

revista del
Comité
Científico de la aecosan

Nº 23

agencia española de consumo, seguridad alimentaria y nutrición
agencia española de consumo, seguridad alimentaria y nutrición
agencia española de consumo, seguridad alimentaria y nutrición
agencia española de consumo, seguridad alimentaria y nutrición
agencia española de consumo, seguridad alimentaria y nutrición

Revista del Comité Científico de la AECOSAN

Madrid, 2016

revista del
Comité
Científico de la aecosan

Nº 23

Nota: los informes que se incluyen a continuación son el resultado de las consultas que la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) y otras instituciones hacen al Comité Científico. Esta revista y sus informes se presentan conforme a normas de presentación y publicación

de bibliografía científica internacionalmente aceptadas. De ello se deriva, entre otras, la necesidad de abordar su estudio e interpretación desde la consideración ineludible de las citas bibliográficas referenciadas en el texto y enumeradas en el apartado "Referencias" que incluye al final de los infor-

mes. Lo contrario, además de dificultar su comprensión integral, pudiera llevar a extraer, conclusiones parciales o equivocadas, divergentes del informe en su conjunto.

Consejo Editorial Científico

Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición

Presidenta

Guillermina Font Pérez

Vicepresidenta

Ascensión Marcos Sánchez

Elena Alonso Lebrero

José Manuel Barat Baviera

María Pilar Conchello Moreno

Ramón Estruch Riba

María Antonia Ferrús Pérez

Susana Guix Arnau

Arturo Hardisson de la Torre

Ángeles Jos Gallego

Amelia Martí del Moral

Olga Martín Belloso

María Aránzazu Martínez Caballero

Alfredo Palop Gómez

Gaspar Pérez Martínez

José Luis Ríos Cañavate

Gaspar Ros Berruezo

Jesús Ángel Santos Buelga

Jesús Simal Gándara

Josep Antoni Tur Marí

Secretario técnico

Vicente Calderón Pascual

Coordinadores de la edición

Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición

Ricardo López Rodríguez

Edita

AECOSAN

Alcalá, 56. 28071. Madrid

Correo electrónico: evaluacionriesgos@msssi.es

Diseño y maquetación

Montserrat Gómez

NIPO: 690-16-003-8

ISSN: 2386-5342

Índice

Prólogo	9
Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición	
Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) en relación a la evaluación de la exposición a morfina de la población española por consumo de semillas de adormidera	11
Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) en relación al uso de una solución acuosa de peróxido de hidrógeno, ácido acético y ácido peracético (23/17/15) como coadyuvante tecnológico para la desinfección bacteriana de cítricos y tomates y el agua de lavado de los mismos	21
Colaboración	
Validación del método de detección de soja alergeno en alimentos mediante PCR en tiempo real	45

De entre las revistas científicas que hay en España, la Revista del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN), que presenta el número 23, tiene unas características particulares. La diferencia con otras revistas abarca varios aspectos, en cuanto a los artículos que incluye, el nexo común a los informes que es la evaluación de riesgos realizada de manera independiente, las personas que los firman y a las que van dirigidos. La Revista del Comité Científico proporciona información de temas relacionados con la Seguridad Alimentaria y la Nutrición, elaborada por profesionales de especialidades diversas dirigida para el público en general, agentes del sector agroalimentario y profesionales sanitarios. La industria alimentaria es el primer sector industrial del país y en ese desarrollo de nuevos productos y manteniendo la calidad necesita a veces soporte de profesionales que en aspectos muy variados puede encontrar apoyo en el Comité. De ahí la enorme responsabilidad que conllevan los informes publicados y los interesantes debates que suscitan, hasta la última coma, en las reuniones del Comité Científico.

A los lectores tal vez les pueda resultar interesante conocer algunos aspectos que pasan desapercibidos para el público en general en relación a estas publicaciones. Hasta que llega a editarse un número de la Revista del Comité Científico transcurre un proceso que empieza por la propuesta de un tema de trabajo por el equipo de la Agencia. Este equipo está constituido por especialistas en evaluación de riesgos y nutrición. Y allí estamos los miembros del Comité, que de forma libre decidimos involucrarnos o no en cada uno de los temas que se propone. Generalmente de tres a cinco personas, o a veces más, de los que constituimos el Comité, coordinadas por un miembro del grupo, trabajan en el tema. ¿Cómo? Pues a través de correos electrónicos y llamadas telefónicas, partiendo de la información previa que se nos indica desde la Agencia, y de la que recabamos a través de bases de datos, informes de otras agencias nacionales e internacionales, sociedades científicas y toda la información relevante que cada una considere oportuno.

Al año se celebran cuatro o cinco reuniones en Madrid, la Agencia se encuentra en la calle Alcalá nº 56. Se madruga y en mi caso en el AVE, forma fantástica de ir a Madrid desde Valencia se acude a la reunión. Tengo que decir que de Valencia asistimos varios investigadores e investigadoras, con lo que lo de ir y volver en el tren ya es placentero y fuente de amistades y conocimientos. Es gratificante el formar parte del Comité Científico, tanto por el aspecto profesional como por el social.

Las reuniones del Comité son un foro de discusión libre de alto nivel científico y, a veces, divertido. Se trabaja, se debate y se vuelve a casa cansada pero contenta y con la satisfacción de haber realizado una tarea de provecho.

Los miembros del Comité como científicos de experiencia estamos acostumbrados a los congresos, las jornadas y las reuniones. Pero las sesiones del Comité son algo distinto, son muy enriquecedoras porque somos investigadores con diferentes especialidades y se abordan las cuestiones desde diversos prismas. Se aprende, se dialoga y se llega a conclusiones. Por ello después de diversos debates en los que se discute y consensua, se aprueban informes que culminan en la publicación de la Revista del Comité Científico. En cada informe se incluye la bibliografía más relevante, de forma que estos informes puedan valorarse por los agentes del sector agroalimentario y profesionales diversos.

Quiero asegurar que hay mucha ciencia en ellos y doy gracias a todas aquellas personas que han permitido que participara en el proceso porque ha sido muy enriquecedor.

Estoy convencida de que estas revistas llegan a la ciudadanía, y que son de utilidad, por lo que son oportunas y necesarias. El hecho de que se traduzcan al inglés contribuye a la visibilidad y difusión de las opiniones del Comité Científico.

El trabajo se realiza entre todos los miembros del Comité de forma totalmente independiente, pero con la inestimable colaboración de los miembros de la Agencia que son verdaderos profesionales en los temas de Seguridad Alimentaria y Nutrición y que se relacionan con nosotros manera exquisita en lo profesional y lo personal, por lo que me consta que el Comité les está muy agradecido.

Solo me queda animar a la lectura de los informes esperando que aproveche su información y sabiendo los lectores que siempre se trabaja para preservar la salud de la población.

Guillermina Font Pérez
*Presidenta de la Sección de Seguridad Alimentaria y
Nutrición del Comité Científico de la AECOSAN*

Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) en relación a la evaluación de la exposición a morfina de la población española por consumo de semillas de adormidera

Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición

Elena Alonso Lebrero, José Manuel Barat Baviera, María Pilar Conchello Moreno, Ramón Estruch Riba, María Antonia Ferrús Pérez, Guillermina Font Pérez, Susana Guix Arnau, Arturo Hardisson de la Torre, Ángeles Jos Gallego, Ascensión Marcos Sánchez, Amelia Marti del Moral, Olga Martín Belloso, María Aránzazu Martínez Caballero, Alfredo Palop Gómez, Gaspar Pérez Martínez, José Luis Ríos Cañavate, Gaspar Ros Berrueto, Jesús Ángel Santos Buelga, Jesús Simal Gándara, Josep Antoni Tur Marí

Secretario técnico

Vicente Calderón Pascual

Número de referencia: AECOSAN-2016-001

Documento aprobado por la Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición del Comité Científico en su sesión plenaria de 18 de mayo de 2016

Grupo de trabajo

José Luis Ríos Cañavate (Coordinador)
Guillermina Font Pérez
María Aránzazu Martínez Caballero
Josep Antoni Tur Marí
Ricardo López Rodríguez (AECOSAN)

Resumen

Las semillas de adormidera (*Papaver somniferum*) se utilizan tradicionalmente en algunos países para la fabricación de panes y dulces. En España el consumo dietético de estas semillas es reducido y se cultiva principalmente la variedad de adormidera destinada a la obtención de morfina. Aunque las semillas de adormidera no contienen alcaloides opiáceos o presentan unos niveles muy reducidos, pueden resultar contaminadas con alcaloides, como consecuencia de daños causados por algunos insectos o de una contaminación externa de las semillas durante la recolección en caso de que partículas de polvo procedentes de la paja se adhieran a las semillas.

El Comité Científico ha realizado una evaluación de la exposición de la población española a la morfina a través del consumo de las variedades de semilla de adormidera cultivadas en España y ha estimado que, conforme a los datos disponibles actualmente, la ingesta de morfina a través del consumo de pan y bollería/pastelería por la población española está por debajo de la dosis de referencia aguda (ARfD) establecida por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA).

La mayor incertidumbre de la estimación realizada procede de la falta de información precisa sobre el consumo de semillas de adormidera por la población española. Tanto el contenido de morfina en las semillas de adormidera, como el consumo de estas semillas, podría variar en el futuro como consecuencia de la mejora de las buenas prácticas en la producción y la transformación de las semillas o de un mayor uso industrial o culinario de las mismas en España.

Palabras clave

Adormidera, amapola, bollería, morfina, pan, *Papaver somniferum*.

Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Consumer Affairs, Food Safety and Nutrition (AECOSAN) in relation to the assessment of the exposure of the Spanish population to morphine resulting from the consumption of poppy seeds

Abstract

Poppy seeds (*Papaver somniferum*) are traditionally used in some countries in the manufacture of bread and cakes. In Spain, the dietary intake of these seeds is low and the variety of poppy mainly grown in the country is used to obtain morphine. Although poppy seeds do not contain opium alkaloids or these occur at very low levels, they may be contaminated with alkaloids, as a result of damage caused by certain insects or of the external contamination of the seeds during harvest if dust particles from the straw become attached to the seeds.

The Scientific Committee has conducted an assessment of the exposure of the Spanish population to morphine as a result of the intake of the varieties of poppy seeds grown in Spain and considers that, in accordance with currently available data, the intake of morphine as a result of the consumption of bread and cakes by the Spanish population is below the acute reference dose (ARfD) established by the European Food Safety Authority (EFSA).

The greatest uncertainty in this estimation comes from the lack of accurate information regarding the consumption of poppy seeds by the Spanish population. Both the morphine content in the poppy seeds, and the intake of these seeds could change in the future as a consequence of the improvement of good practices in the production and processing of the seeds or of an increased industrial or culinary use of the same in Spain.

Key words

Opium poppy, corn poppy, bread, morphine, pastries, *Papaver somniferum*.

1. Introducción

La adormidera es la especie *Papaver somniferum* L. (Papaveraceae), planta herbácea anual de unos 50-150 cm de altura. El fruto es una cápsula esférica u ovoide, situada sobre un pedúnculo engrosado en el punto de unión. En maduración se abre por medio de unas valvas, situadas debajo del estigma estrellado. Las cápsulas contienen numerosas semillas, unas 25 000 por cápsula (Paris y Moyses, 1967) (Kuklinski, 2000). Además de los numerosos híbridos para jardinería, existen tres variedades de cultivo con fines medicinales o alimenticios. *Papaver somniferum* var. *glabrum* Boiss., de flores de color púrpura o a veces blancas, semillas de color blanco a violáceo oscuro; *P. somniferum* var. *album* D.C., flores blancas y semillas blanco-amarillentas; y *P. somniferum* var. *nigrum* D.C., flores de color violáceo y semillas de color gris-pizarra. Una cuarta variedad, *P. somniferum* var. *setigerum* D.C., de flores de color violeta y hojas puntiagudas, es considerada la forma silvestre del sur de Europa y no se utiliza para cultivo (Paris y Moyses, 1967) (Evans, 2009). La especie *P. bracteatum* Lindl. se emplea también para fines farmacéuticos, pero su metabolito principal tebaína, debe ser transformado en morfina mediante semisíntesis (Samuelsson, 1992), por tanto las semillas de esta especie no contendrían morfina, aunque sí otros alcaloides opiáceos. Las semillas de adormidera son pequeñas (de 1 mm aproximadamente), forma arriñonada, cubierta por una red hexagonal y de color variable que va del gris oscuro al blanco-amarillento (Gilg y Brandt, 1926). Se utilizan tradicionalmente en Europa Central y Norteamérica para la fabricación de panes y dulces, y aunque en su forma natural no contienen morfina ni otros alcaloides opiáceos, éstos pueden aparecer adheridos como consecuencia de la manipulación, estando a veces en cantidades apreciables.

Uno de los problemas observados a nivel comercial es la confusión en la denominación entre las semillas de amapola (*Papaver rhoeas* L., Papaveraceae) y de adormidera, también denominadas semillas de papaver. La primera especie carece de alcaloides opiáceos en su cápsula y en la denominada paja. Por ello, es exigible la correcta denominación de la semilla utilizada.

En el año 2011, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) evaluó el riesgo para la salud pública derivado de la presencia de alcaloides del opio en semillas de adormidera. Éstas se utilizan principalmente para la elaboración de productos de panadería, recubrimiento de algunos platos, rellenos de pastelería y para la producción de aceite comestible. En la evaluación llevada a cabo por EFSA se estimó que la exposición de morfina derivada del consumo de alimentos que contienen semillas de adormidera, podía exceder la dosis de referencia aguda en algunos consumidores, como los niños (EFSA, 2011). Con el fin de evitar este riesgo y reducir el contenido de alcaloides en las semillas, la Comisión Europea publicó en 2014 unas recomendaciones que consideraban la aplicación de buenas prácticas (UE, 2014).

En España, se cultiva principalmente la variedad de adormidera destinada a la obtención de morfina, por lo que la presencia de morfina en las semillas puede ser muy superior al que aparece en las semillas de variedades cultivadas en otras regiones europeas donde se destinan las semillas a fines culinarios. Por ello, el Consejo de Dirección de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) ha solicitado a la Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición del Comité Científico que realice la evaluación de la exposición de la población española a la mor-

fin a través del consumo de las variedades de semilla de adormidera cultivadas en nuestro país y determinar si puede existir un riesgo sanitario.

2. Morfina en semillas de adormidera

Aunque las semillas de adormidera no contienen alcaloides opiáceos o presentan unos niveles muy reducidos, pueden resultar contaminadas con alcaloides, como consecuencia de daños causados por algunos insectos o de una contaminación externa de las semillas durante la recolección en caso de que partículas de polvo procedentes de la paja (incluidas las paredes de las cápsulas) se adhieran a las semillas. Las semillas de adormidera se utilizan tradicionalmente en Europa Central y Norteamérica para la fabricación de panes y dulces. En la planta, antes de la recolección, las semillas no contienen morfina ni otros alcaloides opiáceos, pero la contaminación debida a la manipulación de las cápsulas, hace que se hayan detectado en cantidades variables que van desde 4 mg/kg hasta 250 mg/kg (Bruneton, 2009).

El contenido en alcaloides depende de varios factores, observándose una gran diferencia en aquellas variedades que se destinan a la industria farmacéutica frente a las que se cultivan exclusivamente para el sector alimentario. Este puede ser uno de los problemas, ya que el contenido de morfina de la variedad cultivada en España es muy superior al que aparece en las variedades cultivadas en otros Estados miembros. Además, algunos Estados miembros disponen de legislación nacional que fija límites máximos para los alcaloides del opio. Esta situación genera notificaciones de alertas en el sistema RASFF (*Rapid Alert System for Food and Feed*) y pone en riesgo la viabilidad del mercado único ya que las semillas producidas en un Estado miembro no se pueden comercializar en otro.

Por todo lo anteriormente expuesto, se ha solicitado que se realice la evaluación de la exposición de la población española a la morfina a través del consumo de las variedades de semilla de adormidera cultivadas en nuestro país y determinar si puede existir un riesgo sanitario.

El contenido de opiáceos de semillas de adormidera es muy variable y depende de la procedencia de la semilla y el método de procesamiento.

