

revista del
Comité
Científico de la aesan

Nº 13

agencia española de seguridad alimentaria y nutrición
agencia española de seguridad alimentaria y nutrición
agencia española de seguridad alimentaria y nutrición
agencia española de seguridad alimentaria y nutrición
agencia española de seguridad alimentaria y nutrición



Revista del Comité Científico de la AESAN

Madrid, 2011

revista del
Comité
Científico de la asesam

Nº 13

Nota del Comité Editorial

Los Informes que se incluyen a continuación son el resultado de las consultas que la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) 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 "Referen-

cias" que se incluye al final de los Informes. Lo contrario, además de dificultar su comprensión integral, pudiera llevar a extraer conclusiones parciales o equivocadas, divergentes del informe en su conjunto.

Revista del Comité Científico de la AESAN

Consejo Editorial

Presidenta de Honor

Leire Pajín Iraola

Editores Jefe

Roberto Sabrido Bermúdez

Ana María Troncoso González

Secretario del Comité Científico y editor

Jesús Campos Amado

Coeditores

Milagros Nieto Martínez

Rosa Sanchidrián Fernández

Octavio Rivera Atienza

Consejo Editorial Científico

Presidente del Comité Científico

Andreu Palou Oliver

Vicepresidente del Comité Científico

Juan José Badiola Díez

Arturo Anadón Navarro

Albert Bosch Navarro

Juan Francisco Cacho Palomar

Ana María Cameán Fernández

Alberto Cepeda Sáez

Lucas Domínguez Rodríguez

Rosaura Farré Rovira

Manuela Juárez Iglesias

Francisco Martín Bermudo

Manuel Martín Esteban

Albert Más Barón

Teresa Ortega Hernández-Agero

Andrés Otero Carballeira

Perfecto Paseiro Losada

Daniel Ramón Vidal

Elías Rodríguez Ferri

M^a Carmen Vidal Carou

Gonzalo Zurera Cosano

Coordinadores de la edición

Ricardo López Rodríguez

Vicente Calderón Pascual

Responsable de Comunicación de la AESAN

Juan Julián García Gómez

AESAN: Alcalá, 56. 28071. Madrid

Diseño y maquetación

Montserrat Gómez

NIPO: 863-11-002-0

ISSN: 1885-6586

D.L.: M-27353-2005

Correo electrónico: uccaesan@mspsi.es

Imprime

Artegraf



Índice

Prólogo	7
Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre el papel de la nutrición en las enfermedades auto-inmunes	9
Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los niveles de mercurio establecidos para los productos de la pesca	29
Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre proteínas lácteas, alergias y sus métodos de análisis	37
Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación al efecto de la reducción de la sal en la seguridad microbiológica de los productos cárnicos curados	59
Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los envases activos e inteligentes	89

"La formulación de un problema es más importante que su solución"

Albert Einstein

El presente número de la *Revista del Comité Científico* es un claro ejemplo de la multitud de factores que pueden condicionar la seguridad alimentaria y también refleja la transcendencia de las intervenciones por parte de todos los actores de los diferentes eslabones de la cadena alimentaria e incluso de fuera de ella, desde los que se ocupan de la producción primaria hasta los propios consumidores (pues cada uno de nosotros hemos de contribuir activamente en la gestión individual de los riesgos), pasando por los industriales, los distribuidores y los restauradores, pero sin olvidar que la seguridad alimentaria también se ve afectada por todos aquéllos que no participan directamente en actividades alimentarias. Sirva como ejemplo que la contaminación ambiental, que podemos asociar a casi todas las actividades humanas, tiene su fiel reflejo en los alimentos que comemos.

Como consecuencia de esa multiplicidad de peligros y factores que influyen en la seguridad alimentaria el Comité ha tenido que valorar, en los informes que se recogen en este ejemplar, la influencia en la seguridad alimentaria de contaminantes de las materias primas alimenticias (mercurio en los productos de la pesca), de la formulación de los productos alimenticios (efecto de la reducción de sal en los productos cárnicos), de los materiales empleados para envasar los alimentos (envases activos o inteligentes), de los métodos para determinar la composición de los productos alimenticios (detección de proteínas lácteas). También ha revisado el papel de los componentes fundamentales de los alimentos (los nutrientes) en relación con un grupo de enfermedades crónicas (las autoinmunes).

La gestión del riesgo relacionado con la presencia de contaminantes ambientales en los productos alimenticios ha de acompasarse a las nuevas aportaciones científicas y a los nuevos datos que aportan mayor concreción de los niveles de los contaminantes en los diferentes alimentos y de la ingesta real de tales peligros por determinados grupos de consumidores. Dado que la presencia de estos contaminantes ambientales en los alimentos es inevitable, una de las medidas básicas de gestión del riesgo que a ellos se asocia la constituye el establecimiento de niveles máximos para cada uno de los contaminantes en los productos alimenticios, niveles cuya ingesta es segura para los consumidores. En la evaluación del riesgo derivado de la presencia de mercurio en los productos de la pesca, el Comité ha considerado tanto las evidencias del carácter tóxico del peligro (en particular de determinadas formas químicas) como datos recientes acerca de la presencia de mercurio en los productos alimenticios comercializados en España y en algunos tejidos de los consumidores españoles (que reflejan la ingesta real del contaminante) así como los patrones de consumo de los diferentes alimentos. En función de la información disponible, y para mantener el nivel de seguridad actual, el Comité considera que no es recomendable modificar el nivel máximo de contaminación por mercurio actualmente establecido para el pescado y los productos de la pesca. También estima que las medidas tendentes a reducir la presencia de mercurio en el medio ambiente así como el seguimiento de las recomendaciones relativas a limitar la ingesta por los grupos poblacionales especialmente sensibles de carne de las especies de peces más contaminadas con mercurio son eficaces medidas de gestión de este riesgo.

El informe del Comité relativo a la reducción de la sal en la seguridad microbiológica de los productos cárnicos curados es un claro ejemplo de la necesidad de valorar adecuadamente todas las consecuencias derivadas de cualquier intervención en gestión de riesgos. Siendo muy conveniente, en términos de salud pública y para reducir los riesgos relacionados con la hipertensión arterial y las enfermedades cardiovasculares, rebajar la ingesta de sal común por la población española, es necesario evaluar si la reducción en la cantidad de cloruro sódico empleada en la elaboración de los productos alimenticios (una de las medidas básicas a aplicar para reducir la ingesta de sal por la población) tiene algún efecto indirecto sobre otros factores de riesgo. Tal valoración es necesaria pues el cloruro sódico constituye uno de los múltiples componentes del complejo sistema antimicrobiano que garantiza la estabilidad y la seguridad microbiológica de diversos productos alimenticios, en particular de los productos

cárnicos crudos y curados. El Comité destaca la necesidad de que los industriales alimentarios valoren en cada caso concreto el posible efecto de la reducción en el contenido en sal de sus mezclas de ingredientes en la seguridad microbiológica de los productos que elaboran, de que adopten alguna de las múltiples medidas de intervención que permiten garantizar la seguridad de los productos alimenticios obtenidos a partir de estas fórmulas modificadas, y propone, en base a modelos de predicción del comportamiento microbiano, un procedimiento muy útil para orientar la actuación de los técnicos de las industrias alimentarias en la selección de las medidas de gestión de la seguridad microbiológica de los productos alimenticios elaborados a partir de fórmulas con reducido contenido en sal.

La utilización de nuevas tecnologías en el procesado de alimentos únicamente es factible cuando, entre otros aspectos, se ha demostrado la seguridad para los consumidores de los productos en cuya elaboración se han empleado. Las modificaciones en las técnicas y en los procedimientos de envasado de los productos están en el origen de algunas de esas nuevas tecnologías. Los desarrollos técnicos permiten disponer de envases activos (que modifican la composición del alimento o de su entorno con una finalidad determinada: por ejemplo, aumentar su vida útil) y de envases inteligentes (que son capaces de valorar el estado del alimento que contienen o de las condiciones en que se ha mantenido y proporcionar alguna información derivada de dicha evaluación: por ejemplo, muestran un color determinado únicamente cuando el producto ha sido mantenido a temperaturas inadecuadas). El Comité realiza una valoración de los desarrollos más recientes en relación con ambos tipos de envases y evalúa las medidas legislativas de gestión del riesgo actualmente vigentes, considerándolas adecuadas al nivel actual del conocimiento.

La presencia de proteínas lácteas en los productos alimenticios constituye un factor de riesgo para consumidores alérgicos a las mismas. Los métodos analíticos que permiten la detección de estos componentes alergénicos constituyen una valiosa herramienta de control. Sin embargo, los diferentes escenarios de utilización de dichos métodos (desde el uso rutinario en la industria alimentaria hasta la investigación de posibles fraudes) plantean demandas analíticas diversas. El Comité emite un informe sobre los métodos actualmente disponibles y valora su adecuación para el empleo en diversas situaciones, recordando que la gestión de este riesgo concreto no ha de basarse exclusivamente en la utilización de métodos analíticos de detección de proteínas lácteas.

El mejor conocimiento del papel que juegan los diferentes nutrientes en los procesos metabólicos humanos está permitiendo descubrir cómo determinados nutrientes intervienen activamente en el curso de determinadas enfermedades humanas, bien favoreciendo su desarrollo, bien retrasando o impidiendo su aparición. Las enfermedades autoinmunes constituyen un grupo de padecimientos de carácter crónico cuyo desarrollo puede verse afectado por la composición de nuestra dieta. Además de resaltar las evidencias claras de la importancia de una nutrición adecuada y equilibrada en el normal funcionamiento del sistema inmunitario, el Comité considera que, para la posible utilización de nutrientes para la prevención o la mejora de enfermedades autoinmunes concretas (uso que pudiera ser factible en base a los datos procedentes de ensayos animales), aún debe demostrarse adecuadamente su eficacia en ensayos humanos.

Los informes recogidos en este número de la Revista son los últimos adoptados por el Comité del que he formado parte en los últimos siete años. Como está establecido estatutariamente y es necesario por múltiples razones, se ha procedido a la renovación del Comité. Esta oportunidad de prologar este ejemplar que ahora leen me permite al mismo tiempo agradecer, además de tal circunstancia, la confianza personal que los diferentes gestores de la Agencia y de los Ministerios en que se ha integrado e integra me han demostrado al seleccionarme para formar parte de este primer Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y (desde 2006) Nutrición. También me permite trasladar mi reconocimiento a todos y cada uno de los veintinueve colegas con los que he compartido experiencia y a todos y cada uno de los gestores que también han formado parte del Comité o han participado en alguna de sus actividades. Todos y cada uno de ellos han contribuido significativamente a mi mejora intelectual, profesional y humana.

Andrés Otero Carballeira
Miembro del Comité Científico de la AESAN

Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre el papel de la nutrición en las enfermedades autoinmunes

Miembros del Comité Científico

Andreu Palou Oliver, Juan José Badiola Díez, Arturo Anadón Navarro, Albert Bosch Navarro, Juan Francisco Cacho Palomar, Ana María Cameán Fernández, Alberto Cepeda Sáez, Lucas Domínguez Rodríguez, Rosaura Farré Rovira, Manuela Juárez Iglesias, Francisco Martín Bermudo, Manuel Martín Esteban, Albert Más Barón, Teresa Ortega Hernández-Agero, Andrés Otero Carballeira, Perfecto Paseiro Losada, Daniel Ramón Vidal, Elías Rodríguez Ferri, M^a Carmen Vidal Carou, Gonzalo Zurera Cosano.

Secretario

Jesús Campos Amado

Número de referencia: AESAN-2010-007

Documento aprobado por el Comité Científico en su sesión plenaria de 28 de septiembre de 2010

Grupo de Trabajo

Francisco Martín Bermudo (Coordinador)
Alberto Cepeda Sáez
Manuel Martín Esteban
Elías Rodríguez Ferri
M^a Carmen Vidal Carou
Concepción Becerril Moral (AESAN)

9

revista del comité científico nº 13

Resumen

El sistema inmune está formado por una red compleja de células y órganos que protegen al cuerpo de agentes extraños. El sistema inmune tiene varias líneas de defensa. Una vez que las barreras naturales han fracasado se ponen en marcha la inmunidad innata y la adquirida. La inmunidad innata es la primera en actuar, es natural e inespecífica, no requiere sensibilización previa, está mediada fundamentalmente por células con capacidad fagocítica y células asesinas naturales y, por sí misma, permite controlar a la mayor parte de los agentes patógenos que llegan al organismo. La inmunidad adquirida es específica y posee memoria inmunológica cuando el organismo es expuesto por segunda vez a un antígeno determinado; en ella participan prioritariamente los linfocitos y los anticuerpos y citoquinas liberados por ellos. La mucosa del aparato digestivo es una extensa puerta de entrada a agentes patógenos que también posee un tejido linfoide asociado a ella (GALT), el cual está formado por nódulos linfoides solitarios, apéndice, placas de Peyer y linfocitos individuales de la pared intestinal. Generalmente el sistema inmune responde de forma unitaria, por lo que la división en respuesta inespecífica y específica es más teórica que real. Lo que sí ocurre es que, dependiendo de las circunstancias, en unos casos predomina una u otra. En algunas personas el sistema inmune se encuentra alterado y le cuesta trabajo reconocer a sus propias estructuras celulares y tejidos, por lo que inicia un ataque frente a ellas. Cuando esto ocurre se originan las enfermedades autoinmunes. El ataque autoinmunitario puede estar restringido a tejidos específicos o ser generalizado.

El profundo efecto de la dieta en el sistema inmune es algo claramente reconocido. Una ingesta inadecuada de macronutrientes o determinados micronutrientes puede conducir a deficiencias en el sistema inmune que den lugar a manifestaciones clínicas. Un aspecto menos conocido de la estrecha relación entre la nutrición y el sistema inmune es el papel de los nutrientes en la patogenia, la clínica y la evolución de las enfermedades autoinmunes. En este sentido se ha demostrado que, en pacientes con enfermedades autoinmunes: i) la restricción calórica no mejora la clínica o la evolución de la

enfermedad; ii) el AGPI (ácido araquidónico) parece tener una utilidad clínica en las enfermedades autoinmunes, aunque el mecanismo mediante el cual ejerce sus efectos clínicos no está aclarado; iii) determinados péptidos y proteínas presentes en los alimentos están involucrados en la patogenia de enfermedades autoinmunes como la celiaquía, la diabetes tipo 1 y la artritis reumatoide; iv) todos los ensayos de intervención nutricional realizados en pacientes con enfermedades autoinmunes, en los que se administran vitaminas con actividad antioxidantes, aisladas o en conjunto, han mostrado unos beneficios clínicos muy pequeños o nulos; v) el déficit de vitamina D es un factor predisponente a padecer diabetes tipo 1 y esclerosis múltiple. La suplementación en personas con este déficit corrige esa predisposición y vi) los escasos ensayos clínicos aleatorizados, doble ciego y placebo controlados, en los que se administran altas dosis de varias cepas de probióticos, a pacientes con enfermedades inflamatorias intestinales, muestran una mejoría de la clínica inflamatoria, siempre y cuando se administren simultáneamente con la medicación adecuada.

En general parece existir una relación entre determinados nutrientes y la patogenia, la clínica y la evolución de las enfermedades autoinmunes. De momento, los estudios realizados con modelos animales de experimentación parecen arrojar datos más concluyentes que los ensayos de intervención nutricional llevados a cabo en pacientes, los cuales son escasos. Sería necesario disponer de más estudios, en pacientes, para conocer con más claridad el impacto de la dieta en las enfermedades autoinmunes.

Palabras clave

Sistema inmune, enfermedades autoinmunes, nutrición, nutrientes, probióticos.

Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) on the role of nutrition in autoimmune diseases.

Abstract

The immune system is a network of cells, tissues, and organs that work together to defend the body against attacks by "foreign" invaders. If pathogens survive the body's front-line defenses, they still have to find a way to escape a series of general defenses of the innate immune system, which are ready to attack without regard for specific antigen markers. These include patrolling phagocytes, natural killer T cells, and complement. Pathogens that cross the general barriers then confront specific weapons of the adaptive immune system tailored just for them. These specific weapons, which include both antibodies and T cells, are equipped with singular receptor structures that allow them to recognize and interact with their designated targets. Other clumps of lymphoid tissue are found in many parts of the body, especially in the linings of the digestive tract, territories that serve as gateways to the body. These tissues form the gut-associated lymphoid tissue and include the tonsils, adenoids, Peyer's patches, lymphoid aggregates and appendix. The immune system works as a unit, thus the distinction between innate and adaptive is not completely real. In abnormal situations, the immune system can mistake self for non-self and launch an attack against the body's own cells or tissues. The result is called an autoimmune disease. The immune attack may be restricted to certain organs or involve a particular tissue in different places.

The profound effect of diet on the immune system is well-known since many years ago. Lack of adequate macronutrients or selected micronutrients can lead to clinically significant immune deficiencies. However, the relationship between nutrition and autoimmune diseases is not clearly established. In this regard, it has been established that: i) it is not yet possible to conclude whether caloric restriction improves the pathology of human autoimmune diseases; ii) polyunsaturated fatty acids seem to reduce autoimmune disease severity, however, its mechanisms of action is still unclear; iii) some dietary peptides and proteins are capable of inducing autoimmune diseases, such as celiac disease, type 1 diabetes and rheumatoid arthritis; iv) human studies investigating the effects of antioxidant vitamins, administered alone or together, have shown not quite significant benefits on clinical symptoms; v) vitamin D deficiency is associated with a higher risk of type 1 diabetes and multiple sclerosis. Deficiency supplementation ameliorates this predisposition and vi) the few randomised, double-blind placebo-controlled trials, with high doses of several probiotics strains, carried on patients with inflammatory bowel diseases, show a decrease in clinical inflammatory score, in medically treated patients.

