvente para la extracción secuencial de gliadina (a) y glutenina (b), y finalmente la extracción conjunta de gliadinas y gluteninas (c), las últimas dos en presencia de TCEP al 1% p/v (las barras de error representan la desviación estándar relativa (DER) de 6 extracciones llevadas a cabo en paralelo).

Los resultados del experimento mostraron que el DMSO y DMF eran los

disolventes óptimos para la extracción de gliadinas; mientras que el glicerol era el disolvente óptimo para la extracción de gluteninas, cuando cada una de las gliadinas y gluteninas se extrajeron secuencialmente. Cuando se extrajeron simultáneamente las prolaminas, cualquiera de DMSO, DMF o glicerol era óptimo, especialmente cuando se tiene en consideración su punto de ebullición, lo que permite una extracción significativamente potenciada, especialmente de gluteninas HMW.

Tabla 1. Efecto de diferentes disolventes en la extracción de proteínas de gluten (secuencial y simultánea)

|                     | <b>Gliadinas (mg)</b> | <b>Gluteninas (mg)</b> | <b>Suma</b> | <b>Extracción conjunta</b> |
|---------------------|-----------------------|------------------------|-------------|----------------------------|
| <b>Etanol</b>       | 9,3                   | 6,19                   | 15,49       | 14,17                      |
| <b>Glicerol</b>     | 10,04                 | 7,7                    | 17,74       | 17,44                      |
| <b>Metanol</b>      | 6,3                   | 4,1                    | 10,4        | 11,15                      |
| <b>Propanol</b>     | 10,6                  | 6,5                    | 17,1        | 14,85                      |
| <b>DMSO</b>         | 12,1                  | 4,86                   | 16,96       | 16,63                      |
| <b>DMF</b>          | 11,4                  | 4,75                   | 16,15       | 16,3                       |
| <b>Etilenglicol</b> | 9,12                  | 3,87                   | 12,99       | 13,4                       |

Se visualizaron las gliadinas y gluteninas extraídas usando el 60% v/v de diversos disolventes en presencia de TCEP al 1% p/v, a temperatura ambiente en electroforesis en gel (figura 3), cuando puede visualizarse la capacidad de extracción del disolvente para que sea glicerol >DMF > DMSO > etanol > propanol.

En un segundo experimento, se comparó la extracción conjunta frente a la extracción secuencial de proteínas de gluten usando agua y NaCl 0,4 M en  $\text{HNa}_2\text{PO}_4$  0,067 M, para globulinas y albúminas, respectivamente. Se extrajeron las gliadinas con glicerol al 60% p/v y las gluteninas usando glicerol al 60% v/v en HEPES 50 mM pH 7,4 con TCEP al 0,1% p/v en HEPES 50 mM pH 7,4. Se extrajo cada proteína pesando 125 mg de muestra, añadiendo 1,25 ml de disolución de extracción, mezclando en el termomezclador a 40°C durante 20 minutos a 1.400 rpm y centrifugando durante 3 minutos a 12.000 rpm.

Tal como puede observarse en la figura 4, no se observó ninguna diferencia en la capacidad de extracción entre la extracción simultánea y la secuencial.

En otro experimento, se sometió a ensayo el efecto de la temperatura sobre la capacidad de extracción de las prolaminas (figura 5). Se mostró la necesidad de

una temperatura elevada para la extracción de gluten a partir de muestras procesadas por calor, con una temperatura de 85°C, siendo óptimo usar glicerol como disolvente y TCEP como agente reductor.

En otro experimento, se analizó la extracción conjunta de proteínas de gluten en presencia de TCEP o DTT, en glicerol al 60% v/v. Se extrae la proteína pesando 125 mg de muestra, añadiendo 1,25 ml de la composición de la invención. Tras la extracción durante 7 minutos a 85°C, se centrifugó el sedimento durante 3 minutos a 12.000 rpm y se usó el sobrenadante para el análisis por electroforesis (figura 6). Este ensayo demostró las diferencias entre el uso de diferentes agentes reductores, y tal como puede observarse, la TCEP es un agente reductor más eficaz. Esto se debe al hecho de que el punto de ebullición del DTT es 125°C, del 2-ME es 157°C, considerablemente inferior al de la TCEP, que es de 330°C (por tanto, la TCEP puede retener más actividad a la temperatura de extracción aplicada de 85°C).

En otro experimento, se sometió a ensayo el uso de agentes disociantes (figura 7). Se desarrolló un ensayo que comparaba clorhidrato de guanidina o urea (1, 3, 5 M) con glicerol al 60% con TCEP al 0,1% p/v en HEPES, pH 7,4 con glicerol al 60% con TCEP al 0,1% p/v en HEPES, pH 7,4. Se llevaron a cabo las extracciones pesando 125 mg de muestra, añadiendo 1,25 ml de disolución de extracción, mezclando en el termomezclador a 40°C durante 20 minutos a 1400 rpm y centrifugando durante 3 minutos a 12,000 rpm (figura 7 (a)). Se visualizaron los resultados en un gel de electroforesis (figura 7 (b)).

Este ensayo demostró que en el procedimiento de la invención, la adición de agentes disociantes no da como resultado una extracción adicional de gluten a partir de productos alimenticios crudos o cocinados, ya que el uso de una temperatura elevada es suficiente para extraer de manera exhaustiva el gluten.

En otro experimento, se sometió a prueba el uso de agentes desengrasantes. Se llevó a cabo una electroforesis de diferentes agentes desengrasantes usada para someter a prueba su efecto sobre la extracción de las proteínas de gluten (figura 8(a)). Se pesaron 125 mg de la muestra y se añadieron a 1,25 ml de cada agente desengrasante. Tras agitar con vórtex durante 30 segundos, se dejó sedimentar la disolución durante 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó durante 15 minutos y se llevó a cabo la electroforesis de manera normal. Se desarrolló una extracción y detección de Bradford de las proteínas en harina después de la etapa de extracción con desengrasado sin secar la muestra, secando la muestra durante 24 h (figura 8 (b)). Se llevó a cabo el

procedimiento de extracción pesando la muestra (75 mg), añadiendo 0,75 ml de disolución de extracción, agitando con vórtex durante 30 segundos, mezclando en un termomezclador a 1.400 rpm a 85°C y centrifugando durante 3 minutos a 12.000 rpm a temperatura ambiente.

5 Se mostró que la acetona no extraía las gliadinas o gluteninas, y puede usarse por tanto como un agente desengrasante. Los resultados también mostraron que el desengrasado puede ir seguido directamente de extracción, sin necesidad de secar la muestra.

10 Además se llevaron a cabo estudios de estabilidad de la disolución de extracción usando DTT, mercaptoetanol o TCEP, y glicerol al 60% (v/v) en tampón, usando 125 mg de harina en 1,25 ml de disolución de extracción. Se almacenaron tres disoluciones de extracción a TA, 4°C y 37°C (figura 9). Estos estudios dan una idea general de la estabilidad en tiempo real a TA y 4°C y la estabilidad acelerada (a 37°C) del cóctel de extracción con DTT/2-ME o bien glicerol al 60% v/v, en  
15 tampón HEPES 50 mM, pH 7,4, y la TCEP es marcadamente más estable cuando se almacena a 4°C.

Finalmente, en ensayo ELISA desarrollado por los autores, basado en usar anticuerpos frente al epítipo inmunodominante putativo (figura 10) demostró que la disolución de extracción de la invención es extremadamente compatible con ELISA  
20 tanto tipo sándwich como competitivo. Los resultados mostrados en la figura 10 se normalizan relacionando la absorbancia a una concentración de gliadina dada, con la absorbancia obtenida a concentración cero en el caso del ensayo competitivo, o con la absorbancia obtenida a una concentración máxima (por ejemplo 1 µg/ml) en el caso del ensayo tipo sándwich. En ambos ensayos, el tampón de extracción es  
25 completamente compatible a diluciones de 1 en 5 y superiores.

#### **Ejemplo 1. Recuperación de gluten a partir de alimentos no tratados por calor**

30 Se llevó a cabo este experimento para mostrar la eficacia del procedimiento de la invención en la extracción de gluten a partir de alimentos no tratados por calor.

#### *Preparación de muestras dopadas*

35 Se llevaron a cabo estudios con adiciones conocidas con muestras crudas para comprobar la eficacia de los protocolos de extracción desarrollados. A harina de maíz se realizaron adiciones conocidas de gliadina del grupo de trabajo de prolamina IRMM-480 en un intervalo de concentraciones desde 20 ppm hasta 800

ppm. Entonces se usó un ELISA para cuantificar la gliadina extraída usando gliadina IRMM-480 como patrón, ya que ésta había sido la gliadina que se había usado para realizar adiciones conocidas a las muestras. Los patrones usados variaron entre 25 ppm y 1,56 ppm y por tanto fue necesario diluir las muestras con adiciones conocidas para que estuvieran dentro de este intervalo. Las diluciones de muestra empleadas se muestran en la tabla 2:

Tabla 2. Diluciones de muestra

|                |          | 1ª extracción | 2ª extracción |
|----------------|----------|---------------|---------------|
| Muestra dopada | 0 ppm:   | 1/150         | 1/50          |
| Muestra dopada | 20 ppm:  | 1/300         | 1/100         |
| Muestra dopada | 50 ppm:  | 1/800         | 1/200         |
| Muestra dopada | 100 ppm: | 1/1600        | 1/400         |
| Muestra dopada | 200 ppm: | 1/3000        | 1/800         |
| Muestra dopada | 400 ppm: | 1/6000        | 1/1600        |
| Muestra dopada | 800 ppm: | 1/12000       | 1/3000        |

10 *Procedimiento para la extracción simultánea de gluten a partir de alimentos no tratados por calor*

Para llevar a cabo el procedimiento, se introdujeron 125 mg de muestra homogeneizada en un tubo eppendorf. Posteriormente, 1,25 ml de la composición del procedimiento, compuesta por TCEP al 0,1% p/v en glicerol al 60% v/v con tampón HEPES 50 mM, pH 7,4 seguido de una agitación con vórtex rápida de 30 segundos a 2500 rpm (VELP Scientifica, Madrid, España). Entonces se cerraron los tubos y se sellaron con Parafilm que evitar cualquier pérdida debida a evaporación y se mezclaron en un termomezclador a 95°C durante 5 minutos (modelo Thermomixer Compact), antes de centrifugarse finalmente (Eppendorf modelo 5417R) a 12.000 rpm a temperatura ambiente durante 3 minutos. Por tanto, la extracción pudo completarse en menos de 10 minutos.

Entonces se transfirió el sobrenadante a tubos eppendorf de polisulfona limpios para el análisis usando ELISA.

Se preparó tampón HEPES, pH 7,4 añadiendo 4 g de NaOH de Panreac (VidraFoc, Tarragona, España) a 1,19 g de HEPES (Sigma, Barcelona, España), en 100 ml de agua Millipore.

Se prepara la composición compuesta por TCEP al 0,1% p/v y tampón

HEPES 50 mM, por ejemplo, pesando 286,65 mg de TCEP.HCl en 10 ml de tampón HEPES 50 mM y añadiendo entonces esto a una disolución preparada previamente de 60 ml de glicerol con 30 ml de tampón HEPES 50 mM, hasta un volumen final de 100 ml, con TCEP al 0,01% p/v en glicerol al 60% v/v en HEPES 50 mM, pH 7,4.

5

### *Resultados*

Se requirieron dos etapas de extracción para la extracción completa de gluten a partir de productos alimenticios crudos y se llevó a cabo un estudio para observar si había un factor de correlación entre la cantidad de proteína extraída en la primera extracción y la proteína extraíble total. En un estudio de 100 muestras, se observó que la proteína extraída en la primera extracción era el 86,5% de la proteína extraíble total, con un % de desviación estándar relativa (DER) de 1,28 para n=100, lo que sugiere que podía emplearse una extracción y usarse un factor de correlación para extrapolar la proteína total presente en la muestra. Es por tanto recomendable llevar a cabo dos extracciones o usar el factor de correlación de 1,16 (es decir multiplicar el valor de la cantidad de proteína extraída en el primer extracto por 1,16) para extrapolar la proteína extraída en la primera extracción con respecto a la cantidad total de proteína extraíble.

La tabla 3 muestra el porcentaje de recuperación conseguido con las muestras de harina de maíz a las que se habían realizado adiciones conocidas de PWG y que oscila de manera aceptable entre el 99% y el 108% (particularmente si se permite un error de  $\pm 15\%$  asociado comúnmente con la detección mediante ELISA).

**Tabla 3** *Porcentaje de recuperación de muestras crudas de harina de maíz con adiciones conocidas*

| Nivel de dopaje en gliadina (ppm) | Concentración de proteína extraída y detectada (ppm) | Porcentaje de recuperación (%) |
|-----------------------------------|--|--------------------------------|
| 20                                | 21,50  | 107,50                         |
| 50                                | 53,11  | 106,22                         |
| 100                               | 99,99  | 99,99                          |
| 200                               | 195,96   | 97,98                          |
| 400                               | 430,96   | 10,74                          |
| 800                               | 796,14   | 99,52                          |

**Ejemplo 2. Recuperación de gluten a partir de alimentos tratados por calor**

Se llevó a cabo este experimento para demostrar que en ausencia de un agente disociante, se requiere un aumento en la temperatura por encima de los 80°C, necesitando por tanto el uso de un disolvente con altas temperatura de ebullición. Se llevó a cabo la demostración usando muestras procesadas por calor preparadas (a) a partir de harina que contiene gluten y (b) harina de maíz.