En España la adormidera se produce por una sola empresa, principalmente para su uso por la industria farmacéutica, que desde 2015 viene aplicando la Recomendación de la Comisión (2014/662/UE) sobre buenas prácticas para prevenir y reducir la presencia de alcaloides opiáceos en las semillas de adormidera y los productos que las contienen (UE, 2014).

Un conjunto de los análisis realizados en España de 200 muestras diferentes de semillas de *Papaver somniferum* producidas en España entre 2014 y 2016 muestran una gran variabilidad en los mismos. Los análisis realizados mediante HPLC-UV, presentan unos valores que van desde 13,55 mg/kg (2015) a 596,00 mg/kg (2014, antes de la aplicación de la Recomendación de la Comisión (2014/662/UE) sobre buenas prácticas para prevenir y reducir la presencia de alcaloides opiáceos en las semillas de adormidera y los productos que contienen semillas de adormidera).

3. Consumo de semillas de adormidera en España

En España las semillas de adormidera tienen un consumo reducido y las encuestas de ingesta alimentaria no lo recogen, lo cual dificulta de forma importante conocer su nivel de ingesta por parte de la población española y, por tanto, establecer el potencial riesgo que supone el consumo de morfina como contaminante. Sin embargo, en los países centroeuropeos existen datos amplios sobre el consumo de semillas por la influencia de sus contaminantes sobre la salud. Por ejemplo, dos estudios realizados en Hungría en 2003 y 2009 evaluaron la ingestión de morfina a partir del consumo de semillas contaminadas. Aunque se trata de datos estimados en función del consumo de panadería/bollería con semillas de adormidera, del grado de contaminación a partir de análisis previos, y la reducción del contenido en morfina a partir de los procesos de manipulación de la semilla previa a su consumo, se ha estimado una posible ingesta diaria de morfina a través de estos alimentos comprendida entre 18,3-25,4 y 25,6-47,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para adultos y entre 32,9 y 66,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para niños, respectivamente (Zentai et al., 2012).

Las importaciones a España de semillas de adormidera de diferentes países pueden ser un dato de referencia. De acuerdo con Eurostat, durante 2015 se importaron a España semillas de distintos países que, en total, alcanzan las 396,7 toneladas. A ello habría que sumar las 96 toneladas comercializadas en España durante 2015 por la única empresa española productora de estas semillas. Asimismo, se exportaron desde España 7 652,9 toneladas de semillas a distintos países en 2015 (Eurostat, 2016). Sin embargo, estos datos no permiten estimar el consumo de semillas de adormidera por la población española puesto que existe un intercambio comercial que puede incluir el reenvío a otros países de semillas importadas a España.

La Federación Española de Industrias de la Alimentación y Bebidas (FIAB) ha facilitado datos de la producción de pan, bollería y pastelería con semillas de adormidera por parte de la asociación de empresas españolas de este sector. En bollería industrial se emplean mayoritariamente como "topping" en porcentajes que van del 0,87 al 2,5 % del peso según el producto, mientras que en panadería se pueden utilizar indistintamente como "topping" (0,1 a 5 %) o en la masa (0,09 a 0,97 %). En conjunto, las seis empresas que han facilitado datos utilizaron cerca de 72 700 kg durante el año 2015. Tomando estos datos se puede establecer un escenario de consumo de semillas de adormidera en España.

A partir de los porcentajes de uso de semillas en pan y bollería facilitados por la industria se puede calcular la cantidad total de producto de cada empresa que incluye estas semillas entre sus ingredientes. Para ello se toma el menor de los porcentajes de uso reportados para pan (0,09 a 0,8 % según la empresa) y bollería (0,87 a 0,95 % según la empresa), de manera que se sobrestime la producción de producto con semillas y se obtenga un escenario más desfavorable en cuanto a la posible ingesta de morfina. La cantidad de producto con semillas calculado es de 7 252,27 toneladas de pan y 370,75 toneladas de bollería.

Una vez establecida la producción total de pan y bollería/pastelería con semillas de estas empresas, se compara con el total de la producción de las empresas declarado por la Asociación de la Industria de Panadería, Bollería y Pastelería en 2014 (718 000 toneladas de pan y 134 000 de bollería/pastelería) (ASEMAC, 2015) para establecer el porcentaje de la producción total que contiene

semillas. Se obtiene así que el pan con semillas de adormidera supone un 1,33 % de la producción total de pan y que un 0,28 % de la producción total de bollería/pastelería contendría también estas semillas.

Si se aplican esos mismos porcentajes de producción de pan o bollería/pastelería con semillas de adormidera al consumo de pan o bollería/pastelería de la población española según distintas encuestas de consumo para diferentes grupos de edad (medias y P95 de la encuesta ENALIA para 6-11 meses, 12-35 meses, 3-9 años y 10-17 años (AECOSAN, 2016) y encuesta de adultos (AECOSAN, 2006)), se obtienen las correspondientes medias y P95 de consumo de pan y bollería/pastelería con semillas de adormidera (Tablas 1 y 2).

El consumo de pan con semillas más alto obtenido 3,99 g/día es el correspondiente al P95 del intervalo de edad 10-17 años de la encuesta ENALIA, mientras que en el caso de la bollería/pastelería el consumo más elevado es de 0,83 g/día correspondiente al P95 (suma de galletas, bollos, pastas y pasteles) en adultos (Tablas 1 y 2). Al tomar el consumo de todos los tipos de pan y de bollería/pastelería se está sobreestimando el consumo para obtener un escenario más desfavorable.

Tabla 1. Estimación del consumo de pan con semillas por grupos de edad			
Grupos de edad	Consumo pan y similares (solo consumidores)		Consumo pan con semillas
	(g/día)		
Adultos	Media pan blanco	92,3	1,23
	P95 pan blanco	198,64	2,64
	Media pan integral	39,92	0,53
	P95 pan integral	96,54	1,28
10-17 años	Media	123,86	1,65
	P95	300	3,99
3-9 años	Media	79,7	1,06
	P95	200	2,66
12-35 meses	Media	34,7	0,46
	P95	100	1,33
6-11 meses	Media	12,42	0,17
	P95	42,72	0,57

Tabla 2. Estimación del consumo de bollería/pastelería con semillas por grupos de edad

Grupos de edad	Consumo bollería/pastelería (solo consumidores) (g/día)		Consumo bollería/pastelería con semillas (g/día)
Adultos	Media Galletas	31,04	0,09
	P95 Galletas	72,82	0,20
	Media Bollos	51,18	0,14
	P95 Bollos	123,06	0,34
	Media Pastas/pasteles	47,23	0,13
	P95 Pastas/pasteles	104,78	0,29
10-17 años	Media	78,30	0,22
	P95	194,53	0,54
3-9 años	Media	64,79	0,18
	P95	165,39	0,46
12-35 meses	Media	33,46	0,09
	P95	95,18	0,27
6-11 meses	Media	12,84	0,04
	P95	30	0,08

Aplicando al consumo de pan y bollería/pastelería con semillas el mayor porcentaje (%) de contenido de semillas del que han informado las empresas (5 % en pan y 2,5 % en bollería) se obtiene un consumo máximo de semillas de adormidera por persona de 0,2 g/día procedentes del pan (niños de 10-17 años y adultos) y de 0,02 g/día procedentes de bollería/pastelería (correspondiente a adultos). De nuevo al aplicar el porcentaje de semillas más alto se sobreestima el consumo para obtener un escenario más desfavorable. Pese a ello, los consumos que se estiman son muy inferiores a los reflejados por EFSA para países centroeuropeos en su opinión sobre la presencia de alcaloides opiáceos en semillas de adormidera (EFSA, 2011).

4. Exposición a morfina por consumo de semillas de adormidera en España

Aunque, como se ha señalado, actualmente es muy difícil conocer el consumo exacto de semillas de adormidera en España. A partir de los datos de contenido de morfina y de la estimación de ingesta de estas semillas realizada se puede calcular la exposición a morfina por parte de la población española.

Para este cálculo de exposición, en el escenario más desfavorable, se puede considerar el máximo contenido de morfina en semillas producidas en España (un dato de 2014, 596 mg/kg) y la estimación de consumo de semillas realizada aplicando al consumo de pan y bollería/pastelería con semillas el mayor porcentaje de contenido de semillas del que han informado las empresas (5 % en pan y 2,5 % en bollería). Al utilizar el contenido de morfina más alto detectado también se está sobreestimando los contenidos de morfina para tener un escenario más desfavorable.

Con estos datos, para el grupo de mayores consumidores de pan y bollería/pastelería, la ingesta de morfina procedente de pan y productos similares sería de 0,12 mg morfina/día (niños de 10-17 años y adultos) y la procedente de bollería/pastelería sería de 0,01 mg morfina/día (correspondiente a adultos).

Considerando el peso corporal reportado en las encuestas de consumo de alimentos utilizadas, la mayor ingesta de morfina correspondería al grupo de 12-35 meses con una ingesta de 3,58 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c./día procedente de la suma del pan y la bollería/pastelería (Tablas 3 y 4).

Tabla 3. Estimación de ingestas de morfina a través del consumo de pan por población de distintos grupos de edad

Grupos de edad	Consumo pan con semillas (g/día)	Consumo semillas (g/día)	Ingesta morfina (mg/día)	Peso corporal (kg)	μg morfina/kg p.c./día
Adultos	3,93	0,2	0,12	68,5	1,75
10-17 años	3,99	0,2	0,12	50,5	2,38
3-9 años	2,66	0,13	0,08	26,0	3,08
12-35 meses	1,33	0,07	0,04	12,3	3,25
6-11 meses	0,57	0,03	0,02	9,0	2,22

Tabla 4. Estimación de ingestas de morfina a través del consumo de bollería/pastelería por población de distintos grupos de edad

Grupos de edad	Consumo bollería/pastelería con semillas (g/día)	Consumo semillas (g/día)	Ingesta morfina (mg/día)	Peso corporal (kg)	μg morfina/kg p.c./día
Adultos	0,83	0,021	0,013	68,5	0,19
10-17 años	0,54	0,014	0,008	50,5	0,16
3-9 años	0,46	0,010	0,007	26,0	0,27
12-35 meses	0,27	0,007	0,004	12,3	0,33
6-11 meses	0,08	0,002	0,001	9,0	0,11

En la evaluación llevada a cabo por EFSA en 2011, se estableció una dosis de referencia aguda (ARfD) de 10 μg morfina/kg p.c. como valor guía para la morfina teniendo en cuenta la naturaleza de los efectos a corto plazo y debido a que es poco probable que tenga un potencial carcinogénico o genotóxico derivado de la exposición dietética a semillas de adormidera (EFSA, 2011).

Como se ha indicado, en el caso de la población española la mayor ingesta de morfina correspondería al grupo de niños de 12-35 meses con una ingesta de 3,58 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c./día procedente de la suma del pan y la bollería/pastelería. Esta ingesta estimada de morfina estaría muy por debajo de la dosis de referencia aguda (10 μg morfina/kg p.c.) establecida por EFSA.

Conclusiones del Comité Científico

Conforme a los datos disponibles actualmente y la estimación realizada, la ingesta de morfina a través del consumo de pan y bollería/pastelería por la población española está por debajo de la dosis de referencia aguda (ARfD) establecida por EFSA.

El Comité Científico recomienda que se continúe aplicando la Recomendación de la Comisión sobre buenas prácticas para prevenir y reducir la presencia de alcaloides opiáceos en las semillas de adormidera y los productos que las contienen, mediante las cuales se puede llegar a una reducción mínima del 10 % en el contenido en morfina.

Por otro lado es imprescindible la correcta definición del producto, evitando el uso de la palabra “amapola” en vez de adormidera cuando la especia empleada sea *Papaver somniferum*. El empleo del término papaver tampoco es adecuado. Se sugiere que en el etiquetado del producto se indique claramente la procedencia de las semillas: Amapola cuando sea la especie *Papaver rhoeas*, Adormidera en el caso de *Papaver somniferum* o mezcla de ambas se indicará Amapola (*Papaver rhoeas*) y Adormidera (*Papaver somniferum*).

Incertidumbres

La mayor incertidumbre de la estimación realizada procede de la falta de información precisa sobre el consumo de semillas de adormidera por la población española. El consumo se ha estimado a partir de los datos de producción facilitados por la industria de panadería y bollería/pastelería. Existen otros usos industriales recientes de estas semillas como su adición a yogures, pero dado que las estimaciones realizadas han tratado de representar siempre los peores escenarios se considera que, actualmente, la ingesta procedente de esos productos es reducida y queda cubierta por la estimación realizada.

También existe la posibilidad de un consumo por uso culinario por parte de consumidores que adquieran las semillas o de panaderías y pastelerías locales. Este consumo no parece muy relevante en el conjunto de la población española dada la falta de tradición de un uso gastronómico amplio de estas semillas en España. Por otra parte no se ha tenido en cuenta la disminución de los contenidos de morfina que pueden tener lugar durante el procesado de los alimentos que los contengan.

Tanto el contenido de morfina en las semillas de adormidera, como el consumo de estas semillas, podría variar en el futuro como consecuencia de la mejora de las buenas prácticas en la producción y la transformación de las semillas o de un mayor uso industrial o culinario de las mismas en España.

Referencias

- AECOSAN (2006). Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. Modelo de dieta española para la determinación de la exposición del consumidor a sustancias químicas.
- AECOSAN (2016). Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. Encuesta Nacional de Alimentación en la Población Infantil y Adolescente. Disponible en: http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/enalia.shtml [acceso: 10-05-16].
- ASEMAC (2015). Asociación Española de la Industria de Panadería, Bollería y Pastelería. Dossier de prensa-junio 2015. Disponible en: <http://www.asemac.es/datos.php> [acceso: 9-05-16].
- Bruneton, J. (2009). En libro: *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*. 4ª Ed., Lavoisier, Paris.
- EFSA (2011). European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of opium alkaloids in poppy seeds. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). *The EFSA Journal*, 9 (11): 2405.
- Eurostat (2016). Complete database. International trade detailed data. Disponible en: <http://ec.europa.eu/eurostat/data/database> [acceso: 11-05-16].
- Evans, W.C. (2009). En libro: *Trease and Evans Pharmacognosy*. 16ª Ed., Saunders-Elsevier, Edimburgo. pp: 377-382.
- Gilg, E. y Brandt, W. (1926). En libro: *Farmacognosia*. Ed. Labor, Barcelona. pp: 178-179.

- Kuklinski, C. (2000). En libro: *Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Ed. Omega, Barcelona. pp: 192-194.
- Paris, R.R. y Moyses, H. (1967). *Précis de Matière Médicale*. Vol. 2, Masson, Paris. pp: 186-206.
- Samuelsson, G. (1992). Drug of natural origin. A textbook of Pharmacognosy. *Swedish Pharmaceutical Press*, Estocolmo. pp: 259-266.
- UE (2014). Recomendación de la Comisión (2014/662/UE) de 10 de septiembre de 2014 sobre buenas prácticas para prevenir y reducir la presencia de alcaloides opiáceos en las semillas de adormidera y los productos que contienen semillas de adormidera. DO L 271 de 12 de septiembre de 2014, pp: 96-100.
- Zentai, A., Sali, J., Szeitzné-Szabó, M., Szabó, I.J. y Ambrus, Á. (2012). Exposure of consumers to morphine from poppy seeds in Hungary. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 29 (3), pp: 403-414.

Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) en relación al uso de una solución acuosa de peróxido de hidrógeno, ácido acético y ácido peracético (23/17/15) como coadyuvante tecnológico para la desinfección bacteriana de cítricos y tomates y el agua de lavado de los mismos

Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición

Elena Alonso Lebrero, José Manuel Barat Baviera, María Pilar Conchello Moreno, Ramón Estruch Riba, María Antonia Ferrús Pérez, Guillermina Font Pérez, Susana Guix Arnau, Arturo Hardisson de la Torre, Ángeles Jos Gallego, Ascensión Marcos Sánchez, Amelia Martí del Moral, Olga Martín Belloso, María Aránzazu Martínez Caballero, Alfredo Palop Gómez, Gaspar Pérez Martínez, José Luis Ríos Cañavate, Gaspar Ros Berrueto, Jesús Ángel Santos Buelga, Jesús Simal Gándara, Josep Antoni Tur Marí

Secretario técnico

Vicente Calderón Pascual

Número de referencia: AECOSAN-2016-002

Documento aprobado por la Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición del Comité Científico en su sesión plenaria de 18 de mayo de 2016

Grupo de trabajo

José Manuel Barat Baviera (Coordinador)
Guillermina Font Pérez
Gaspar Pérez Martínez
Ricardo López Rodríguez (AECOSAN)

Resumen

La empresa Productos Citrosol S.A. ha solicitado una evaluación de la seguridad del uso como coadyuvante tecnológico de una solución acuosa de peróxido de hidrógeno (23 %), ácido acético (17 %) y ácido peracético (15 %). Como estabilizantes se incluyen el ácido 1-hidroxietileno-1,1-difosfónico (HEDP) (<0,2 %) y el ácido dipicolínico (DPA) ($\leq 0,01$ %).