Taken together, various dietary components have been suggested to impact on autoimmune diseases. To date, human studies are encouraging, but not as straightforward as expected from experiences with experimental animal models. There is a clear need for more good-quality studies assessing the putative effects of nutritional compounds on autoimmune diseases.

Key words

Immune system, autoimmune diseases, nutrition, nutrients, probiotics.

Introducción

En los últimos años la aparición de alimentos con propiedades funcionales ha aumentado considerablemente. En algunas ocasiones, a estos alimentos se les atribuyen propiedades beneficiosas sobre el sistema inmune. Este aspecto podría llevar a confusiones sobre los posibles efectos de los nutrientes en las enfermedades autoinmunes. Por estas razones, el objetivo de este informe es analizar y evaluar el papel que tiene la nutrición sobre la patogenia y la evolución clínica de las enfermedades autoinmunes.

El sistema inmune esta formado por una intrincada red de tejidos especializados, órganos, células y sustancias químicas que protegen de los agentes infecciosos, las toxinas, las células cancerosas y los tejidos extraños. Existen muchas variaciones individuales en las funciones inmunes originadas por la dotación genética, el estado nutricional del individuo, el estrés, la edad y los hábitos de conducta. Algunos de estos factores podrían ser la causa de que en determinados individuos el sistema inmunitario sufra alteraciones llegando a no establecer diferencias entre el tejido propio y los agentes extraños. El resultado es una respuesta inmunitaria que altera y destruye los tejidos corporales normales de las personas que lo padecen, originando las enfermedades autoinmunes.

1. El sistema inmune

Los primeros mecanismos de defensa destinados a combatir y eliminar los elementos extraños implican factores físicos, químicos y biológicos tales como la barrera de la piel, las mucosas, el pH del estomago, las enzimas digestivas, la biota normal de ciertos tejidos y otros. Cuando estos mecanismos fallan o son superados, actúa el sistema inmune.

El sistema inmune posee dos vías interactivas: la inmunidad innata o inespecífica y la inmunidad adquirida o específica. Ambas están mediadas por proteínas y células procedentes de los órganos linfoides (timo, bazo, nódulos linfoides y placas de Peyer) que son transportadas a los lugares diana a través del torrente circulatorio y linfático.

Inmunidad innata

Es la primera en actuar. Es de naturaleza inespecífica, es decir, su actuación no necesita una exposición previa al patógeno y no aumenta por la exposición reiterada a los mismos. Existen varias respuestas de inmunidad innata:

- La respuesta inflamatoria, cuya consecuencia final es el fenómeno de eliminación por fagocitosis, de elementos extraños y que está a cargo de los monocitos o macrófagos y los neutrófilos, según tenga lugar en la sangre o en los tejidos. Ante una agresión las células liberan sustancias mediadoras de la inflamación (histamina, prostaglandinas, leucotrienos, etc.) que actúan sobre: i) los capilares provocando su vasodilatación y un aumento de su permeabilidad y ii) sobre los fagocitos activando la síntesis de las enzimas digestivas y quimiotaxis. Las células fagocíticas activadas salen de los capilares, se dirigen hacia la lesión y allí aíslan, fagocitan y destruyen los elementos extraños.
- El mecanismo del interferón (IFN). El interferón es un grupo de glicoproteínas séricas que intervienen en el rechazo y control de la infección vírica y, en general, de los patógenos intracelulares, cualquiera que sea su origen (virus o bacterias). Además, pueden ser inducidas por ARNbc (ARN

producidos como parte del proceso de replicación/transcripción del ARN vírico), antígenos de muchos tipos, lipopolisacáridos y mitógenos, con capacidad para inhibir la replicación del patógeno en células de la misma especie, o relacionadas. Las células infectadas por virus liberan IFN que es captado por las células próximas sin infectar, las cuales sintetizan enzimas que impiden la multiplicación del genoma viral y la síntesis de proteínas virales, frenando así la propagación de la infección. El IFN también inhibe la proliferación celular, participa en el rechazo de tejidos, activa los macrófagos, e interviene en la inmunidad específica. Existen dos tipos generales de interferón: i) el tipo I, del que existen cinco variantes, lo sintetizan los trofoblastos, fibroblastos, monocitos, macrófagos, linfocitos T y células epiteliales y ii) el tipo II, también denominado interferón inmune o γ -interferón, que es producido por linfocitos T y células NK.

- La vía alternativa del Complemento. Se trata de un conjunto de proteínas del suero que se activan en "cascada" y cuya consecuencia final es la lisis bacteriana. Existe una vía clásica del Complemento que puede activarse en ausencia de anticuerpos y cuyo papel puede ser sustituido por la lactoferrina, la cual unida a determinados patógenos activa el C1q e inicia la cascada que termina en la lisis bacteriana.
- Células *natural killer* (NK) que destruyen las células infectadas por patógenos intracelulares, independientemente de cual sea su naturaleza (bacterias, hongos o virus).

Inmunidad adquirida

Este tipo de inmunidad se activa tras el contacto con el patógeno o elemento extraño. Sus características principales son la especificidad y la memoria. Es específica porque va dirigida contra un elemento extraño concreto (antígeno) y tiene memoria porque el segundo y los siguientes contactos desencadenan una respuesta más rápida y potente.

La respuesta inmune específica se lleva a cabo fundamentalmente por parte de los linfocitos T y B. El antígeno es procesado y presentado a los linfocitos T principalmente por los macrófagos, las células dendríticas y las células B.

El resultado del reconocimiento del antígeno es que el sistema inmune reacciona simultáneamente de dos formas:

- Respuesta inmune humoral. Los linfocitos B, estimulados por la presencia del antígeno y por citoquinas proliferan y evolucionan a "células plasmáticas", las cuales secretan inmunoglobulinas (Ig) con actividad anticuerpo. Los principales tipos de anticuerpos que intervienen en la respuesta inmune son las IgG y las IgM, en el suero, y las IgA en las mucosas. Las IgE interviene en fenómenos de hipersensibilidad y las IgD lo hace sirviendo de receptor de antígenos en las células B.
- Respuesta inmune celular. Los linfocitos T son estimulados para reaccionar contra el antígeno. Existen tres subpoblaciones de linfocitos T:
 - Linfocitos T colaboradores (Th o T-CD4). Estos sintetizan citoquinas que estimulan a otras células, que intervienen tanto en la inmunidad innata, como en la adquirida (linfocitos B, LTC, macrófagos, etc.).
 - Linfocitos T citotóxicos (LTC o T-CD8) que destruyen las células infectadas por los patógenos intracelulares.

Los linfocitos T se activan tras el reconocimiento del antígeno, siempre y cuando este vaya unido a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), del que existen dos clases: i) las de clase I se expresan en todas las células nucleadas y plaquetas y ii) las de clase II están presentes solo en las "células presentadoras de antígeno" (CPA) (macrófagos, células dendríticas, linfocitos B. etc.).

El MHC de clase I sirve de mecanismo de presentación de antígenos intracelulares a los linfocitos CD8, mientras que el MHC II presenta antígenos derivados de microorganismos extracelulares y proteínas a los linfocitos CD4 (Figura 1). La comunicación entre la inmunidad innata y la adquirida tiene lugar a través de interacciones directas célula-célula, implicando a su vez la adhesión de moléculas y la proliferación de mensajeros químicos tipo citoquinas.

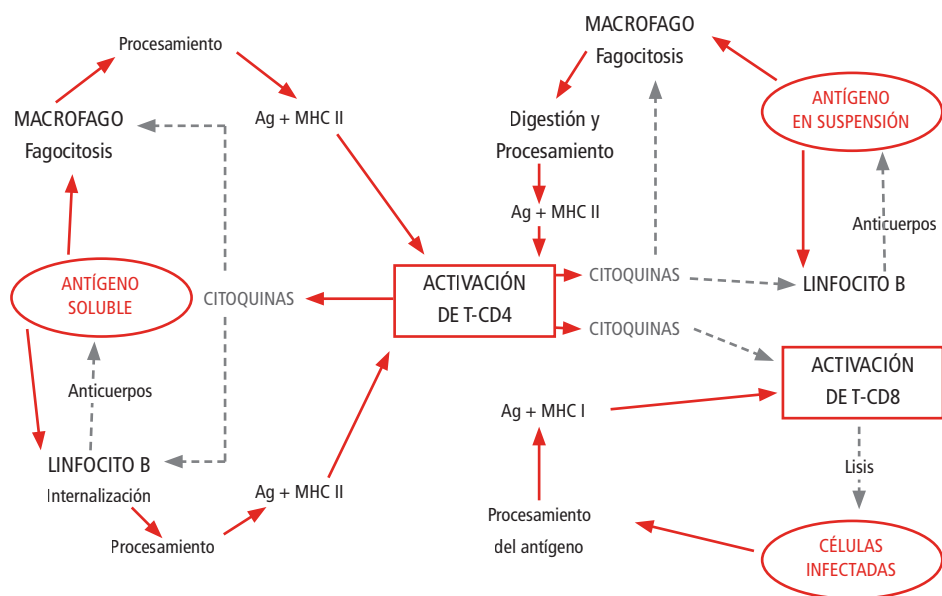


Figura 1. Esquema de los procesos implicados en la respuesta inmune adquirida. Ag= antígeno. MHC I= proteínas de histocompatibilidad de clase I. MHC II=proteínas de histocompatibilidad de clase II. T-CD4=Linfocito T colaborador. T-CD8=Linfocito T citotóxico.

2. Sistema inmunitario y tracto gastrointestinal

Existe una relación estrecha entre el sistema inmune y el tracto gastrointestinal, derivada del hecho de que el intestino es el órgano linfóide más grande del organismo, lo que a su vez está muy relacionado con la gran cantidad de antígenos a los que las células intestinales están expuestas constantemente.

La superficie mucosa intestinal está colonizada por una microbiota que alcanza valores muy altos de bacterias, de hasta 10^{11} ufc/g/cm² en el colon y entre 10^5 y 10^7 en el resto. Está abundante masa bacteriana, también variada, contribuye a la protección creando una barrera que impide la colonización de bacterias y hongos patógenos, principalmente, por un principio elemental de exclusión competitiva (competición por espacio y nutrientes). La importancia de la microbiota intestinal, por otra parte, queda de manifiesto cuando se produce su eliminación o una alteración brusca en su composición, facilitando la presencia de patógenos potenciales.

A nivel del estómago, el pH desciende normalmente hasta valores microbicidas, aunque no siempre resulte eficaz. Igualmente, el pH de los primeros tramos del intestino delgado también puede comprometer la vida de los patógenos potenciales, debido al carácter anaerobio facultativo de la microbiota que, en los lactantes, selecciona la presencia de lactobacilos que producen ácido láctico y butírico de la lactosa, lo cual ejerce un efecto bacteriostático sobre muchos patógenos bacterianos. Además, la mucosa del estómago segrega lisozima y en el intestino, las células de *Paneth* liberan lisozima y criptidinas. Todos ellos tienen propiedades antimicrobianas. Los macrófagos presentes en la mucosa intestinal también liberan lisozima. Además, estos macrófagos aclaran la presencia de patógenos en el lumen mediante su actividad fagocítica y la secreción de citoquinas.

Los mecanismos intestinales de defensa necesitan diferenciar correctamente entre la microflora simbiótica y los patógenos exógenos. Hoy en día, aún no se entiende bien este mecanismo, pero es probable que tanto la respuesta inmunológica innata como la adquirida participen en este proceso.

Se ha explorado *in vitro* la capacidad de las células inmunocompetentes de la mucosa para discernir entre señales emitidas por diferentes tipos de bacterias y se han encontrado, al menos, dos patrones distintos de respuesta innata a las bacterias Gram negativas y Gram positivas. Es posible que la comprensión de estas funciones moduladoras pueda suministrar información para prevenir o corregir problemas intestinales asociados a las alergias alimentarias, la enfermedad inflamatoria del intestino y la autoinmunidad. En este contexto, se están investigando los efectos moduladores de la actividad inmunitaria que puede ofrecer la ingesta de organismos vivos no patógenos (probióticos) que pueden interactuar con la mucosa intestinal y promover efectos protectores, por ejemplo, limitando la intensidad y la extensión de las respuestas inmunitarias en el ámbito de la mucosa (Zaldivar, 2002) (Marcos et al., 2006) (Guarner, 2007) o incrementando en la mucosa intestinal la presencia de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ y la producción de citoquinas (Naidu et al., 1999).

El tejido linfóide asociado a las mucosas (MALT: *mucosal associated lymphoid tissue*), constituye una parte esencial del sistema inmune de las mucosas. El MALT gástrico y el intestinal (GALT: *gut-associated lymphoid tissue*) engloban nódulos linfoides solitarios, apéndice, placas de Peyer y linfocitos individuales de la pared intestinal. Desde el punto de vista funcional el MALT protege las mucosas frente a la infección y colonización por patógenos, establece tolerancia frente a antígenos derivados de la ingesta alimentaria y previene de respuestas alteradas frente a estos antígenos, en el caso de que sean

capaces de romper y atravesar la mucosa. En las placas de Peyer, las células M (célula membranosa), que representan el tejido linfoide principal del intestino, están especializadas en atrapar antígenos de la luz intestinal y transportarlos a la submucosa (transcitos), a través del linfoepitelio, donde se liberan al espacio extracelular desde el que son captadas por las células dendríticas y transportadas a otros territorios orgánicos. De hecho, este tipo de células representa la puerta de entrada habitual de patógenos intracelulares facultativos como *Brucella spp*, *Salmonella spp*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia*, *Cryptosporidium*, astrovirus, virus brea y rotavirus.

En el tracto gastrointestinal, como en otras mucosas, los mecanismos protectores incluyen la exclusión y la eliminación inmunes, tareas en las que se reparten los distintos tipos de inmunoglobulinas. La exclusión supone el bloqueo de la penetración del agente extraño a nivel de la mucosa, mientras que la eliminación inmune representa la eliminación propiamente dicha del agente una vez que ha penetrado en la mucosa. En este sentido, la IgA bloquea la unión de las adhesinas bacterianas o víricas a las células epiteliales de la mucosa intestinal (o de otras mucosas) oponiéndose a la colonización y además posee la capacidad de activar el complemento. Finalmente, la IgA actúa a nivel intracelular, en las células epiteliales, las cuales la transportan hacia la superficie mucosa, uniéndose por ejemplo a proteínas víricas, impidiendo la replicación vírica. La IgE y la IgG poseen capacidad para eliminar el antígeno que penetra en la mucosa, destruyéndolo, mediante la activación del sistema del complemento por la vía clásica. Además, la IgE puede unirse a los mastocitos de la pared del intestino, provocando su desgranulación y la liberación de aminas vasoactivas, lo que causa un incremento de la permeabilidad capilar y la extravasación de fluidos ricos en IgG, originando los signos típicos de la inflamación.

Como se ha señalado, el sistema digestivo es la puerta de entrada habitual de muchos antígenos extraños, incluyendo proteínas alimentarias y microorganismos (comensales y patógenos). Aunque la mayor parte son degradados, una pequeña porción de los antígenos alimentarios se absorben de forma intacta, siendo filtrados por las células de Kupffer en el hígado, cuya función es facilitada por la IgA presente en el punto de absorción, que se une al antígeno y estimula la fagocitosis del complejo inmune. El equilibrio, en el aparato digestivo, entre la respuesta frente a agentes patógenos y la tolerancia frente a los nutrientes supone la intervención de linfocitos T reguladores. Estos a dosis bajas de antígenos provocan supresión activa, mientras que a dosis altas originan anergia clonal o apoptosis de linfocitos T específicos.

3. Enfermedades autoinmunes

Uno de los desequilibrios del sistema inmune está representado por las llamadas enfermedades autoinmunes, en las cuales la respuesta inmunitaria va dirigida frente a las propias células del individuo, destruyendo el tejido corporal sano. En muchos casos se desconoce la razón por la que sucede esto, aunque se especula con que la presencia de algunos microorganismos, la ingesta de algunos fármacos, tóxicos y/o determinadas sustancias químicas presentes en los alimentos puedan desencadenarlos, especialmente en el caso de personas nutricionalmente deficientes o que posean más susceptibilidad genética para desarrollar trastornos autoinmunes.

Las enfermedades autoinmunes pueden ser de dos tipos: i) aquellas en las que el daño afecta a varios órganos (sistémicas) y ii) cuando la lesión se encuentra en un solo órgano o tejido (específicas). Sin embargo, dado que en este último caso la lesión a veces se extiende a otros tejidos, de un modo indirecto, la

distinción entre ambos tipos de enfermedades autoinmunes a veces no está muy clara. En la actualidad hay descritas mas de 80 enfermedades autoinmunes. Entre las enfermedades autoinmunes sistémicas destacan la artritis autoinmune, el lupus, la esclerodermia, el síndrome de *Sjögren*, la dermatomiositis y el síndrome de *Guillain-Barre*. Dentro de las específicas, las mas importantes son la diabetes mellitus tipo 1, la tiroiditis de *Hashimoto*, la enfermedad de *Graves*, la enfermedad celíaca, la enfermedad de *Chron*, la colitis ulcerosa, la esclerosis múltiple, la enfermedad de *Addison* y la miastenia gravis.