*Materiales*

- Muestras procesadas por calor a partir de harina que contiene gluten

Se prepararon muestras procesadas por calor a partir de harina que contiene gluten añadiendo 5 ml de agua destilada a 10 mg de muestra cruda, es decir harina de trigo. Se mezcló a mano la disolución hasta que se obtuvo una masa flexible. Se estiró la masa usando un rodillo manual hasta un espesor de 2 mm y se cocinó en un horno precalentado durante 10 minutos a 180°C. Tras el enfriamiento, se molieron las muestras cocinadas con una batidora durante 3 minutos hasta que se obtuvo un polvo homogéneo de muestra procesada por calor.

- Muestras procesadas por calor a partir de harina de maíz sin gluten a la que se realizaron dopajes con gliadina IRMM-480 (IRMM = Institute for Reference Materials and Measurements)

Se realizaron adiciones conocidas de diferentes cantidades de gliadina IRMM-480 a harina de maíz blanco precocinado (P.A.N. Venezuela), que se esperaba que estuviera sin gluten. Para 0, 20, 50, 100, 200, 400, 800 ppm de gliadina en harina, se añadieron respectivamente, 0, 1, 2,5, 5, 10, 20 y 40 mg de gliadina PWG IRMM-480 a harina de maíz hasta que se obtuvo una cantidad final de 50 g. Brevemente, se añadió la harina, muy gradualmente, a la gliadina pesada y se mezcló meticulosamente durante 10 minutos con una mano de mortero y un mortero con el fin de obtener la mezcla más homogénea posible. Una vez que se obtuvieron muestras con adiciones conocidas representativas, se añadieron 10 mg de muestra a 5 ml de agua destilada, y se mezclaron a mano hasta que se obtuvo una masa flexible. Entonces se estiró la masa usando un rodillo de mano hasta un espesor de aproximadamente 2 mm, y entonces se cocinó a 180°C durante 10 minutos. Cuando las muestras procesadas por calor estaban frías, se molieron durante 3 minutos usando una mezcladora comercial Moulinex, hasta que se obtuvo un polvo homogéneo de la muestra procesada por calor.

*Procedimiento de la invención*

Para llevar a cabo el procedimiento, se introdujeron 125 mg de muestra homogeneizada en un tubo eppendorf. Posteriormente, 1,25 ml de la composición del procedimiento, compuesta por TCEP al 0,1% p/v en glicerol al 60% v/v con  
5 tampón HEPES 50 mM, pH 7,4 seguido de una agitación con vórtex rápida de 30 segundos a 2500 rpm (VELP Scientifica, Madrid, España). Entonces se cerraron los tubos y se sellaron con Parafilm para evitar cualquier pérdida debido a evaporación y se mezclaron en un termomezclador a 95°C durante 5 minutos (modelo Thermomixer Compact), antes de centrifugarse finalmente (Eppendorf modelo  
10 5417R) a 12.000 rpm a temperatura ambiente durante 3 minutos. Por tanto, la extracción pudo completarse en menos de 10 minutos.

Entonces se transfirió el sobrenadante a tubos eppendorf de polisulfona limpios para su análisis usando ELISA.

Se preparó tampón HEPES, pH 7,4 añadiendo 4 g de NaOH de Panreac  
15 (VidraFoc, Tarragona, España) a 1,19 g de HEPES (Sigma, Barcelona, España), en 100 ml de agua Millipore.

Se prepara la composición compuesta por TCEP al 0,1% p/v y tampón HEPES 50 mM, por ejemplo, pesando 286,65 mg de TCEP.HCl en 10 ml de tampón HEPES 50 mM, y añadiendo entonces esto a una disolución preparada previamente  
20 de 60 ml de glicerol con 30 ml de tampón HEPES 50 mM, hasta un volumen final de 100 ml, con TCEP al 0,01% p/v en glicerol al 60% v/v en HEPES 50 mM, pH 7,4.

*Resultados*

- Efecto de la temperatura sobre la extracción de muestras no procesadas por calor  
25 y procesadas por calor

Se llevó a cabo un análisis de electroforesis en gel del gluten extraído a temperatura ambiente usando TCEP al 0,1% p/v en glicerol al 60% v/v con tampón HEPES 50 mM, pH 7 para muestras no procesadas por calor (harina de trigo cruda que contienen gluten) y muestras procesadas por calor (la misma harina de trigo  
30 que contiene gluten preparada como base de pizza y cocinada a 180°C durante 10 minutos).

La figura 11 muestra el requisito para aumentar la temperatura de extracción para extraer eficazmente a partir de muestras procesadas por calor. A temperatura ambiente, se extrajo el gluten en dos extracciones a partir de harina que contiene  
35 gluten no procesada por calor. Sin embargo, para las muestras procesadas por calor ("base de pizza"), tras 13 extracciones el gluten no se había extraído

completamente, liberándose sólo una pequeña fracción del gluten para cada extracción.

En la figura 12, se representa el gluten extraído en cada extracción a partir de muestras no procesadas por calor (“harina”) y procesadas por calor (“base de pizza”), llevándose a cabo la extracción a temperatura ambiente (a) o a 85°C (b). Se consiguió la extracción completa a 85°C con sólo dos extracciones.

Se mostró que aumentando la temperatura de extracción desde temperatura ambiente hasta 85°C, el gluten total puede extraerse de ambas muestras de alimento, crudo y procesado por calor, en las primeras dos extracciones.

- Número de extracciones y factor de correlación

Se requieren dos extracciones para la extracción completa del gluten a partir de productos alimenticios cocinados, tal como en el caso de los productos alimenticios crudos, extrayéndose más gluteninas HMW en la segunda extracción. De nuevo, tal como en el caso de los productos alimenticios crudos, hay un factor de correlación entre la cantidad de proteína extraída en la primera extracción con respecto a la proteína extraíble total, que es 58,1, n=400, % de DER= 7,87. Por tanto, para las muestras cocinadas, el factor de correlación requiere multiplicar el valor de la cantidad extraída en el primer extracto por 1,72.

- Recuperación de gluten a partir de harina de maíz procesada por calor a la que se le ha añadido de manera conocida gluten

La tabla 4 muestra el porcentaje de recuperación conseguido con las muestras de harina de maíz a las que se le ha añadido de manera conocida PWG, y que oscila de manera aceptable entre el 96% y el 111% (particularmente si se permite un error del  $\pm 15\%$  asociado comúnmente con la detección de ELISA).

**Tabla 4** Porcentaje de recuperación de muestras de harina de maíz con adiciones conocidas procesadas por calor

| Concentración de gliadina (dopaje) (ppm) | Concentración de proteína extraída y detectada (ppm) | Porcentaje de recuperación (%) |
|--|--|--------------------------------|
| 20                                       | 22,27  | 111,35                         |
| 50                                       | 48,26  | 96,52                          |
| 100                                      | 97,24  | 97,24                          |
| 200                                      | 201,34   | 100,67                         |

|     |        |        |
|-----|--------|--------|
| 400 | 423,86 | 105,97 |
| 800 | 797,22 | 99,65  |

**Ejemplo 3. Comparación del procedimiento de la invención con el protocolo de extracción de la patente ES2182698**

5 El objetivo de este ejemplo es comparar la eficacia de la extracción del protocolo y la composición inventados (protocolo de extracción A) con el procedimiento y el protocolo descritos en la solicitud de patente ES2182698 (protocolo de extracción B).

10 *Materiales*

Preparación de muestras con adiciones conocidas (sin gluten): Se prepararon muestras con adiciones conocidas mezclando diferentes concentraciones de gliadina PWG diluida en etanol al 60% v/v con harina de trigo Maizena. Para 0, 20, 25, 50, 100, 150 ppm de gliadina en harina, se diluyeron 0, 1, 1,25, 2,5, 5, 7,5 mg de gliadina PWG en 25 ml de etanol 60% v/v en HEPES 50 mM pH 7,4 y se mezclaron con la harina de maíz alcanzando un total de 50 g de sólidos en los 25 ml. Tras una homogeneización meticulosa, se secaron las muestras a temperatura ambiente. Se extrajeron las muestras con adiciones conocidas usando el protocolo de extracción A y B, y se analizaron usando el kit Ingezim Gluten ELISA.

20 Preparación de muestras procesadas por calor a partir de harina de trigo que contiene gluten: Se prepararon muestras procesadas por calor a partir de harina que contiene gluten añadiendo 5 ml de agua destilada a 10 mg de muestra cruda, es decir harina de trigo. Se mezcló a mano la disolución hasta que se obtuvo una masa flexible. Se estiró la masa usando un rodillo manual hasta un espesor de 25 2 mm y se cocinó en un horno precalentado durante 10 minutos a 180°C. Tras el enfriamiento, se molieron las muestras cocinadas con una batidora durante 3 minutos hasta que se obtuvo un polvo homogéneo de muestras procesada por calor.

30 Procedimiento

Protocolo de extracción A: Se introdujeron 125 mg de muestra homogeneizada en un tubo eppendorf. Posteriormente, 1,25 ml de la composición del procedimiento, compuesta por TCEP al 0,1% p/v en glicerol al 60% v/v con

tampón HEPES 50 mM, pH 7,4 seguido de una agitación con vórtex rápida de 30 segundos a 2500 rpm (VELP Scientifica, Madrid, España). Entonces se cerraron y se sellaron los tubos con Parafilm para evitar cualquier pérdida debido a evaporación y se mezclaron en un termomezclador a 95°C durante 5 minutos (modelo Thermomixer Compact), antes de centrifugarse finalmente (Eppendorf modelo 5417R) a 12.000 rpm a temperatura ambiente durante 3 minutos. Por tanto, pudo completarse la extracción en menos de 10 minutos.

El protocolo de extracción B consistía en pesar 250 mg de muestra y añadir 2,5 ml de 2-mercaptoetanol 250 mM y clorhidrato de guanidina 2 M en etanol al 80% v/v y agitar con vórtex durante 5 segundos. Tras mezclar durante 1 hora a temperatura ambiente, se añadieron 7,5 ml de etanol al 80% v/v en H<sub>2</sub>O desionizada, se mezclaron durante 1 hora más y se centrifugaron durante 10 minutos a 12000 rpm.

Para ambos protocolos de extracción, se transfirió entonces el sobrenadante a tubos eppendorf de polisulfona limpios para su análisis usando ELISA.

Se preparó tampón HEPES, pH 7,4 añadiendo 4 g de NaOH de Panreac (VidraFoc, Tarragona, España) a 1,19 g de HEPES (Sigma, Barcelona, España), en 100 ml agua Millipore.

Se preparó la composición del protocolo de extracción A compuesta por TCEP al 0,1% p/v y tampón HEPES 50 mM, por ejemplo, pesando 286,65 mg de TCEP.HCl en 10 ml de tampón HEPES 50 mM, y añadiendo entonces esto a una disolución preparada previamente de 60 ml de glicerol con 30 ml de tampón HEPES 50 mM, hasta un volumen final de 100 ml, con TCEP al 0,01% p/v en glicerol al 60% v/v en HEPES 50 mM, pH 7,4.

También se intentó aumentar la temperatura de extracción de la primera etapa del protocolo de extracción B, hasta la misma temperatura que la usada en el protocolo de extracción A (por ejemplo 85°C), pero debido al bajo punto de ebullición del etanol sólo pudo aumentarse la temperatura hasta 60°C.

### *Resultados*

Comparando el porcentaje de recuperación a partir de muestras procesadas por calor, conseguida usando los protocolos de extracción, y analizándolas usando un kit comercial de ELISA R5 Sandwich, que detecta una secuencia de pentámeros repetida encontrada en la gliadina, las recuperaciones son comparables, demostrando el procedimiento de esta invención una mejor recuperación a concentraciones inferiores.

**Tabla 5** Comparación de la recuperación de extracción usando el procedimiento de la invención y la invención según el documento US2004/0137137A1

| <b>PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN A</b>                |   |                                       |
|---|---|---------------------------------------|
| <b>Concentración de gliadina (dopaje) (ppm)</b> | <b>Concentración de proteína extraída y detectada (ppm)</b> | <b>Porcentaje de recuperación (%)</b> |
| 0,00  | 0,48  | -                                     |
| 20,00   | 18,58   | 92,90                                 |
| 25,00   | 27,37   | 109,48                                |
| 50,00   | 55,22   | 110,44                                |
| 100,00  | 96,97   | 96,97                                 |
| 150,00  | 165,10  | 110,07                                |
| <b>PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN B</b>                |   |                                       |
| <b>Concentración de gliadina (dopaje) (ppm)</b> | <b>Concentración de proteína extraída y detectada (ppm)</b> | <b>Porcentaje de recuperación (%)</b> |
| 0,00  | 0,59  | -                                     |
| 20,00   | 13,46   | 67,30                                 |
| 25,00   | 25,24   | 100,96                                |
| 50,00   | 44,48   | 88,96                                 |
| 100,00  | 95,34   | 95,34                                 |
| 150,00  | 142,62  | 95,08                                 |

5

Adicionalmente, se comparó la extracción a partir de muestras procesadas por calor usando el análisis de Bradford y electroforesis. Para esta demostración se usó harina de trigo que contiene gluten para preparar muestras procesadas por calor. Tal como se muestra en la figura 13.a), se extrajo casi tres veces más proteína (en términos de proteína total) usando el protocolo de extracción A, que extrae 4,21 mg de una muestra de 25 mg de base de pizza en comparación con los 1,47 mg extraídos usando el protocolo de extracción B. De la manera más probable esto no se mide usando el ELISA Ingezim R5 Sandwich, ya que la principal diferencia en lo que está extrayéndose es principalmente gluteninas LMW y HMW.