El uso propuesto para el coadyuvante tecnológico es la desinfección bacteriana de cítricos y tomates a su llegada a las plantas de procesamiento así como del agua de lavado de los mismos. Al desinfectar el agua utilizada para el lavado, ésta se puede aprovechar en el lavado consecutivo de las frutas y hortalizas a través de un sistema de recirculación manteniendo el agua de lavado en condiciones adecuadas y disminuyendo el consumo de agua. La dosis de uso solicitada es del 0,4 % en cítricos y 0,2 % en tomates.

El Comité Científico realizó en 2013 la evaluación de un producto de composición similar. En esta ocasión el solicitante realiza el análisis de los residuos de ácido dipicolínico en los caldos de tratamiento y en los cítricos y tomates después de haber sido sometidos a tratamiento. A partir de esos datos, considerando el escenario más desfavorable y el consumo de cítricos y tomates en Europa se ha hecho una estimación de la ingesta diaria (IDE) por consumo de cítricos y tomates tratados con el coadyuvante tecnológico así como una valoración del riesgo que puede suponer para el consumidor mediante el cálculo del "margen de seguridad" (MOS).

El Comité Científico concluye que, basándose en la información facilitada por el solicitante y teniendo en cuenta la composición y condiciones de uso propuestas, el uso del coadyuvante tecnológico no implica riesgo para la salud del consumidor.

Palabras clave

Cítricos, tomates, coadyuvante tecnológico, desinfección bacteriana.

Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Consumers Affairs, Food Safety and Nutrition (AECOSAN) in relation to the use of an antimicrobial aqueous solution containing hydrogen peroxide, acetic acid and peroxyacetic acid (23/17/15) as a processing aid on citrus fruits and tomatoes, and their wash water

Abstract

The company Productos Citrosol S.A. has requested a safety assessment on the use of an aqueous solution containing hydrogen peroxide (23 %), acetic acid (17 %) and peracetic acid (15 %) as a processing aid. As stabilisers, 1-hydroxyethylidene-1,1-diphosphonic acid (HEDP) (<0.2 %) and dipicolinic acid (DPA) (≤ 0.01 %) are included in the solution.

The proposed use of the processing aid is for the bacterial disinfection of citrus fruits and tomatoes on their arrival at processing plants, and the bacterial disinfection of the water used to wash them. By disinfecting the washing water, it can be employed for the consecutive washing of fruits and vegetables through a recirculation system, keeping the water in suitable conditions and reducing water consumption. The requested dose of use is 0.4 % for citrus fruits and 0.2 % for tomatoes.

In 2013, the Scientific Committee assessed a product of similar composition. On this occasion, the applicant analysed the residues of dipicolinic acid in treatment liquids and in citrus fruits and tomatoes following treatment. From that data, taking into account the least favourable scenario and the consumption of citrus fruits and tomatoes in Europe, estimated daily intake (EDI) was established for the consumption of citrus fruit and tomatoes treated with the processing aid; the risk to the consumer was also assessed using a "margin of safety" (MOS) calculation

The Scientific Committee concludes that, based on the information provided by the applicant and taking into account the proposed composition and conditions of use, the use of the processing aid does not involve a health risk for the consumer.

Key words

Citrus fruits, tomatoes, processing aid, bacteriological disinfection.

1. Introducción

La empresa Productos Citrosol S.A., ubicada en Potrías (Valencia), ha solicitado una evaluación de la seguridad del uso de una solución acuosa de peróxido de hidrógeno (23 %), ácido acético (17 %) y ácido peracético (15 %), como coadyuvante tecnológico en el proceso de desinfección bacteriana de cítricos y tomates a su llegada a las plantas de procesado así como del agua de lavado de los mismos. El coadyuvante, fabricado por la empresa Solvay Chemicals International S.A. (Bruselas, Bélgica), está formado por dos compuestos activos: peróxido de hidrógeno y ácido acético en solución acuosa, que dan lugar a la formación de un tercer compuesto activo, el ácido peracético, a través de un equilibrio químico. Para mantener ese equilibrio, se incluyen además como estabilizantes el ácido 1-hidroxietilen-1,1-difosfónico (HEDP) (<0,2 %) y el ácido dipicolínico (DPA) ($\leq 0,01$ %). Se trata de una solución acuosa similar en cuanto a sus componentes a otra ya evaluada anteriormente por el Comité Científico de la AECOSAN (2013).

Atendiendo a dicha solicitud, el Consejo de Dirección de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) ha solicitado a la Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición del Comité Científico que evalúe la seguridad del uso de la citada solución acuosa de peróxido de hidrógeno, ácido acético y ácido peracético, como coadyuvante tecnológico en el proceso de desinfección bacteriana de cítricos y tomates y las aguas de lavado de los mismos, teniendo en cuenta las “Líneas directrices de la documentación precisa para la evaluación de coadyuvantes tecnológicos que se pretenden emplear en la alimentación humana” (AECOSAN, 2010).

En lo que respecta al peróxido de hidrógeno, está autorizado en España como descontaminante de agua destinada a consumo humano (BOE, 2003) y no se ha establecido una Ingesta Diaria Admisable (IDA) por parte de JECFA (Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios) (JECFA, 2004a). Por otro lado, el ácido acético es un aditivo alimentario (E 260) autorizado en la Unión Europea y el ácido peracético (PAA) se encuentra autorizado en alimentación humana (como aditivo alimentario o coadyuvante tecnológico) en países como Canadá o Australia. En lo que respecta a su IDA, tampoco ha sido establecida (JECFA, 2004a).

En cuanto a los estabilizantes incluidos en la formulación, tampoco existe una IDA establecida para las sustancias individuales, aunque en el caso del HEDP se ha establecido una IDA aceptable formando parte de soluciones antimicrobianas de peroxiacidos (JECFA, 2004a).

Dado que no se puede descartar la presencia de residuos detectables en el producto final (cítricos y tomates) tras el empleo de esta solución acuosa, de acuerdo con los criterios establecidos en las citadas Líneas directrices, el coadyuvante se clasifica dentro de una situación 4: sustancia autorizada en alimentación humana cuya IDA no está establecida y cuyo empleo puede conducir a la presencia de residuos técnicamente inevitables. De acuerdo a esta situación, el solicitante del producto presenta información relativa a los siguientes aspectos:

- Datos administrativos y presentación general.
- Características físicoquímicas.
- Función tecnológica.
- Estudios de residuos: método analítico y validación del método.
- Estudios y datos relativos a la inocuidad: Nivel A.

- Estudio de consumo y evaluación del nivel anticipado de ingesta por el consumidor.

2. Datos administrativos y presentación general

2.1 Denominación comercial y composición

El producto propuesto como coadyuvante tecnológico, con denominación comercial Citrocide Plus, es una solución acuosa de peróxido de hidrógeno (23 %) y ácido acético (17 %) que se mantiene en equilibrio químico con ácido peracético (15 %) y agua. Para mantener el citado equilibrio se utilizan además dos estabilizantes (ácido 1-hidroxietilen-1,1-difosfónico (<0,2 %) y ácido dipicolínico ($\leq 0,01$ %)).

2.2 Uso previsto para la sustancia

Coadyuvante tecnológico en el proceso de desinfección bacteriana de cítricos y tomates a su llegada a la planta de procesado, así como de sus aguas de lavado.

2.3 Usos autorizados en alimentación humana

Entre los principales usos autorizados en alimentación humana se destacan:

- Peróxido de hidrógeno. Autorizado en España como descontaminante de agua destinada a consumo humano (Real Decreto 140/2003) (BOE, 2003).
- Ácido acético. Aditivo alimentario (E 260) autorizado por el Reglamento (CE) N° 1333/2008 (UE, 2008), con una dosis máxima específica *quantum satis*.
- Ácido peracético. Autorizado en alimentación humana (como aditivo alimentario o coadyuvante tecnológico) en países como Canadá o Australia. También están autorizadas en alimentación humana varias soluciones que contienen ácido peracético (Francia y Estados Unidos).
- Ácido 1-hidroxietilen-1,1-difosfónico (HEDP). Autorizado en España para el tratamiento de aguas destinadas al consumo humano. Además, está autorizado en Estados Unidos para el proceso de lavado o ayuda en el pelado de frutas y hortalizas y como desinfectante de canales. También está incluido en la base de datos *Effective Food Contact Substance (FCS) Notifications* de sustancias en contacto con alimentos de la *Food and Drug Administration* (FDA). En Australia está autorizado como coadyuvante tecnológico en aguas y como quelante en agentes desinfectantes de carne, frutas y hortalizas.
- Ácido dipicolínico (DPA). incluido en la base de datos *Effective Food Contact Substance (FCS) Notifications* de sustancias en contacto con alimentos de la FDA.

En la tabla 1 se recogen usos autorizados y evaluaciones de estas sustancias.

Tabla 1. Relación de usos autorizados y evaluaciones		
Sustancia	Uso autorizado/evaluación	País/Referencia
Peróxido de hidrógeno	El Reglamento (CE) N° 853/2004 establece para las gelatinas y el colágeno un residuo de peróxido de hidrógeno de 10 mg/kg	Unión Europea (UE, 2004)
	Autorizado su uso como sustancia para descontaminar agua destinada a consumo humano	España (BOE, 2003)
	Evaluación toxicológica favorable como coadyuvante tecnológico en el procesado de hemoderivados y cefalópodos	España (AECOSAN, 2011)
	Autorizado su uso como coadyuvante tecnológico en tripas	Francia (Arrêté, 2006)
	Autorizado su uso en producción de cerveza como agente clarificante (cantidad máxima 135 mg/kg), en suero de leche para mantenimiento del pH (100 mg/kg) y en vainas de avena como agente blanqueante (GMP)	Canadá (DJC, 2016)
	Reconocido como GRAS (<i>Generally Recognized As Safe</i>) (21 CFR 184.1366), utilizado en leche (0,05 %), lactosuero (0,04 %), queso de lactosuero coloreado con annato (0,05 %), almidón (0,15 %), jarabe de maíz (0,15 %), huevos deshidratados, estómagos, patas de carne de vacuno, arenques, vino, té, vinagre de vino y emulsionantes (1,25 %)	Estados Unidos (FDA, 2016a)
	Autorizado el aditivo mezcla de ácido peracético, ácido octanoico, ácido acético, peróxido de hidrógeno y HEDP como desinfectante de canales de aves, partes, tripas y órganos con una concentración máxima de peroxiácidos de 220 mg/kg como ácido peroxiacético, 110 mg/kg de peróxido de hidrógeno y 13 mg/kg de HEDP	Estados Unidos (FDA, 2016c)
	Autorizado su uso como coadyuvante tecnológico (agente blanqueante) en alimentos, estableciéndose un residuo máximo de 5 mg/kg	Australia (ANZFSC, 2016)
Ácido acético	Autorizado como aditivo alimentario (E 260), según el Reglamento (CE) N° 1333/2008, con una dosis máxima específica <i>quantum satis</i>	Unión Europea (UE, 2008)
Ácido peracético	Autorizado el uso como coadyuvante tecnológico del ácido peracético en solución con peróxido de hidrógeno y ácido acético, en cáscaras de huevo destinadas a la fabricación de <i>ille flotant</i> (solución al 2,5 % con un 4,5 % de peracético); en guisantes y judías verdes destinados a la esterilización (500 mg/l de ácido peracético); en almidón, fécula y derivados (1 kg/tonelada); en ensaladas crudas listas para el consumo (4ª gama); en espinacas escaldadas destinadas a la congelación (75 mg/l de peracético) y en trigo antes de la molienda (3 l de una solución a base de 15 % de peracético y 23 % de peróxido de hidrógeno por tonelada de trigo)	Francia (Arrêté, 2006)
	Autorizado para el proceso de lavado o ayuda en el pelado de frutas y hortalizas que no sean materias primas sin procesar y que no exceda 80 mg/kg en el agua de lavado	Estados Unidos (FDA, 2016b)
	Autorizado el aditivo mezcla de ácido peracético, ácido octanoico, ácido acético, peróxido de hidrógeno y HEDP como desinfectante de canales de aves, partes, tripas y órganos con una concentración máxima de peroxiácidos de 220 mg/kg como ácido peroxiacético, 110 mg/kg de peróxido de hidrógeno y 13 mg/kg de HEDP	Estados Unidos (FDA, 2016c)

Tabla 1. Relación de usos autorizados y evaluación		
Sustancia	Uso autorizado/evaluación	País/Referencia
Ácido peracético	Incluido en la base de datos de <i>Effective Food Contact Substance (FCS) Notifications</i> formando fundamentalmente parte de disoluciones acuosas junto con ácido acético y peróxido de hidrógeno	Estados Unidos (FDA, 2016d)
	Autorizado como aditivo alimentario (agente modificador de almidón)	Canadá (DJC, 2016)
	Autorizado como coadyuvante tecnológico como agente blanqueante, de lavado y “peeling” y como catalizador con un nivel máximo permitido de 0,7 mg/kg	Australia (ANZFSC, 2016)
Ácido 1-hidroxietil-1,1-difosfónico (HEDP)	Autorizado su uso como sustancia para descontaminar agua destinada a consumo humano (no debe aparecer el producto en el agua por encima del límite de detección de la mejor técnica de análisis disponible)	España (BOE, 2003)
	Autorizado su uso como coadyuvante tecnológico en azúcar	Francia (Arrêté, 2006)
	Autorizado junto con ácido peroxiacético para el proceso de lavado o ayuda en el pelado de frutas y hortalizas que no sean materias primas sin procesar y que no exceda 4,8 mg/kg en el agua de lavado	Estados Unidos (FDA, 2016b)
	Autorizado el aditivo mezcla de ácido peracético, ácido octanoico, ácido acético, peróxido de hidrógeno y HEDP como desinfectante de canales de aves, partes, tripas y órganos con una concentración máxima de peroxiacidos de 220 mg/kg como ácido peroxiacético, 110 mg/kg de peróxido de hidrógeno y 13 mg/kg de HEDP	Estados Unidos (FDA, 2016c)
	Incluido en la base de datos de <i>Effective Food Contact Substance (FCS) Notifications</i> formando fundamentalmente parte de disoluciones acuosas junto con ácido acético, ácido peracético, peróxido de hidrógeno y ácido dipicolínico	Estados Unidos (FDA, 2016d)
	Autorizado como coadyuvante tecnológico en agua y como quelante en agentes desinfectantes de carne, frutas y hortalizas	Australia (ANZFSC, 2016)
Ácido dipicolínico (DPA)	Incluido en la base de datos de <i>Effective Food Contact Substance (FCS) Notifications</i> formando fundamentalmente parte de disoluciones acuosas junto con ácido acético, ácido peracético, peróxido de hidrógeno y HEDP	Estados Unidos (FDA, 2016d)
	Presente en las esporas de la bacteria perteneciente al género <i>Bacillus</i> y se encuentra en grandes cantidades en un alimento fermentado tradicional japonés conocido como <i>natto</i> , alimento que consiste en semillas de soja fermentadas ¹	Japón

¹La ingesta diaria media de ácido dipicolínico (DPA) de la población japonesa proveniente del alimento *natto* es de 0,6-4 mg (Ohsugi y Sumi, 2011). Además, el DPA muestra actividad antimicrobiana a frente a *E. coli*, levaduras y *Vibrio* (Sumi y Ohsugi, 1999) y está siendo estudiado por su actividad farmacológica en la circulación sanguínea (Ohsugi et al., 2005). Algunas especies del género *Bacillus* están calificadas por EFSA entre los microorganismos incorporados intencionadamente a los alimentos como seguros (QPS) con la calificación de ausencia de actividad toxigénica y genes de resistencia a antibióticos adquiridos (EFSA, 2015).