4. Estado nutricional y sistema inmune

Es un hecho aceptado desde hace ya más de 75 años, que el sistema inmune esta fuertemente influenciado por la ingesta de nutrientes. El desarrollo, mantenimiento y buen funcionamiento del sistema inmunitario depende de una nutrición adecuada y equilibrada. Una nutrición incorrecta afecta a la respuesta inmune innata y adquirida, llegando a alterar la respuesta a la infección, aumentando indirectamente la virulencia de patógenos y favoreciendo el desarrollo de enfermedades autoinmunes.

La interacción estado nutricional/sistema inmune tiene una gran importancia, no solamente en países en vías de desarrollo donde la ingesta de nutrientes es insuficiente, sino también en los países industrializados, especialmente en personas con dietas restrictivas, tras procesos postoperatorios, con enfermedades infecciosas, en fumadores, en individuos expuestos a estrés medioambiental, individuos con abusos crónicos de alcohol, con obesidad mórbida, con trastornos de la conducta alimentaria, etc. También se ha demostrado la importancia de la relación nutrición/sistema inmune en determinadas etapas de la vida como en la infancia, la vejez, las mujeres embarazadas, la fase de lactancia o en niños prematuros (Wintergerst et al., 2007).

La primera evidencia científica de que el sistema inmune esta fuertemente influenciado por la ingesta de nutrientes fue publicada en 1925 por Jackson. Desde entonces y hasta ahora, se han realizado numerosos estudios experimentales y epidemiológicos, los cuales han demostrado que existe una relación sinérgica entre la malnutrición, del tipo que sea, y las enfermedades infecciosas.

Aunque no se conocen con exactitud alguno de los mecanismos por los cuales actúan determinados nutrientes, ni su papel en el desarrollo o gravedad de las enfermedades autoinmunes, actualmente existen evidencias del papel fundamental que juegan los ácidos grasos esenciales, los aminoácidos esenciales, las vitaminas (A, B6, B9, B12, C y E) y minerales (Se, Zn, Cu y Fe) sobre la función inmune. Además, conviene señalar que cantidades excesivas de algunos nutrientes también pueden perjudicar la función inmunitaria.

Existen varias razones por las cuales el sistema inmune depende de la disponibilidad de nutrientes: i) la respuesta inmune va asociada a la síntesis de nuevas moléculas de naturaleza proteica y a la proliferación celular y ii) los nutrientes actúan como cofactores en muchas vías metabólicas fundamentales para el mantenimiento de la función inmune. Además, pueden regular el estrés oxidativo y la integridad de las membranas celulares.

Influencia de la restricción calórica en las enfermedades autoinmunes

Los primeros estudios del efecto de la restricción calórica en las enfermedades autoinmunes se realizaron en conjunto con la restricción proteica. Los trabajos se llevaron a cabo en modelos de ratones

NZB/W, que desarrollaban lupus eritematoso (Fernandes et al., 1976). En estos animales la restricción dietética les confirió una protección frente al daño renal autoinmune (Friend et al., 1978), menor producción de autoanticuerpos anti-DNA, menor presencia de γ -globulinas en los capilares del glomérulo renal (Fernandes et al., 1978), menor actividad de linfocitos T citotóxicos, menor respuesta del timo a la IL 2 (Jung et al., 1982), menor cantidad de inmunocomplejos circulantes (Izui et al., 1981), menor proliferación de linfocitos (Kubo et al., 1984) y, en general, un retraso significativo en el comienzo de la enfermedad autoinmune (Good, 1981).

Sin embargo, existen contradicciones fuertes entre estos trabajos en animales y los resultados encontrados en humanos. En este sentido, por ejemplo, no se ha encontrado mejoría alguna en los parámetros inmunológicos estudiados en pacientes malnutridos con lupus eritematoso sistémico (Lockshin, 1980) (Lom-Orta et al., 1980). Las discrepancias observadas probablemente se deban a la diferencia en el diseño experimental de los estudios en animales y humanos. Además, se han realizados muy pocos estudios de restricción calórica en pacientes autoinmunes y los pocos disponibles son ya muy antiguos, entre los que destacan dos estudios realizados sobre pacientes con artritis autoinmune (Panush et al., 1983) (Skoldstam et al., 1979) que tuvieron una restricción calórica del 60%, junto con una dieta relativamente elevada en ácidos grasos poliinsaturados; en ninguno de los estudios se demostró un efecto de la restricción calórica sobre la patogenia de las enfermedades autoinmunes o la clínica de las mismas.

Papel de los lípidos en las enfermedades autoinmunes

El efecto de las grasas en la aparición y evolución de las enfermedades autoinmunes comenzó a estudiarse en la década de los años 80. En modelos de animales que desarrollaban lupus eritematoso o síndrome de Sjögren se comprobó que las dietas bajas en grasas producían un retraso significativo en el inicio de la enfermedad (Levy et al., 1982) (Morrow et al., 1985). Trabajos posteriores evidenciaron que lo realmente importante, además de la cantidad de grasa presente en la dieta, era el grado de saturación de las grasas. Las investigaciones que analizaban los efectos de las grasas saturadas versus grasas poliinsaturadas sobre la progresión de las enfermedades autoinmunes, comprobaron que las grasas saturadas: i) adelantaban el inicio de la enfermedad; ii) incrementaban el nivel de autoanticuerpos; iii) aumentaban la actividad y la proliferación de los linfocitos CD8⁺; iv) estimulaban la capacidad de fagocitosis de los macrófagos; v) producían un mayor infiltrado linfocitario en los órganos afectados y vi) causaban niveles elevados de prostaglandinas (PG) en los tejidos linfoides (Levy et al., 1982) (Morrow et al., 1985) (Fernández et al., 1983). Estos últimos resultados hicieron que tomara fuerza la hipótesis propuesta por Mertin y Hunt (1976) que sugería que el efecto de las grasas sobre la autoinmunidad estaba mediado por la vía de la síntesis de las PG y los leucotrienos (LT).

El precursor bioquímico más importantes de las PG es el ácido araquidónico (AGPI), un tipo de ácido graso poliinsaturado (Figura 2). A su vez, en mamíferos el precursor necesario para la síntesis de ácido araquidónico es el ácido linoleico. Se ha visto que, en los ratones NZB, dietas pobres en ácido linoleico reducen las manifestaciones clínicas del lupus eritematoso y que dietas ricas en ácido araquidónico no incrementan la gravedad de los síntomas (Hurd et al., 1981). Por otro lado, el ácido eicosapentanoico, otro precursor en menor grado del ácido araquidónico, se puede romper en formas de PG y LT con ac-

tividad inflamatoria (Figura 3). En este sentido, en animales de experimentación y en humanos, dietas ricas en aceite de pescado producen una disminución en la proliferación de los linfocitos CD8⁺, menor activación de los macrófagos peritoneales y menor producción de PG E2, tromboxanos y prostaciclina. Además, también producen mejoría en la clínica de las enfermedades autoinmunes (Prickett et al., 1981) (Kelley et al., 1985) (Leslie et al., 1985) (Kremer et al., 1985) (Panush et al., 1983). El mecanismo propuesto es que el ácido eicosapentaenoico induce la formación de PGs con actividad inmunoinhibitoria y disminuye la síntesis de PG proinflamatorias y LT.

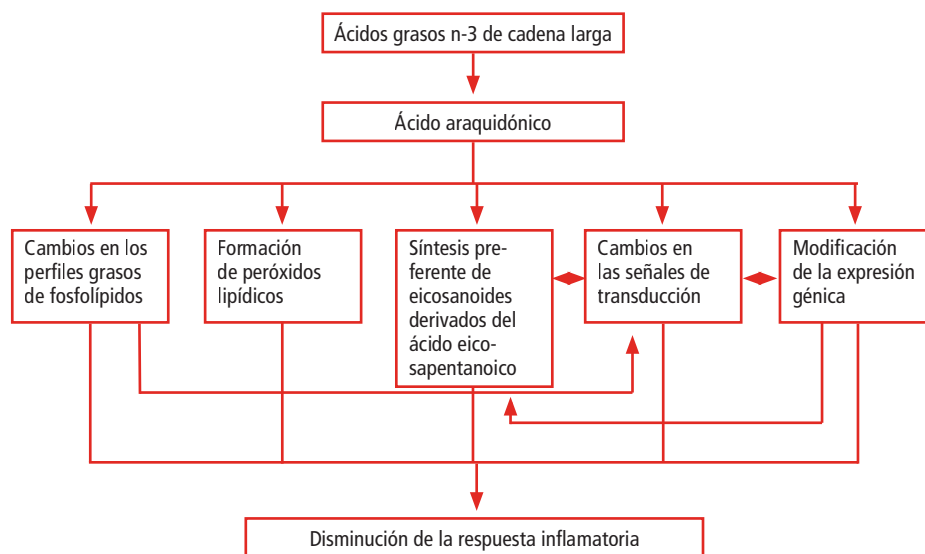


Figura 2. Mecanismo por el cual los ácidos grasos n-3 ejercen un proceso inmunomodulador y una función antiinflamatoria. **Fuente:** (Mataix y de Pablo, 2009).

Estudios realizados en los últimos años han confirmado que los AGPI de las series n-6 y n-3 son los que tienen mayor importancia en la modulación del sistema inmune e influyen en la gravedad de las enfermedades autoinmunes. Los estudios de enfermedades autoinmunes espontáneas mediadas por autoanticuerpos, realizados en modelos animales, señalan que los AGPI de la serie n-3 presentes en aceites de pescado, reducen de forma significativa la proliferación de linfocitos T y B cuando son estimulados por mitógenos, disminuyendo la producción de diferentes tipos de citoquinas principalmente de tipo proinflamatorio. También están implicados en la inhibición de la actividad de las células NK (Figura 2), además de que mejoran la clínica y la supervivencia. Por el contrario, en modelos experimentales de enfermedades autoinmunes inducidas por linfocitos T, los AGPI de la serie n-3 incrementan la gravedad de la enfermedad, mientras que los de la serie n-6 previenen y reducen la clínica de la enfermedad (Harbige, 2003). Los estudios epidemiológicos llevados a cabo, en personas, han mostrado una incidencia baja de las enfermedades autoinmunitarias, en los esquimales de Groenlandia que

consumen alimentos ricos en AGPI (n-3) de origen marino. También, los ensayos clínicos han mostrado una mejoría en el tratamiento y la prevención de diferentes enfermedades autoinmunes (artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa o esclerosis múltiple) (OMS, 1997). En este sentido, trabajos de esclerosis múltiple realizados en modelos animales y estudios epidemiológicos y de intervención nutricional llevados a cabo en pacientes parecen concluir que existe una relación significativa entre el consumo de los AGPI, particularmente los n-6, y la patogenia y el tratamiento de la esclerosis múltiple (OMS, 1997) (Harbige y Sharief, 2007). Según parece, alteraciones metabólicas en la producción de ácidos grasos n-6 de cadena larga, como el ácido dihomo- γ -linolénico (DGLA) y el ácido araquidónico (AA), afectan a la integridad fisiológica de las células del sistema inmune, con la consiguiente reducción en la producción de citoquinas proinflamatorias. En el ensayo realizado por Harbige y Sharief (2007), en el que a individuos con esclerosis múltiple se les suministró diferentes dosis de DGLA, se comprobó que a concentraciones altas, se obtenía un efecto terapéutico, disminuyendo significativamente la tasa de recaída y la progresión de la enfermedad.

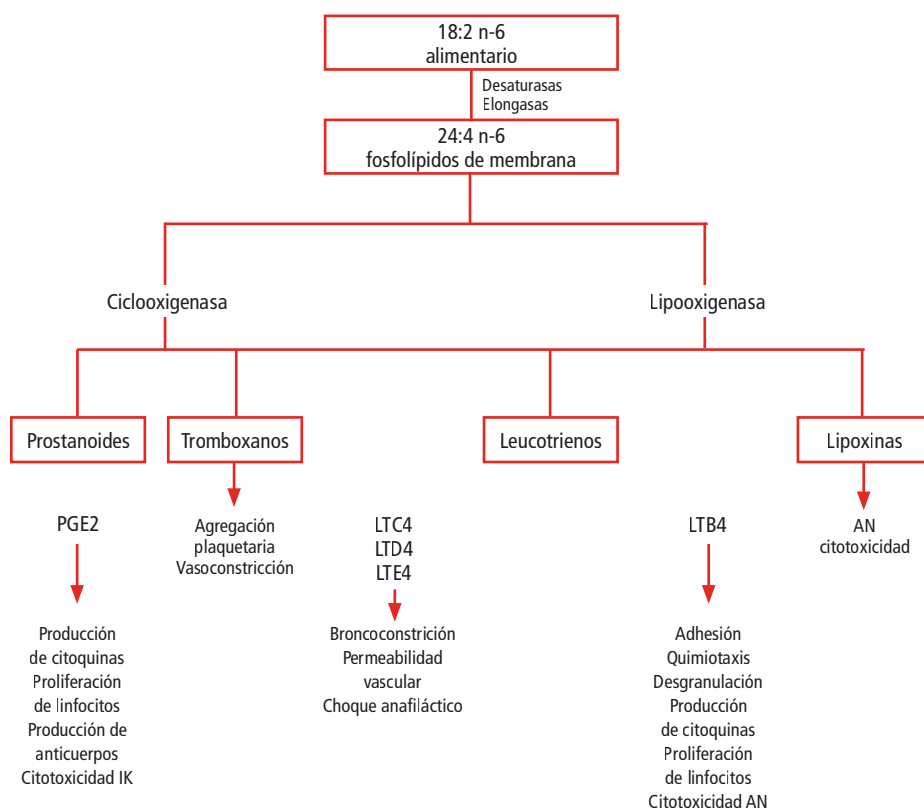


Figura 3. Papel de los ácidos eicosanoicos en la regulación de los procesos inmunológicos e inflamatorios.

Fuente: (OMS, 1997).

No obstante, aunque los AGPI parecen tener una utilidad clínica en las enfermedades autoinmunes, el mecanismo mediante el que ejercen sus efectos clínicos no está aclarado.

También existen evidencias sobre el papel beneficioso de los ácidos grasos monoinsaturados en las enfermedades autoinmunes. Recientemente, se ha descrito que el aceite de oliva tiene un efecto inmunosupresor y antiinflamatorio debido probablemente, aunque no de forma exclusiva, a su principal componente, el ácido oleico. Sin embargo, los componentes polifenólicos que contiene esta grasa, a los cuales se les atribuye una acción antioxidante, parece que intervienen también en la regulación de la respuesta inmune. Estudios epidemiológicos han demostrado que la administración de aceite de oliva en la dieta reduce el riesgo de padecer artritis reumatoide (Mataix y de Pablo, 2009).

Finalmente, otro aspecto importante a considerar es que las células del sistema inmunitario dependen en gran medida de la función de su membrana celular para realizar operaciones tales como secreción de citoquinas y anticuerpos, reconocimiento de antígenos, transformación de linfocitos y lisis por contacto. La importancia de los lípidos en el mantenimiento de la integridad de la membrana parece indicar que estos compuestos pueden ser nutrientes críticos en la regulación de la función inmunitaria y, de hecho, se ha demostrado que las grasas influyen en la gravedad de las enfermedades autoinmunitarias (OMS, 1997).

Importancia de los aminoácidos y proteínas en las enfermedades autoinmunes

Las investigaciones pioneras de Fernández et al. (1976) ya demostraron que una leve restricción proteica (6%) producía una menor tasa de autoanticuerpos, una menor citotoxicidad mediada por células, una mejoría clínica y un retraso en la aparición del lupus eritematoso en el ratón NZB. También, por la década de los años 70 comenzaron a aparecer estudios que relacionaban la restricción selectiva de ciertos aminoácidos, como fenilalanina y tirosina, con la mejoría clínica de los ratones NZB (Dubois, 1974).

Por esos años se comprobó que el empleo de preparaciones con aminoácidos sintéticos en vez de los aminoácidos naturales, en las dietas de los ratones NZB inducía una disminución de los autoanticuerpos, de los inmunocomplejos y una mejoría clínica de los animales (Batsford et al., 1984). Además, en un modelo de ratas que desarrollaban una diabetes tipo 1 de un modo espontáneo (ratas BB), el empleo de los aminoácidos sintéticos reducía la prevalencia de la enfermedad en un 35% (Elliot y Martin, 1984). La propuesta que se hizo fue que la presencia de aminoácidos sintéticos en las dietas hacía que no estuvieran presentes algunas proteínas que ya se habían descrito que tenían un carácter antigénico.

Estos estudios fueron los primeros que establecieron una relación entre la presencia de antígenos proteicos en la dieta y la aparición de enfermedades autoinmunes. Posteriormente, aparecieron estudios que señalaban que los antígenos proteicos podían desencadenar reacciones cruzadas de autoinmunidad, de un modo similar a como hacían agentes infecciosos o determinados fármacos (Cooke et al., 1984). Así pues, se establecieron las primeras relaciones entre gliadinas y celiaquía (Cole y Kagnoff, 1985), reticulina y fibronectina (presentes en el colágeno) y la artritis reumatoide o el síndrome de Sjögren (Lane et al., 1982) (Teppo y Maury, 1984), el aminoácido L-canavanina (presente en ciertos cereales y semillas) y el lupus eritematoso (Roberts y Hayashi, 1983) y las proteínas lácteas y diabetes tipo 1 o artritis reumatoide (Scott, 1991) (Welsh et al., 1985).