10

Se comparó también el efecto de aumentar la temperatura de extracción del protocolo B y, tal como se muestra en la figura 13.a), se consiguió una extracción de las gluteninas HMW potenciada, extrayéndose 2,66 mg de proteína total en comparación con los 1,47 mg extraídos a temperatura ambiente.

5           Se llevó a cabo la electroforesis de extracción de proteínas de gluten (figura 13.a) out usando (A) etanol al 60%, mercaptoetanol 250 mM, clorhidrato de guanidina 2 M, llevándose a cabo la extracción a temperatura ambiente (B) etanol al 60%, mercaptoetanol 250 mM, clorhidrato de guanidina 2 M, llevándose a cabo la extracción a 60°C y (C) protocolo inventado, extracción 1 (D) protocolo inventado, extracción 2.

#### **Ejemplo 4. Extracción de gluten en de muestras sin gluten disponibles comercialmente e hidrolizados de gluten**

15           *Materiales*

Las muestras comerciales estudiadas pueden dividirse en cuatro grupos:

- Muestras que contienen gluten
- Muestras de alimento sin gluten
- Muestras de alimento sin gluten que requieren desengrasado
- 20           - Hidrolizados de gluten

Se tomaron cinco muestras de diferentes partes de la muestra de alimento y se combinaron hasta una cantidad de 1 g, homogeneizando a continuación meticulosamente con una batidora. Entonces se usó un muestreo representativo para proporcionar una muestra homogénea, para su análisis.

Desengrasado de muestras: En el caso de las muestras que requerían desengrasado, se añadieron 1,25 ml de acetona a la muestra homogeneizada (125 mg) y se agitaron con vórtex durante 30 segundos a temperatura ambiente, se dejaron sedimentar durante 5 minutos y se centrifugaron durante 15 minutos a 14000 rpm a temperatura ambiente. Inmediatamente tras el desengrasado se aplicó el sedimento obtenido tras la centrifugación al procedimiento de la invención.

Se introdujeron 125 mg de muestra homogeneizada en un tubo eppendorf. Posteriormente, 1,25 ml de la composición del procedimiento, compuesta por TCEP al 0,1% p/v en glicerol al 60% v/v con tampón HEPES 50 mM, pH 7,4 seguido de una agitación con vórtex rápida de 30 segundos a 2500 rpm (VELP Scientifica, Madrid, España). Entonces se cerraron los tubos y se sellaron con Parafilm para

evitar cualquier pérdida debido a evaporación y se mezclaron en un termomezclador a 95°C durante 5 minutos (modelo Thermomixer Compact), antes de centrifugarse finalmente (Eppendorf modelo 5417R) a 12.000 rpm a temperatura ambiente durante 3 minutos. Por tanto, pudo completarse la extracción en menos de 10 minutos.

Entonces se transfirió el sobrenadante a tubos eppendorf de polisulfona limpios para su análisis usando ELISA. Se preparó tampón de pH 7,4 añadiendo 4 g de NaOH de Panreac (VidraFoc, Tarragona, España) a 1,19 g de HEPES (Sigma, Barcelona, España), en 100 ml de agua Millipore. Se prepara la composición del protocolo de extracción A compuesta por TCEP al 0,1% p/v y tampón HEPES 50 mM, por ejemplo, pesando 286,65 mg de TCEP.HCl en 10 ml de tampón HEPES 50 mM, y añadiendo entonces esto a una disolución preparada previamente de 60 ml de glicerol con 30 ml de tampón HEPES 50 mM, hasta un volumen final de 100 ml, con TCEP al 0,01% p/v en glicerol al 60% v/v en HEPES 50 mM, pH 7,4.

**Tabla 6.** Gliadina extraída y detectada usando un ELISA propio

| <b><i>Muestras que contienen gluten (desengrasadas)</i></b> | <b>Concentración de gliadina (ppm)</b> |
|---|--|
| Bizcocho  | >10000                                 |
| Salsa barbacoa  | 363,74                                 |
| Yogur con sabor a galleta                                   | 95,64                                  |
| Yogur con sabor a fresa                                     | 46,13                                  |
| Mayonesa ligera   | 115,78                                 |

| <b><i>Muestras sin gluten (no desengrasadas)</i></b> | <b>Concentración de gliadina (ppm)</b> |
|--|--|
| Mermelada de melocotón                               | 1,01                                   |
| Crema de vinagre balsámico                           | 0,88                                   |

| <b><i>Muestras sin gluten (desengrasadas)</i></b> | <b>Concentración de gliadina (ppm)</b> |
|---|--|
| Margarina vegetal                                 | 1,16                                   |
| Nata montada                                      | 7,13                                   |
| Queso rallado                                     | 1,59                                   |
| Aperitivos de patata                              | 0,89                                   |

|                       |      |
|-----------------------|------|
| Chorizo               | 1,60 |
| Salchicha Frankfurt   | 1,58 |
| Morcilla              | 4,26 |
| Panceta               | 1,87 |
| Concentrado de tomate | 3,76 |

| <b><i>Hidrolizados con gluten (no desengrasados)</i></b> | <b>Concentración de gliadina (ppm)</b> |
|--|--|
| Mostaza  | 3,89                                   |
| Sirope de chocolate                                      | 2,55                                   |
| Aspartamo  | 1,70                                   |
| Cacao instantáneo  | 1,63                                   |
| Salsa rosa   | 3,54                                   |
| Almidón de trigo nº 1                                    | 29,40                                  |
| Almidón de trigo nº 2                                    | 23,45                                  |
| Almidón de trigo nº 3                                    | 80,12                                  |
| Almidón de trigo nº 4                                    | 114,27                                 |
| Almidón de trigo nº 5                                    | 80,70                                  |
| Maltodextrina de trigo                                   | 0,14                                   |
| Dextrosa de trigo  | 0,00                                   |
| Copos de maíz (cereal para desayuno)                     | 5701,75                                |
| Aromatizante de malta 20606                              | 280,66                                 |
| Aromatizante de malta 20606                              | 363,41                                 |
| Cerveza nº 1   | 317,11                                 |
| Cerveza nº 2   | 133,66                                 |
| Cerveza nº 3   | 429,99                                 |

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Sollid L M & Thorsby E. *Gastroenterology* (1993) ,105, 910–22
2. Catassi C, Rossini M, Ratsch I-M, Bearzi I, Santinelli A, Castagnani R, Pisani E, Coppa GV & Giorgi PL. 1993, *Gut*, 34, 1515 – 9
3. Faulkner-Hogg KB, Selby WS, Loblay RH. (1999), *Scand J Gastroenterol*, 34 784 – 9
4. Holmes GKT, Prior P, y Lane MR *et al.* (1989), *Gut*, 30, 333 – 8
5. Ellis HJ, Rosen-Bronson S, O'Reilly N y Ciclitira PJ. (1998), *Gut*, 43, 190 – 5
- 10 6. Skeritt, JH & Hill AS. (1991), *Journal of the Association of Official Analytical Chemistry*, 74 257 – 264
7. Sorell L, Lopez J A, Valdes I, Alfonso P, Camafeita E, Acevedo B, Chirido F, Galvilondo J, Mendez E. (1998), *FEBS Letters*, 439, 46 – 50
8. Aubrecht E y Toth A. (1995), *Acta Alimentaria*, 24, 23 – 29
- 15 9. Troncone R, Vitale M, Donatiello A, Farris E, Roos G y Auricchio S. (1986), *Journal of Immunological Methods*, 92, 21–23
10. Chirido FG, Anon MC & Fossati CA. (1998), *Food & Agricultural Immunology*, 10, 143 – 155
11. Skeritt J H y Hill A S. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (1990), 20 38, 1771 – 1778
12. Ellis H J, Doyle A P, Wieser H, Sturgess R P, Day P y Ciclitira P J. (1994), *Journal of Biochemical and Biophysical methods*, 28, 77 – 82
13. Chirido F G, Anon M C y Fossati C A. (1995), *Food and Agricultural Immunology*, 7, 333 – 343
- 25 14. Nicolas Y, Denery-Papini S, Martinant J P y Popineau Y. (2000), *Food and Agricultural Immunology*, 12, 53 – 65
15. Valdes I, Garcia E, Llorente M, Mendez E. (2003), *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 155, 465 –474
16. Spaenij-Dekking EHA, Kooy-Winkelaar EMC, Nieuwenhuizen WF, Drijfhout JW, Koning F. (2004), *Gut*, 53, 1267 – 1273
- 30 17. Dewar D, Pereira SP, Ciclitira PJ. (2004), *Int J Biochem Cell Biol.* 36,17-24.
18. Shan L, Molberg O, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM, Sollid LM, Khosla C. (2002) *Science*, 29727, 2275 – 2279
- 35 19. Bietz, J.A. (1984), *Bakers Dig.* 58(1), 15-17, 20-21, 32
20. Bietz, J.A. (1983), *Journal of Chromatography*, 255, 239-245

21. Huebner, F.R. y Bietz, J.A., (1993), *Cereal Chemistry*, 70, 506-511.
22. Wieser, H., Seilmeier, W. y Belitz, H.D., (1994), *Journal of Cereal Science*, 19, 149-155
- 5 23. Lookhart, G.L., Jones, B.L., Hall, S.B., y Finney, K.F., (1982), *Cereal Chemistry*, 59, 178-181
24. Marchylo, B.A. y Kruger, J.E., (1988), *Cereal Chemistry*, 65, 192-198
25. Lookhart, G. y Bean, S., (1995), *Cereal Chemistry*, 72, 42-47
26. Aubrecht, E., y Tóth, Á., (1995), *Acta Alimentaria*, 24, 23-29
27. Burnouf, T. y Bietz, J.A., (1989), *Cereal Chemistry*, 66, 121-127
- 10 28. Melas, V., Morel, M.H., Autran, J.C., y Feillet, P., (1994), *Cereal Chemistry*, 71, 234-237
29. Fu, B.X. y Sapirstein, H.D., (1996), *Cereal Chemistry*, 73, 143-152
30. Marchylo, B.A., Hatcher, D.W., Kruger, J.E., y Kirkland, J.J., (1992), *Cereal Chemistry*, 69, 371-378
- 15 31. Byers, M., Mifflin, B.J. y Smith, S.J., (1983), *J.Sci.Food.Agric*, 34, 447-462
32. Wieser, H., Antes, S., Seilmeier, W., (1998), *Cereal Chemistry*, 75, 644-650
33. Marchylo, B.A.; Kruger, H.E., y Hatcher, D.W., (1989), *Journal of Cereal Science*, 9, 113-130
34. Kazemie, M. y Bushuk, W., (1992), *Cereal Chemistry*, 69, 105-107
- 20 35. Burnouf, T. y Bietz, J.A., (1989), *Cereal Chemistry*, 66, 121-127
36. Gupta, R.B. y MacRitchie, F., (1991), *Journal of Cereal Science*, 14, 105-109
37. Bietz, J.A., Burnouf, T., Conn, L.A. y Wall, J.S., (1984), *Cereal Chemistry*, 61, 124-129
38. Nicolas, Y., Larré, C., y Popineau, Y., (1997), *Journal of Cereal Science*, 25, 151-154
- 25 39. Sutton, K.H., (1991), *Journal of Cereal Science*, 14, 25-34
40. Hou, G. y Ng, P.K.W, (1995), *Cereal Chemistry*, 72, 545-551
41. Morel, M.H., (1994), *Cereal Chemistry*, 71, 238-242
42. Singh, N.K., Shepherd, K.W., y Cornish, G.B., (1991), *Journal of Cereal Science*, 14, 203-208
- 30 43. Marhcylo, B.A., Hatcher, D.W., y Kruger, J.E., (1988), *Cereal Chemistry*, 65, 28-40
44. Keck, B., Köhler, P., y Wieser, H., (1995), *Z Lebensm Unters Forsch*, 200, 432-439
- 35 45. Burnouf, T. y Bietz, J.A., (1984), *Journal of Chromatography*, 299, 185-199
46. Mimouni, B., Robin, J.M., Azanza, J.L., y Raymond, J., (1998), *J Sci Food*

- Agric, 78, 423-428
47. Tkachuk, R., y Mellish, V.J., artículo nº 600 del Grain Research Laboratory, Canadian Grain Commission
48. Garcia, E., Llorente, M., Hernando, A., Kieffer, R., Wieser, H., y Mendez, E., (2005), Eur. J. Gastroenterol & Hepatol, 17, 529-539
- 5
49. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. "Procedimiento para la extracción de gluten en alimentos, procesados y no procesados por calor, compatible con ELISA, composición y kits que comprenden dicha composición". WO02092633, 21 de noviembre de 2002.
- 10
50. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. "Procedimiento para la extracción cuantitativa de gluten en alimentos procesados o no procesados por calor, y composición solubilizante de proteínas de gluten o un kit comercial que la contenga necesario para su puesta en práctica". ES2182698, 13 de mayo de 2004. Solicitud 200101098, 14 de mayo de 2001.
- 15
51. Wieser, H. Food Research and Technology (1998), 207(2), 128-132.
52. Wieser H., Antes, S., y Seilmeier W., (1998) Cereal Chem, 75(5), 644-650.
53. Nicolas Y. Martinant, J.-P., Denery-Papini, S., Popineau, Y. (1998) J. Sci. Food Agric, 77, 96-102
- 20
54. Huebner F.R. y Bietz, J.A., (1999) Cereal Chem. 76(2), 299-302.
55. Mamone G., Ferranti, P., Chianese, L., Scafuri, L., Addeo, F. (2000), Rapid Commun. Mass Spectrom 14, 897-904
56. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. "Method for extracting gluten from processed and unprocessed foods by means of heat based on the use of ionic and non-ionic detergents". WO2007/104825, 20 de septiembre de 2007. Número de prioridad ES200600675, 16 de marzo de 2006.
- 25
57. Hurkman, W.J. y Tanaka, C.K., (2007), Journal of Chromatography B, 849, 344-350
- 30
58. DuPont, F.M., Chan, R., Lopez, R., Vensel, W.H., (2005), Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 1575-1584.
59. Burns, J.A., Butler, J.C., Moran, J., Whitesides, G.M., (1991), J. Org. Chem., 56, 2648-2650
60. Getz, E.B., Xiao, M., Chakrabarty, T., Cooke, R., y Selvin, P.R., (1999), Anal. Biochem., 273, 73-80
- 35
61. Shafer, D.E., Inman, J.K., y Lees, A., (2000), Anal. Biochem., 282, 161-164