El solicitante indica que tanto el peróxido de hidrógeno como el ácido peracético están notificados en el Reglamento (CE) N° 1451/2007 relativo a la segunda fase del programa del trabajo de 10 años contemplado en el artículo 16, apartado 2, de la Directiva 98/8/CE del Parlamento Europeo y del Consejo relativa a la comercialización de productos biocidas, como sustancias activas para la fabricación de dichos productos (UE, 2007). Esto implica que, durante un periodo de transición, se pueden utilizar mientras se evalúan esos usos.

Asimismo, el peróxido de hidrógeno tiene autorizado su uso como sustancia activa en biocidas de los tipos de producto 1, 2, 3, 4, 5 y 6 (UE, 2015).

2.4 Ingestas Diarias Admisibles

Ninguno de los componentes del producto tiene establecido un valor de IDA.

Adicionalmente, se destaca que este tipo de formulados han sido evaluados por diferentes organismos internacionales. Así, JECFA (2004a) para las soluciones antimicrobianas de peroxiácidos entre los que se encuentran el peróxido de hidrógeno el ácido acético, y el ácido peracético incluyendo el HEDP como estabilizante, considera que en las condiciones de uso previstas las cantidades de residuos en alimentos tratados, en el momento de su consumo, no suponen ninguna preocupación desde el punto de vista de la seguridad alimentaria.

3. Características fisicoquímicas

3.1 Composición y formulación detallada

El producto propuesto como coadyuvante tecnológico es una solución acuosa de peróxido de hidrógeno (23 %) y ácido acético (17 %) en equilibrio químico con ácido peracético (15 %) y agua. Según se indica en la solicitud, junto a los compuestos activos, el producto contiene dos estabilizantes (ácido 1-hidroxietilen-1,1-difosfónico (<0,2 %) y ácido dipicolínico (≤0,01 %)). En la tabla 2 se muestra la composición del coadyuvante.

Componente	Función	N° CAS	Peso molecular (g/mol)
Peróxido de hidrógeno	Sustancia activa	7722-84-1	34
Ácido acético	Sustancia activa	64-19-7	60,1
Ácido peracético	Sustancia activa	79-21-0	76,1
Ácido 1-hidroxietilen-1,1-difosfónico (HEDP)	Estabilizante	2809-21-4	205,02
Ácido dipicolínico (DPA)	Estabilizante	499-83-2	167,12
pH=0,46			

3.2 Especificaciones del producto

En la tabla 3 se incluyen las especificaciones, la ficha técnica y los resultados de los análisis de tres lotes del coadyuvante tecnológico propuesto.

Tabla 3. Especificaciones, ficha técnica y resultados analíticos para el Citroside Plus

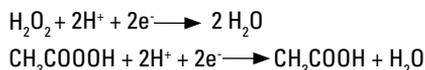
Componente	Especificaciones (% p/p)	Ficha técnica (% p/p)	Certificados de análisis (% p/p)		
Peróxido de hidrógeno	21-24	23	22,5	22,3	22,5
Ácido acético	-	17	-	-	-
Ácido peracético	14,5-15,5	15	15	15,1	14,9
Ácido 1-hidroxi-etilen-1,1-difosfónico (HEDP)	<0,2 %	-	0,164±0,010	0,172±0,010	0,179±0,012
Ácido dipicolínico (DPA)	≤0,01 %	-	0,00336±0,00018	0,00180±0,00008	0,00974±0,00018

3.2.1 Estabilidad del producto

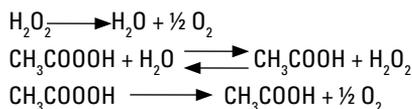
El solicitante aporta datos sobre la estabilidad del formulado con denominación comercial Proxitan 15 (pero igual composición) para demostrar que es estable a temperatura ambiente, siendo la pérdida de concentración del ácido peracético de aproximadamente 1 % p/p al año.

3.2.2 Reactividad

Las reacciones que tienen lugar en el agua son las de descomposición de los compuestos con grupos peróxidos para dar lugar a ácido acético y agua (EFSA, 2005):



Las reacciones que tiene lugar respecto al entorno de contacto son las siguientes (JECFA, 2004b):



JECFA, al evaluar soluciones desinfectantes que contienen peróxido de hidrógeno, ácido peracético, ácido octanoico, ácido peroxioctanoico y HEDP, indica que, en contacto con los alimentos, los ingredientes activos se descomponen con rapidez en sustancias no tóxicas y que las cantidades de ácido acético que pueden permanecer como resultado de la descomposición del ácido peracético no suponen un problema de seguridad. Además, señala que el peróxido de hidrógeno se descompone rápidamente en contacto con los alimentos, obteniéndose agua y oxígeno (JECFA, 2004b).

Asimismo, el uso de este tipo de soluciones no parece afectar negativamente al contenido de nutrientes (vitamina C y β -caroteno) presentes en frutas y verduras según indica JECFA (2006).

Igualmente, EFSA (2005) en la evaluación del uso de peroxiácidos en el tratamiento de canales de pollo concluye que no se detectaron efectos sobre proteínas y lípidos en los productos tratados.

4. Función tecnológica

4.1 Uso tecnológico alegado

El solicitante indica que el uso tecnológico alegado es el de desinfectante bacteriano de cítricos y tomates así como de las aguas de lavado de los mismos. El lavado de cítricos y tomates tiene lugar a su llegada a los centros de procesado con objeto de minimizar las contaminaciones o recontaminaciones durante esta primera fase del procesado. Asimismo, permite disminuir el consumo de agua en las centrales hortofrutícolas y evita la emisión de vertidos con una fuerte carga química contaminante sobre los acuíferos, a diferencia de otros métodos de desinfección.

Otras ventajas indicada por el solicitante, además de su eficacia y de no alterar la calidad y valor nutricional de los alimentos tratados, son la baja fitotoxicidad y la posibilidad de su aplicación junto con fungicidas sin que se vea disminuida la eficacia de éstos.

4.2 Alimentos o grupo de alimentos de destino

Los alimentos o grupos de alimentos de destino son los cítricos y los tomates.

4.3 Nivel de uso solicitado

Según indica el solicitante, la dosis de coadyuvante tecnológico a utilizar será del 0,4 % en cítricos y 0,2 % en tomates.

4.4 Justificación del uso, interés y eficacia

Tal como se indicaba en el informe del Comité Científico de 2013 (AECOSAN, 2013), de acuerdo a diferentes estudios (FAO/OMS, 2009) (EFSA, 2013) los principales microorganismos patógenos asociados a enfermedades que afectan al ser humano como resultado del consumo de productos frescos de origen no animal, entre los que se encuentra las frutas y hortalizas, son *E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Cryptosporium* spp., *Cyclospora* spp. y *Clostridium botulinum*. Estas fuentes también citan como patógenos diversos virus entéricos (norovirus y virus de la hepatitis A).

En frutas y hortalizas frescas la mayor proporción de contaminación por microorganismos patógenos para humanos se debe en última instancia a factores previos a la cosecha. Fuentes potenciales de contaminación en diferentes etapas de cultivo pueden ser: agua de riego, fertilizantes y abonos, herramientas contaminadas, mala higiene del personal de campo, etc. Además, aún en aquellas frutas y hortalizas que se consumen con un mínimo manipulado/procesado postcosecha, el riesgo de contaminación microbiológica por contaminación cruzada en etapas posteriores a la recolección aumenta, incrementando así el riesgo para la salud humana. En este sentido, procesos como el lavado y envasado son prácticas muy comunes en la mayoría de frutas y hortalizas para consumo en fresco. Estos procesos representan puntos críticos en lo que a contaminación microbiológica se refiere.

Los procesos de lavado postcosecha con agua potable pueden llegar a eliminar solo una parte de los microorganismos presentes en la superficie de la fruta, pero no actúan como un tratamiento desinfectante. La etapa de lavado postcosecha representa un punto crítico. Estos procesos requieren el uso de grandes cantidades de agua, lo que hace necesario el reciclado de la misma para ahorrar recursos y minimizar el impacto ambiental de esta práctica. En sistemas de lavado de frutas y hortalizas con recirculación de agua, si el agua no se desinfecta correctamente, ésta actúa como medio de transmisión de microorganismos produciendo contaminación cruzada en la fruta lavada.

En el sector hortofrutícola el primer tratamiento postcosecha que se realiza en los productos vegetales es el lavado, que puede tener lugar bien por inmersión en una balsa, o bien mediante el sistema denominado *drencher*, o ducha de palés que permite alcanzar un mojado perfecto de las frutas u hortalizas. En ambos métodos es fundamental el mantenimiento del caldo de tratamiento o agua de lavado, ya que éste se recircula a través de la fruta palé a palé, con lo que van pasando al caldo tanto los restos de los tratamientos químicos aplicados al cultivo con anterioridad, como parte de la suciedad proveniente de la recolección (hojas, ramas, tierra, etc.) y de la fruta misma, así como esporas y microorganismos patógenos depositados en el material vegetal. Esta situación provoca que la acumulación de contaminación se incremente de manera considerable con cada recirculación, haciendo del equipo una fuente de diseminación de microorganismos que puede afectar a la inocuidad de los productos. Para evitar que el agua de lavado se convierta en un vector de propagación de infección por contaminaciones cruzadas hay que asegurar que su calidad microbiológica se conserva, pudiéndose utilizar al efecto productos desinfectantes siempre garantizando que los productos de degradación y residuos del agente antimicrobiano utilizado no representen un riesgo para la salud del consumidor ni para el medioambiente, y que no alteren las propiedades organolépticas de la fruta u hortaliza (Gil et al., 2009) (Kyanko et al., 2010) y que se puedan combinar con productos fitosanitarios sin degradarlos.

En lo que respecta a la eficacia del coadyuvante tecnológico propuesto (Citroside Plus), se alega que la forma de actuar de estas soluciones de peróxido de hidrógeno, ácido acético y ácido peracético es similar a la de los clorógenos. Es decir, este tipo de soluciones tiene un alto poder oxidante pero, a diferencia de los clorógenos, su acción es menos corrosiva, poseen un mayor rango de acción, son efectivas en presencia de materia orgánica y aguas duras y generan como productos de reacción oxígeno, agua y ácido acético. Asimismo, se destaca como ventaja frente a la cloración (método de desinfección más frecuentemente utilizado en el sector) la eliminación del peligro que supone la formación de trihalometanos y vapores de cloro, ya que la reacción de oxidación de la materia orgánica resultante de la acción del ácido peracético genera oxígeno y ácido acético, sustancias que no son tóxicas (Vero et al., 2004) (Gil et al., 2009).

Según indica el solicitante, las mezclas de ácido peracético/peróxido de hidrógeno son un tipo de desinfectante que presenta uno de los espectros de actividad más amplio, altas eficacias en rangos variados de pH y temperaturas de trabajo, no siendo además un factor limitante en dicha actividad la presencia de materia orgánica. Asimismo, se destaca que tras el lavado de una cierta cantidad de productos hortofrutícolas el agua de lavado debe desecharse, lo que implica un gasto importante de agua potable cuando no se recupera y unos vertidos significativos.

Se señala además que el coadyuvante tecnológico es compatible con las sustancias activas fitosanitarias autorizadas, no evidenciándose degradación de las mismas cuando se desinfectan los caldos con este producto. En este sentido, el solicitante presenta los resultados de un estudio de compatibilidad de Citrocide Plus con sustancias fungicidas autorizadas concluyéndose que son compatibles.

4.4.1 Estudios de eficacia

Con objeto de establecer una dosis mínima de uso con la que se consiga una desinfección eficaz en todos los usos solicitados sin que se originen fitotoxicidades o variaciones en las propiedades organolépticas de los cítricos y tomates, el solicitante presenta los resultados de los siguientes ensayos:

- Establecimiento de las dosis mínimas de coadyuvante tecnológico Citrocide Plus eficaces para la desinfección bacteriana de cítricos, tomates y sus caldos de tratamiento.
- Evaluación de la eficacia en la superficie de los productos hortofrutícolas y en sus caldos de tratamiento frente a *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Clostridium perfringens*.
- Control de la contaminación microbiológica en la superficie de los productos hortofrutícolas y en sus caldos de tratamiento a las dosis mínimas correspondientes durante el tiempo de uso.
- Estudio de los efectos fitotóxicos en cítricos y tomates.

4.4.1.1 Establecimiento de dosis mínimas eficaces de coadyuvante tecnológico

Se han llevado a cabo dos ensayos piloto en planta industrial para establecer la dosis mínima necesaria para mantener el caldo de tratamiento recirculante en las condiciones microbiológicas adecuadas. Para ello se testaron dosis crecientes de coadyuvante tecnológico Citrocide Plus evaluándose su eficacia frente a bacterias.

En el caso de los tomates se testaron dosis del coadyuvante comprendidas entre el 0,03 y 0,23 % en el caldo de tratamiento postcosecha, estableciendo como control el lavado convencional que se realiza con agua potable de red.

Para los cítricos (naranjas y clementinas) se testaron dosis comprendidas entre el 0,10 y 0,60 %. En limones, considerando los resultados obtenidos en naranjas, se procedió a testar dos dosis con objeto de confirmar los resultados obtenidos.

Los resultados obtenidos mostraron que para asegurar en todo momento la higiene bacteriológica del caldo de tratamiento en tomates se requiere una dosis mínima del 0,20 % de coadyuvante tecnológico. En el caso de los cítricos se observó que la dosis mínima necesaria para lograr controlar la contaminación bacteriana en sus caldos de tratamiento era del 0,40 %.

4.4.1.2 Eficacia frente a *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Clostridium perfringens*

El solicitante aporta los resultados de un ensayo llevado a cabo por un laboratorio independiente. En dicho ensayo se recogen los parámetros microbiológicos establecidos en el Real Decreto 140/2003 por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano (*E.coli*, *Enterococcus*, *Clostridium perfringens*) (BOE, 2003).

Se inocularon sobre muestras de naranjas, tomates y agua cepas ATTC de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Clostridium perfringens* con dos niveles de contaminación: entre 10 y 100 ufc y alrededor de 100 ucf. A continuación, las muestras de naranjas y tomates se sumergieron durante 30 segundos en una suspensión de agua y el coadyuvante tecnológico Citrocide Plus (al 0,4 % en el caso de las naranjas y al 0,2 % en el caso de los tomates), se dejaron secar y se realizó el recuento posterior.

En el caso del agua, se inoculó la muestra y se le adicionó el coadyuvante al 0,2 y 0,4 %, haciendo el recuento posteriormente teniendo en cuenta varios tiempos de contacto (30 segundos, 1 minuto, 5 minutos y 15 minutos).

En todos los casos se vio también el porcentaje de recuperación tras la inoculación analizando muestras testigo (sin tratamiento con el coadyuvante tecnológico).

Para la determinación de bacterias aerobias se utilizó el medio de cultivo Plate Count Agar (incubado a 30 °C durante 72 horas) y para *Clostridium perfringens* se utilizó como medio de cultivo Perfringens Agar Base incubado a 37 °C durante 48 horas.

Los resultados obtenidos muestran eficacias de inhibición del 98-100 % en naranjas y del 95-100 % en tomates. En el caso de los estudios en agua, se observa una eficacia de inhibición del 100 %, tanto con Citrocide Plus al 0,2 % como al 0,4 %, desde los primeros 30 segundos de contacto con el producto, verificando esta inhibición en el resto de análisis con tiempos de contacto superiores (1, 5 y 15 minutos).

4.4.1.3 Control de la contaminación microbiológica en la superficie de los productos hortofrutícolas y en sus caldos tratamiento

Se llevaron a cabo tres ensayos piloto en planta industrial en distintas condiciones. En todos los casos las dosis utilizadas de coadyuvante tecnológico Citrocide Plus fueron del 0,2 % para tomates y 0,4 % para cítricos. Se analizaron bacterias aerobias mesófilas totales, coliformes fecales y *E. coli* en los caldos de tratamiento. También se evaluó la contaminación superficial de los tomates y cítricos (limones) por bacterias aerobias mesófilas totales.

Los resultados obtenidos indican que tanto en el caso de los tomates como de los cítricos se mantienen los caldos de tratamiento libres de bacterias. En el caso de la contaminación superficial, la carga microbiológica se redujo en más de 2 unidades logarítmicas de bacterias tanto en cítricos como en tomates.