En el caso de la diabetes estudios epidemiológicos de caso-control y de cohortes han demostrado que proteínas lácteas como la caseína, la α -lactoalbúmina y la β -lactoglobulina están directamente relacionadas con la aparición de la diabetes tipo 1 e incluso con la edad de aparición de la enfermedad (Peng y Hagopian, 2006) (Luopajarvi et al., 2008).

Otro aspecto importante es que el procesamiento de los alimentos genera compuestos como los de *Maillard* que pudieran estar implicados en la aparición de enfermedades autoinmunes. En este sentido, se han comprobado que los compuestos de *Maillard* tienen estructuras muy similares a algunos alérgenos.

Las vitaminas y las enfermedades autoinmunes

La importancia de las vitaminas en la función inmune está bien documentada desde hace unos 30 años, sin embargo existen muy pocos estudios concluyentes que investiguen el papel de las vitaminas en las enfermedades autoinmunes.

1. Vitaminas con actividad antioxidante

En modelos de ratones NZB se ha visto que el déficit de vitamina A induce una aparición más temprana de autoanticuerpos, así como, una elevación de los mismos (Gerschwin et al., 1985). En estos mismos animales la vitamina E induce retraso de la aparición del lupus eritematoso (Dormandy, 1983). La vitamina C en modelos de animales con encefalomiелitis reduce la linfoproliferación y mejora el infiltrado inflamatorio (Anderson et al., 1980).

En el caso de humanos, los resultados son contradictorios. Trabajos antiguos señalan que la administración de suplementos de vitamina E inducía remisiones en pacientes que sufrían distintas enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso, esclerodermia y polimiositis (Ayres y Mihan, 1978) (Mihan y Ayres, 1979). Sin embargo, estudios de metaanálisis recientes indican que la suplementación aislada o conjunta con vitamina A, E o C no induce ninguna mejoría, realmente significativa, en pacientes con artritis reumatoide o enfermedades inflamatorias intestinales (Calder et al., 2009) (Rosenbaum et al., 2010).

Así pues, de un modo general, aunque los antioxidantes presentes en la dieta suponen una defensa importante frente a las lesiones inflamatorias que aparecen en muchas enfermedades autoinmunes, especialmente las enfermedades inflamatorias intestinales y la artritis reumatoide, los ensayos clínicos realizados en pacientes muestran unos beneficios clínicos muy pequeños o nulos.

2. Vitaminas hidrosolubles

La vitamina B12 es esencial para la proliferación de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, así como para la actividad de las células NK. Sin embargo, estudios realizados hace ya muchos años no han demostrado que su administración mejore a pacientes con lupus (Goldblatt, 1951) y artritis reumatoide (Rosenberg, 1954). La biotina es necesaria para la producción de anticuerpos y para la proliferación de los linfocitos T. En animales se ha visto que tiene un efecto similar a la vitamina C en modelos de encefalomiелitis (Linthicum et al., 1979).

3. Vitamina D

La vitamina D y sobre todo su metabolito el 1,25-dihidroxicolecalciferol posee una acción inmunoregulatora. La mayoría de las células del sistema inmune, a excepción de las células B, expresan receptores para la vitamina D y sus metabolitos, indicando así, el papel preponderante de esta vitamina en el funcionamiento del sistema inmune. De un modo general, la vitamina D incrementa la inmunidad innata y mejora la regulación de la inmunidad adquirida, lo cual produce un incremento de la tolerancia inmunológica a los propios tejidos (Szodoray et al., 2008). Además, la vitamina D y su metabolito el dihidroxicolecalciferol tienen la capacidad de inhibir la maduración de las células dendríticas y regular la producción de citoquinas. Esta vitamina se ha visto implicada como agente inmunomodulador en enfermedades autoinmunes, tales como la encefalitis autoinmune, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, enfermedades inflamatorias intestinales, diabetes, prostatitis autoinmune y esclerosis múltiple (Fernández de Abreu et al., 2009). En este sentido, estudios epidemiológicos realizados en niños de corta edad sugieren que el desarrollo de la diabetes tipo 1 esta asociada con una baja ingesta de vitamina D en los primeros años de vida y postula que la vitamina D actúa como un agente inmunosupresor, previniendo el exceso de citoquinas inflamatorias (Hyppönen et al., 2001). Además, estudios de intervención nutricional con suplementación con vitamina D, en personas con déficit han concluido que en estas situaciones la suplementación esta asociada a una disminución del riesgo de desarrollar diabetes tipo 1 (EURODIAB, 1999) (Maggini et al., 2007). En lo que respecta a la esclerosis múltiple, una adecuada ingesta de vitamina D reduce la presencia de citoquinas inflamatorias, mediante la regulación de la expresión de genes. Por lo tanto, se sugiere que su deficiencia podría contribuir a la inflamación y la aparición de la enfermedad. Además, parece ser que la suplementación con vitamina D, siempre y cuando haya un déficit de esta vitamina, podría ser beneficiosa para los pacientes con esclerosis múltiple (Mark y Carson, 2006).

Los microminerales y la autoinmunidad

El desarrollo de las técnicas analíticas de la genética molecular ha facilitado la identificación de las funciones moleculares específicas de algunos de los elementos traza en la maduración, activación y función de los mecanismos de defensa de los distintos componentes del sistema inmune (Muñoz et al., 2007). Los elementos mas directamente implicados en el mantenimiento de la función del sistema inmune son el cobre, hierro, selenio y el zinc. Sin embargo, entre todos ellos solo se ha demostrado una cierta relación del selenio con las enfermedades autoinmunes.

El selenio es esencial para el buen funcionamiento de la respuesta innata y adquirida del sistema inmune. Se encuentra en grandes cantidades en tejidos tan importantes para la función inmune como el hígado, bazo y nódulos linfáticos. Juega un papel clave en la regulación redox y en la función antioxidante a través de la glutatión peroxidasa. La selenoenzima tioredoxina reductasa afecta la regulación redox de varias enzimas claves, factores de transcripción, y receptores, incluyendo la ribonucleósido reductasa, receptores glucocorticoides, proteínas antiinflamatorias y el factor-kappa B nuclear que activa la expresión de los genes que codifican las proteínas involucradas en la respuesta inmune. La suplementación con selenio ejerce un efecto inmunomodulador que se traduce en un incremento en el numero de linfocitos T citotóxicos y en un aumento de la actividad de las células NK. Su deficiencia

baja los niveles de inmunoglobulina y afecta a todo lo referente a la inmunidad mediada por células (Arthur et al., 2003) (Wistergerst et al., 2007) (Magglini et al., 2007). En humanos, el déficit de selenio se ha relacionado con la aparición de la tiroiditis autoinmune (Stazi y Trinti, 2008) y con la evolución de la artritis reumatoide (Tarp, 1995). Sin embargo, si los niveles de selenio, son adecuados, la suplementación no ha producido una mejoría en la evolución de la artritis reumatoide.

Beneficios del uso de probióticos en las enfermedades autoinmunes

Las bacterias de la microbiota intestinal contribuyen a la protección inmunológica creando una barrera que impide la colonización por bacterias patógenas. Se sabe que la administración de probióticos ayuda a mantener la microbiota intestinal. Además, existen evidencias que demuestran que los probióticos actúan directamente sobre el sistema inmune intestinal mejorándolo (Calder y Kew, 2002).

Estudios recientes indican que el origen de las enfermedades inflamatorias del intestino, como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, radicarían en una reacción exagerada del sistema inmunitario ante ciertas bacterias presentes en el tracto gastrointestinal, provocando la inflamación del intestino. En este sentido, se ha puesto de manifiesto la capacidad de determinados probióticos como *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus* GG, VSL#3, *Escherichia coli* Nissle 1917 y *Bifidobacterium longum* (Calder et al., 2009) de modular la respuesta inmune de la mucosa del tubo digestivo, y por tanto, de disminuir la inflamación, tanto en modelos experimentales de colitis crónica, como en enfermedades inflamatorias intestinales en humanos (Di Giacinto et al., 2005) (Pronio et al., 2008) (Thalcave, 2009) (Haller et al., 2010). Tomando en su conjunto todos los estudios realizados en humanos, los resultados demuestran que las intervenciones terapéuticas con probióticos, en enfermedades inflamatorias intestinales son esperanzadores. De momento, los pocos ensayos clínicos aleatorizados, doble ciego y placebo controlados, publicados hasta la fecha, demuestran que la ingesta de altas dosis de probióticos de varias cepas combinadas, mejoran la clínica inflamatoria, siempre y cuando se administren simultáneamente con la medicación adecuada para cada enfermedad (Calder et al., 2009).

También se ha investigado el papel de los probióticos en otras enfermedades autoinmunes como la diabetes tipo 1. Matsuzaki et al. (2007) utilizaron ratones diabéticos no obesos (ratones NOD) que desarrollan espontáneamente un tipo de diabetes similar a la diabetes mellitus tipo 1. Los citados autores comprobaron que cuando los ratones de cuatro semanas eran alimentados con una dieta que contenía el 0,05% del peso corporal de bacterias del ácido láctico, en particular *Lactobacillus casei*, cepa Shirota, la incidencia de diabetes era significativamente más baja que en el grupo control, revelando una fuerte inhibición en la destrucción inmunológica de las células β secretoras de insulina. También observaron una disminución significativa de las células T CD8⁺ entre los esplenocitos, lo que hacía pensar en la inhibición de las células T autorreactivas. Los autores concluyeron que *L. casei* podría alterar el balance de la producción de citoquinas Th1/Th2 y que esta fuera la causa probable de la menor incidencia de diabetes.

Finalmente, con respecto a la artritis reumatoide se han visto efectos beneficiosos de los probióticos en modelos experimentales animales. En un modelo de ratas con artritis reumatoidea, la administración de *L. casei* mejoró la sintomatología clínica, la infiltración linfocitaria y la destrucción de cartílago. Según parece el efecto se debía a un aumento de la tolerancia oral específica de antígeno y a una

supresión de la respuesta inmune de tipo Th-1 (So et al., 2008). Además, en el mismo modelo experimental de ratas, la administración de *Enterococcus faecium* junto con metotrexato, también indujo el mismo tipo de mejoría que en el caso de *L. casei* (Rovensky et al., 2002). Sin embargo, el único ensayo clínico realizado, a pequeña escala, en pacientes con artritis reumatoide administrando *L. rhamnosus* GG no ha mostrado ningún efecto clínico beneficioso (Hatakka et al., 2003).

Conclusiones del Comité Científico

1. A lo largo de las últimas cinco décadas se han ido acumulando numerosas evidencias científicas que señalan que el sistema inmune está fuertemente influenciado por la ingesta de nutrientes. De hecho, el desarrollo, mantenimiento y buen funcionamiento del sistema inmunitario depende de una nutrición adecuada y equilibrada.
2. En los modelos experimentales animales de enfermedades autoinmunes, determinados nutrientes (AGPI, vitaminas A, E, C, D y B12) y probióticos producen una mejoría clínica y un retraso en la aparición de la enfermedad significativos.
3. En los pacientes con enfermedades autoinmunes, algunos estudios de intervención nutricional realizados sugieren que varios componentes dietéticos, especialmente los AGPI, la vitamina D y el selenio, así como, la administración de varios probióticos combinados pueden tener un impacto sobre la mejoría clínica de los pacientes. Sin embargo, el número de estudios llevados a cabo con los adecuados controles es todavía muy escaso. Por otro lado, en casi todos los casos se desconocen los mecanismos por los que se producen las mencionadas mejorías clínicas.
4. Actualmente es necesario disponer de más estudios y de mejor calidad para conocer con más claridad el impacto de la nutrición y de los nutrientes en la patogenia, la clínica y la evolución de las enfermedades autoinmunes.

Referencias

- Anderson, R., Oosthuizen, R., Maritz, R., Theron, A. y Van Rensburg, A.J. (1980). The effect of increasing weekly doses of ascorbate on certain cellular and immune functions in normal volunteers. *American Journal of Clinical Nutrition*, 33, pp: 71-76.
- Arthur, J.R., McKenzie, R. y Beckett, G.J. (2003). Selenium in the immune system. *Journal of Nutrition*, 133, pp: 1457-1459.
- Ayres, S. y Mihan, R. (1978). Is vitamin E involved in the autoimmune mechanism? *Cutis*, 21, pp: 321-325.
- Batsford, S., Schwerdtfeger, M., Rohrbach, R., Cambiaso, C. y Kluthe, R. (1984). Synthetic aminoacid diet prolongs survival in autoimmune murine disease. *Clinical Nephrology*, 21, pp: 60-65.
- Calder, P.C. y Kew, S. (2002). The immune system: a target for functional foods? *British Journal of Nutrition*, 88, pp: S165-S176.
- Calder, P.C., Albers, R., Antoine, J.M., Blum, S., Bourdet-Sicard, R., Ferns, G.A., Folkerts, G., Friedmann, P.S., Frost, G.S., Guarner, F., Løvik, M., Macfarlane, S., Meyer, P.D., M'Rabet, L., Serafini, M., Van Eden, W., Van Loo, J., Vas Dias, W., Vidry, S., Winkhofer-Roob, B.M. y Zhao, J. (2009). Inflammatory disease processes and interactions with nutrition. *British Journal of Nutrition*, 101, pp: S1-S45.
- Cole, S.G. y Kagnoff, M.F. (1985). Celiac disease. *Annual Review of Nutrition*, 5, pp: 241-266.
- Cooke, A., Lydyard, P.M. y Roitt, I.M. (1984). Autoimmunity and idiotypes. *Lancet*, 79, pp: 723-725.
- Di Giacinto, C., Marinaro, M., Sanchez, M., Strober, W. y Boirivant, M. (2005). Probiotics ameliorate recurrent th1-

- mediated murine colitis by inducing IL-10 and IL-10-dependent TGF-beta-bearing regulatory cells. *Journal of Immunology*, 174, pp: 3237-3246.
- Dormandy, T.L. (1983). An approach to free radicals. *Lancet*, 29, pp: 1010-1014.
- Dubois, E.L. (1974). Lupus erythematosus: a review of the current status of discoid and systemic lupus erythematosus and their variants. *University of South California Press*, Los Angeles.
- Elliot, R.B. y Martin, J.M. (1984). Dietary proteins: a trigger of insulin-dependent diabetes in BB rats? *Diabetologia*, 26, pp: 297-299.
- EURODIAB (1999). The Epidemiology and Prevention of Diabetes. Vitamin D supplement in early childhood and risk for Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. The Substudy 2 Study Group. *Diabetologia*, 42, pp: 51-54.
- Fernandes, G., Yunis, E.J. y Good, R.A. (1976). Influence of protein restriction on immune functions in NZB mice. *Journal of Immunology*, 116, pp: 782-790.
- Fernandes, G., Friend, P., Yunis, E.J. y Good, R.A. (1978). Influence of dietary restriction on immunological function and renal disease in NZB x NZWF1 mice. *Proceedings of the National Academic of Science USA*, 75, pp: 1500-1504.
- Fernandes, G., Alonso, R.A., Tanaka, T., Thaler, H.T., Yunis, E.J. y Good, R.A. (1983). Influence of diet on vascular lesions in autoimmune-prone mice. *Proceedings of the National Academic of Science USA*, 80, pp: 874-877.
- Fernandez de Abreu, D.A., Eyles, D. y Feron, F. (2009). Vitamin D, a neuro-immunomodulator: implications for neurodegenerative and autoimmune diseases. *Psychoneuroendocrinology*, 34, pp: 265-277.
- Friend, P.S., Fernandes, G., Good, R.A., Michael, A.F. y Yunis, E.J. (1978). Dietary restriction early and late: effects on the nephropathy of the NZB x NZW mouse. *Laboratory Investigation*, 38, pp: 629-632.
- Gershwin, M.E., Beach, R.S. y Hurley, L.S. (1985). Nutrition and immunity. *Academic Press*, London.
- Goldblatt, S. (1951). Treatment of lupus erythematosus with vitamin B12: preliminary report of 4 cases. *Journal of Investigation Dermatology*, 17, pp: 303-304.
- Good, R.A. (1981). Nutrition and immunity. *Journal of Clinical Immunology*, 1, pp: 3-11.
- Guarner, F. (2007). Prebiotics in inflammatory bowel diseases. *British Journal Nutrition*, 98, pp: 85-89.
- Haller, D., Antoine, J.M., Bengmark, S., Enck, P., Rijkers, G.T. y Lenoir-Wijnkoop, I. (2010). Guidance for Substantiating the Evidence for Beneficial Effects of Probiotics: Probiotics in Chronic Inflammatory Bowel Disease and the Functional Disorder Irritable Bowel Syndrome. *Journal of Nutrition*, 140, pp: 690-697.
- Harbige, L.S. (2003). Fatty acids, the immune response, and autoimmunity: a question of n-6 essentiality and the balance between n-6 and n-3. *Lipids*, 38, pp: 323-341.
- Harbige, L.S. y Sharief, M.K. (2007). Polyunsaturated fatty acids in the pathogenesis and treatment of multiple sclerosis. *British Journal of Nutrition*, 98, pp: 46-53.
- Hatakka, K., Martio, J., Korpela, M., Herranen, M., Poussa, T., Laasanen, T., Saxelin, M., Vapaatalo, H., Moilanen, E. y Korpela, R. (2003). Effects of probiotic therapy on the activity and activation of mild rheumatoid arthritis-a pilot study. *Scandinavian Journal Rheumatology*, 32, pp: 211-215.
- Hurd, E.R., Johnston, M.J., Okita, J.R., MacDonald, P.C., Ziff, M. y Guilleam, J.N. (1981). Prevention of glomerulonephritis and prolonged survival in NZB/NZWF1 hybrid mice fed with essential fatty acid-deficient diet. *Journal of Clinical Investigation*, 67, pp: 476-485.
- Hyppönen, E., Läärä, E., Reunanen, A., Järvelin, M.R. y Virtanen, S.M. (2001). Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet*, 358, pp: 1500-1503.
- Izui, S., Fernandes, G., Hara, I., McConahey, P.J., Jensen, F.C., Dixon, F.J. y Good, R.A. (1981). Low caloric diet selectively reduces expression of retroviral envelop glycoprotein gp70 in sera of NZB x NZWF1 mice. *Journal of Experimental Medicine*, 154, pp: 1116-1124.
- Jackson, C.M. (1925). The effect of inanition and malnutrition upon growth and structure. *Blakiston's Son y Co.*, Philadelphia.
- Jung, L.K.L., Palladino, M.A., Calvano, S., Mark, D.A., Good, R.A. y Fernandes, G. (1982). Effect of caloric restriction