62. Lykkesfeldt, J., (2000), *Anal. Biochem.*, 282, 89-93
  63. Krezel, A., Latajka, R., Bujacz, G.D., y Bal., W., (2003), *Inorganic Chemistry*, 42, 1994-2003
  64. Carmen Bermudo *et al* (2005) (65) Monoclonal antibody based competitive assay for the sensitive detection of coeliac disease toxic prolamins, *Anal-Chim. Acta*, 551, 105-114.
- 5

**REIVINDICACIONES**

1. Composición que consiste en un agente reductor para la reducción irreversible de puentes de disulfuro y un disolvente con alto punto de ebullición y/o alta constante dieléctrica, en un tampón con un pH entre 4 y 9.
2. Composición según la reivindicación 1, en la que el agente reductor es un agente reductor no tóxico con una concentración superior a 0,1 mM.
3. Composición según la reivindicación 2, en la que el agente reductor es Tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP).
4. Composición según la reivindicación 1, en la que el disolvente se selecciona de entre DMF, DMSO o glicerol, con una concentración comprendida entre el 30-70% v/v.
5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que consiste en TCEP, como agente reductor, un disolvente seleccionado de entre glicerol, DMSO o DMF, en tampón HEPES o PBS, con un pH entre 4 y 9.
6. Procedimiento para la extracción simultánea de gliadinas y gluteninas, en muestras de alimento, procesados o no procesados por calor, que comprende extraer el contenido en gliadinas y gluteninas en presencia de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, que comprende: a) mezclar la muestra de alimento con una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, y b) incubar la mezcla resultante a una temperatura superior a 50°C, durante un periodo de tiempo superior a 2 minutos.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6 y 7, que comprende repetir este procedimiento en un intervalo de 2 a 10 veces.
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6-8, en el que, antes de la extracción, se lleva a cabo una etapa de desengrasado.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que la etapa de desengrasado se lleva a cabo usando acetona.
11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6-10, en el que, tras la extracción, se lleva a cabo una etapa de cuantificación de las gliadinas y gluteninas extraídas usando ELISA.
12. Kit que comprende una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
13. Kit según la reivindicación 12, que comprende además los reactivos necesarios para realizar un ELISA para cuantificar el contenido en gliadinas

y gluteninas de ambas muestras de alimento, procesado por calor y no procesado por calor.

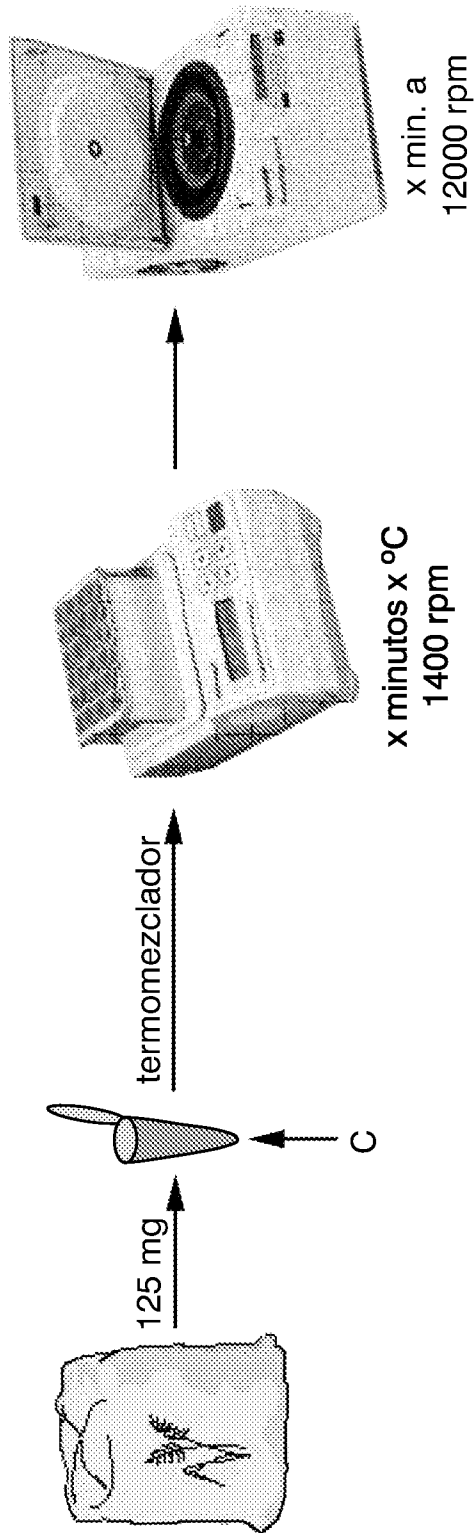


FIG. 1

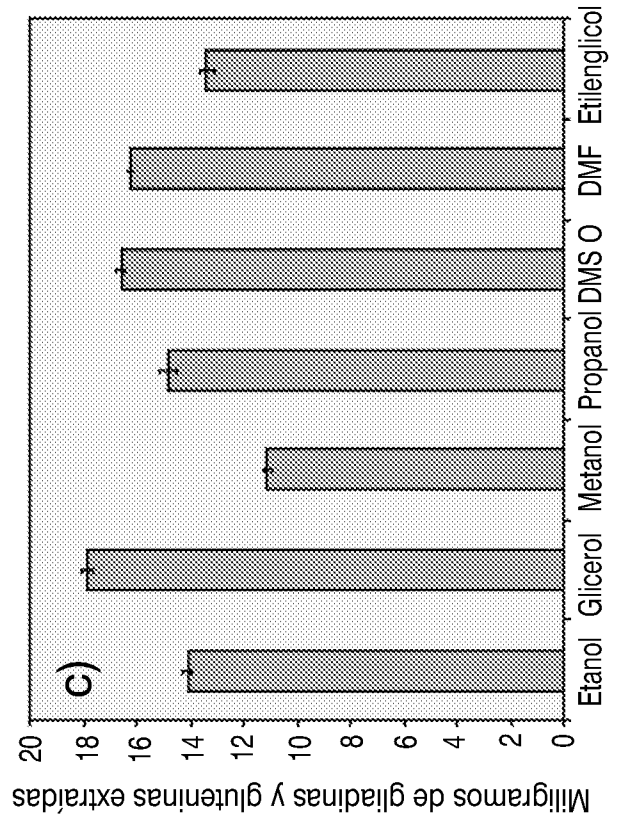
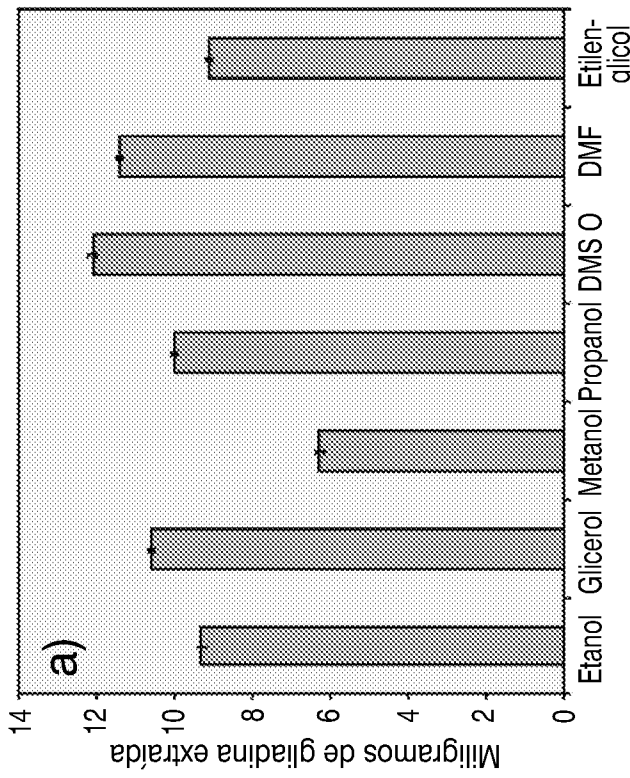
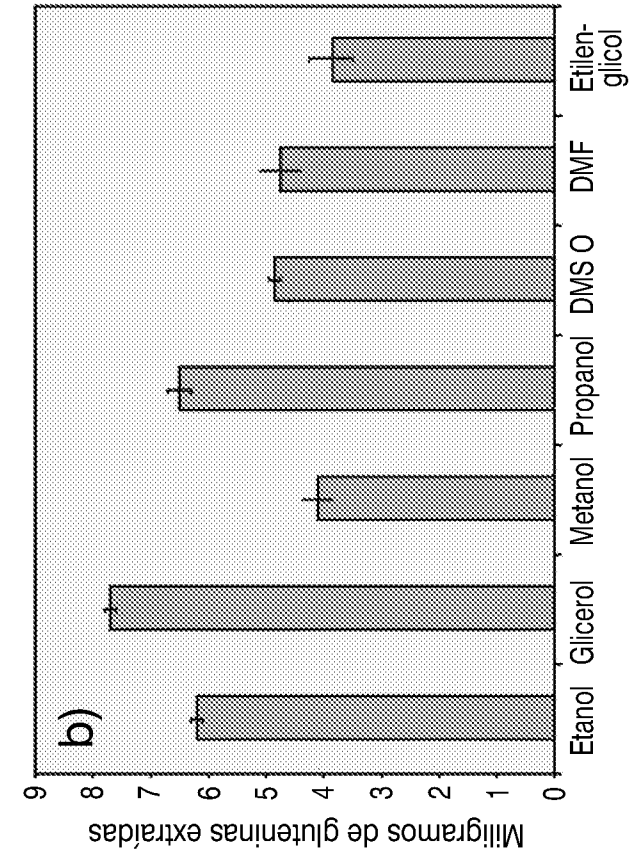
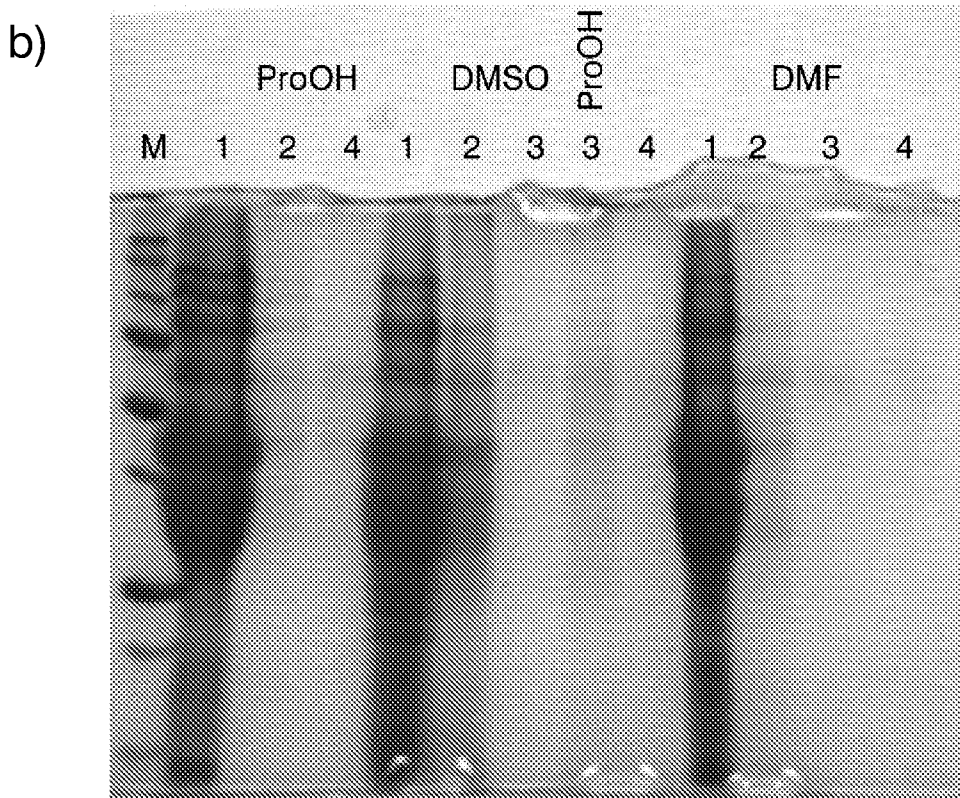
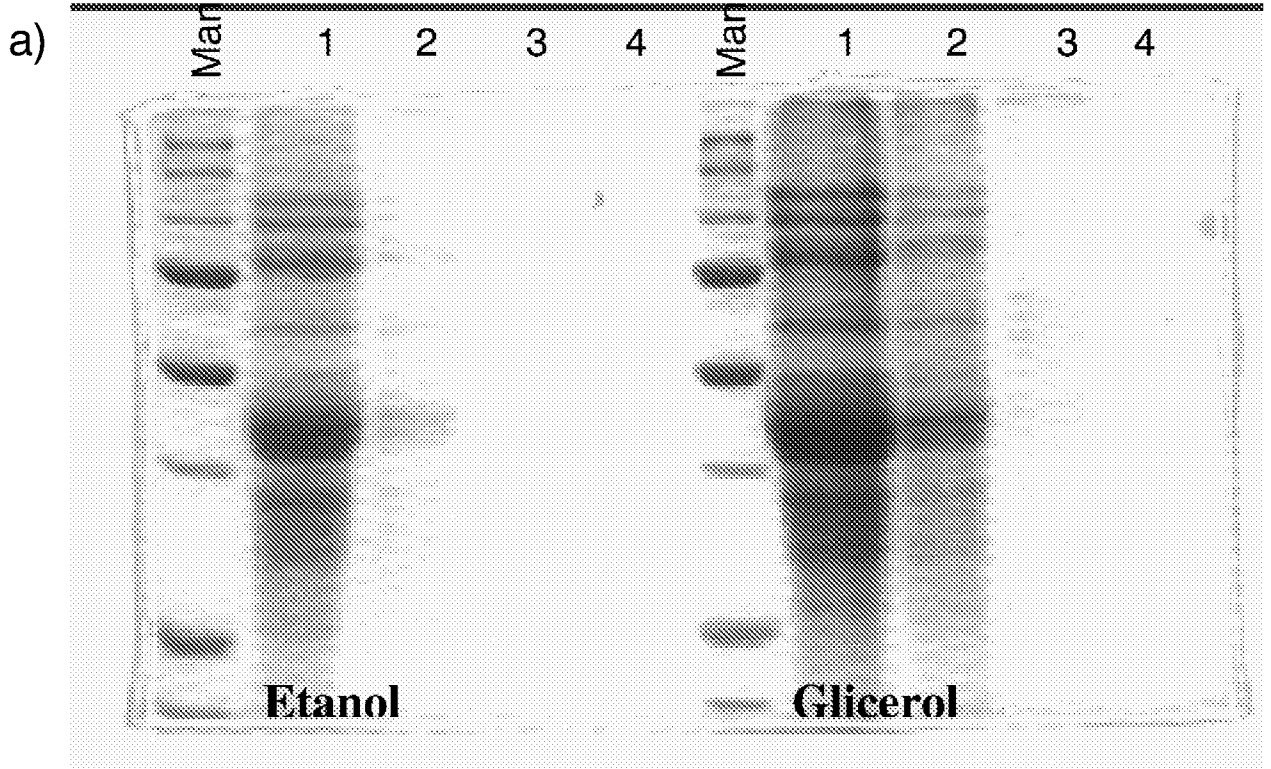