4.4.1.4 Estudio de los efectos fitotóxicos

El solicitante presenta los resultados de un estudio cuyo objetivo es el establecimiento de la dosis máxima fitotóxica en diferentes variedades de cítricos y tomates.

Para poder establecer la dosis máxima fitotóxica en tomates se probaron dosis crecientes en diferentes variedades de tomates observándose daños de Nivel 2 a la máxima dosis testada (0,23 %) en dos de las variedades (tomates Cherry y Rama). En lo que respecta al índice de manchado, sólo se observaron manchas de Nivel 1 en tomates Cherry. En base a los índices de manchado se indica que la aplicación del coadyuvante a dosis iguales o inferiores al 0,2 % no representa un riesgo significativo de fitotoxicidad.

En el caso de los cítricos, se indica que solo se observan daños de Nivel 2 en las variedades de naranja y mandarina cuando se utilizaron las dosis más altas estudiadas. En limones, sin embargo, no se pudo detectar daño de Nivel 2 con ninguna de las dosis aplicadas. El estudio concluye que teniendo en cuenta que la dosis mínima eficaz de Citrocide Plus está establecida en el 0,4 %, se recomienda esta dosis en el lavado de frutos cítricos a fin de evitar la aparición de manchas en la piel de origen fitotóxico que provocarían un descenso en la calidad comercial de la fruta tratada.

4.5 Descripción del proceso

4.5.1 Formas de incorporación del coadyuvante tecnológico

En la solicitud presentada se describe el proceso de aplicación del coadyuvante tecnológico Citrocide Plus. Ésta tiene lugar durante el lavado de los productos hortofrutícolas a su llegada a las centrales de confección, adicionando el coadyuvante al agua de lavado en concentraciones (0,2 % para tomates y 0,4 % para cítricos) que garanticen la desinfección bacteriana del agua y los cítricos y tomates.

El sistema de lavado utilizado es diferente según el producto de que se trate. En el caso de los cítricos, se indica que el modo de lavado es por sistema *drencher*, o duchadora de palés el cual consiste en un sistema de duchado de un palé con 36 cajas de frutas recién recolectadas con abundante caudal de líquido a baja presión. En este sistema se considera fundamental el mantenimiento de la concentración del caldo, dado que se recircula a través de la fruta palé a palé lo que provoca que la acumulación de contaminación se incremente de manera considerable con la recirculación.

Respecto a los tomates, el lavado también tiene lugar mediante ducha aunque se realiza con un dispositivo diferente y en dos fases. En una primera fase los tomates se introducen mediante rodillos en la lavadora de prelavado donde reciben agua pulverizada a presión que se recoge en la parte inferior. La finalidad de esta fase es eliminar la suciedad y restos más groseros. Posteriormente, pasan por un dispositivo similar donde además de las duchas con agua reciben un cepillado. Este agua cae a un depósito desde donde se recircula continuamente hasta que pierde su condición de potabilidad (mínimo una vez al día). Es en este punto donde se adiciona el coadyuvante con objeto de eliminar la carga de inóculo presente que infectaría a todos los tomates que se lavaran después.

Tanto para los cítricos como para los tomates, la dosificación del coadyuvante se realiza mediante dosificadores automáticos programables. Se dispone además de sondas en los depósitos que miden la concentración de ácido peracético y envían la orden de dosificar en función de la concentración del mismo, manteniéndose así la concentración constante en el agua de lavado.

4.5.2 Identificación de las fases de eliminación del coadyuvante tecnológico

Según indica el solicitante, las cantidades de sustancias activas presentes en cítricos y tomates son despreciables dado que éstas se descomponen rápidamente dando lugar a ácido acético, agua y oxígeno.

En relación al ácido peracético, en el Informe de la AECOSAN de 2013 se indicaba que se observaba que el ácido peracético se mantiene o disminuye ligeramente en los caldos finales de tratamiento de pimientos y cítricos por la dosificación continua que compensaba su degradación (AECOSAN, 2013).

En el caso de los estabilizantes, el solicitante indica que no se ha considerado la exposición de los consumidores al HEDP, puesto que su baja concentración en el formulado (<0,2 %), las bajas dosis de aplicación (0,2 % en tomates y 0,4 % en cítricos) y su tendencia a quedar retenido en las tierras y fangos que se acumulan durante el proceso de lavado de estos productos hortofrutícolas, hacen que la cantidad de residuo que pudiera quedar en los frutos debidos a este uso, sea despreciable frente a los 4,8 mg/kg que están autorizados por la FDA en el agua de lavado de frutas y hortalizas (FDA, 2016b). Asimismo, en un formulado con los mismos componentes pero en distinta proporción evaluado en 2013 se verificó que el HEDP no solo no se acumulaba sino que, a diferencia del DPA, se degradaba con los sucesivos tratamientos (AECOSAN, 2013).

Por otro lado, el ácido dipicolínico (DPA) se acumula en el caldo de tratamiento a medida que se utiliza en ciclos sucesivos.

El solicitante afirma además que tanto los cítricos como los tomates se someten a un enjuagado final con agua potable antes de proceder a la comercialización evitando la posible presencia de residuos del ácido peracético o de los estabilizantes en estos alimentos. En este sentido, se presentan los resultados de unos ensayos llevados a cabo a escala piloto y en laboratorio con cítricos y tomates tratados con el coadyuvante tecnológico objeto de evaluación.

5. Estudios de residuos

Tal como se indicaba en el informe de 2013 (AECOSAN, 2013), numerosos estudios han analizado las características desinfectantes de estos sistemas así como sus propiedades toxicológicas. Así, JECFA ha llevado a cabo una evaluación de las soluciones antimicrobianas de peroxiácidos que contienen HEDP (<1 %), peróxido de hidrógeno (4-12 %), ácido acético (40-50 %) y ácido octanoico (3-10 %) en equilibrio con ácido peracético (12-15 %) y ácido peroxioctanoico (1-4 %). JECFA considera que las pequeñas cantidades de residuos de estos peroxiácidos en los alimentos en el momento de su consumo no plantean un problema de seguridad (JECFA, 2005).

Este tipo de soluciones también ha sido objeto de evaluación por parte de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). Así, EFSA (2005) ha evaluado el uso en canales de pollo de una solución a base de peroxiácidos compuesta por ácido peracético (<15 %), ácido peroxioctanoico (<2 %), peróxido de hidrógeno (<10 %), ácido acético, ácido octanoico y ácido 1-hidroxi-etilideno-1,1-difosfónico (HEDP) (<1 %). El contenido total de peroxiácidos, expresado en ácido peracético, es de 220 mg/l y las concentraciones máximas de peróxido de hidrógeno y HEDP son 110 y 13 mg/l, respectivamente. En la citada evaluación se han tenido en cuenta aspectos tales como los posibles

riesgos toxicológicos de los productos de reacción (por ejemplo, semicarbazida), concluyéndose que en las condiciones de uso descritas no suponen un problema de seguridad.

Como se indica en el apartado 1, el coadyuvante tecnológico se clasifica dentro de una situación 4: sustancia autorizada en alimentación humana cuya IDA no está establecida y cuyo empleo puede conducir a la presencia de residuos técnicamente inevitables de acuerdo con las “Líneas directrices de la documentación precisa para la evaluación de coadyuvantes tecnológicos que se pretenden emplear en la alimentación humana” (AECOSAN, 2010). En consecuencia el solicitante debe presentar información sobre estudios de residuos (método analítico y validación del método).

En relación a la posible presencia de residuos del componente que se puede acumular en los caldos de tratamiento, el ácido dipicolínico (DPA), en cítricos y tomates, el solicitante presenta los resultados de un ensayo piloto en planta industrial y otro en laboratorio, en los que se ha determinado la concentración de DPA, tanto en los caldos de tratamiento como en los frutos (naranjas, mandarinas y tomates) tras su desinfección mediante la aplicación del coadyuvante tecnológico.

Para la determinación del DPA se ha utilizado un método UHPLC-MS/MS (*Ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*) validado por un laboratorio externo y cuyos límites de detección y cuantificación se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Límites de detección y cuantificación del método UHPLC-MS/MS para determinación de ácido dipicolínico (DPA)

Matrices	Límite de detección (LOD)	Límite de cuantificación (LOQ)
Naranjas	0,004 mg/kg	0,1 mg/kg
Mandarinas	0,004 mg/kg	0,1 mg/kg
Tomates	0,003 mg/kg	0,1 mg/kg
Caldos de tratamiento	0,25 µg/l	1 µg/l

5.1 Ensayo piloto en planta industrial

El solicitante indica que a fin de conseguir que los resultados fueran representativos de los tratamientos que se realizarán en las centrales hortofrutícolas, se siguió el procedimiento habitual de lavado de estos frutos, dosificando de manera automática el coadyuvante tecnológico, para garantizar en todo momento que las concentraciones del coadyuvante (0,4 % para cítricos y 0,2 % para tomates) se mantengan constantes.

En el caso de las naranjas y mandarinas, se hizo una dosificación inicial al 0,4 % con la que se inició el proceso y posteriormente se fueron adicionando de forma automática las cantidades del coadyuvante necesarias para mantener la concentración del mismo constante. Se tomaron muestras de caldos de tratamiento de cada uno de los 10 días que duró el ensayo y de las frutas en el primer día y en el último día tras el enjuagado final con agua potable.

Para los tomates, la dosificación inicial fue del 0,2 % y se cogieron muestras de caldos de tratamiento de cada uno de los 5 días que duró el ensayo y de tomates (de dos variedades distintas) en el primer y el último día tras el enjuagado final con agua potable. Los resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Contenidos de ácido dipicolínico (DPA) en naranjas, mandarinas, tomates y caldos de tratamiento						
	Contenidos DPA					
	Naranjas (mg/kg)	Mandarinas (mg/kg)	Caldos de tratamiento naranjas y mandarinas (µg/l)	Tomates pera (mg/kg)	Tomates cherry (mg/kg)	Caldos de tratamiento tomates (µg/l)
Caldo inicial	-	-	191,91	-	-	2,71
Día 1 inicio	-	-	-	n.d.	n.d.	3,3
Día 1 final	n.d. ¹	n.d.	459,31	-	-	8,56
Día 2	-	-	430,29	-	-	13,49
Día 3	-	-	655,66	-	-	11,56
Día 4	-	-	569,91	-	-	12,12
Día 5	-	-	663,79	n.d.	n.d.	34,52
Día 6	-	-	557,37			
Día 7	-	-	564,28			
Día 8	-	-	604,61			
Día 9	-	-	539,49			
Día 10	n.d.	<LOQ ²	546,41			

¹n.d.: no detectado. ²LOQ: límite de cuantificación.

5.2 Ensayos en laboratorio

Se determinó la concentración de DPA suponiendo el peor escenario posible: todo el DPA que se dosifica durante una campaña entera se acumula, tanto para cítricos (244,8 ppm) como para tomates (400 ppm). Se realizaron dos ensayos para la determinación de residuos en cada una de estas matrices vegetales:

- Bañando naranjas y tomates con caldo que contenía 100 ppm de DPA.
- Bañando naranjas con caldo al que se le hayan añadido 250 ppm de DPA y tomates con caldo que contenía 400 ppm de DPA.

En ambos casos se analizó el contenido de DPA en los caldos de tratamiento tras el baño de cítricos y tomates y también se analizó el contenido de DPA en naranjas y tomates antes y después del enjuagado final con agua potable. Los resultados se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Contenidos de ácido dipicolínico (DPA) en naranjas, tomates y caldos de tratamiento

Matrices	Contenido DPA en caldos de tratamiento		Contenidos DPA en cítricos y tomates	
	DPA adicionado (mg/l)	Contenido tras baño (mg/l)	Sin enjuagado final (mg/kg)	Con enjuagado final (mg/kg)
Naranjas	100	67,59	0,15	n.d. ¹
Naranjas	250	204,42	0,36	n.d.
Tomates	100	100,03	<LOQ ²	<LOQ
Tomates	400	356,19	0,488	<LOQ

¹n.d.: no detectado. ²LOQ: límite de cuantificación.

5.3 Interpretación de resultados

En base a los datos aportados por el solicitante, se observa que el DPA se acumula en los caldos de tratamiento de cítricos y tomates. Así en el caso de los caldos de tratamiento de tomates, los contenidos de DPA se incrementan desde 2,71 µg/l (concentración en el caldo inicial) hasta 34,52 µg/l (quinto día que corresponde al último día de tratamiento). Mientras que en el caso de las mandarinas y naranjas el contenido de DPA se incrementa de 191,91 µg/l (caldo inicial) hasta 663,79 µg/l correspondiente al quinto día de los diez que duró el tratamiento.

Sin embargo, no se detectaron residuos de DPA en naranjas, mandarinas y tomates, correspondientes a las muestras del primer y último día de tratamiento. Solo en el caso de una muestra de mandarinas (correspondiente al último día) el residuo de DPA fue inferior al límite de cuantificación (0,1 mg/kg).

En el caso de los ensayos de laboratorio, en los que se han considerado dos escenarios para los cítricos (adición de 100 y 250 ppm de DPA), se obtuvieron antes del enjuagado final con agua potable unos residuos de DPA en naranjas de 0,15 y 0,36 mg/kg, respectivamente, mientras que tras el enjuagado final los residuos en ambos casos fueron no detectables.

Para los tomates, en los que también se han considerado dos escenarios (adición de 100 y 400 ppm de DPA), se obtuvieron antes del enjuagado final con agua potable unos residuos de DPA inferiores al límite de cuantificación y de 0,488 mg/kg, respectivamente, mientras que tras el enjuagado final los residuos en ambos casos fueron inferiores al límite de cuantificación.

Respecto a los caldos de tratamiento, tras el tratamiento (baño) de los frutos se obtiene una concentración máxima de DPA en caldos de naranjas y tomates de 204,42 y 356,19 mg/l, respectivamente.

6. Estudios y datos relativos a la inocuidad del ácido dipicolínico

Como ya se ha indicado, no hay una IDA establecida para el ácido dipicolínico. Una alternativa consiste en utilizar el *Margin of Safety* (MOS), considerando que cuando el MOS es >100 no existe riesgo para el consumidor. El MOS se calcula teniendo en cuenta el NOAEL (*Non Observable Adverse Effect Level*) y la ingesta diaria estimada (IDE).

En este sentido, EFSA (2009) evaluó los picolinatos de cromo y cinc como complementos alimenticios basándose en el cálculo del MOS. Dicha evaluación concluye que los picolinatos no suponen

un riesgo para el consumidor. Para ello, se estableció un NOAEL de 2 100 mg/kg p.c./día para el ácido picolínico en base a un estudio llevado a cabo en ratas (NTP, 2008) (EFSA, 2009) y se estimó la exposición por el uso de picolinato de cinc (Zn) como fuente de Zn en 1,57 mg picolinato/kg p.c./día para una persona de 60 kg. Además, considerando el uso conjunto de picolinato de cinc y de cromo como fuente de Zn, la ingesta diaria se estimó en 1,6 mg/kg p.c./día.

Otro dato a favor de la inocuidad del ácido dipicolínico es que el ácido dipicolínico es un ingrediente del “natto”, un alimento tradicional japonés a base de soja fermentada (tabla 1). La ingesta diaria media de ácido dipicolínico (DPA) de la población japonesa proveniente del alimento “natto” es de 0,6-4 mg (Ohsugi y Sumi, 2011).

7. Estudio de consumo y evaluación del nivel anticipado de ingesta de DPA por el consumidor

Según establecen las Líneas directrices para coadyuvantes (AECOSAN, 2010), la posible presencia de residuos en los cítricos y tomates tratados implica la necesidad de valorar su seguridad.

Para estimar la exposición a los residuos de DPA se han tenido en cuenta los consumos crónicos en Europa de cítricos y tomates correspondientes a adultos y niños (0-12 meses) recogidos en la *Comprehensive European Food Consumption Database* de EFSA (2016) (tablas 7 y 8). Para cada alimento, el consumo seleccionado es el correspondiente al percentil 97,5 más alto de entre los recogidos en las encuestas incluidas en la *Comprehensive European Food Consumption Database*. Como criterio adicional solo se han tenido en cuenta los datos correspondientes a un número de consumidores >10 salvo en aquellos casos en los que se trate del único dato disponible.