- on the production and responsiveness to interleukin 2 in NZB x NZWF1 mice. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 25, pp: 295-303.
- Kelley, V.E., Ferretti, A., Izui, S. y Strom, T.B. (1985). A fish oil diet rich in eicosapentanoic acid reduces cyclooxygenase metabolitos and suppresses lupus in MRL/1pr mice. *Journal of Immunology*, 134, pp: 1914-1919.
- Kremer, J., Bigauoette, J., Michalek, A.V., Timchalk, M.A., Lininger, L., Rynes, R.J., Huyck, C., Zieminski, J. y Bartholomew, L.E. (1985). Effects of manipulation of dietary fatty acids on clinical manifestations of rheumatoid arthritis. *Lancet*, 26, pp: 184-187.
- Kubo, C., Day, N.K. y Good, R.A. (1984). Influence of early or late dietary restriction on life span and immunological parameters in MRL/MP-1pr/1pr mice. *Proceedings of the National Academic of Science USA*, 81, pp: 5831-5835.
- Lane, A.T., Huff, J.C. y Weston, W.L. (1982). Detection of gluten in human sera by an enzyme immunoassay: comparison of dermatitis herpetiformis and celiac disease in patients with normal controls. *Journal of Investigation Dermatology*, 79, pp: 185-189.
- Leslie, C.A., Gonnerman, W.A., Ullman, M.D., Hayes, K.C., Franzbalu, C. y Cathcart, E.S. (1985). Dietary fish oil modulates macrophage fatty acids and decrease arthritis susceptibility in mice. *Journal of Experimental Medicine*, 162, pp: 1336-1349.
- Levy, J.A., Ibrahim, A.B., Shirai, T., Ohta, K., Nagasawa, R., Yoshida, H., Estes, J. y Gardner, M. (1982). Dietary fat affects immune response, production of antiviral factors and immune complex disease in NZB/NZW mice. *Proceedings of the National Academic of Science USA*, 79, pp: 1974-1978.
- Linthicum, P.S., Mackay, I.R. y Carnegie, P.R. (1979). Experimental murine autoimmune encephalomyelitis. En libro: *Humoral immunity in neurobiological diseases*, pp: 193-225.
- Lockshin, M.D. (1980). Malnutrition does not ameliorate SLE. *Arthritis Rheumatoid*, 23, pp: 132-133.
- Lom-Orta, H., Diaz-Jouanen, E. y Alarcon-Segovia, D. (1980). *Protein-caloric malnutrition and systemic lupus erythematosus*. *Journal of Rheumatology*, 7, pp: 178-182.
- Luopajarvi, K., Savilahti, E., Virtanen, S.M., Ilonen, J., Knip, M., Akerblom, H.K. y Vaarala, O. (2008). Enhanced levels of cow's milk antibodies in infancy in children who develop type 1 diabetes later in childhood. *Pediatrics Diabetes*, 9, pp: 434-441.
- Maggini, S., Wintergerst, E.S., Beveridge, S. y Hornig, D.H. (2007). Selected vitamins and trace elements support immune function by strengthening epithelial barriers and cellular and humoral immune responses. *British Journal of Nutrition*, 98, pp: 29-35.
- Marcos, A., Nova, E., Perdigon, G. y Moreno, A. (2006). Nutrición e inmunidad. En libro: *Nutrición y salud pública*. Ed. Elsevier, pp: 482-490.
- Mark, B.L. y Carson, J.A. (2006). Vitamin D and autoimmune disease: implications for practice from the multiple sclerosis literatura. *Journal of the American Dietetic Association*, 106, pp: 418-424.
- Mataix, J. y de Pablo, M. (2009). Sistema de defensa y nutrición. En libro: *Nutrición y alimentación*. Ed. Ergon, pp: 1715-1765.
- Matsuzaki, T., Takagi, A., Ikemura, H., Matsuguchi, T. y Yokokura, T. (2007). Intestinal Microflora: probiotics and autoimmunity. *Journal of Nutrition*, 137, pp: 7985-8025.
- Mertin, J. y Hunt, R. (1976). Influence of polyunsaturated fatty acids on survival of skin allografts and tumor incidente in mice. *Proceedings of the National Academic of Science USA*, 73, pp: 928-931.
- Mihan, R. y Ayres, S. (1979). Lupus erythematosus and vitamin E: an effective and non-toxic therapy. *Cutis*, 23, pp: 49-52.
- Morrow, W.J.W., Ohashi, Y., May, J., Pribnow, J., Hirose, S., Shiraz, T. y Levy, J.A. (1985). Dietary fat and immune function: Antibody responses, lymphocytes and accessory cell function in (NZB x NZWF1 mice. *Journal of Immunology*, 135, pp: 3857-3863.
- Muñoz, C., Rios, E., Olivos, J., Brunser, O. y Olivares, M. (2007). Iron, copper and inmunocompetence. *British Journal of Nutrition*, 98, pp: 24-28.

- Naidu, A.S., Bidlack, B.R. y Clemens, R.A. (1999). Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38, pp: 13-26.
- OMS (1997). Organización Mundial de la Salud. Grasas y aceites en la nutrición humana. Consulta FAO/OMS de expertos. Estudio FAO Alimentación y Nutrición, n° 57. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/V4700S/v4700S0g.htm> [acceso 15-04-10].
- Panush, R.S., Carter, R.I., Katz, P., Kowsari, B., Longley, S. y Finnie, S. (1983). Diet therapy for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatoid*, 26, pp: 462-471.
- Peng, H. y Hagopian, W. (2006). Environmental factors in the development of type 1 diabetes. *Review Endocrinology Metabolic Disorders*, 7, pp: 149-162.
- Prickett, Jd., Robinson, D.R. y Steinberg, A.D. (1981). Dietary enrichment with the polyunsaturated fatty acid eicosapentaenoic acid prevents proteinuria and prolongs survival. *Journal of Clinical Investigation*, 68, pp: 556-559.
- Pronio, A., Montesani, C., Butteroni, C., Vecchione, S., Mumolo, G., Vestri, A., Vitolo, D. y Boirivant, M. (2008). Probiotic administration in patients with ileal pouch-anal anastomosis for ulcerative colitis is associated with expansion of mucosal regulatory T cell. *Inflammatory Bowel Diseases*, 14, pp: 662-668.
- Roberts, J.L. y Hayashi J.A. (1983). Exacerbation of SLE associated with alfalfa ingestion. *Lancet*, 308, pp: 1361.
- Rosenbaum, C.C., O' Mathuna, D.P., Chavez, M. y Shields, K. (2010). Antioxidants and anti-inflammatory dietary supplements for osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Alternative Therapy Health Medicine*, 16, pp: 32-40.
- Rosenberg, E.F. (1954). Diet and vitamin in rheumatoid arthritis. En libro: Comroe's arthritis and allied conditions. Ed. Lea y Febiger, pp: 89-95.
- Rovensky, J. Svik, K., Stanciková, M., Istok, R., Ebringer, L. y Frencik, M. (2002). Treatment of experimental adjuvant arthritis with the combination of methotrexate and lyophilized *Enterococcus faecium* enriched with organic selenium. *Folia Microbiologica*, 47, pp: 573-578.
- Scott, F.W. (1991). Cow milk and insulin-dependent diabetes mellitus: is there a relationship? *American Journal of Clinical Nutrition*, 51, pp: 489-491.
- Skoldstam, L., Larsson, L. y Lindstrom, F.D. (1979). Effects of fasting and lactovegetarian diet on rheumatoid arthritis. *Scandinavian Journal of Rheumatoid*, 8, pp: 249-255.
- So, J.S., Lee, C.G., Kwon, H.K., Yi, H.J., Chae, C.S., Park, J.A., Hwang, K.C. y Im, S.H. (2008). *Lactobacillus casei* potentiates induction of oral tolerance in experimental arthritis. *Molecular Immunology*, 46, pp: 172-180.
- Stazi, A.V. y Trinti, B. (2008). Selenium deficiency in celiac disease: a risk of autoimmune thyroid diseases. *Minerva Medicine*, 99, pp: 643-653.
- Szodorat, P., Nakken, B., Gaal, J., Jonsson, R., Szegedi, A., Zold, E., Szegedi, G., Brun, J.G., Gesztelyi, R., Zeher, M. y Bodolay, E. (2008). The complex role of vitamin D on autoimmune diseases. *Scandinavian Journal of Immunology*, 68, pp: 261-269.
- Tarp, U. (1995). Selenium in rheumatoid arthritis: A review. *Analyst*, 120, pp: 877-881.
- Teppo, A.M. y Maury, C.P.J. (1984). Antibodies to gliadin, gluten and reticulin glycoprotein in rheumatoid disease: elevated levels in Sjögren's syndrome. *Clinical Experimental Immunology*, 57, pp: 73-78.
- Thalcave (2009). Bacterias prebióticas y alimentos probióticos. Disponible en: http://www.accumalaga.es/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=241 [acceso 12-04-10].
- Welsh, C.J.R., Hanglow, Ac., Conn, P., Barrer, T.H.W. y Coombs, R.R.A. (1985). Early rheumatoid-like lesions in rabbits drinking cows' milk. *International Archives of Allergy Applied Immunology*, 78, pp: 145-151.
- Wintergerst, E.S., Maggini, S. y Hornig, D.H. (2007). Contribution of Selected Vitamins and Trace Elements to Immune Function. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 51, pp: 301-323.
- Zaldívar, M. (2002). El sistema inmunológico de las mucosas. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 18 (5). Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/mgi/vol18_5_02/mgi1252002.htm#cargo [acceso 15-04-10].

Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los niveles de mercurio establecidos para los productos de la pesca

Miembros del Comité Científico

Andreu Palou Oliver, Juan José Badiola Díez, Arturo Anadón Navarro, Albert Bosch Navarro, Juan Francisco Cacho Palomar, Ana María Cameán Fernández, Alberto Cepeda Sáez, Lucas Domínguez Rodríguez, Rosaura Farré Rovira, Manuela Juárez Iglesias, Francisco Martín Bermudo, Manuel Martín Esteban, Albert Más Barón, Teresa Ortega Hernández-Agero, Andrés Otero Carballera, Perfecto Paseiro Losada, Daniel Ramón Vidal, Elías Rodríguez Ferri, M^a Carmen Vidal Carou, Gonzalo Zurera Cosano

Secretario

Jesús Campos Amado

Número de referencia: AESAN-2010-008

Documento aprobado por el Comité Científico en su sesión plenaria de 28 de septiembre de 2010

Grupo de Trabajo

Rosaura Farré Rovira (Coordinadora)

Ana María Cameán Fernández

M^a Carmen Vidal Carou

Ana López-Santacruz Serraller (AESAN)

Victorio J. Teruel Muñoz (AESAN)

Elia Teso Canales (AESAN)

29

revista del comité científico nº 13

Resumen

En el pescado y los mariscos el mercurio (Hg) se encuentra mayoritariamente en forma de metil mercurio (MeHg), la forma más tóxica. Los mayores contenidos se encuentran en los peces predadores. La FAO/OMS (2003) ha establecido la ingesta semanal tolerable provisional (PTWI) para el MeHg en 1,6 µg/kg peso corporal.

Las mujeres en edad fértil, embarazadas o en periodo de lactancia y los niños son los grupos más vulnerables. Ante la imposibilidad de minimizar el riesgo únicamente mediante el establecimiento de contenidos máximos más estrictos de Hg en pescados, la Comisión Europea (2008) ha instado a los Estados miembros a formular recomendaciones para proteger la salud de los consumidores. Así, se han estimado los tamaños de ración de pescado y las frecuencias de consumo de estas raciones que proporcionan aportes inferiores a la PTWI y que, por tanto, pueden considerarse seguras.

Los datos disponibles de contenidos de Hg y MeHg en el pescado consumido en España, las ingestas estimadas y las evaluaciones de exposición al Hg en la población española, en especial entre los consumidores pertenecientes a los grupos de riesgo, no recomiendan aumentar los límites máximos de Hg establecidos por la Unión Europea (UE, 2006) para los pescados.

Palabras clave

Mercurio, metil mercurio, pescado, grupos de riesgo.

Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) in regard to the levels of mercury established for fish products.

Abstract

In fish and shellfish, mercury (Hg) is mostly found in the form of methyl mercury (MeHg), its most toxic form. The highest contents are present in predators. The FAO/WHO (2003) has provisionally established a tolerable weekly intake (PTWI) for MeHg of 1.6 µg/kg of bodyweight.

Women of child-bearing age, during pregnancy or breastfeeding, and children are the most vulnerable groups. In view of the impossibility of establishing stricter Hg contents in fish, the European Commission (2008) has urged Member States to draft recommendations in order to protect these groups. Thus, attempts have been made to estimate the portion sizes and consumption frequencies that would provide intakes in consumed fish in Spain lower than the PTWI and therefore can be considered as safe.

The available data on Hg and MeHg contents, the estimated intakes and the assessments of exposure to Hg, particularly among consumers belonging to the risk groups, do not recommend any increase in the maximum Hg limits established by the European Union (EU, 2006) for fish.

Key words

Mercury, methyl mercury, fish, risk groups.

Introducción

La Dirección Ejecutiva de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN), en base a una cuestión planteada por la Xunta de Galicia, ha solicitado al Comité Científico de la AESAN una evaluación de riesgos que permita estudiar posibles estrategias de gestión integral en relación con la comercialización de partidas de determinados productos de la pesca (especialmente el pez espada) con contenidos de mercurio superiores a los establecidos en la legislación vigente.

La toxicidad del mercurio (Hg) depende de su forma química, tipo y dosis de exposición y edad a la que ésta se produce. De todas las especies químicas de Hg presentes en los alimentos, el compuesto orgánico metil mercurio (MeHg) es el que muestra la mayor toxicidad y se encuentra mayoritariamente en pescado y mariscos, donde puede representar más del 90% del Hg total (Bloom, 1992).

El MeHg afecta a los riñones y al Sistema Nervioso Central (SNC), en especial durante el desarrollo, al atravesar tanto la barrera hematoencefálica como la placenta. Puede provocar alteraciones en el desarrollo normal del cerebro de los lactantes y a dosis mayores inducir cambios neurológicos en los adultos. Se ha asociado neurotoxicidad y nefrotoxicidad a incidentes de intoxicación aguda por MeHg en humanos. En fetos la neurotoxicidad se ha relacionado con exposiciones crónicas a bajas concentraciones de Hg.

El pescado y los mariscos son los alimentos que más preocupan en relación con el riesgo asociado a la exposición al Hg, por ser los que tienen mayores contenidos y hallarse éste mayoritariamente en forma de MeHg. Las concentraciones más elevadas de MeHg se encuentran en peces de agua dulce y salada, en particular en especies de gran tamaño, situadas en el nivel más alto de la cadena trófica. En otros alimentos el Hg está principalmente en forma inorgánica y se considera que supone un menor riesgo.

En la sección 3 del anexo del Reglamento (CE) N° 1881/2006 (UE, 2006) se fijan los siguientes contenidos máximos para el Hg en productos de la pesca (Tabla 1).