FIG. 2



**FIG. 3**

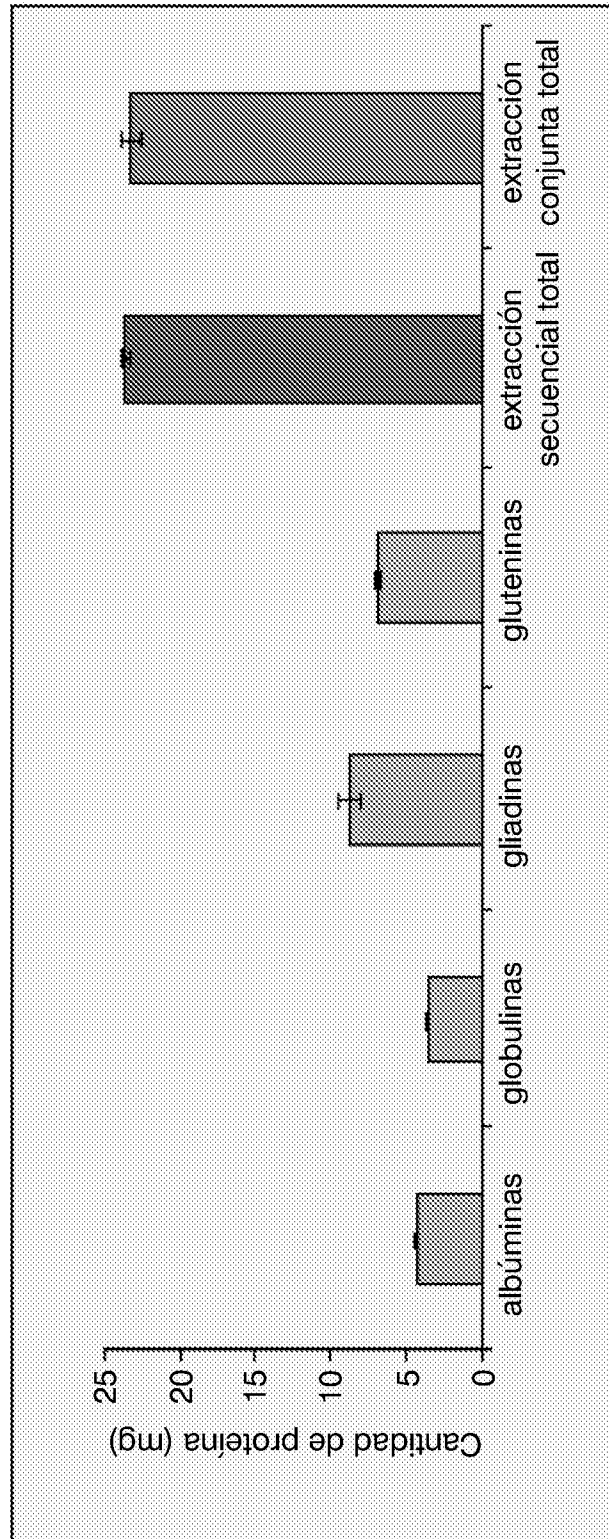


FIG. 4

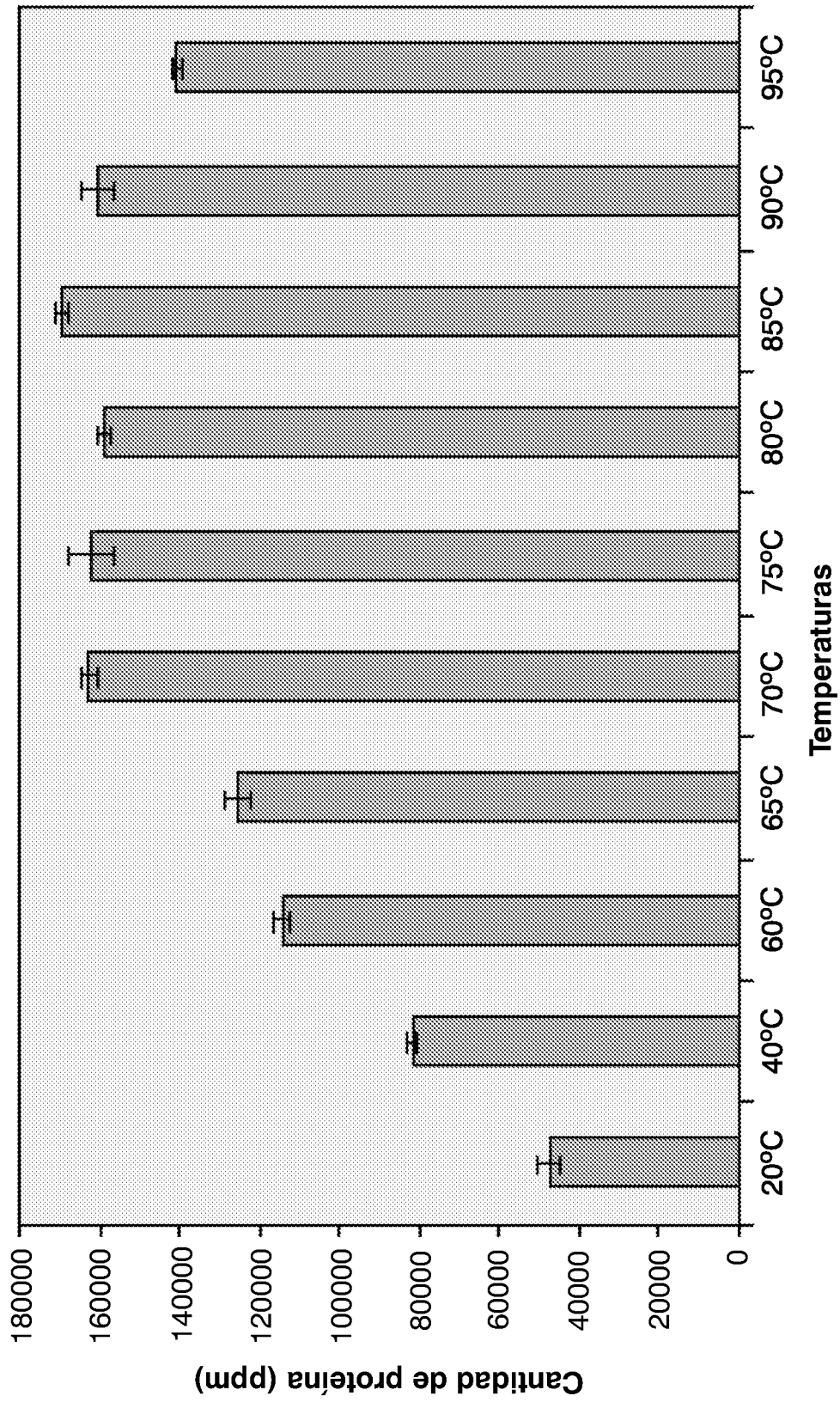


FIG. 5

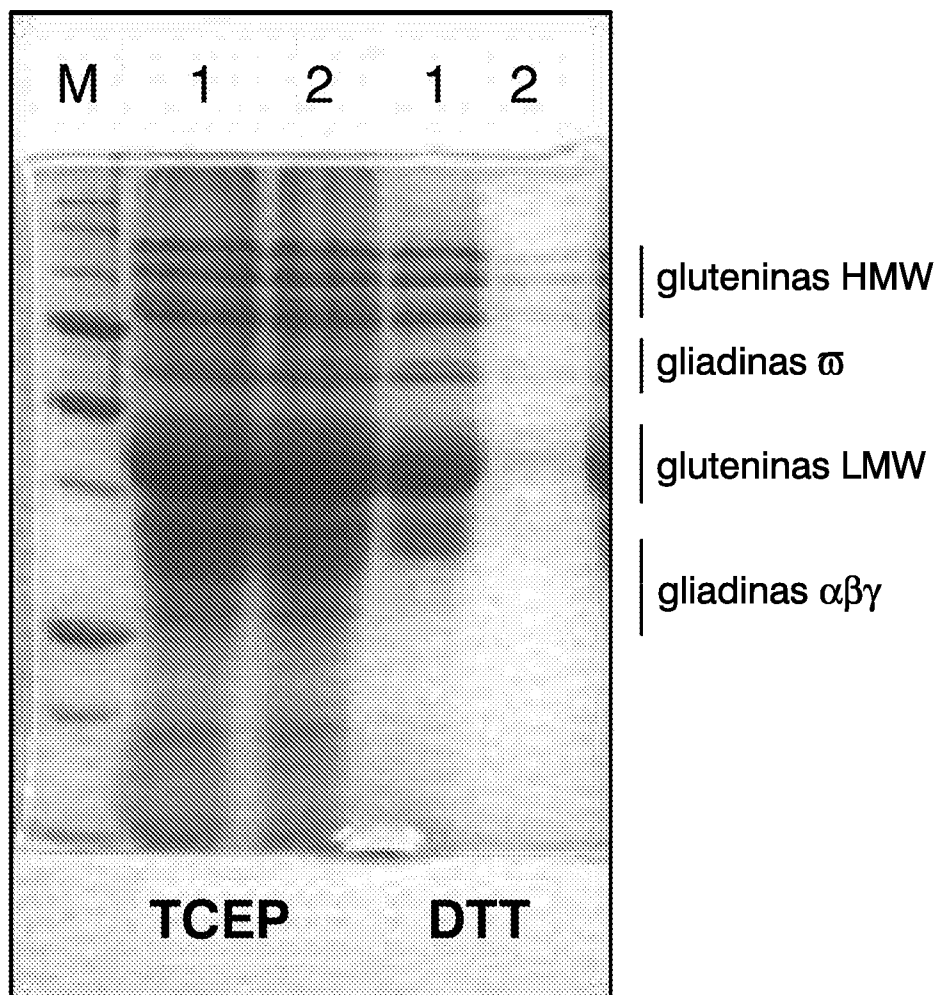
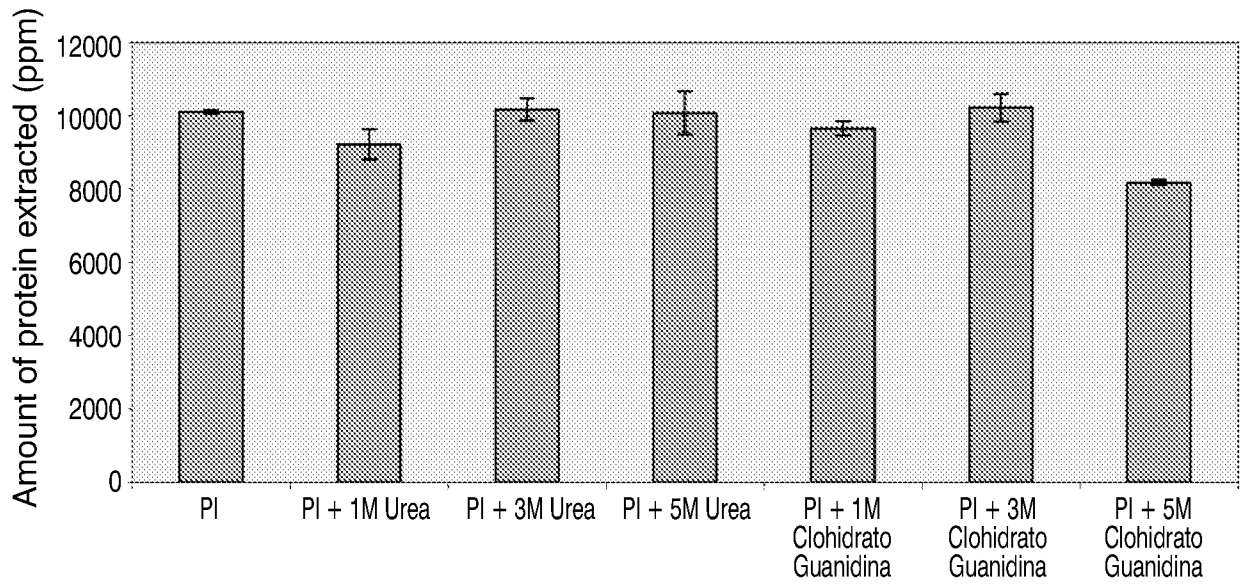