Alimentos		Consumidores adultos	Consumo crónico (g/día)	
			Media	P97,5
Tomates	Tomates	Solo consumidores (Rumanía)	97,97	310,86
	Zumo tomate	Solo consumidores (Alemania)	176,29	750
	Tomate ketchup	Solo consumidores (Alemania)	16,66	70,60
	Puré tomate	Solo consumidores (Alemania)	44,53	130,55
	Chutney tomate	Solo consumidores (Reino Unido)	10,50	57,75
Cítricos	Naranjas	Solo consumidores (Finlandia)	163,29	540
	Zumo naranja	Solo consumidores (Alemania)	216,10	850
	Mandarinas	Solo consumidores (Italia)	94,30	350
	Limonas	Solo consumidores (Rumanía)	13,65	100
	Zumo limón	Solo consumidores (Alemania)	46,08	350
	Zumo pomelo	Solo consumidores (Alemania)	233,27	790

Teniendo en cuenta el peor escenario posible, percentil 97,5 para solo consumidores adultos, se obtiene que el consumo de cítricos es de 2 980 g/día. Considerando además la concentración máxima de DPA detectada en las muestras de cítricos (mandarinas tratadas con caldo del décimo día de tratamiento), que se corresponde con el LOQ (0,1 mg/kg) del método analítico utilizado, se obtiene la Ingesta Diaria Estimada (IDE) de DPA para cítricos:

$$\text{IDE (DPA en cítricos)} = (2,98 \text{ kg cítricos/día} \times 0,1 \text{ mg DPA/kg}) / 70 \text{ kg p.c.} = 0,0043 \text{ mg DPA/kg p.c./día}$$

En el caso de los tomates, el consumo para solo consumidores (P97,5) en Europa es de 1 319,76 g/día. Considerando como concentración máxima de DPA detectada en las muestras de tomates el LOD del método analítico utilizado (0,003 mg/kg), se obtiene una IDE para el DPA en tomates de 0,000057 mg DPA/kg p.c./día.

Al comparar el valor obtenido para la IDE del DPA en cítricos y tomates (0,004357 mg DPA/kg p.c./día) con la IDE obtenida en la evaluación de los dipicolinatos de cinc y de cromo (1,6 mg/kg p.c./día) llevada a cabo por EFSA (2009) y considerada como segura, se observa que es mucho menor que ésta. Al igual que en dicha evaluación, se aplica el concepto MOS para evaluar la seguridad de la IDE del DPA debida al consumo de cítricos y tomates tratados con el coadyuvante tecnológico: $\text{MOS} = \text{NOAEL} / \text{IDE} = 2\ 100 / 0,004357 = 481\ 983,02 \gg 100$

El elevado valor obtenido para el MOS indicaría que no existe riesgo para el consumidor.

Un escenario aún más desfavorable para el cálculo del MOS consiste en tener en cuenta los residuos de DPA obtenidos en los ensayos de laboratorio. Así, considerando unos residuos de DPA de 0,36 mg/kg en naranjas y 0,488 mg/kg en tomates y un consumo (solo consumidores, P97,5) de 2 980 g/día para cítricos y 1 319,76 g/día para tomates, se establecen unas IDE de 0,015 mg DPA/kg p.c./día y 0,009 mg DPA/kg p.c./día, respectivamente. En base a estas IDE y un NOAEL de 2 100 mg/kg p.c./día: $\text{MOS} = \text{NOAEL} / \text{IDE} = 2\ 100 / (0,015 + 0,009) = 87\ 500 \gg 100$

Al igual que en el caso anterior, el alto valor obtenido para el MOS indicaría que no existe riesgo para el consumidor.

En el caso de los niños de 0-12 meses, los consumos de cítricos y tomates son los recogidos en la tabla 8.

Tabla 8. Consumo de cítricos y tomates en niños (0-12 meses) en Europa				
Alimentos		Consumidores niños (0-12 años)	Consumo crónico (g/día)	
			Media	P97,5
Tomates	Tomates	Solo consumidores (Finlandia)	12,51	75
	Zumo tomate	Solo consumidores (Bulgaria)	80	80
	Tomate Ketchup	Solo consumidores (Reino Unido)	2,25	7,5
	Puré tomate	Sólo consumidores (Reino unido)	4,62	24,75
Cítricos	Naranjas	Solo consumidores (Dinamarca)	12,63	51
	Zumo naranja	Solo consumidores (Bulgaria)	61,13	175
	Mandarinas	Solo consumidores (Reino Unido)	13,71	68,75
	Limonos	Solo consumidores (Bulgaria)	2,10	5,34
	Zumo limón	Solo consumidores (Reino Unido)	0,65	2,40
	Zumo pomelo	Solo consumidores (Bulgaria)	15	15

Teniendo en cuenta el peor escenario posible, P97,5 para solo consumidores niños (0-12 meses), se obtiene que el consumo de cítricos y de tomates es de 317,49 g/día y 187,25 g/día, respectivamente.

Al igual que en el caso de los adultos, considerando la concentración máxima de DPA detectada en las muestras de cítricos (mandarinas tratadas con caldo del décimo día de tratamiento), que se corresponde con el LOQ (0,1 mg/kg) del método analítico utilizado, se obtiene la IDE de DPA en cítricos:

IDE (DPA en cítricos)= (0,32 kg cítricos/día x 0,1 mg DPA/kg)/5 kg p.c.= 0,0064 mg DPA/kg p.c./día

En el caso de los tomates, considerando como concentración máxima de DPA detectada en las muestras de tomates el LOD del método analítico utilizado (0,003 mg/kg), se obtiene una IDE de 0,000114 mg DPA/kg p.c./día.

Al comparar el valor obtenido para la IDE del DPA en cítricos y tomates (0,006514 mg DPA/kg p.c./día) con la IDE obtenida en la evaluación de los dipicolinatos de cinc y de cromo (1,6 mg/kg p.c./día) llevada a cabo por EFSA (2009) y considerada como segura, se observa que es mucho menor que ésta. De forma similar al caso de los adultos, se aplica el concepto MOS para evaluar la seguridad de la IDE del DPA debida al consumo de cítricos y tomates tratados con el coadyuvante tecnológico, obteniéndose que el $MOS=322\ 382,6 \gg 100$.

El elevado valor obtenido para el MOS indicaría que no existe riesgo para el consumidor.

Al igual que en el caso de los adultos, un escenario aún más desfavorable para el cálculo del MOS consiste en tener en cuenta los residuos de DPA obtenidos en los ensayos de laboratorio. Así, considerando unos residuos de DPA de 0,36 mg/kg en naranjas y 0,488 mg/kg en tomates y un consumo (solo consumidores, P97,5) de 317,49 g/día para cítricos y 187,25 g/día para tomates, se establecen unas IDE de 0,023 mg DPA/kg p.c./día y 0,019 mg DPA/kg p.c./día, respectivamente. En base a estas IDE y un NOAEL de 2 100 mg/kg/día: $MOS=NOAEL/IDE=2\ 100/(0,023+0,019)=50\ 000 \gg 100$.

Asimismo, hay que tener en cuenta que tal y como se establece en las condiciones de uso, tanto los cítricos como los tomates serán sometidos a un enjuagado final con agua potable, obteniéndose tras él unos residuos de DPA no detectables (<0,004 mg/kg) en naranjas e inferiores al límite de cuantificación (0,1 mg/kg) en el caso de los tomates, tal y como se indica en los análisis presentados por el solicitante.

A la misma conclusión respecto a la ausencia de riesgo para el consumidor se llega comparando la IDE para el DPA en cítricos y tomates en adultos y niños (0,004357 mg DPA/kg p.c./día y 0,006514 mg DPA/kg p.c./día, respectivamente) con la ingesta diaria media de DPA de la población japonesa proveniente del alimento "natto" que es de 0,01-0,066 mg/kg p.c. día.

Conclusiones del Comité Científico

El Comité Científico, una vez evaluado el expediente de solicitud de uso de este coadyuvante tecnológico en el proceso de desinfección bacteriana de cítricos y tomates así como de las aguas de lavado de los mismos, concluye que, basándose en la información facilitada por el solicitante y teniendo en cuenta la composición y condiciones de uso propuestas, el uso del coadyuvante no implica riesgo para la salud del consumidor.

Las conclusiones de este informe se refieren exclusivamente al formulado objeto de evaluación como coadyuvante tecnológico en las condiciones de uso propuestas y con su composición actual,

tanto en lo referido a sus componentes activos como a sus estabilizantes, no pudiéndose extender a otras formulaciones o condiciones distintas de las evaluadas. Debe tenerse en cuenta que los kg de fruta tratados, las condiciones climáticas o la suciedad pueden influir en las concentraciones de los componentes del coadyuvante en los caldos de tratamiento y por tanto, en sus eventuales residuos.

Referencias

- AECOSAN (2010). Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. Líneas Directrices de la documentación precisa para la evaluación de coadyuvantes tecnológicos que se pretenden emplear en la alimentación. *Revista del Comité Científico de la AECOSAN*, 12, pp: 79-93.
- AECOSAN (2011). Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación al uso del peróxido de hidrógeno como coadyuvante tecnológico en el procesado de hemoderivados y cefalópodos. *Revista del Comité Científico de la AECOSAN*, 15, pp: 11-32.
- AECOSAN (2013). Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación al uso de una solución acuosa de peróxido de hidrógeno, ácido acético y ácido peracético como coadyuvante tecnológico para la desinfección bacteriana de cítricos y pimientos y el agua de lavado de los mismos. *Revista del Comité Científico de la AECOSAN*, 18, pp: 53-69.
- ANZFS (2016). Australia New Zealand Food Standards Code. Standard 1.3.3 Processing aids. Disponible en: <https://www.legislation.gov.au/Details/F2016C00196> [acceso: 9-03-16].
- Arrêté (2006). Arrêté du 19 de octobre 2006 relatif à l'emploi d'auxiliaires technologiques dans la fabrication de certaines denrées alimentaires. Ministère de l'Économie, des Finances et de l'Industrie. Journal Officiel de la République Française de 2 de diciembre de 2006. Disponible en: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000271061&dateTexte=20160309> [acceso: 9-03-16].
- BOE (2003). Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. BOE 45 de 21 de febrero de 2003, pp: 7228-7245.
- DJC (2016). Department of Justice Canada. Food and Drug Regulations. Food Additives that may be used as Starch Modifying Agents. Disponible en: http://laws-lois.justice.gc.ca/eng/regulations/C.R.C.,_c._870/Full-Text.html [acceso: 9-03-16].
- EFSA (2005). European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on a request from the Commission related to treatment of poultry carcasses with chlorine dioxide, acidified sodium chlorite, trisodium phosphate and peroxyacids. Question N° EFSA Q-2005-002. *The EFSA Journal*, 297, pp: 1-27.
- EFSA (2009). European Food Safety Authority. Scientific Opinion on chromium picolinate, zinc picolinate and zinc picolinate dehydrate added for nutritional purposes in food supplements. *The EFSA Journal*, 1113, pp: 1-41.
- EFSA (2013). European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 1 (outbreak data analysis and risk ranking of food/pathogen combinations). *The EFSA Journal*, 11 (1): 3025.
- EFSA (2015). European Food Safety Authority. Statement on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 3: Suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2015. *The EFSA Journal*, 13 (12): 4331.
- EFSA (2016). European Food Safety Authority. Comprehensive European Food Consumption Database. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/food-consumption/comprehensive-database> [acceso: 18-03-16].
- FAO/OMS (2009). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura/Organización Mun-

- dial de la Salud. Benefits and Risks of the Use of Chlorine-containing Disinfectants in Food Production and Food Processing Report of a Joint FAO/WHO Expert Meeting Ann Arbor, MI, USA. pp: 27-30.
- FDA (2016a). Food and Drug Administration. Direct Food Substances Affirmed as Generally Recognized as Safe. §184.1366 Hydrogen peroxide. Disponible en: <http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?c=ecfr&SID=3922fd7ac44288a0e9e699cc3607b353&rgn=div8&view=text&node=21:3.0.1.1.14.2.1.102&idno=21> [acceso: 10-03-16].
- FDA (2016b). Food and Drug Administration. CFR-Code of Federal Regulations. Title 21-Food and Drugs, Sec. 173.315. Chemicals used in washing or to assist in the peeling of fruits and vegetables. Disponible en: http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=9e43c8243ba638d9049d069fcc658ec5&mc=true&node=pt21.3.173&rgn=div5#se21.3.173_1315 [acceso: 10-03-16].
- FDA (2016c). Food and Drug Administration. CFR-Code of Federal Regulations. Title 21-Food and Drugs, Sec. 173.370 Peroxyacids. Disponible en: http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=9e43c8243ba638d9049d069fcc658ec5&mc=true&node=pt21.3.173&rgn=div5#se21.3.173_1315 [acceso: 10-03-16].
- FDA (2016d). Food and Drug Administration. Inventory of Effective Food Contact Substance (FCS) Notifications. Disponible en: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnNavigation.cfm?rpt=fcsListing> [acceso: 10-03-16].
- Gil, M., Allende, A., López Gálvez, F. y Selma, V. (2009). ¿Hay alternativas al cloro como higienizante para productos de IV Gama? *Horticultura internacional*, 69, pp: 38-45.
- JECFA (2004a). Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios. Peroxyacid antimicrobial solutions containing 1-hydroxyethylidene-1,1-diphosphonic acid (HEDP) and three or more of the following components: peroxacetic acid, acetic acid, hydrogen peroxide, octanoic acid and peroxyoctanoic acid. Disponible en: http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecval/jec_1854.htm [acceso: 10-03-16].
- JECFA (2004b). Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios. Chemical and Technical Assessment. Hydrogen peroxide, peroxyacetic acid, octanoic acid, peroxyoctanoic acid, and 1-hydroxyethylidene-1,1-diphosphonic acid (HEDP) as components of antimicrobial washing solution. Disponible en: <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/technical-assessments/en/> [acceso: 10-03-16].
- JECFA (2005). Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios. Evaluation of certain food additives: sixty-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO technical report series 928. Geneva. pp: 8-17
- JECFA (2006). Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios. Safety evaluation of certain food additives. Prepared by the sixty-third meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Food additives Series: 54.
- Kyanko, M.V., Russo, M.L., Fernández, M. y Pose, G. (2010). Efectividad del ácido peracético sobre la reducción de la carga de esporas de mohos causantes de pudrición poscosecha de frutas y hortalizas. *Información Tecnológica*, 21 (4), pp: 125-130.
- NTP (2008). National Toxicology Program. Toxicology and carcinogenesis studies of chromium picolinate monohydrate (CAS No. 27882-76-4) in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed studies). Technical Report Series No. 556, NIH Publication No. 8-5897. National Institutes of Health, Public Health Service, US Department of Health and Human Services, Research Triangle Park (draft).
- Ohsumi, T., Ikeda, S. y Sumi, H. (2005). Anti-platelet aggregation and anti-blood coagulation Activities of dipicolinic acid, a sporal component of *Bacillus Subtilis* Natto. *Food Science and Technology Research*, 3 (11), pp: 308-310.
- Ohsumi, T. y Sumi, H. (2011). The effects of dipicolinic acid on the Thrombolytic activity of human cells. *Journal of Food Biochemistry*, 35, pp: 370-380.
- Sumi, H. y Ohsumi, T. (1999). Anti-bacterial component dipicolinic acid measured in natto and natto bacilli. *Nippon Nougai Kagaku Kaishi*, 73, pp: 1289-1291.
- UE (2004). Reglamento (CE) N° 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, por el que

se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. DO L 139 de 30 de abril de 2004, pp: 55-205.

UE (2007) Reglamento (CE) N° 1451/2007 de la Comisión de 4 de diciembre de 2007, relativo a la segunda fase del programa de trabajo de diez años contemplado en el artículo 16, apartado 2, de la Directiva 98/8/CE del Parlamento Europeo y del Consejo relativa a la comercialización de biocidas. DO L 325 de 4 de diciembre de 2007, pp: 3-65.

UE (2008). Reglamento (CE) N° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008 sobre aditivos alimentarios. DO L 354 de 31 de diciembre de 2008, pp: 16-33.