Tabla 1. Contenidos máximos de mercurio para productos de la pesca

Productos de la pesca y carne de pescado, excepto las especies del apartado siguiente	0,5 mg/kg peso fresco
Perro del norte (<i>Anarhichas lupus</i>), rape (<i>Lophius species</i>), bonito (<i>Sarda sarda</i>), anguila (<i>Anguilla lupus</i>), reloj (<i>Hoplostethus species</i>), granadero (<i>Coryphaenoides rupestres</i>), fletán (<i>Hippoglossus hippoglossus</i>), marlin (<i>Makaira species</i>), gallo (<i>Lepidorhombus species</i>), salmonete (<i>Mullus species</i>), lucio (<i>Esox lucius</i>), tasarte (<i>Orcynopsis unicolor</i>), mollera (<i>Tricopterus minutes</i>), pailona (<i>Centroscymines coelolepis</i>), raya (<i>Raja species</i>), gallineta nórdica (<i>Sebastes marinus</i> , <i>S. mentella</i> , <i>S. viviparus</i>), pez vela (<i>Istiophorus platypterus</i>), espadilla (<i>Lepidopus caudatus</i> , <i>Aphanopus carbo</i>), besugo o aligote (<i>Pagellus species</i>), tiburón (todas las especies), sierra (<i>Lepidocybium flavobrunneum</i> , <i>Ruvettus pretiosus</i> , <i>Gempylus serpens</i>), esturión (<i>Acipenser species</i>), pez espada (<i>Xiphias gladius</i>), atún (<i>Thunnus species</i> , <i>Euthynnus species</i> , <i>Katsuwonus pelamis</i>).	1,0 mg/kg peso fresco

El Comité mixto FAO/OMS de expertos en aditivos alimentarios revisó en junio de 2003 la ingesta semanal tolerable provisional (PTWI) para el MeHg, reduciéndola de 3,3 µg/kg peso corporal a 1,6 µg/kg peso corporal (FAO/OMS, 2003) (equivalente a una Ingesta Diaria Tolerable Provisional (PTDI) de 0,228 µg/kg peso corporal). Esta ingesta provisional se basó en dos estudios epidemiológicos que analizaban la relación entre la exposición materna al Hg y el daño en el desarrollo neuronal de sus hijos.

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) publicó en marzo de 2004 una opinión científica sobre el Hg y el MeHg en los alimentos y unas recomendaciones generales para los grupos de población más susceptibles en relación con la ingesta de Hg en productos de la pesca (EFSA, 2004). Para ello, tuvo en cuenta el informe elaborado en 2004 por la Dirección General de Sanidad y Protección de los Consumidores de la Comisión Europea, sobre la exposición dietética al Hg, entre otros metales pesados, de la población de los Estados miembros de la Unión Europea (SANCO, 2004).

En enero de 2005, la Comisión Europea publicó un documento sobre la "Estrategia comunitaria sobre el mercurio" en el que, entre otras medidas, se trata la protección frente a la exposición al Hg, haciendo hincapié en el establecimiento de los límites máximos y de recomendaciones a la población (Comisión Europea, 2005).

En abril de 2008, la Comisión Europea emitió una nota informativa en la que, analizando la situación en relación con el Hg, y ante la imposibilidad de minimizar el riesgo únicamente mediante el establecimiento de contenidos máximos más estrictos de Hg en pescado, instaba a los Estados miembros a formular recomendaciones a los consumidores al respecto, considerando la PTWI fijada por el Comité mixto FAO/OMS, para proteger a los grupos vulnerables de población, como son las mujeres en edad fértil, embarazadas o en período de lactancia y niños (Comisión Europea, 2008).

A raíz de la revisión de la publicación de la nota de la Comisión Europea, la AESAN recopiló 699 datos de contenidos de Hg en pescado y marisco capturados durante los años 2001 a 2007, que fueron proporcionados por las Comunidades Autónomas, el Centro Nacional de Alimentación de la AESAN y el Instituto Español de Oceanografía.

A partir de estos datos y el consumo medio de pescado según el estudio "Modelo de dieta española para la determinación de la exposición del consumidor a sustancias químicas" (AESAN, 2006), se obtienen unas estimaciones de ingesta media de mercurio para la población española de 0,225 y 0,184 µg Hg/kg de peso corporal/día para niños y adultos, respectivamente. Estas ingestas corresponden al 98,7% (en niños) y al 80,7% (en adultos) de la PTDI establecida para el MeHg en 0,228 µg/kg de peso corporal (FAO/OMS, 2003).

Asimismo, a partir de la PTWI establecida para el MeHg (FAO/OMS, 2003) y de los contenidos medios de Hg en pescado procedentes de la recopilación realizada por la AESAN antes señalada, puede calcularse la ingesta semanal máxima de pescado, expresada en raciones (1 ración equivale a 100 g), que podría considerarse segura (en relación con el riesgo objeto de evaluación: ingesta de mercurio). Según esta estimación, un niño de entre 7 y 12 años que pese 35 kg sólo podría ingerir de manera continuada media ración (unos 50 g) de pez espada a la semana y ningún otro de los pescados grandes en la misma semana, mientras que una mujer embarazada de unos 60 kg que ingiera una ración (100 g) de pez espada a la semana ya superaría la ingesta máxima tolerable de MeHg, con las consecuencias de daño en el desarrollo cerebral del feto que dicha ingestión puede suponer.

Situación actual

La exposición al Hg a través de la dieta es motivo de preocupación creciente, lo que ha dado lugar a sucesivas revisiones de los límites máximos establecidos, tendiendo en todas las ocasiones a su reducción, la última establecida por el Comité mixto FAO/OMS en 2003 (FAO/OMS, 2003). Asimismo, las autoridades sanitarias coinciden en la importancia de formular recomendaciones a la población en relación con el consumo de pescado a partir de los niveles de contaminación por Hg.

Ante esta situación, seguidamente se discuten algunos hechos a tener en cuenta en la evaluación del riesgo derivado de la presencia de Hg en pescado, en relación a la cuestión planteada al Comité Científico de la AESAN.

Por un lado, la posibilidad de defender un aumento del contenido máximo establecido para el Hg en pescados y productos de la pesca, basándose en:

- El equilibrio entre riesgo toxicológico y beneficio nutricional del consumo de determinadas especies de pescado.
- La elaboración de recomendaciones encaminadas a disminuir el consumo de determinadas especies de pescado (por debajo de lo aconsejado en la actualidad), permitiendo así un aumento de los contenidos máximos establecidos. En este sentido, cabe señalar que las raciones recomendadas por la Comisión Europea (2008) para carne de peces predadores grandes son ya pequeñas (menos de 100 g por semana) en los grupos de población de riesgo.

En un estudio reciente de estimación de la ingesta de MeHg, realizado en Murcia, se obtienen los siguientes valores ($\mu\text{g/kg pc/semana}$): niños de 1-5 años 2,60 (Intervalo de confianza (IC) al 95% 2,10 a 3,10); niños de 6 a 10 años 2,65 (IC al 95% 2,26 a 3,03); mujeres en edad fértil 0,98 (IC al 95% 0,89 a 1,07) y mujeres embarazadas 0,88 (IC al 95% 0,81 a 0,95). Las principales responsables de la exposición al MeHg, en especial en niños pequeños, son las ingestas de atún de aleta azul (*Thunnus thynnus*) y pez espada. Un 54% de niños (1-10 años), un 10% de mujeres embarazadas y un 15% de mujeres en edad fértil superan la PTWI establecida en el año 2003 por el Comité mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos alimentarios (Ortega-García et al., 2009).

- Datos recientes relativos al grado de contaminación de ciertas especies de peces. En un trabajo reciente (Torres Escribano et al., 2010) determinan los contenidos de Hg total y de las fracciones bioaccesibles de Hg total y de MeHg de pez espada comercializado en España. A partir de dichos contenidos y de los consumos estimados de pez espada por la población española (CSN, 2002) estiman las ingestas de Hg total y de MeHg, que comparan con los valores de la TDI (FAO/OMS, 2003). A partir de estas estimaciones establecen en 25 g y 50 g por semana, para niños y adultos respectivamente, las máximas cantidades de pez espada que podrían ser consumidas, en el peor de los casos (ejemplares con mayor nivel de contaminación por mercurio), para no superar la ingesta de MeHg establecida en la PTWI (Tabla 2).

Tabla 2. Consumo semanal de pez espada de niños y adultos españoles, que en el peor de los casos, proporcionaría ingestas de MeHg inferiores a la PTWI propuesta por la FAO/OMS (2003)

Contenido de Hg mg/kg peso fresco					
		Mínimo	Medio	Máximo	
		0,413	0,958	2,11	
Consumo	Ingesta de MeHg µg/semana			Valor de la PTWI MeHg	
Niños	25 g/semana	10	24	53	55
Adultos	50 g/semana	21	48	106	110

Fuente: (Torres-Escribano et al., 2010).

- Estudios de evaluación de la exposición al Hg en población española que demostraran que ésta es baja. La exposición al Hg se evalúa midiendo su contenido en pelo. En España, un estudio piloto realizado en el año 2007 por el Instituto de Salud Carlos III, reveló, entre otros datos de interés, que los contenidos de Hg en pelo oscilaban entre 0,15 y 11,6 µg/g, con un valor medio de 2,23 µg/g (Castaño et al., 2008), superando el valor de referencia (2 µg/g) de exposición al Hg. Los contenidos de Hg en el pelo se asocian a la edad y al consumo de pescado (IPCS, 1990). En otro estudio en pre-escolares de Granada la concentración de Hg total en pelo fue de 0,96 µg/g (IC al 95% 0,76 a 1,2 µg/g), asociándose el contenido de Hg total a una mayor frecuencia de consumo de pescado graso, lugar de residencia, edad de la madre y tabaquismo pasivo (Freire et al., 2010). Además, y en consonancia con los resultados anteriores, Ramón et al. (2009) encuentran contenidos elevados de Hg total en sangre de cordón umbilical, como indicador de exposición prenatal al elemento en Valencia, área mediterránea asociada al consumo de pescado graso.
- La distinta toxicidad de las diferentes formas de Hg y la forma química elegida (Hg total) para fijar los contenidos máximos para la comercialización. En muchos de los estudios, los contenidos de MeHg en pescado se infieren a partir de las concentraciones de Hg total, estimándose que en el pescado el 95% del Hg se encuentra en forma de MeHg, aunque no se puede confirmar que dicha proporción sea estable en todas las especies y áreas geográficas (Ortega-García et al., 2009). En la evaluación de riesgos sobre MeHg en pescados llevada cabo por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2008) se indica la necesidad de determinar MeHg en las muestras de pescado para conocer la relación MeHg/Hg de las diferentes especies consumidas, y estimar mejor la exposición a MeHg. En la actualidad se dispone de métodos asequibles para la determinación del MeHg.
- El análisis de otros factores, tales como la eventual disminución de los contenidos de Hg durante el cocinado (posibilidad poco probable a tenor de lo publicado por Perelló et al. (2008)) o la bioaccesibilidad del Hg en función de su interacción con el selenio (Cabañero, 2005), o en función de la especie de pescado. La bioaccesibilidad del Hg-total en el pez espada es variable (38-83%), y el MeHg representa el 94% del contenido de Hg-total de la fracción soluble (Torres-Escribano et al., 2010).

Por otro lado, cabe contemplar también el estudio de determinados aspectos que pudieran favorecer la disminución de la ingesta de Hg mediante la selección de los productos de la pesca, algunos de los cuales vienen referenciados por la OMS (2008), tales como:

- La correlación entre el tamaño del pescado y la concentración de Hg, ya que los peces más grandes (pez espada, atún y bonito) son los que acumulan mayores contenidos de Hg, tal y como establece la Comisión Europea en su nota informativa (Comisión Europea, 2008), basada en la opinión de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). La OMS considera entre las opciones de gestión del riesgo, promover el consumo de carne de peces no predadores, de especies de menor tamaño, o reducir la ingesta de pescado entre los grandes consumidores de este alimento (OMS, 2008).
- La influencia de los caladeros. En relación con este aspecto, el Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (MARM), encargó en 2008 al Instituto Español de Oceanografía el estudio de las concentraciones de Hg por especies pesqueras y origen, entre los años 2000 y 2005. En este estudio puede observarse, en concreto para el pez espada, que prácticamente todas las muestras de las distintas zonas pesqueras superaban el límite establecido de 1 mg/kg. Sin embargo, el porcentaje de muestras que superaba dicho límite, era mayor en el Atlántico Norte y menor en el Pacífico.

Para estos dos últimos supuestos se podrían solicitar datos al sector pesquero, aunque, en cualquier caso, debería contarse con la valoración del MARM.

Conclusiones del Comité Científico

Teniendo en cuenta que los resultados obtenidos en los estudios de evaluación en población española demuestran que la exposición al Hg no es baja, en especial en los grupos de población de riesgo, y que el tamaño de la ración recomendada de carne de peces predadores (por ejemplo, pez espada) en dichos grupos ya es reducido (100 g/semana), no se recomienda aumento alguno de los contenidos máximos establecidos para el Hg en pescados y productos de la pesca.

Esta evaluación del riesgo se ha realizado a partir de la información del contenido total de Hg de los alimentos objeto de análisis y asumiendo que la mayor parte del Hg está presente en dichos productos en forma de MeHg. Sin embargo, para realizar una evaluación del riesgo más precisa, es necesario disponer de mayor información acerca del contenido de MeHg del pescado y los productos de la pesca, así como acerca de la biodisponibilidad de este compuesto (MeHg), pues ésta es la forma de mayor toxicidad.

Dado que el Hg presente en el pescado procede del mar, la disminución de la contaminación marina es una medida imprescindible para gestionar eficazmente el riesgo sanitario objeto de esta evaluación.

Referencias

- AESAN (2006). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Modelo de dieta española para la determinación de la exposición del consumidor a sustancias químicas. Revisión 1. Disponible en: http://www.aesan.msc.es/AESAN/docs/docs/notas_prensa/modelo_dieta_espanola.pdf [acceso: 15-5-2010].
- Bloom, N.S. (1992). On the methylmercury content of fish tissue. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 49, pp: 1010-1017, doi:10.1139, pp: 92-113.
- Cabañero, A.I. (2005). Acumulación-interacción de especies de mercurio y selenio en tejidos animales: desarrollo de nuevas metodologías de análisis. Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid.

- Castaño, A., Navarro, C., Cañas, A., Díaz, G., García, J., Esteban, M., Lucena, M., Misericordia, A. y Jiménez, J. (2008). A biomonitoring study of mercury in hair and urine of 267 adults living in Madrid (Spain). *Toxicology Letters*, 180, pp: 79-80.
- Comisión Europea (2005). Estrategia comunitaria sobre el mercurio. Comunicación COM (2005) 20 final, de la Comisión al Consejo y al Parlamento Europeo. Disponible en: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2005:0020:FIN:ES:PDF>
- Comisión Europea (2008). Information note. Methyl mercury in fish and fishery products. Disponible en: http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/information_note_mercury-fish_21-04-2008.pdf
- CSN (2002). Consejo de Seguridad Nuclear. Estudios sobre dietas y hábitos alimentarios en la población española. Colección de documentos CSN. Referencia Doc. 05.01. CSN. Madrid (España).
- EFSA (2004). European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to mercury and methylmercury in food. Request N° EFSA-Q-2003-030. *The EFSA Journal*, 34, pp: 1-14.
- FAO/OMS (2003). Food and Agriculture Organization of the United Nations. World Health Organization. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Sixty-first meeting. Rome 10-19 June 2003. Summary and Conclusions. Disponible en: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_922.pdf
- Freire, C., Ramos, R., Lopez-Espinosa, M.J., Díez, S.J., Vioque, J., Ballester, F. y Fernández, M.F. (2010). Hair mercury levels, fish consumption, and cognitive development in preschool children from Granada, Spain. *Environmental Research*, 110, pp: 96-104.
- IPCS (1990). International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 101, Methylmercury. World Health Organization, Geneva. Disponible en: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc101.htm> [acceso: 18-5-2010].
- OMS (2008). Organización Mundial de la Salud. Guidance for identifying populations at risk from mercury exposure. Issued by UNEP DTIE Chemicals Branch and WHO Department of Food Safety, Zoonoses and Foodborne Disease. Geneva. Disponible en: <http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/mercuryexposure.pdf> [acceso: 18-5-2010].
- Ortega-García, J.A., Rodríguez, K., Calatayud, M., Martín, M., Vélez, D., Devesa, V. y Sánchez-Alarcon, M.C. (2009). Estimated intake levels of methylmercury in children, childbearing age and pregnant women in a Mediterranean region, Murcia, Spain. *European Journal of Pediatrics*, 168, pp: 1075-1080.
- Perelló, G., Martí-Cid, R., Lloret, J.M. y Domingo, J.L. (2008). Effects of various cooking processes on the concentrations of arsenic, cadmium, mercury and lead in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, pp: 11262-11269.
- Ramón, R., Murcia, M., Ballester, F., Rebalato, M., Lacasaña, M., Vioque, J., Llop, S., Amurio, A. y Aguinalalde, X. (2009). Prenatal exposure to mercury in a prospective mother-infant cohort study in a Mediterranean area, Valencia, Spain. *Science Total Environment*, 392, pp: 69-78.
- SANCO (2004) Directorate-General Health and Consumer Protection. Assessment of the dietary exposure to arsenic, cadmium, lead and mercury of the population of the EU Member States. Report on tasks for scientific cooperation. Report of experts participating in Task 3.2.11. Disponible en: http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/scoop_3-2-11_heavy_metals_report_en.pdf
- Torres-Escribano, S., Vélez, D. y Montoro, R. (2010). Mercury and methylmercury bioaccessibility in swordfish. *Food Additives and Contaminants*, 27, pp: 327-337.
- UE (2006). Reglamento (CE) N° 1881/2006 de la Comisión, de 19 de diciembre de 2006, por el que fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. DO L 364 de 19 de diciembre de 2006, pp: 5-24.

Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre proteínas lácteas, alergias y sus métodos de análisis

Miembros del Comité Científico

Andreu Palou Oliver, Juan José Badiola Díez, Arturo Anadón Navarro, Albert Bosch Navarro, Juan Francisco Cacho Palomar, Ana María Cameán Fernández, Alberto Cepeda Sáez, Lucas Domínguez Rodríguez, Rosaura Farré Rovira, Manuela Juárez Iglesias, Francisco Martín Bermudo, Manuel Martín Esteban, Albert Más Barón, Teresa Ortega Hernández-Agero, Andrés Otero Carballeira, Perfecto Paseiro Losada, Daniel Ramón Vidal, Elías Rodríguez Ferrí, M^a Carmen Vidal Carou, Gonzalo Zurera Cosano

Secretario

Jesús Campos Amado

Número de referencia: AESAN-2010-009

Documento aprobado por el Comité Científico en su sesión plenaria de 28 de septiembre de 2010

Grupo de Trabajo

Francisco Martín Bermudo (Coordinador)
Juan Francisco Cacho Palomar
Alberto Cepeda Sáez
Manuela Juárez Iglesias
Manuel Martín Esteban
Elena Molina Hernández (C. Externa)
Isabel Prieto Santos (CNA-AESAN)

37

revista del comité científico nº 13

Resumen

La leche es un alimento complejo con un 3,3% de proteínas en su composición. Estas proteínas están distribuidas en diferentes fracciones, especialmente las caseínas y las seroproteínas. Sus proteínas son, en general, resistentes a los tratamientos tecnológicos a los que se somete la leche.

La leche es el primer antígeno alimentario conocido con el que las personas entran en contacto. En su composición proteica existen varias proteínas con potencial alergénico. Entre ellas destacan la β -lactoglobulina, las caseínas y la α -lactalbúmina.

Esta situación hace que su consumo pueda desencadenar reacciones alérgicas, que en la mayoría de las ocasiones están mediadas por inmunoglobulina E (IgE). Esta alergia es de tipo inmediato y sus síntomas pueden ser leves y limitarse al sitio de contacto o de carácter general e intensidad variable, llegando incluso a producir reacciones anafilácticas graves. Su prevalencia en España no es superior al 2% y en el 80% de los casos desaparece al alcanzar los 4-5 años. El mejor tratamiento en la actualidad es la eliminación de cualquier alimento que contenga leche en su composición.

La dieta de eliminación es muy difícil de conseguir en la vida real y para poder seguirla es necesario conocer los ingredientes de los alimentos de elaboración industrial. En este sentido, la legislación nacional y europea obliga a reflejar en el etiquetado de un alimento cualquier componente que pueda ser considerado como alérgeno. No obstante, en ocasiones el problema se mantiene porque pueden encontrarse en los alimentos trazas de proteínas lácteas debido a contaminaciones accidentales o adulteraciones.

Actualmente, los métodos para la detección de las proteínas alergénicas de la leche se pueden clasificar en dos grandes grupos: i) métodos basados en la detección directa de las proteínas lácteas mediante técnicas inmunológicas (test radioalergoabsorbente, ELISA, inmunoelectroforesis, ensayo cohete de inmunoelectroforesis, tiras de flujo lateral, *microarrays* y biosensores) o no inmunológicas (espectrometría de masas y cromatografía líquida-espectrometría de masas en tandem) y ii) métodos

indirectos basados en el reconocimiento específico de fragmentos de ADN que codifican una determinada proteína. De todos los métodos disponibles son básicamente los métodos inmunológicos concretamente, los enzimoimmunoensayo tipo ELISA los más recomendables para ser usados por la industria alimentaria. Las razones son que es una técnica: i) rápida; ii) de bajo coste; iii) no requiere personal altamente cualificado; iv) su sensibilidad es muy alta (0,2-1 ppm) y v) su especificidad es elevada.

Palabras clave

Leche, proteínas lácteas, alergias alimentarias, técnicas analíticas, ELISA.

Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) on milk proteins, allergies and methods of analysis.

Abstract

Milk is a complex food with a 3.3% of proteins in its composition. Milk proteins are classified as caseins and whey proteins. Milk technological treatments usually have a small effect on the antigenic/allergenic potential of milk proteins.

Milk is the first food known antigen that contacts people. Milk contains several proteins that can potentially be involved in allergic sensitization but only a few of them are recognized as being major allergenic, specially β -lactoglobulin, caseins and α -lactalbumin.

This issue implicates that milk consumption generates food allergies. This allergic reaction is characterized by a rapid onset of the symptoms and is mediated by allergen-specific immunoglobulin E. The symptoms can be moderated and limited to the contact site or general and life-threatening. In Spain the prevalence is lower than 2% and disappears in the 80% of the sensitized kids before five years old. Currently, the only effective treatment for milk allergy is avoidance of allergen-containing food.

However total avoidance is sometimes difficult for the allergic individuals since processed food products contain a large variety of ingredients. In this sense national and European legislation elaborated some directives intended to ensure that all consumers are informed of the complete contents of foods and enable them to identify any allergenic ingredient that may be present. Nevertheless, sometimes food products can be contaminated with trace amounts of milk proteins due to fraud or cross-contaminations.

Nowadays, there are several technical possibilities for the detection of milk allergen proteins. The methods employed are either targeting the protein itself or DNA fragments. The first ones are based on immunology techniques (radioallergosorbent test, ELISA, immunoblotting, rocket immunoelectrophoresis, lateral flow test strips, microarrays and biosensors) or not immunological techniques (mass spectrometry and liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry). Presently, ELISA technique is the most commonly method used in laboratories of the food industry. The reasons are its high precision (0.2-1 ppm), simple handling and speed, low cost, good potential for standardization and high specificity.

Key words

Milk, milk proteins, food allergies, analytical methods, ELISA.

Introducción

La leche es un componente fundamental de la alimentación a lo largo de toda la vida y especialmente durante la infancia. Además, muchos productos alimenticios y algunos medicamentos contienen leche como ingrediente alimentario.

Las proteínas lácteas pueden desencadenar reacciones alérgicas. Estas reacciones, aunque no son muy frecuentes y, además, suelen ir desapareciendo en los primeros años de vida, sin embargo pueden llegar a ser graves, produciendo incluso en algunos casos episodios anafilácticos.

Ante la importancia de la potencial gravedad de estas reacciones alérgicas, la leche, sus componentes y derivados son ingredientes o sustancias que deben aparecer obligatoriamente en el etiquetado de los alimentos, cualquiera que sea su cantidad, y así lo recogen las normativas españolas y europeas.

Hasta ahora, el método más efectivo que existe para evitar las reacciones alérgicas producidas por el consumo de alimentos y medicamentos que contengan proteínas lácteas es eliminar de la dieta la ingesta de estos productos. Esto pone en evidencia la importancia que tiene para un individuo alérgico a estas proteínas conocer si un alimento las contiene. En este sentido, hay que ser especialmente cuidadoso porque, a veces, pueden encontrarse en los alimentos, de forma no intencionada, trazas de proteínas lácteas. La presencia de estos denominados "Alérgenos Ocultos" puede afectar a la seguridad de los productos alimenticios, ya que puede suponer una amenaza para la salud del consumidor alérgico. Por lo tanto, es necesario disponer de técnicas específicas y lo suficientemente sensibles que permitan detectar cantidades trazas de proteínas lácteas en los alimentos y medicamentos. En este sentido, es importante avanzar en el desarrollo de estas técnicas para que puedan ser empleadas por la industria alimentaria.

El objetivo del presente informe es, fundamentalmente, revisar cual es la situación actual en referencia a los métodos de análisis que existen para detectar las trazas de proteínas lácteas.

Composición de la leche

La leche es una mezcla en equilibrio de proteínas, grasa, carbohidratos, sales y otros componentes menores dispersos en agua en forma de emulsiones, suspensiones coloidales y soluciones verdaderas. La grasa y las vitaminas liposolubles se encuentran en forma de emulsión. Las proteínas se encuentran en dos fases: las caseínas se encuentran dispersas en forma de partículas no sedimentables, llamadas micelas y permanecen en suspensión coloidal y el resto de proteínas (seroproteínas y algunas caseínas solubles), vitaminas hidrosolubles y la lactosa se encuentran en la fase soluble de la leche (Huppertz y Kelly, 2009). La composición media de la leche se muestra en la Tabla 1 (Walstra et al., 2006), aunque varía considerablemente con la raza, lactación, alimentación, época del año y muchos otros factores (Juárez, 1985).

Tabla 1. Composición media de la leche

Componente	%
Agua	87,1
Grasa	3,1
Proteínas	3,3
Caseínas (CAS)	2,60*
Proteínas de suero (PS)	0,40*
Lactosa	4,0
Sólidos totales	8,9
Sustancias minerales	0,7
Ácidos orgánicos	0,17

*Porcentaje referido al valor de proteína.

1. Composición proteica de la leche

La leche contiene una media de 0,5% de nitrógeno (3-3,5% de proteínas), distribuido en diferentes fracciones, de importancia variada desde el punto de vista de la tecnología láctea y la nutrición: caseínas, proteínas solubles o seroproteínas y sustancias nitrogenadas no proteicas. Las proteínas lácteas se presentan en dos fases diferentes: i) una fase micelar inestable constituida por partículas sólidas, que forman micelas en suspensión, que difunden la luz y dan a la leche el aspecto blanco opaco. Son las caseínas y ii) otra fase soluble, constituida por diferentes polímeros proteicos hidrófilos y que se denominan seroproteínas. La composición media de las proteínas lácteas se refleja en la Tabla 2.

Tabla 2. Contenido en proteínas de la leche

	g/Kg	% de proteína total
Proteína total	33,0	100,0
Caseína total	26,0	79,5
α s1-caseína	10,0	30,6
α s2-caseína	2,6	8,0
β -caseína	9,3	28,4
γ -caseína	0,8	2,4
κ -caseína	3,3	10,1
Proteínas de suero	6,3	19,3
α -lactoalbúmina	1,2	3,7
β -lactoglobulina	3,2	9,8
Seroalbúmina	0,4	1,2
Inmunoglobulinas	0,7	2,1
Varias (incluida proteosa-peptona)	0,8	2,4
Proteínas de la membrana del glóbulo graso	0,4	1,2

Fuente: (Walstra et al., 2006) (Fox y McSweeney, 2003).

2. Proteínas lácteas y sus modificaciones durante los procesos tecnológicos

La leche es un alimento muy complejo desde el punto de vista de su composición molecular. Sin embargo, tal y como se señala en la Tabla que a continuación se detalla (Tabla 3), sus proteínas son en general resistentes a la mayoría de los tratamientos tecnológicos a los que se somete la leche, por lo que su potencial alergénico no se ve muy modificado por dichos tratamientos. No obstante, varios procesos de fabricación como el calentamiento, el tratamiento químico o enzimático, los procesos de alta presión o la fermentación, entre otros, pueden alterar su potencial alergénico (Paschke y Besler, 2002).

Tabla 3. Tipos de proteínas más abundantes en la leche, características y efectos de los tratamientos tecnológicos

Tipo de proteína	Características y efectos de los tratamientos tecnológicos
α_{s1} -caseína	Mayoritaria en la leche de vaca (aproximadamente el 34% del total de la proteína de la leche). Es una molécula hidrofóbica que forma parte del interior las micelas y es esencial en la incorporación de Ca a las mismas. Resistente a tratamientos térmicos y sensible a precipitación ácida o enzimática.
α_{s2} -caseína	Menos abundante que la α_{s1} -caseína (aproximadamente el 8% del total de la proteína de la leche). También forma parte del interior de las micelas. Resistente a tratamientos térmicos y sensible a precipitación ácida o enzimática.
β -caseína	Aproximadamente el 25% del total de la proteína. Es la más hidrofóbica de todas las caseínas. Responsable de que durante la refrigeración aumente la hidratación y volumen de las micelas de caseínas.
κ -caseína	Aproximadamente el 12% del total de la proteína de la leche. Responsable de la regulación del tamaño de las micelas de caseínas y de su estabilidad. Es la proteína atacada por el cuajo durante la coagulación enzimática. Es la más sensible a los tratamientos térmicos de todas las caseínas, y la que interactúa con las proteínas séricas desnaturalizadas durante estos tratamientos.
α -lactoalbúmina	Aproximadamente el 4% del total de la proteína de la leche. Es termolábil con tratamientos térmicos severos. Forma agregados con las β -lactoglobulinas.
β -lactoglobulinas	Aproximadamente el 9% del total de la proteína de la leche. Es termolábil y juega un papel muy importante en los tratamientos térmicos por ser la responsable del sabor característico que adquiere la leche tratada térmicamente.
Proteosas-peptonas	Aproximadamente el 2% del total de la proteína de la leche. Presentan acción enzimática y juegan un importante papel digestivo. Son estables a los tratamientos térmicos moderados y a la acción de los ácidos.
Inmunoglobulinas	Aproximadamente el 2% del total de la proteína de la leche. No son específicas de la leche, ya que se encuentran presentes en todos los fluidos corporales. Presentan una función defensiva. Son muy termosensibles.
Seroalbúminas	Representan aproximadamente el 1% del total de proteínas de la leche. Son un grupo muy heterogéneo que presenta la facultad de ligarse de forma reversible dependiendo de las condiciones a diversas sustancias.

1. La alergia a la leche

Aunque se ha demostrado que la leche de varios mamíferos causa reacciones alérgicas, la más frecuente y mejor estudiada es la leche de vaca. En la especie humana, la leche, o una fórmula derivada, suele ser el primer alimento no homólogo que el individuo recibe en cantidades importantes. Esto quiere decir que también es el primer antígeno alimentario con que el ser humano entra en contacto de forma conocida. Por ello, no es de extrañar que sea el alimento que produce mayor número de reacciones adversas en la primera infancia, si bien, aunque en pocas ocasiones, pueden presentarse en cualquier época de la vida, incluso en lactantes con lactancia materna exclusiva.

No todas las reacciones adversas a la leche son reacciones alérgicas. Siguiendo la nomenclatura europea de 2001 (Johansson et al., 2001), refrendada por la *World Allergy Organization* (WAO) (Johansson et al., 2004), bajo el término "hipersensibilidad a leche de vaca" se incluyen tanto la hipersensibilidad no alérgica, conocida tradicionalmente como "intolerancia a leche de vaca", como la hipersensibilidad alérgica a la leche de vaca, o "alergia a la leche de vaca". Esta última situación requiere que en su producción haya un mecanismo inmunológico subyacente.

En la mayoría de los casos, la alergia a la leche es mediada por inmunoglobulina E (IgE), por lo que también se conoce como "alergia inmediata" y se considera como una expresión fenotípica más de la atopía, asociada o no con dermatitis atópica, rinitis alérgica o asma. Sin embargo, un subgrupo de pacientes tiene una alergia a la leche no mediada por IgE ("alergia retardada") (probablemente mediada por células) que presentan principalmente signos y síntomas gastrointestinales en relación con la ingestión de leche. Se incluyen en este grupo una serie de situaciones, generalmente subagudas o crónicas, mediadas principalmente por células T. Algunas pueden, además, asociarse con la presencia de IgE específica (Sampson y Anderson, 2000). Entre las primeras se encuentran las enterocolitis y enteropatías y entre las segundas la colitis alérgica o eosinofílica.

2. Alergia inmediata, mediada por IgE, a la leche

Hay muy pocos datos de incidencia y prevalencia de alergia a alimentos, al contrario de lo que ocurre en otras enfermedades alérgicas, como la rinitis o el asma. Esta situación es tal vez más evidente en el caso de alergia a la leche.

La percepción por la población de la alergia a la leche es mucho más frecuente que la alergia a la leche de vaca confirmada. En un reciente meta-análisis disponible en este campo (Rona et al., 2007), la prevalencia de alergia a leche percibida por el paciente oscila entre 1-17,5% en niños preescolares, 1-13,5% en niños de 5 a 16 años y 1-4% en adultos. Estos valores disminuyen, respectivamente, a 0,5-2, 0,5% y menos de 0,5%, cuando se confirma la situación mediante las técnicas diagnósticas apropiadas. En España los pocos datos publicados muestran una incidencia entre 0,36% y 1,9% de alergia a la leche en el primer año de vida (Sanz et al., 2001) (García-Ara et al., 2003).

La alergia a la leche comienza casi siempre en los primeros meses de vida y pocas veces persiste en el adulto. Aproximadamente, el 50% de los pacientes toleran la leche de vaca al cabo de un año de evolución y el 80% alcanzan su tolerancia hacia los 3 ó 4 años (García-Ara et al., 2004) (Vanto et al., 2004).

Los síntomas y signos son los típicos de cualquier reacción alérgica mediada por IgE. Pueden limitarse al sitio de contacto de la leche o una fórmula derivada, por ejemplo, la orofaringe (síndrome de alergia oral), el tracto gastrointestinal (alergopatía gastrointestinal), la piel (urticaria y dermatitis de contacto por proteínas) o el tracto respiratorio a continuación de una exposición a productos volátiles procedentes del vapor de leche hirviendo (rinoconjuntivitis, asma) (Roberts et al., 2003). Sin embargo, es más frecuente la aparición de reacciones generales a distancia, de intensidad y localización variables, en las que los órganos principalmente involucrados son la piel (urticaria, angioedema) y, en menor grado, el tracto gastrointestinal. Menos frecuente es la afectación del tracto respiratorio o de otros aparatos y sistemas. Ocasionalmente pueden aparecer reacciones graves, como angioedema laríngeo (edema de glotis) o con compromiso cardiovascular, hipotensión y pérdida de conciencia (choque anafiláctico).