FIG. 6

a)



b)

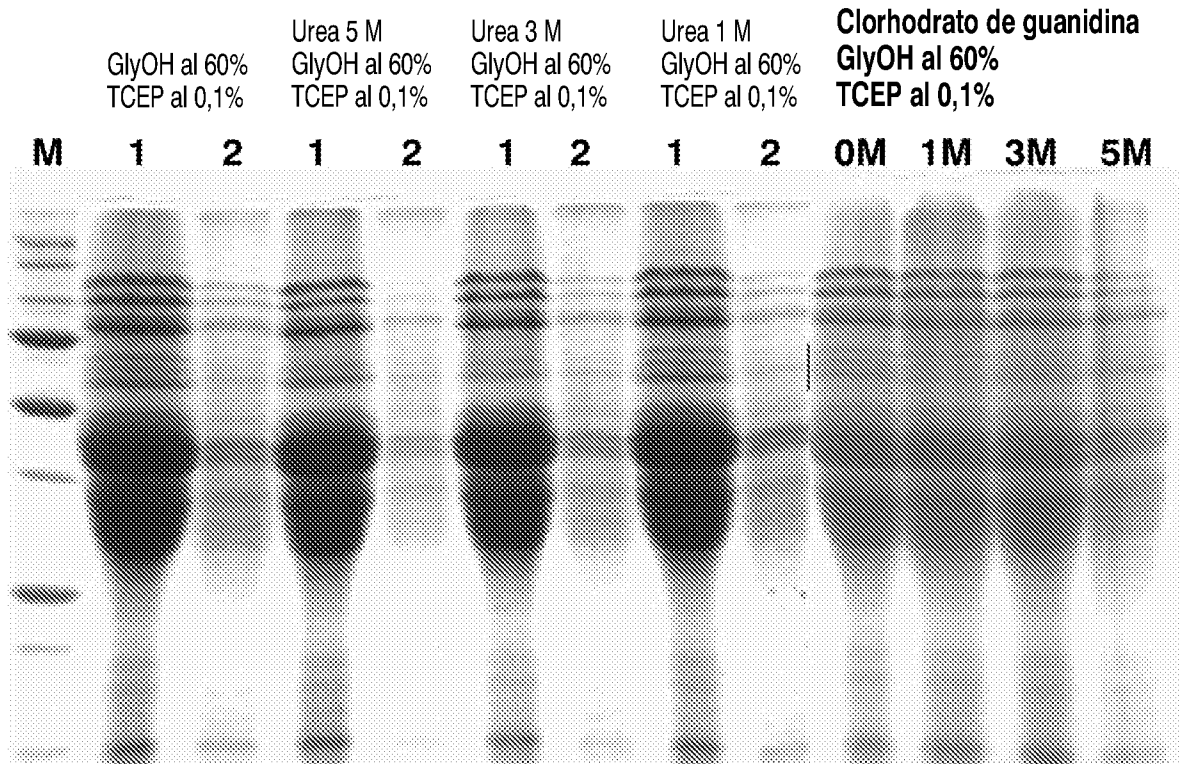
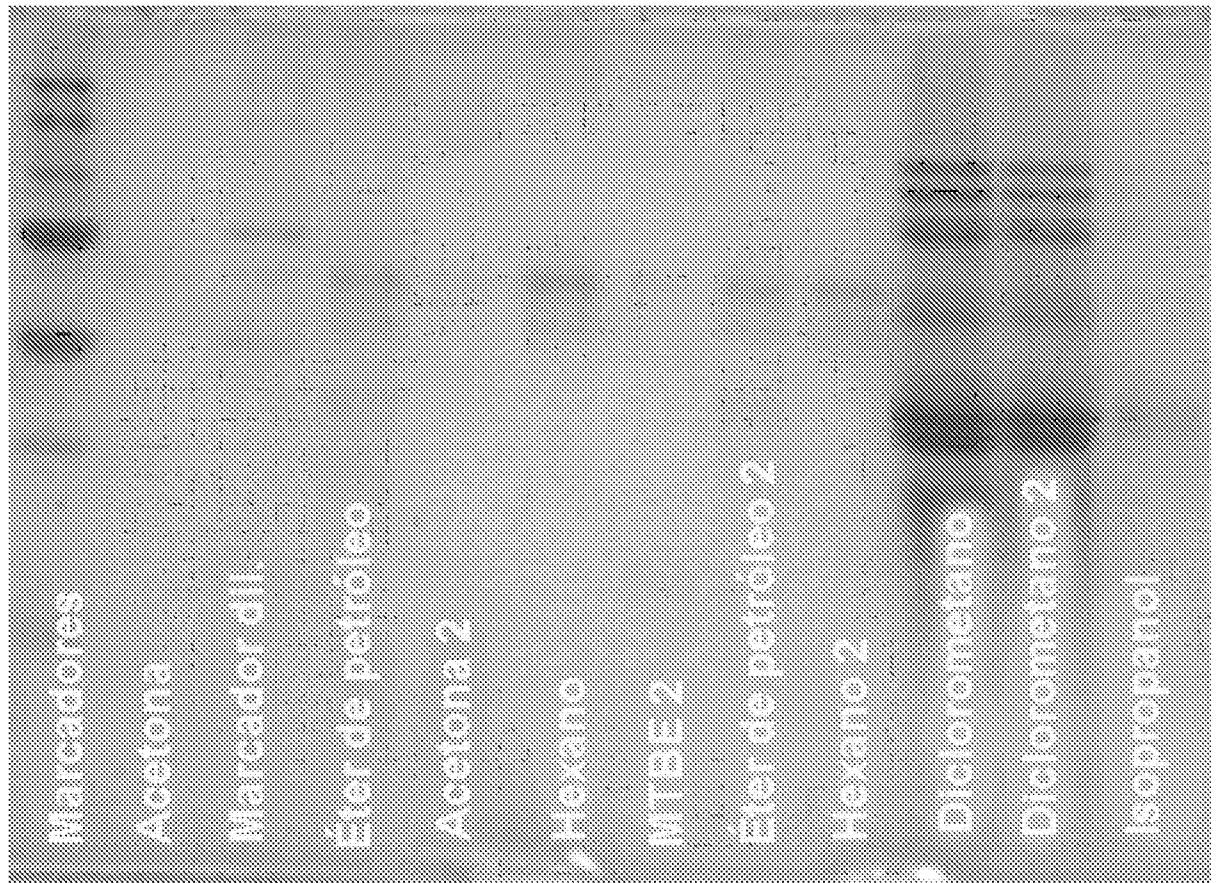


FIG. 7

a)



b)

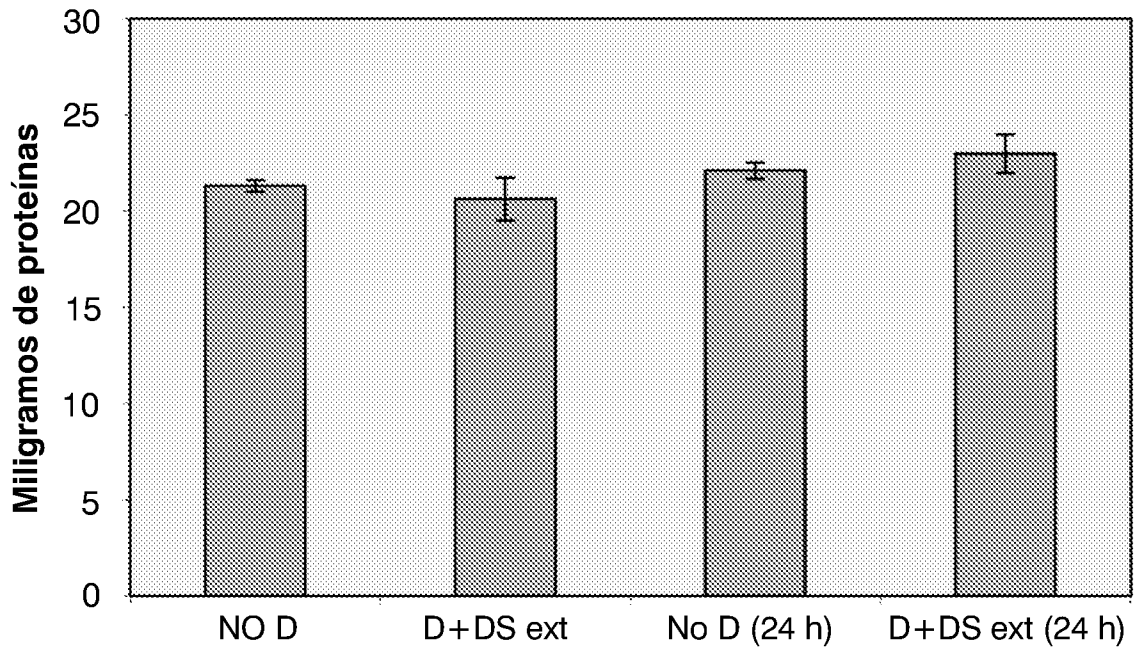


FIG. 8

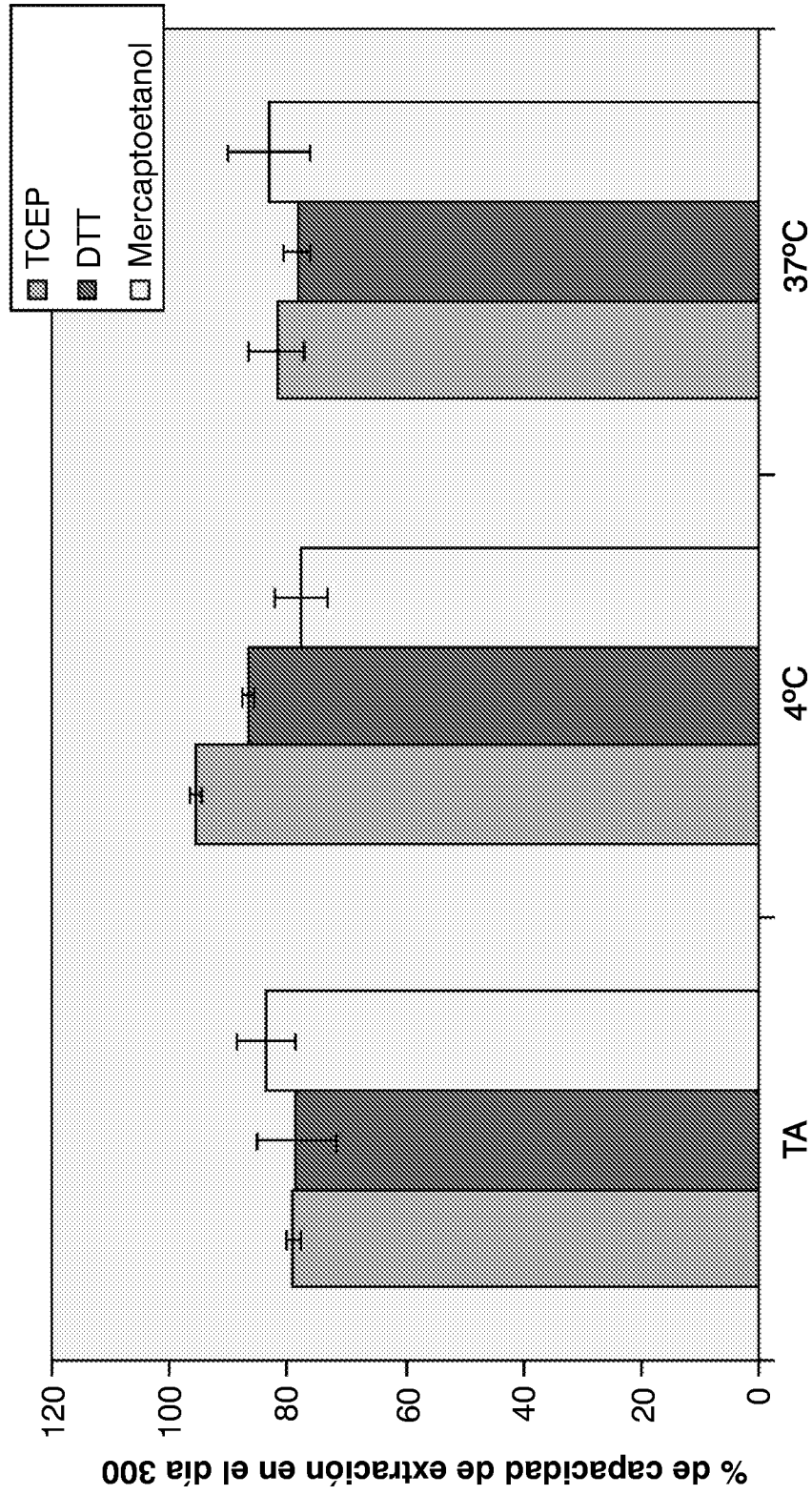
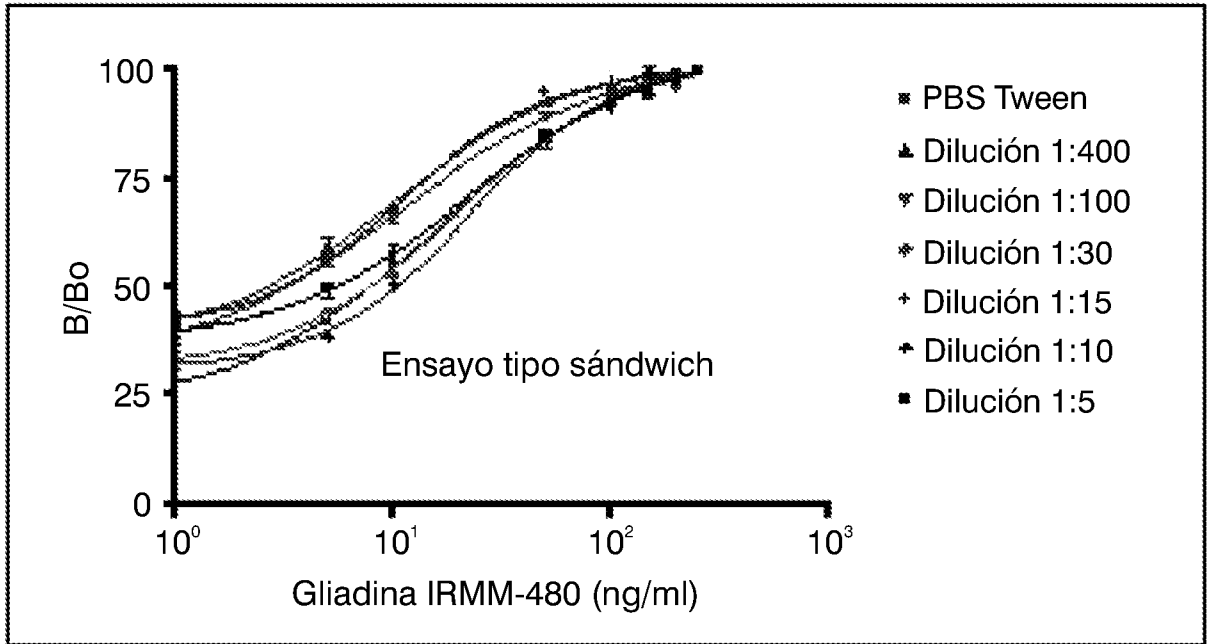