UE (2015). Reglamento de Ejecución (UE) 2015/1730 de la Comisión, de 28 de septiembre de 2015, por el que se aprueba el uso del peróxido de hidrógeno como sustancia activa existente en biocidas de los tipos de producto 1, 2, 3, 4, 5 y 6. DO L 252 de 29 de septiembre de 2015, pp: 27-32.

Vero, S., Garmendia, G., Garat, F., Alaniz, S., de Aurrecoechea, I., Wozniak, A. y Silvera, E. (2004). Alternativas al tratamiento convencional de poscosecha de citrus. Memorias. X Congreso Nacional de Hortifruticultura. Montevideo, Uruguay INIA.

Validación del método de detección de soja alergeno en alimentos mediante PCR en tiempo real

M^a del Camino Martín-Forero, Silvia Gil, Mercedes Fernández de la Puebla*, Marisa Salvador, M^a Isabel Rodríguez, Mirian Gómez* y M^a Isabel Prieto.

Servicio de Biotecnología, Centro Nacional de Alimentación. Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición.

*Tragsatec

Resumen

La soja (*Glycine max*) es considerado un “alérgeno alimentario clásico” responsables de provocar reacciones alérgicas en niños y adultos. La soja, se encuentra entre las sustancias que causan alergias o intolerancias incluidas en el anexo II del Reglamento (UE) N° 1169/2011.

El uso de métodos de biología molecular para la detección de alérgenos se ha desarrollado y ampliado en los últimos años de forma que compiten con los métodos inmunológicos, considerados hasta ahora métodos de elección. En este sentido, las normas UNE-EN 15842:2010 y UNE-CEN/TR 16338 IN.:2012 proporcionan información sobre los criterios que deben cumplir los métodos de biología molecular en la detección de alérgenos alimentarios.

El método elegido para la detección de residuos soja en alimentos se basa en la detección de un fragmento de 81 bp (pares de bases) del gen de la lectina (*le1*) mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR en tiempo real).

El objetivo de este trabajo ha sido la puesta a punto y posterior validación del método elegido. Los estudios de validación realizados han demostrado que el método muestra suficiente sensibilidad y especificidad para ser utilizado en la detección de trazas de soja en alimentos crudos y procesados, pudiéndose llegar a detectar 10 copias de genoma haploide de soja, y permitiendo con una sensibilidad mayor al 95 % la detección de 5 mg/kg de soja en muestras de alimentos.

Palabras clave

Alérgenos, soja, alimentos procesados, PCR tiempo real.

Validation of the real-time PCR method for detecting the allergen soya in foods

Abstract

Soya (*Glycine max*) is considered one of the “classic food allergens” responsible for causing reactions in children and adults. Soya is one of the substances causing allergies or intolerances listed in annex II of Regulation (EU) No 1169/2011.

The use of molecular biology methods to detect allergens has developed and spread in recent years to the extent that they compete with immunological methods, until now considered the methods of choice. In this respect, regulations UNE-EN 15842:2010 and UNE-CEN/TR 16338 IN.:2012 provide information on the criteria which must be met by molecular biology methods in the detection of food allergens.

The method chosen for detecting soya residue in foods is based on the detection of an 81 bp (base pair) fragment of the lectin (*le1*) gene using the real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) technique.

The aim of the study was to fine-tune and subsequently validate the selected method. The validation studies carried out demonstrated that the method is sufficiently sensitive and specific for use in the detection of traces of soya in raw and processed foods. It was possible to detect 10 copies of the soya haploid genome and allowed the detection at greater than 95 % sensitivity of 5 mg/kg soya in food samples.

Key words

Allergens, soya, processed foods, real-time PCR.

1. Introducción

La soja es considerada un “alérgeno alimentario clásico” y es uno de los alimentos responsables de provocar reacciones alérgicas en niños y adultos. Las reacciones alérgicas a la soja cursan principalmente como problemas estomacales y cutáneos, pero también incluyen síntomas respiratorios que pueden en ocasiones llegar a producir reacciones alérgicas graves.

En consecuencia, la soja se encuentra entre las sustancias recogidas en el anexo II del Reglamento (UE) N° 1169/2011, que obliga al etiquetado de todas aquellas sustancias que pueden ser causa de alergias o intolerancias (UE, 2011).

La soja (*Glycine max*) es una leguminosa comestible perteneciente a la familia *Fabaceae*, la semilla contiene alrededor del 20 % de aceite y entre el 38-40 % de proteína. El consumo de soja se encuentra ampliamente extendido en Asia y Estados Unidos, donde la incidencia de alergias a la soja es del 2,7 % en niños menores de 3 años y entre el 0,1 y 1,8 % en adultos (Greenhawt et al., 2009). Hasta el momento, la incidencia es mucho menor en Europa, pero hay que tener en cuenta que en los últimos años el consumo de soja ha experimentado un considerable aumento, debido a su poder nutricional y tecnológico, que hace que podemos encontrar soja formando parte de condimentos naturales, caldos, almidón y goma de mascar vegetal, salsas, etc., además de por el hecho de ser considerado un alimento que proporciona numerosos beneficios para la salud, sin olvidar la cada vez más frecuente utilización de la cocina vegetariana.

El consumo de soja es también frecuente en niños al introducir formulas a base de soja en la nutrición infantil, utilizadas como alternativa en el tratamiento de alergias a las proteínas de la leche o intolerancias a la lactosa. Este aumento en su consumo ha dado lugar a un incremento en la aparición de personas alérgicas a esta leguminosa, por lo que se hace cada vez más necesario disponer de técnicas seguras y fiables para su detección en alimentos.

El uso de métodos de biología molecular para la detección de alérgenos se ha desarrollado y ampliado en los últimos años de forma que compiten con los métodos inmunológicos, considerados hasta ahora métodos de elección. En el caso particular de la soja, son muchos los estudios desarrollados para demostrar la utilización de métodos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar ADN de soja que muestran su efectividad en la detección de soja en alimentos procesados y no procesados (Soares et al., 2010).

En este sentido, la Norma UNE-EN 15634-1:2009 proporciona el esquema general sobre las características que deben cumplir los métodos de biología molecular que se utilizan para la detección de secuencias correspondientes a especies que contienen alérgenos, mediante el uso de PCR en matrices alimentarias.

En consecuencia, el objetivo de este trabajo ha sido la puesta a punto y la posterior validación de un método de detección de soja en alimentos mediante PCR en tiempo real.

2. Material y método

2.1 Material

Con el fin de evaluar la posible utilización del método elegido para la detección de soja en alimentos complejos susceptibles de contener soja residual, se comprobó el comportamiento del mismo sobre distintas matrices.

La elección de las matrices se realizó teniendo en cuenta las siguientes características:

- Alimentos que por su naturaleza pudieran estar implicados en las reacciones alérgicas de soja debido a contaminación o adulteraciones.
- Alimentos procesados y formados por mezclas complejas, de forma que nos sirviera para comprobar la efectividad del método y asegurar que no se van a producir interferencias en el ensayo.
- Alimentos seleccionados de acuerdo a su etiquetado.

Teniendo en cuenta las características descritas, las muestras seleccionadas se dividieron en cuatro tipos de productos:

- Productos cárnicos (jamón cocido, salchichas, hamburguesa y chorizo).
- Productos de bollería o panadería.
- Productos líquidos o semilíquidos (batidos, yogures, zumos,...).
- Productos tipo salsas, sopas preparadas, vinagres balsámicos, margarinas.

Para llevar a cabo los ensayos de validación se analizaron un total de 26 muestras. De entre los tipos descritos, se seleccionaron 10 etiquetadas como contiene soja o trazas de soja entre sus ingredientes, y 16 en las que no figuraba soja entre sus ingredientes.

Al no ser actualmente posible disponer de material de referencia certificado, la preparación de las muestras fortificadas, para la determinación del límite de detección se realizó utilizando como material de referencia para la fortificación, una muestra del 100 % de harina de soja.

La solución de carga se preparó en una concentración 1 mg/ml en tampón de urea 6M (6M Urea ultrapura, 20 mM Tampón fosfato (PBS), 0,1 % Tween 20). La fortificación en la concentración deseada se realizó sobre 5 gramos de matriz blanco.

2.2 Método

El proceso analítico consistió, en la extracción de ADN de las muestras y la posterior amplificación de una secuencia diana específica de soja mediante PCR en tiempo real.

2.2.1 Extracción de ADN

Para la realización de la extracción de ADN, se trituró y homogenizó una cantidad representativa de cada una de las muestras con el fin de conseguir una correcta distribución de los componentes en las mismas.

La extracción y purificación de ADN se llevó a cabo sobre 1 gramo de la muestra homogeneizada, siguiendo el procedimiento de extracción basado en el método CTAB (Murray y Thompson, 1980).

Cada una de las muestras se extrajo por duplicado y el ADN purificado se diluyó con 100 µl de tampón TE (10 mM Tris-ClH, 1 mM EDTA, pH 8,0).

La cuantificación y la pureza del ADN obtenido se analizó mediante la medida de absorbancia a 280 nm y el cálculo de la relación A260/A280 utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000.

En la mayoría de las muestras, los resultados de concentración y pureza obtenidos se consideraron satisfactorios para continuar con el proceso analítico y proceder a la amplificación de la secuencia diana mediante PCR.

En los casos en los que los resultados de concentración y pureza obtenidos en la extracción de ADN mediante el método CTAB no fueron lo suficientemente aceptables para continuar los ensayos, se utilizó, como método de extracción alternativo, el Kit comercial (SureFood® PREP Avanced Art. No S1053, R-Biopharm), especialmente indicado para la extracción de ADN en alimentos altamente procesados.

La harina de soja utilizada como material de referencia fue extraída simultáneamente con las muestras mediante el método CTAB.

La solución de ADN obtenido se diluyó cuando fue necesario con tampón TE para obtener la concentración de la solución de trabajo 50 ng/µl.

2.2.2 Detección de soja mediante PCR en tiempo real

El método elegido para la detección de residuos soja en alimentos se basa en la detección de un fragmento de 81 bp (pares de bases) del gen de la lectina (*le1*) mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR en tiempo real).

La elección del gen de la lectina (*le1*), se debe al hecho de que se trata de un gen endógeno que se encuentra presente en todas las variedades de soja (*Glycine max*).

La reacción de PCR se preparó en un volumen final de 25 µl, para lo que se mezclaron 12,5 µl de 2x TaqMan® Universal Master Mix (Applied Biosystems), 5 µl del ADN extraído en una concentración de 50 ng/µl, 500 nM de cada uno de los *primers* y 200 nM de sonda. Las reacciones de PCR se realizaron en el equipo 7500 Applied Biosystems, utilizando el siguiente programa: 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95 °C, y 45 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C.

Las secuencias de oligonucleótidos utilizados como *primers* y la sonda marcada con los fluoróforos FAM y TAMRA fueron sintetizadas por la casa comercial Metabíom GMBH (Tabla 1).

Tabla 1. Secuencias utilizadas en la amplificación del gen lectina (<i>le1</i>)	
Gen (lectina <i>Le1</i>)	Secuencia
<i>TM-Lectin -F</i>	5'-TCC ACC CCC ATC CAC ATT T-3'
<i>TM-Lectin -R</i>	5'-GGC ATA GAA GGT GAA GTT GAA GGA-3'
<i>Lectin -p</i>	FAM 5'-AAC CGG TAG CGT TGC CAG CTT CG-3'TAMRA

3. Requisitos de validación

Los criterios y requisitos previos exigibles al método de detección de soja mediante PCR en muestras de alimentos se han establecido teniendo en cuenta las Normas UNE-CEN/TR 16338 IN.:2012 y UNE-EN 15842:2010 (normas que se refieren a los criterios que deben cumplir los métodos de biología molecular en la detección de alérgenos):

- **Aplicabilidad.** Demostrar que el método es efectivo para el fin previsto. Concretamente, en este caso se deberá demostrar que el método es útil para la detección de trazas de soja en muestras de alimentos.
- **Especificidad.** Propiedad del método para responder exclusivamente al analito de interés. El método debe cumplir el 100 % de especificidad. La especificidad de la secuencia objeto debería verificarse de forma teórica y experimental.
- **Sensibilidad.** La sensibilidad calculada como el coeficiente del número de muestras positivas verdaderas entre el número de muestras positivas conocidas. La sensibilidad deberá ser \geq al 95 % (UNE-CEN/TR 16338 IN.:2012).
- **Límite de detección (LD).** Cantidad mínima de analito que puede ser detectado con un nivel de confianza superior o igual al 95 %. El límite de detección deberá ser adecuado al fin previsto.

3.1 Diseño experimental para la validación del método

Los estudios de validación se diseñaron con la finalidad de comprobar la efectividad del método para el fin previsto.

3.1.1 Aplicabilidad del método

La aplicabilidad del método se demostró mediante el análisis de las 10 muestras seleccionadas, en base a su contenido de soja o trazas de soja, con la finalidad de demostrar que el proceso de extracción así como la posterior amplificación de la diana elegida, podía considerarse adecuado para la detección de soja en la mayoría de los tipos de alimentos posiblemente implicados en la reacción alérgica de soja (Tabla 2).

Para ello se comprobó la concentración y la pureza del ADN obtenido como se ha indicado en el apartado 2.2.1. Posteriormente se realizó la reacción de amplificación mediante PCR en tiempo real como se ha descrito en el apartado 2.2.2.

Como control de la reacción se utilizó ADN extraído de harina de soja en una concentración del 0,001 % de ADN de soja en la reacción de PCR.

3.1.2 Especificidad

La especificidad de la secuencia elegida como diana está demostrada y se encuentra publicada en los métodos validados por el Laboratorio Europeo de Referencia para Organismos Modificados Genéticamente (EURL-GMFF, 2016). Según se indica en dichos métodos la secuencia elegida ha sido diseñada para reconocer como diana una secuencia del gen específico de soja (*le1*), descrita en la base de datos GenBank. No se ha encontrado similitud entre la secuencia diana y las secuencias de ADN de otras plantas cultivadas (leguminosas, vegetales y cereales) en las búsquedas

realizadas en bases de datos como NCBI, BlastN, EMBL, por lo que no se ha considerado necesario realizar estudios teóricos para la comprobación de la especificidad.

Sin embargo, para asegurar que no se producían interferencias o reacciones inespecíficas con el resto de ingredientes o componentes que forman parte de las muestras complejas, la especificidad se confirmó de forma experimental mediante el análisis de las 16 muestras de alimentos elegidas para llevar a cabo el proceso de validación en base a la carencia de la declaración de soja en el etiquetado (Tabla 3).

Asimismo, se confirmó que no se producía amplificación con otras variedades vegetales cercanas o susceptibles de producir reactividad cruzada con la soja (Tabla 3).

3.1.3 Límite de detección

El límite de detección se determinó bajo dos aspectos; como límite de detección absoluto, entendido como número de copias de genoma haploide de soja que es capaz de detectar el ensayo, y como límite de detección experimental o real, considerado como la mínima cantidad de soja que es capaz de detectar el ensayo sobre una determinada muestra, expresado como mg de soja por kg de alimento.

3.1.3.1 Límite de detección absoluto

El límite de detección absoluto, se determinó comprobando la mínima cantidad de ADN de soja que es capaz de producir una señal de amplificación en la reacción de PCR en tiempo real por debajo del ciclo 40.

Para ello, se realizaron cinco ensayos independientes de amplificación, en condiciones de reproducibilidad, realizando dos réplicas de PCR para cada uno de los puntos, sobre una serie de diluciones obtenidas a partir del ADN extraído de harina de soja, de forma que la concentración de ADN en la reacción de PCR se encontrara entre 1 000 pg y 10 pg.

La transformación de pg de ADN en número de copias se realizó considerando que una copia de genoma de soja corresponde a 1,13 pg de ADN (Arumuganathan y Earle, 1991), de forma que tendríamos en la reacción de amplificación valores de entre 885 a 8,8 copias de genoma haploide de soja.

Simultáneamente para comprobar que la reacción transcurría con suficiente linealidad y eficiencia se realizó la representación gráfica de los valores del correspondiente ciclo de amplificación (Ct) frente al logaritmo de la concentración en número de copias.