FIG. 9

a)



b)

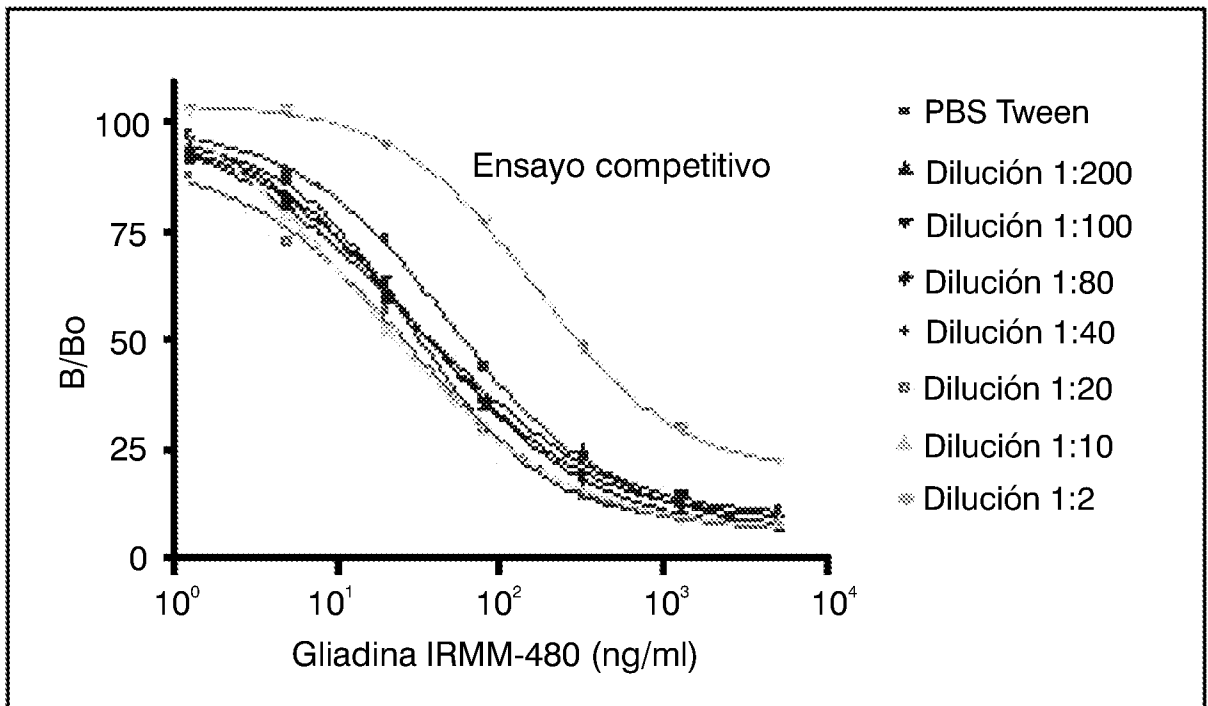


FIG. 10

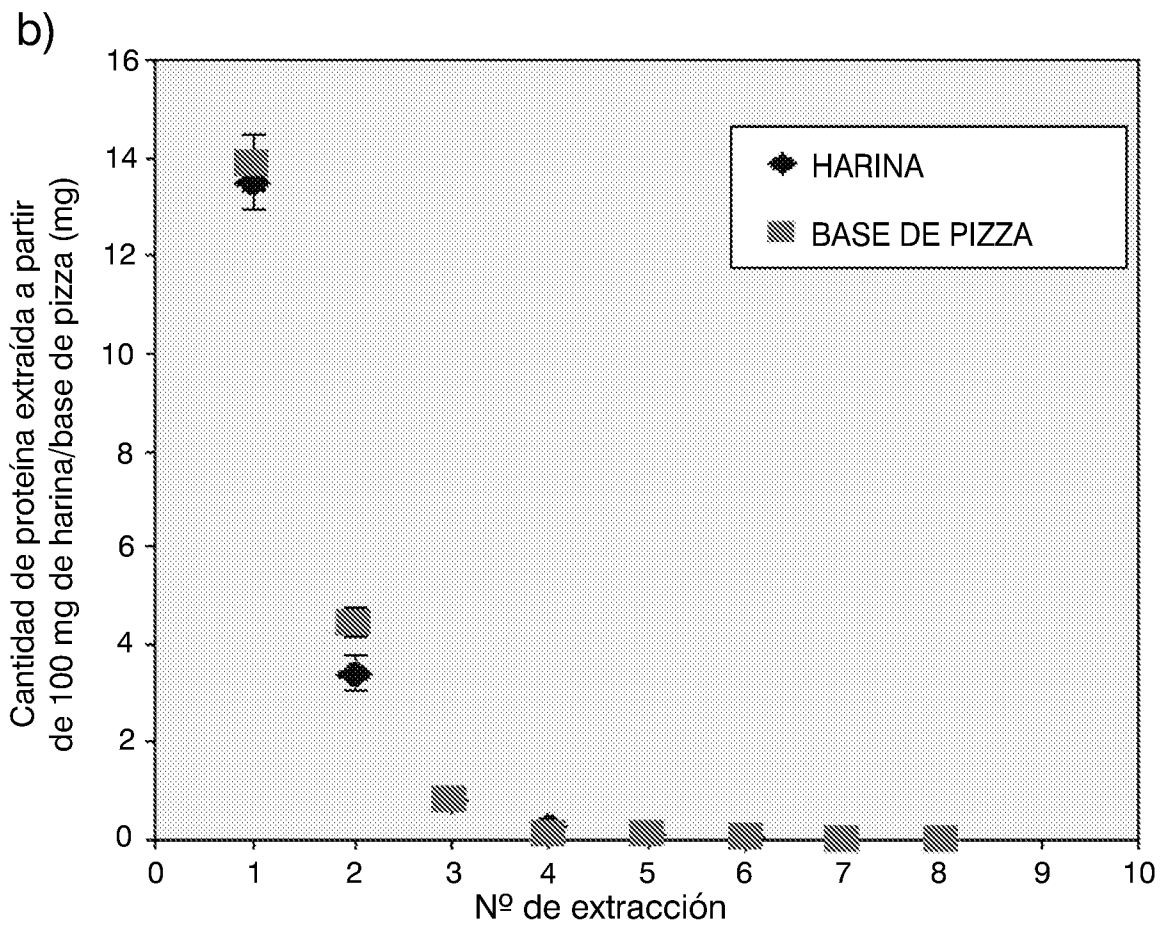
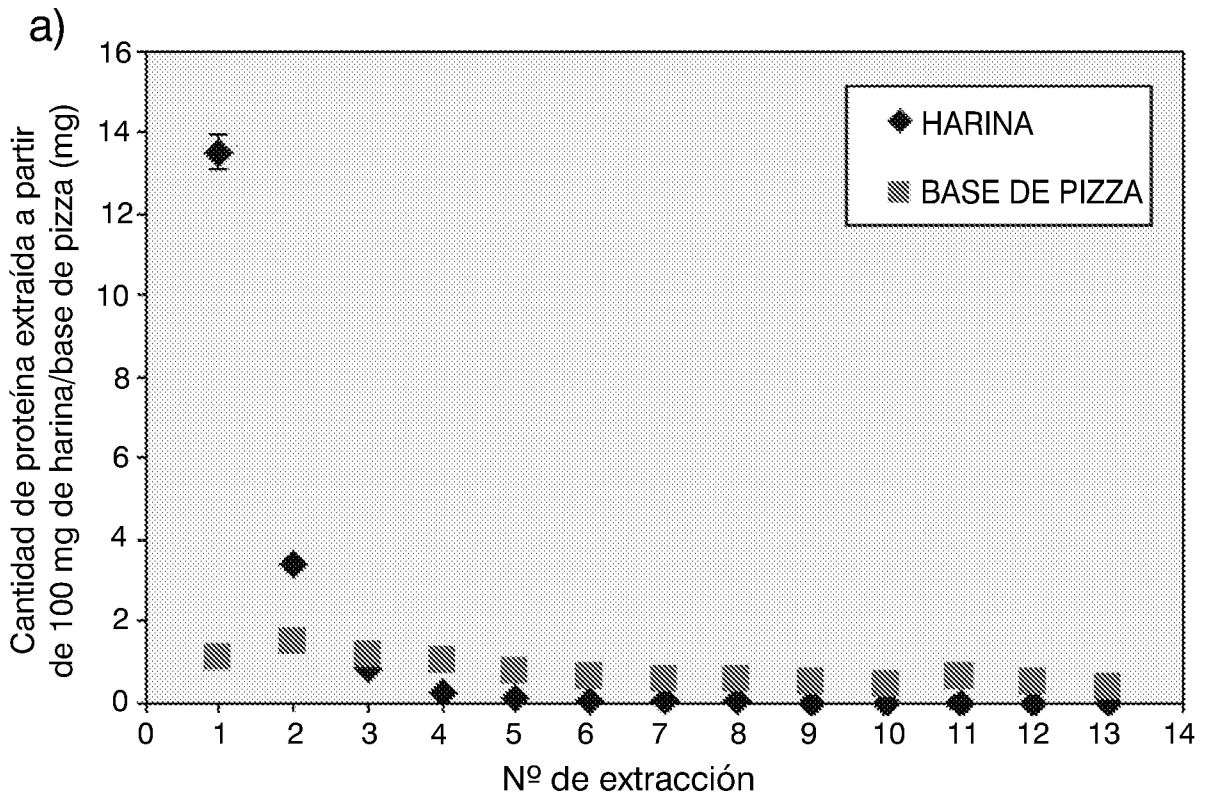