La reacción de amplificación se consideró aceptable cuando:

- $R^2 \geq 0,98$
- Eficiencia calculada a partir de la pendiente de la recta se encontraba entre el 80 y 110 %

$$\text{Eficiencia} = [10^{(-1/\text{pendiente})}] - 1 \times 100$$

3.1.3.2 Límite de detección experimental

El límite de detección experimental, expresado como mg de constituyente alergénico por kg de alimento, se comprobó mediante el análisis de cada una de las 16 matrices blanco elegidas, fortificadas en bajos niveles de concentración como se ha indicado en el apartado 2.1.

Los análisis se realizaron por duplicado en dos procesos analíticos independientes, en condiciones de reproducibilidad interna y realizando 10 réplicas de PCR en cada uno de ellos.

Se consideró como límite real del método, la menor cantidad de concentración de analito que es capaz de detectar el método con un intervalo de confianza del 95 %, sobre los diferentes tipos de muestras.

3.1.4 Sensibilidad

La sensibilidad se determinó a partir de la totalidad de los resultados obtenidos para cada uno de los cuatro tipos de matrices fortificadas al límite de detección del ensayo, es decir, sobre 80 resultados para cada tipo de matriz, procedentes de 10 réplicas, 2 ensayos independientes, 4 muestras diferentes por grupo de matriz.

La sensibilidad se calculó de acuerdo a la Norma UNE-CEN/TR 16338 IN.:2012 como la relación de número de muestras positivas confirmadas entre el número de muestras positivas conocidas. La sensibilidad debería ser ≥ 95 %.

4. Resultados

4.1 Aplicabilidad del método

Los resultados obtenidos en las 10 muestras etiquetadas como contiene soja o trazas de soja reflejados en la tabla 2, muestran que el proceso de extracción es adecuado para ser aplicado a ese tipo de matrices ya que en la mayoría de los casos la concentración fue superior a la concentración establecida para ser utilizada como concentración de trabajo, 50 ng/ μ l, y la pureza se encontraba dentro de los límites aceptados.

Igualmente se comprobó que en todos los casos se detectaba amplificación de ADN de soja en valores de ciclo de amplificación inferiores al máximo aceptable, ciclo 40, por lo que podíamos considerar que la reacción de amplificación era apropiada y no se observaban interferencias o inhibición por tratarse de matrices complejas.

Tabla 2. Resultados obtenidos en la extracción de muestras de soja				
Muestra	Etiquetado	Concentración ADN (ng/μl)	Pureza de ADN A260/A280	Ciclo de amplificación (gen <i>Le1</i>)
Salchichas	Contiene soja	398,1	1,9	32,22
Sopa de pollo	Puede contener trazas de soja	121,1	1,85	36,51
Galletas "special line"	Proteína de soja	120,8	1,9	31,36
Hamburguesa de vacuno	Proteína de soja	223,3	1,8	29,15
Yogur	Soja	27,3	1,5	32,25
Cereales de trigo con miel	Puede contener soja	156,1	1,6	35,27
<i>Rice Snack</i>	Contiene salsa de soja	185,7	1,7	37,58
Bebida de chocolate	Contiene soja	85,1	1,6	35,42
Magdalenas	Puede contener trazas de soja	137,4	1,8	36,12
Pan con semillas	Puede contener trazas de soja	269,9	1,9	35,27

4.2 Especificidad

La especificidad teórica se confirmó analizando 16 muestras en las que no se indicaba presencia de soja en el etiquetado, así como en variedades vegetales cercanas u otras que pudieran tener reactividad cruzada.

Los resultados mostraron que no se detectaba amplificación en ausencia de soja y que no se producían reacciones inespecíficas como consecuencia de los ingredientes existentes en las muestras que pudieran llevar a detectar falsos positivos (Tabla 3).

Como se puede ver en la tabla 3, la cantidad de ADN extraída de las muestras se consideró suficiente para poder continuar con el proceso analítico. En la mayoría de los casos la concentración fue superior a la concentración de trabajo, 50 ng/μl. En las muestras altamente procesadas en las que no se alcanzó una concentración de 50 ng/μl, las concentraciones obtenidas fueron próximas a 20 ng/μl por la que se consideraron aceptables para la continuación de los ensayos.

Tabla 3. Resultados obtenidos en muestras en las que la soja no forma parte de sus ingredientes					
	Muestra	Método	Concentración ADN (ng/μl)	Pureza de ADN A280/A260	Ciclo de amplificación (gen <i>Le1</i>)
Cárnicos	Chorizo	CTAB	908,4	1,89	n.d. ¹
	Hamburguesa	CTAB	116,7	1,85	n.d.
	Jamón cocido	CTAB	105,5	1,87	n.d.
	Salchichas	CTAB	453,4	1,91	n.d.
Bollería	Sobaos	SureFood	66,8	1,64	n.d.
	Magdalenas	CTAB	137,4	1,79	n.d.
	Bizcocho soletilla	CTAB	228,5	1,87	n.d.
	Pan de molde	CTAB	427,9	1,89	n.d.
Varios	Crema espárragos	CTAB	133,7	1,84	n.d.
	Helado de chocolate	SureFood	38,9	1,8	n.d.
	Margarina	SureFood	24,7	1,5	n.d.
	Salsa rosa	CTAB	19,6	1,36	n.d.
Líquidos	Batido de chocolate	CTAB	18,9	1,39	n.d.
	Yogur	SureFood	18,4	1,17	n.d.
	Flan	CTAB	34,5	1,73	n.d.
	Zumo de frutas	SureFood	72,2	1,47	n.d.

¹n.d.: no detectado.

Igualmente se confirmó la ausencia de amplificación en aquellas variedades vegetales cercanas o posible causa de reactividad cruzada mediante métodos inmunológicos (Tabla 4).

Variedad vegetal	Amplificación (gen <i>Le1</i>)
Cacahuete	n.d. ¹
Guisantes	n.d.
Trigo	n.d.
Cebada	n.d.

¹n.d.: no detectado.

Para asegurar los resultados, en todas las muestras se confirmó que el resultado negativo de amplificación se debía a la falta de dicho componente en la muestra y no como consecuencia de procesos de inhibición por algún componente de la matriz, para lo que se realizó un ensayo de inhibición en cada una de las matrices adicionando 1 µl de ADN extraído de harina de soja sobre el ADN extraído de la muestra y realizando un nuevo ensayo de amplificación.

En todos los casos se detectó amplificación, por lo que se descartó la posibilidad de resultado negativo como consecuencia de la presencia de sustancias inhibitoras en la muestra (datos no mostrados).

4.3 Límite de detección del ensayo

4.3.1 Límite de detección absoluto (número de copias)

Los resultados obtenidos en los cinco ensayos independientes realizados sobre las diluciones seriadas entre 1 000 pg y 10 pg, preparadas a partir del ADN extraído de harina de soja mostraron que el ensayo era capaz de amplificar en valores de ciclo de amplificación inferiores al ciclo 40, una concentración de 10 pg de ADN en la reacción de PCR en tiempo real, lo que correspondería teniendo en cuenta que una copia de genoma de soja equivale 1,13 pg, a 8,8 copias (Tabla 5).

Concentración		Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5
pg (PCR)	Copias de GHP					
1 000	885	29,12	28,8	28,87	29,34	29,3
200	177	31,31	31,27	30,87	31,87	31,47
40	35,4	34,1	33,58	33,24	33,94	34,76
20	17,7	35,59	34,353	35,3	35,94	34,78
10	8,8	36,97	35,45	36,33	36,22	36,16
Pendiente		-3,93	-3,28	-3,77	-3,55	-3,45
R²		0,99	0,99	0,98	0,984	0,98
Eficiencia		80,5	101,8	84,2	91,3	94,9

Este resultado nos permite establecer que el método es capaz de detectar con fiabilidad concentraciones de 10 copias de genoma de soja.

De la representación gráfica de los valores de los ciclos de amplificación respecto al logaritmo del número de copias, se puede comprobar que la reacción de amplificación transcurre con suficiente linealidad y eficiencia, ya que en todos los casos el R^2 fue $\geq 0,98$ y la eficiencia se encontraba entre los valores óptimos de 80 a 110 % (Figura 1).

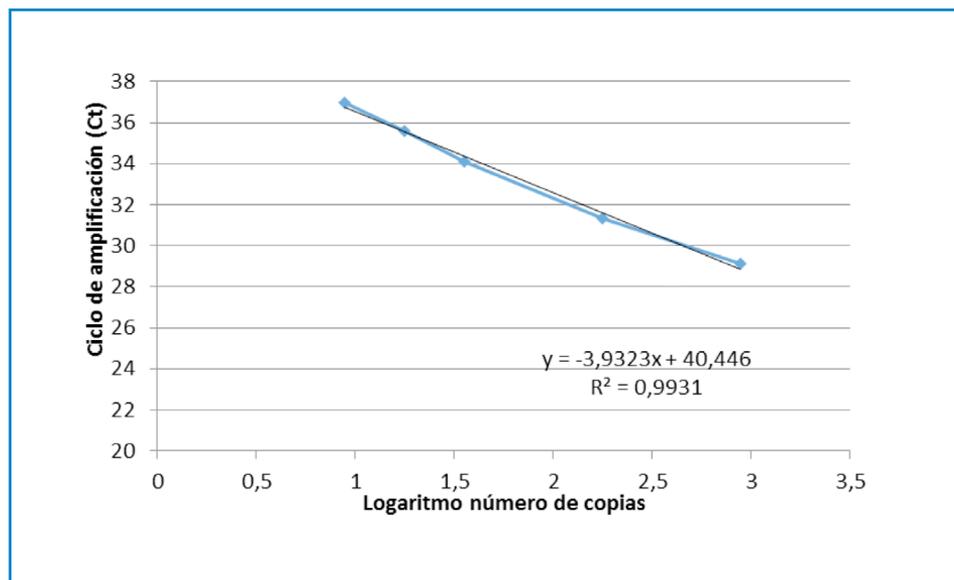


Figura 1. Ejemplo de la representación gráfica de la curva 1.

4.3.2 Límite de detección experimental

Un ensayo inicial realizado sobre las 16 muestras blanco seleccionadas, fortificadas en dos niveles de concentración 2,5 mg/kg y 5 mg/kg, mostró que no en todas las ocasiones se detectaba amplificación en las muestras fortificadas con 2,5 mg/kg de soja.

Sin embargo, se podía garantizar suficiente fiabilidad de detección cuando las muestras se fortificaron con 5 mg/kg de soja (datos no mostrados).

La confirmación del límite de detección experimental en la concentración de 5 mg/kg se llevó a cabo mediante el análisis de las 16 muestras elegidas entre los cuatro tipos de matrices fortificadas para ese nivel de concentración, realizando dos ensayos independientes en condiciones de reproducibilidad interna mediante 10 réplicas de PCR en cada ensayo.

La revisión de los resultados obtenidos para cada uno de los tipos de matrices, garantizó que el método es capaz de detectar 5 mg/kg de soja en muestras de alimentos (Tabla 6).

Tabla 6. Resultados obtenidos para la determinación del LD experimental 5 mg/kg

	Muestra fortificada con 5 mg/kg de soja	Extracción 1 Ct ± Sd (10 réplicas)	Extracción 2 Ct ± Sd (10 réplicas)
Cárnicos	Chorizo	37,50±0,93	36,40±0,65
	Hamburguesa	37,54±1,30	37,43±0,64
	Jamón cocido	36,91±0,85	36,58±1,40
	Salchichas	37,42±0,90	35,32±0,65
Bollería	Sobaos	37,51±0,66	36,15±0,54
	Magdalenas	32,50±0,28	35,31±0,60
	Bizcocho soletilla	34,52±0,33	35,63±0,68
	Pan de molde	34,30±0,36	36,25±0,48
Varios	Crema espárragos	36,28±0,76	36,13±0,85
	Helado de chocolate	36,42±0,56	36,39±1,21
	Margarina	36,13±0,34	38,29±0,72
	Salsa rosa	32,36±0,22	35,19±0,74
Líquidos	Batido de chocolate	34,49±0,32	37,49±0,89
	Yogur	36,04±1,40	37,54±1,05
	Flan	32,89±0,23	37,58±1,50
	Zumo de frutas	34,17±0,51	35,33±0,24

Como se puede ver en los resultados mostrados en la tabla 6, las medias de amplificación obtenidas en las 10 réplicas realizadas sobre el ADN extraído de las muestras fortificadas con 5 mg/kg, confirman que en todos los casos se detectó amplificación en valores inferiores al ciclo 40, por lo que se puede garantizar que el método es capaz de detectar concentraciones de soja de 5 mg/kg con suficiente fiabilidad. Los resultados se confirmaron en los dos ensayos independientes realizados en condiciones de reproducibilidad interna, lo que a su vez nos permite valorar que el método cumplía el requisito de reproducibilidad interna.

4.4 Sensibilidad

Los resultados muestran que la sensibilidad del ensayo calculada de acuerdo a la Norma UNE-CEN/TR 16338 IN.:2012 como el coeficiente de número de muestras positivas verdaderas entre el número de muestras positivas conocidas (verdaderos positivos/verdaderos positivos+falsos negativos) se encontraba en todos los casos dentro del nivel aceptable siendo $\geq 95\%$ (Tabla 7).

Tabla 7. Sensibilidad al límite de detección 5 mg/kg de acuerdo al tipo de matriz

Tipo matrices fortificadas con 5 mg/kg de soja	Número de positivos conocidos	Verdaderos positivos	Falsos negativos	Sensibilidad
Cárnicos	80	78	2	97,5 %
Bollería	80	79	1	99,0 %
Varios	80	79	1	99,0 %
Líquidos	80	76	4	95,0 %
Total	320	312	8	97,5 %

5. Conclusiones

1. El método analítico puede ser utilizado para la detección de soja o trazas de soja en la mayoría de matrices posiblemente implicadas en alergias alimentarias a la soja.
2. El límite de detección absoluto del ensayo se ha establecido en 10 picogramos de ADN de soja que correspondería teóricamente a 10 copias de genoma haploide de soja.
3. El límite de detección real del ensayo se ha establecido en 5 mg/kg de soja en alimentos.
4. La sensibilidad del ensayo es superior al 95 %.
5. El método de ensayo y el proceso de validación fueron presentados para su acreditación a la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC), en mayo de 2015, alcanzando, sin observaciones, la acreditación bajo la Norma UNE 17025. El método ha sido incluido en el alcance a Acreditación del CNA (Anexo técnico 178_LE397 Rev_30).

Referencias

- Arumuganathan, K. y Earle, E.D. (1991). Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9, pp: 210-220.
- EURL-GMFF (2016). European Union Reference Laboratory for GMO Food & Feed. Compendium of reference methods for GMO analysis. Disponible en: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/> [acceso: 29-06-16].
- Greenhawt, M.J., Singer, A.M. y Baptist, A.P. (2009). Food allergy and food allergy attitudes among college students. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 124, pp: 323-327.
- Murray, M.G. y Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8, pp: 4321-4325.
- Soares, S., Mafra, I., Amaral, J.S. y Oliveira, M.B.P.P. (2010). A PCR assay to detect trace amounts of soybean in meat sausages. *International Journal of Food Science & Technology*, 45, pp: 2581-2588.
- UE (2011). Reglamento (UE) N° 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de octubre de 2011, sobre la información alimentaria facilitada al consumidor. DO L 304 de 22 de noviembre de 2011, pp: 18-63.
- UNE-EN 15634-1:2009. Productos alimenticios. Detección de alérgenos mediante métodos biológicos moleculares. Parte1: Consideraciones generales.
- UNE-EN 15842:2010. Productos alimenticios. Detección de alérgenos alimenticios. Consideraciones generales y validación de los métodos.
- UNE-CEN/TR 16338 IN.:2012 Productos alimenticios. Detección de alérgenos alimenticios. Formato para proporcionar información sobre métodos inmunológicos y métodos de biología molecular.

Si desea citar un Informe del Comité Científico de la AECOSAN en una publicación científica, le sugerimos que siga este modelo, adaptándolo al estilo de citación requerido por la publicación de destino:

Ferrús, M.A., Barat, J.M., Conchello, M.P., Guix, S., Palop, A., Santos, J.A., Herrera, A., Martín de Santos, M.R. y Martínez, A. Grupo de trabajo (2015). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) sobre los riesgos microbiológicos asociados al consumo de leche cruda y productos lácteos elaborados a base de leche cruda. *Revista del Comité Científico de la AECOSAN*, 21, pp: 45-78.

Abreviatura revista: Rev. Com. Cient. AECOSAN