FIG. 11

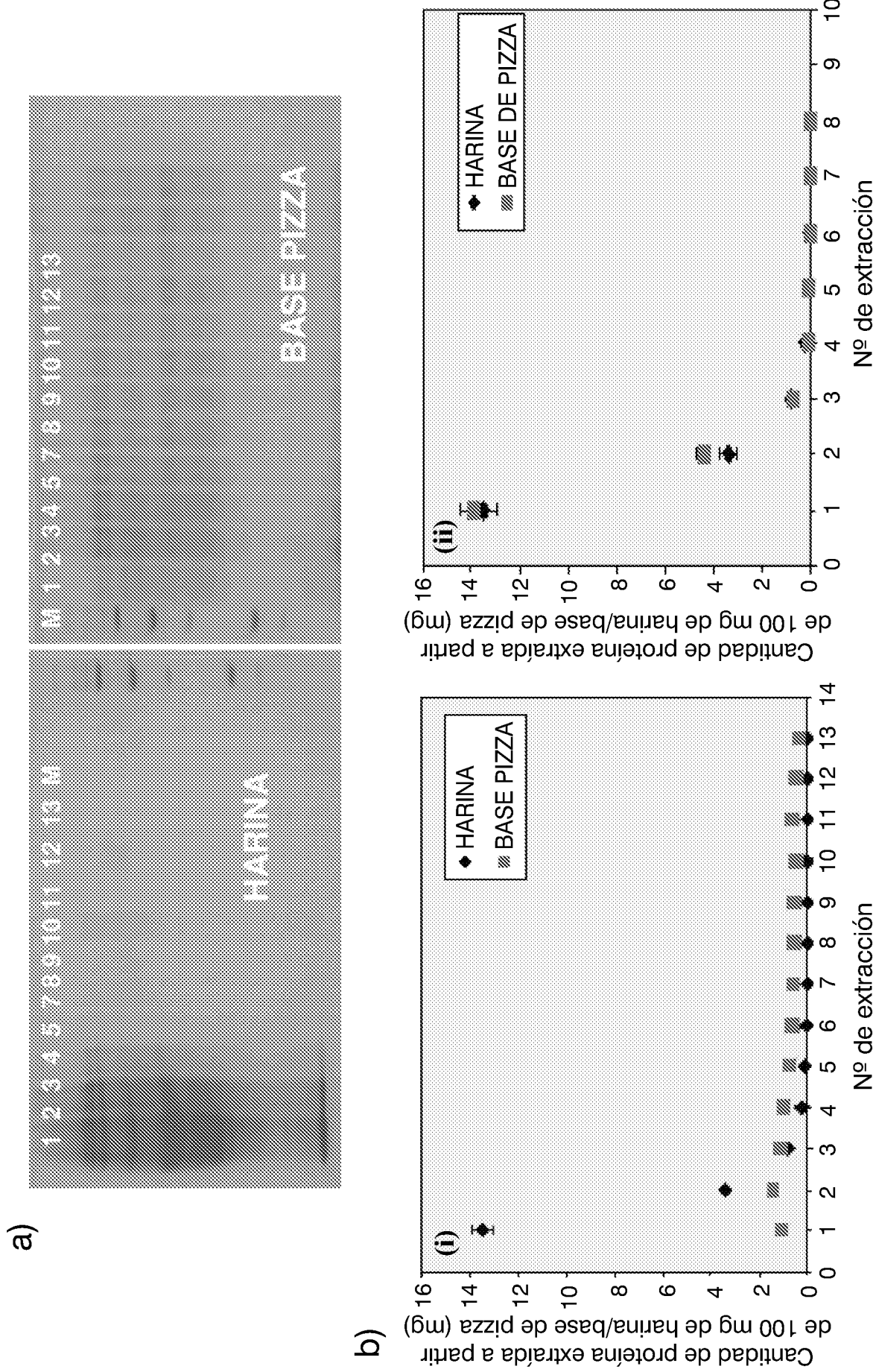
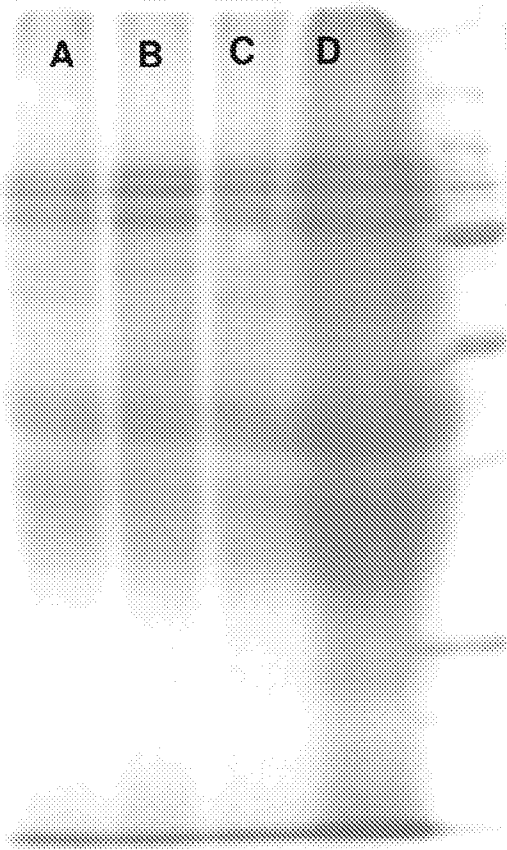


FIG. 12

a)



b)

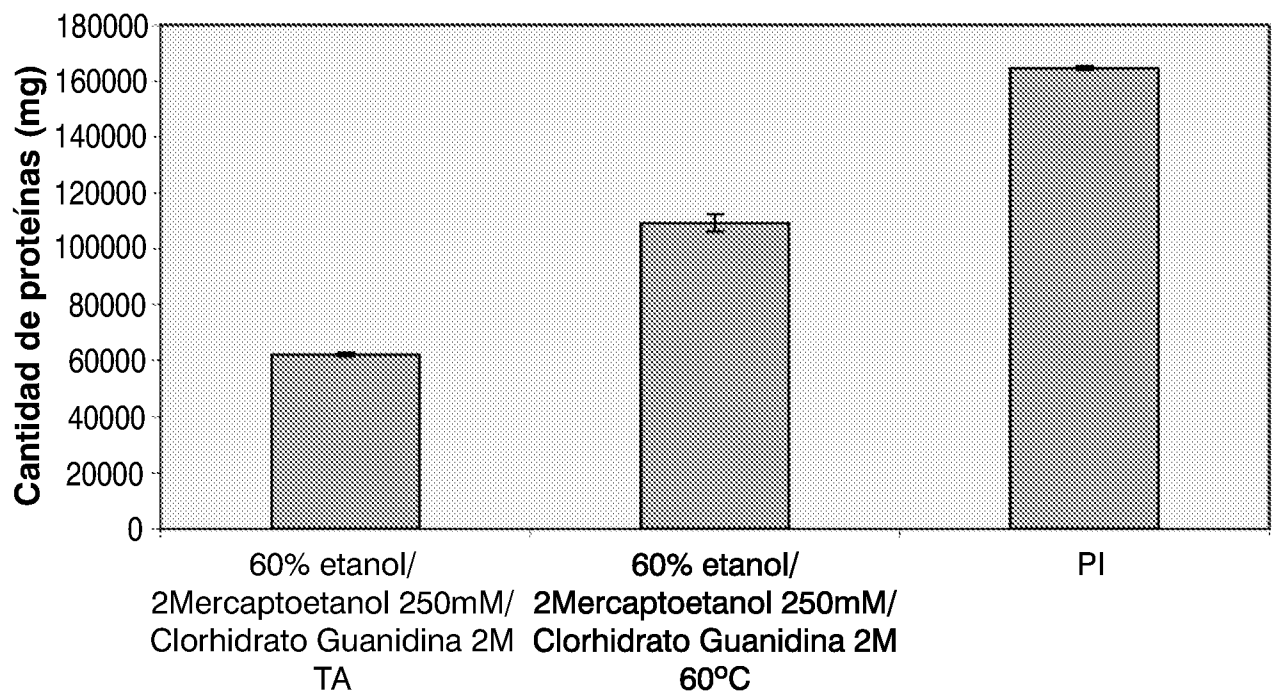


FIG. 13

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ ES 2009/070328

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**C07K 1/14** (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, NPL, XPESP, EMBASE, BIOSIS

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

INVENES,EPODOC

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A         | BURNS J.A, BUTLER J.C, MORAN J. et all. Selective Reduction of Disulfides by Tris(2-carboxyethyl)phospine. Journal of Organic Chemistry. 1991.volume 56, pages 2648-2650.                                      | 1-5                   |
| A         | HURKMAN W.J. and TANAKA. Extraction of wheat endosperm proteins for proteome analisis. Journal of chromatography B: biomedical science & applications.December, 2006. Volume 849. Pages 344-350.ISSN 1570-0232 | 1-13                  |
| A         | GUERRIERI N., SIRONI E. and CERLETTI. Gluten Dishulphide Reduction Using DTT and TCEP. Wheat Gluten, The Royal Society of Chemistry, 2000. ISBN: 978-0-85404-865-6. Pages 215-218                              | 1-13                  |

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

|   |   |
|---|---|
| <p>* Special categories of cited documents:<br/>                     "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.<br/>                     "E" earlier document but published on or after the international filing date<br/>                     "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br/>                     "O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means<br/>                     "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> | <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br/>                     "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br/>                     "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art<br/>                     "&amp;" document member of the same patent family</p> |
|---|---|

Date of the actual completion of the international search  
10 November 2009 (10.11.2009)

Date of mailing of the international search report  
(13/11/2009)

Name and mailing address of the ISA/  
O.E.P.M.  
Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.  
Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer  
A. Barrios de la Fuente  
Telephone No. +34 91 349 68 68

**Box II.2****Claims. 1-3 and 6-13 (all in part)**

**These claims do not meet the requirement of PCT Article 6 in respect to clarity. The term "solvent with a high boiling point and/or high dielectric constant" is not clear. The claimed composition is not clearly defined, and for this reason the search was limited to TCEP as the reducing agent and to the solvents described in the application: glycerol, DMSO And DMF.**

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/ES 2009/070328

| C (continuation). |  | DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |
|-------------------|--|-------------------------------------|
| Category*         | Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages        | Relevant to claim No.               |
| A                 | WO2007/104825 A 1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) 20.09.2007. Example 1. | 1-13                                |
| A                 | ES 2182698 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) 01.03.2003. Example 1      | 1-13                                |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ ES 2009/070328

| Patent document cited<br>in the search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s)   | Publication date   |
|---|---------------------|--|--|
| WO 2007104825 A1                              | 20.09.2007          | EP 2003448 A1<br>EP 20070730498  | 17.12.2008<br>16.03.2007   |
| ES 2182698 A1                                 | 01.03.2003          | WO 02092633 A1<br>CA 2447085 A1<br>EP 20020730303 A1<br>US 2004137137 A1<br>US 7585529 B | 21.11.2002<br>21.11.2002<br>03.05.2002<br>15.07.2004<br>08.09.2009<br>08.09.2009 |

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°  
PCT/ ES 2009/070328

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**C07K 1/14** (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)  
C07K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda  
INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, NPL, XPESP, EMBASE, BIOSIS

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)  
INVENES, EPODOC

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

| Categoría* | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes   | Relevante para las reivindicaciones N° |
|------------|--|--|
| A          | BURNS J.A, BUTLER J.C, MORAN J. et all. Selective Reduction of Disulfides by Tris(2-carboxyethyl)phospine. Journal of Organic Chemistry. 1991.volumen 56, páginas 2648-2650.   | 1-5                                    |
| A          | HURKMAN W.J. and TANAKA. Extraction of wheat endosperm proteins for proteome analysis. Journal of chromatography B: biomedical science & applications. Diciembre, 2006. Volumen 849. Páginas 344-350. ISSN 1570-0232 | 1-13                                   |
| A          | GUERRIERI N., SIRONI E. and CERLETTI. Gluten Dishulphide Reduction Using DTT and TCEP. Wheat Gluten, The Royal Society of Chemistry, 2000. ISBN: 978-0-85404-865-6. Páginas 215-218                                  | 1-13                                   |

En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos  Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

|  |  |
|--|--|
| <p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>“A” documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>“E” solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>“L” documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>“O” documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>“P” documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p> | <p>“T” documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>“X” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>“Y” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>“&amp;” documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p> |
|--|--|

|  |  |
|--|--|
| Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.<br>10 Noviembre 2009 (10.11.2009)  | Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional<br><b>13-NOVIEMBRE-2009 (13/11/2009)</b> |
| Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional<br>O.E.P.M.<br>Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.<br>N° de fax 34 91 3495304 | Funcionario autorizado<br><b>A. Barrios de la Fuente</b><br>N° de teléfono +34 91 349 68 68        |

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ ES 2009/070328

## Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el Artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1.  Las reivindicaciones N°s:  
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
  
2.  Las reivindicaciones N°s: 1-3 y 6-13 (todas parcialmente)  
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:  
Estas reivindicaciones no cumplen el requisito de claridad requerido por el artículo 6 del PCT. Los términos disolvente con “alto punto de ebullición” y/o “alta constante dieléctrica” no son claros. No queda definida claramente cual es la composición reivindicada, por tanto la búsqueda se ha limitado al agente reductor TCEP y los disolventes Glicerol, DMSO y DMF descritos en la solicitud.
  
3.  Las reivindicaciones N°s:  
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la Regla 6.4.a).

## Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la búsqueda internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1.  Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
  
2.  Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
  
3.  Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones N°s:
  
4.  Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones N°s:

### Indicación en cuanto a la protesta

- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
- El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2009/070328

| C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES |  |  |
|--|--|--|
| Categoría*   | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes                   | Relevante para las reivindicaciones N° |
| A  | WO2007/104825 A 1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) 20.09.2007. Ejemplo 1. | 1-13                                   |
| A  | ES 2182698 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) 01.03.2003. Ejemplo 1      | 1-13                                   |

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2009/070328

| Documento de patente citado en el informe de búsqueda | Fecha de Publicación | Miembro(s) de la familia de patentes   | Fecha de Publicación   |
|---|----------------------|--|--|
| WO 2007104825 A1                                      | 20.09.2007           | EP 2003448 A1<br>EP 20070730498  | 17.12.2008<br>16.03.2007   |
| ES 2182698 A1   | 01.03.2003           | WO 02092633 A1<br>CA 2447085 A1<br>EP 20020730303 A1<br>US 2004137137 A1<br>US 7585529 B | 21.11.2002<br>21.11.2002<br>03.05.2002<br>15.07.2004<br>08.09.2009<br>08.09.2009 |