En cualquier caso, suelen ser signos y síntomas de aparición inmediata, muchas veces instantánea, casi siempre antes de transcurrida una hora de la ingestión de la leche o un derivado y en clara relación con ella, con evidencia de anticuerpos específicos de la clase IgE, demostrables por pruebas cutáneas y métodos "in vitro". Otra característica a tener en cuenta es que la intensidad de los síntomas no está en relación con la cantidad de leche ingerida, ni con el grado de sensibilización que muestran pruebas cutáneas o la tasa de IgE específica sérica (Allen et al., 2009). Igualmente, en un mismo individuo, la localización, intensidad y duración de los signos y síntomas puede ser cambiante en diferentes episodios. Tampoco una reacción leve o moderada excluye que el paciente pueda tener un grave choque anafiláctico en una siguiente exposición. Los datos publicados sobre la leche como causa de anafilaxia varían entre el 11 y el 28% de los episodios anafilácticos diagnosticados en población pediátrica (Jarvinen et al., 2008). En un estudio en el Reino Unido, la ingestión de leche fue causa de muerte por anafilaxia en 4 de los 8 casos mortales producidos durante 10 años en niños de 0 a 15 años de edad y estuvo involucrada en el 10,9% de episodios anafilácticos mortales o casi mortales ocurridos (Macdougall et al., 2002).

Ante la importancia de la potencial gravedad de sus reacciones alérgicas, la leche, sus componentes y derivados son ingredientes o sustancias que deben aparecer obligatoriamente en el etiquetado de los alimentos, cualquiera que sea su cantidad (anexo III bis de la Directiva 2003/89/CE (UE, 2003)). También existe la posibilidad de anafilaxia con la ingestión de ciertos medicamentos, que contienen en su excipiente leche, como es el caso de algunos preparados de hierro (Larramendi et al., 2006) y de probióticos (Bruni et al., 2009). Además, puede ocurrir lo mismo con medicamentos de uso tópico y cosméticos (Codreanu et al., 2006).

Como en la alergia a otros alimentos, el diagnóstico de la alergia a leche mediada por IgE, se basa en tres elementos (AESAN, 2007): i) una historia clínica cuidadosa; ii) búsqueda y demostración de la presencia de IgE específica para proteínas de leche, bien por prueba cutánea o por inmunoanálisis y iii) comprobación de que los signos y síntomas recogidos en la historia clínica están en relación evidente con la administración de leche, mediante prueba de provocación controlada, siempre que no esté contraindicada.

3. Alérgenos de la leche

Cabe señalar que las proteínas de la leche están reconocidas como importantes alérgenos, y la leche utilizada como ingrediente está afectada por el Real Decreto 1334/1999 y sus posteriores modificaciones (Real Decreto 1245/2008), así como, por la Directiva Comunitaria 2000/13/CE (UE, 2000), posteriormente modificada por la Directiva 2007/68/CE (UE, 2007), que obligan a reflejar en el etiquetado del alimento la presencia de cualquier sustancia empleada en la producción de un alimento que permanezca en el producto final, cuando éste sea considerado material alérgico.

Cualquiera de las proteínas de la leche puede actuar como antígenos en humanos. La β -lactoglobulina (β -LG) es la proteína que con mayor frecuencia induce respuestas clínicas, seguida de caseínas, α -lactalbúmina (α -LA) y, mucho menos frecuente, de seroalbúmina bovina (BSA). Puede haber diferencias en relación con la población estudiada y en la mayoría de casos hay más de un alérgeno involucrado (Wal, 1998). Se ha postulado que se podrían formar nuevos alérgenos durante la digestión enzimática de las proteínas, pero no existe suficiente evidencia que sustente esta teoría. La importancia alérgica de otras proteínas de la leche, como transferrina y gammaglobulina bovina es mínima (Bernhisel-Broadbent et al., 1991).

La β -LG es termolábil, pero relativamente resistente a la hidrólisis ácida y a la digestión por proteasas, lo que permite que algunas moléculas queden intactas después de la digestión y sean absorbidas, estimulando el sistema inmunitario. Al haberse detectado en la leche materna, en la que no existe una proteína homóloga, se cree que puede inducir sensibilización y/o sintomatología en niños que reciben lactancia materna exclusiva (Wal, 2004).

La mayoría de los pacientes alérgicos a caseína están sensibilizados a los cuatro tipos de caseína (Restani et al., 1995). Se ha observado que la sensibilización a determinados epítomos secuenciales de caseínas α_{s1} , α_{s2} y κ , constituye un marcador de persistencia de la alergia a leche (Järvinen et al., 2002).

La albúmina bovina sérica (BSA) es la misma proteína que se encuentra en la carne de vacuno, por lo que los pacientes sensibilizados pueden presentar reacciones al comer este tipo de carne, especialmente si está cruda o poco hecha, ya que la BSA es una proteína termolábil y se desnaturaliza durante el cocinado. Se ha comprobado reacción a la carne de vaca entre el 13-20% de personas alérgicas a leche (Martelli et al., 2002).

La leche de vaca tiene reacción cruzada con las de otros bóvidos, como cabra y oveja, debido a la homología existente entre sus proteínas, especialmente la β -LG. La mayor parte de los alérgicos a leche de vaca no toleran la leche de estas especies, pero también se han descrito reacciones alérgicas selectivas a leche de cabra o de oveja con buena tolerancia clínica a leche de vaca (Martins et al., 2005). La homología es mucho menor con la de suidos (cerda), équidos (yegua y burra) y camélidos (camella, dromedario), así como la leche humana. Es interesante señalar que la leche de camella y dromedaria, igual que la leche humana, no contienen β -LG.

Clínicamente, la persistencia de la alergenidad en leche tratada térmicamente se confirma por el hecho de que en algunos niños se presenta alergia a leche después de la ingestión de leche tratada de esta forma. Además, el calentamiento sólo puede modificar epítomos conformacionales, que podrían perder su capacidad de enlace para la IgE específica, mientras que los epítomos secuenciales o estructurales mantienen su potencial alérgico incluso después del calentamiento. Las proteínas

de la leche contienen ambos tipos de epítomos, pero parece que los epítomos de β -LG y de la caseína son más estructurales que conformacionales (Ball et al., 1994) (Kohn et al., 1994), y, aunque con el calentamiento puede observarse una ligera reducción de la alergenicidad de las proteínas de suero de leche, es insignificante con las caseínas.

Para complicar aún más el cuadro, el calentamiento intenso, tal como el utilizado para determinados procesos de esterilización y UHT (*Ultra-high temperature*), así como el menos drástico de pasteurización, han demostrado que incrementan algunas características alergénicas (Roth-Walter et al., 2008). Además, las proteínas de la leche pueden oxidarse durante el tratamiento industrial, resultando en la formación de residuos de aminoácidos modificados, particularmente en la β -LG, que pueden ser responsables del desarrollo de nuevas estructuras inmunorreactivas (Fenaille et al., 2005).

4. Tratamiento de la alergia a la leche

Puesto que la dieta es fundamental en el manejo del individuo con alergia a alimentos, cualquier transgresión, voluntaria o involuntaria, puede conducir a una respuesta clínica de intensidad imprevisible. Por ello, es necesario:

1. La eliminación de la leche, de derivados y de otros alimentos con reacción cruzada conocida en los que se haya comprobado que producen síntomas.
2. Educación del paciente y su familia, acerca de la dieta de eliminación y posibles fuentes ocultas para evitar su ingestión accidental.
3. Tratamiento de los síntomas ante su ingestión accidental.
4. Consejos nutricionales para asegurar una alimentación adecuada.

La dieta de eliminación que parece fácil, económica y cómoda de llevar a cabo, es muy difícil de conseguir en la vida real (Nowak-Węgrzyn et al., 2001), por lo que la aparición de episodios agudos por ingestión accidental es frecuente (Boyano-Martínez et al., 2009).

La tarea de prevenir totalmente la ingestión o el contacto con leche y derivados, obliga a una serie de restricciones que no solo consisten en la simple exclusión directa del alérgeno por el paciente, sino que se extienden al entorno del alérgico, de su familia y de su círculo social. Para seguir una dieta de exclusión correcta es necesario conocer los ingredientes de los alimentos de elaboración industrial (Warner, 2005) y sus denominaciones y cuidar las contaminaciones entre alimentos. Todo ello dificulta la compra de alimentos elaborados, lleva a restringir las actividades sociales como las comidas fuera de casa, la asistencia a fiestas infantiles o de otras actividades de ocio. En ocasiones, estos niños pueden sufrir dificultades para ser admitidos en comedor escolar o para participar en actividades extraescolares donde no puede garantizarse un estricto control de los alimentos (Bollinger et al., 2006). A ello hay que unir la ansiedad generada por el miedo de las familias a que su hijo presente una reacción adversa por confusión, inadvertencia, accidente y/o falta de suficiente vigilancia. La normativa sobre etiquetado (Real Decreto 1334/1999) solo facilita parcialmente la tarea diaria, ya que la nota precautoria de "puede contener" como elemento protector del fabricante limita aun más de lo estrictamente necesario las opciones de consumo. En ocasiones, en sensibilizaciones graves, las familias optan por estrategias más drásticas y el alimento implicado no entra en el domicilio familiar o se duplican utensilios de cocina, almacenaje, etc., para evitar confusiones.

En el terreno de los contactos, además de la manipulación más o menos voluntaria o inadvertida, entran en juego situaciones relacionadas con la afectividad como besos o caricias que son causa de urticaria local por haber tomado o tocado otra persona el alimento alergénico. Este hecho es referido frecuentemente por las familias, en relación a besos tras tomar leche o por aplicar crema o peinar o asear al niño con un lavado insuficiente de las manos tras manipular alimentos. Igualmente frecuentes son los síntomas por contaminación a través de instrumentos de cocina, equivocación de cubiertos, confusión con servilletas, etc. que motivan una atención continua y estresante por parte de los familiares de pacientes anafilácticos (Teufel et al., 2007). Es frecuente la aparición de episodios en relación con juegos infantiles de arrojarse comida, vómitos de otros niños, estornudos que dispersan leche, contactos a través de manos en fiestas infantiles, etc.

Ante estas dificultades, la dieta de eliminación sería más fácil de seguir con la ayuda del conocimiento de las dosis umbral, reactiva y no reactiva, para cada individuo, que permitirían conocer el riesgo de cada paciente en la eventualidad de una posible transgresión. Sin embargo, los datos disponibles son muy variables, por lo que resulta difícil realizar pronósticos personalizados de riesgo de reacción (Moneret-Vautrin y Kanny, 2004). Además, la utilidad de conocer la dosis que no provoque efectos alergénicos resultaría fundamental para regular normativas industriales basadas en la disponibilidad de métodos de detección suficientemente sensibles y específicos para determinar el contenido de proteínas de leche en los alimentos y su indicación en el etiquetado.

Afortunadamente, están surgiendo nuevas posibilidades de tratamiento y control de la alergia alimentaria, mediante procedimientos de inmunomodulación, dirigidos preferentemente a pacientes de alto riesgo (Burks et al., 2008). Entre ellos, los que se encuentran más avanzados y con resultados muy aceptables son la inmunoterapia sublingual y la desensibilización oral o inducción de tolerancia (Zapatero et al., 2008). También están en fase experimental nuevas estrategias que incluyen aspectos como la inmunoterapia con proteínas mutadas, la inmunoterapia con péptidos, la inmunización con ADN y otros, todos ellos dirigidas a disminuir las respuestas Th2 nocivas.

Métodos para la detección de proteínas lácteas en cantidades trazas

El método más efectivo hasta ahora para evitar las reacciones alérgicas producidas por el consumo de sustancias alergénicas, como por ejemplo las proteínas de la leche, como se ha mencionado anteriormente, es evitar el consumo del alimento que causa la alergia. De ahí la importancia que tiene para un individuo alérgico conocer si un alimento contiene el o los ingredientes que causan su alergia, para así poder evitar su consumo. Esta necesidad queda recogida en varios Reales Decretos y Directivas Europeas, donde se obliga a reflejar en el etiquetado de un alimento cualquier componente que pueda ser considerado como alérgeno. Sin embargo, el problema se mantiene debido a que en muchos casos trazas de ingredientes alergénicos pueden encontrarse en los alimentos de forma no intencionada, como consecuencia de adulteraciones o debido a contaminaciones accidentales durante el transporte o procesado. La presencia de estos denominados "Alérgenos Ocultos" puede afectar a la seguridad de los productos alimenticios, ya que puede suponer una amenaza para la salud del consumidor alérgico.

Se han detectado proteínas ocultas de leche en diversos productos como, mermelada, jamón cocido, salchichas, cereales, galletas, dulces, conservas, atún, chocolate, café, vinos, queso de soja vegetariano y

polvo de guantes de látex (Gern et al., 1991) (Giovannacci et al., 2004). Por lo tanto, es necesario disponer de técnicas específicas y lo suficientemente sensibles para poder asegurar su detección en los alimentos. El reto de hoy, es la detección y la cuantificación de pequeñas cantidades, “trazas” de alérgenos en mezclas de alimentos que, sin embargo, son capaces de provocar reacciones alérgicas a veces graves.

Actualmente, los métodos para la detección de las proteínas alergénicas de la leche al igual que para el resto de alérgenos, se pueden clasificar en dos grandes grupos: métodos basados en la detección directa de las proteínas lácteas mediante técnicas electroforéticas, cromatográficas y espectrométricas de alta resolución, y técnicas inmunoquímicas y métodos indirectos, basados en el reconocimiento específico de fragmentos de ADN que codifican una determinada proteína, en este caso alergénica, mediante técnicas genéticas. Sin embargo, del rango de métodos disponibles para esta finalidad, son básicamente los métodos inmunológicos concretamente, los ensayos de tipo ELISA y recientemente los métodos basados en técnicas genéticas PCR, los más utilizados en los análisis de rutina para la detección y cuantificación de alérgenos, mientras que el resto de métodos son, hoy por hoy, sólo aplicables en el campo de investigación.

1. Técnicas inmunológicas

Estas técnicas están basadas en el reconocimiento de una determinada proteína por los anticuerpos específicos generados frente a ella. Las principales ventajas de estas técnicas son su elevada sensibilidad y especificidad, por lo que son muy apropiadas para analizar una proteína minoritaria contenida en una mezcla compleja.

Radioalergosorbent test (RAST) y enzimoalergosorbent test (EAST)

La mayoría de las técnicas de diagnóstico de alergias alimentarias en pacientes utilizan las propiedades del suero sanguíneo de los individuos alérgicos. El suero contiene anticuerpos IgE que reconocen específicamente y se unen a los antígenos (alérgeno). Métodos inmunológicos basados en la utilización de anticuerpos IgE como *radioalergosorbent test* (RAST) y *enzimoalergosorbent test* (EAST), pueden ser también utilizados en la detección y cuantificación de alérgenos en alimentos.

Existen varias referencias sobre la utilización de estas técnicas en la detección de alérgenos de la leche (Walsh et al., 1987) (Adams et al., 1991) (Frémont et al., 1996). Para su aplicación al análisis de alimentos, ha sido necesario realizar algunas modificaciones como, por ejemplo, una primera etapa en la que se lleva a cabo una preincubación de los sueros humanos con las proteínas extraídas de los respectivos alimentos y, posteriormente, la determinación de la disminución de la cantidad de anticuerpos específicos IgE que se une a la fase sólida donde se encuentra fijado el alérgeno (método de inhibición de RAST/EAST). Mediante este sistema, Frémont et al. (1996) fueron capaces de detectar niveles de 1 µg de α-LA en 1 gramo de alimento (1 ppm), en una papilla infantil de cereales contaminada con proteínas de leche y responsable de un brote de respuesta alérgica.

Sin embargo, la utilización de estas metodologías para la detección de alérgenos en la industria alimentaria es muy limitada. En primer lugar, debido a la gran variabilidad que existe en la producción de IgE, dependiendo del individuo y en consecuencia de la dificultad que supone poder estandarizar estos sistemas y segundo, a la falta de disponibilidad de sueros en pacientes alérgicos.

En conclusión, los métodos RAST y EAST se pueden considerar una herramienta ideal para la caracterización de las propiedades de los epítomos para IgE de los alérgenos alimentarios y comprobar su actividad en distintas formas como extractos de proteínas crudas, preparaciones de alérgenos purificados, actividad alergénica de diferentes variedades o especies y en varios alimentos (Besler et al., 2001), pero no pueden considerarse un sistema de elección para su aplicación a la detección de alérgenos en alimentos.

Métodos ELISA

De todos los métodos inmunológicos disponibles, el sistema más utilizado para la detección de alérgenos en alimentos es el ensayo de inmunoenzimático (ELISA). Son varios los trabajos publicados sobre métodos ELISA para la detección de la presencia de alérgenos de la leche en alimentos. Para el desarrollo de estos sistemas se han utilizado sueros o anticuerpos, policlonales o monoclonales, obtenidos a partir de animales inmunizados con proteínas lácteas. Los sistemas descritos, han mostrado una clara preferencia por la obtención de anticuerpos policlonales, debido a que estos reaccionan frente a diferentes epítomos de la proteína, lo que permite el reconocimiento en diferentes grados de desnaturalización (Gern et al., 1991) (Mäkinen-Kiljunen y Palosuo, 1992) (Venien et al., 1997) (Hefle y Lambrecht, 2004).

El primer paso en el diseño de los métodos de detección de ingredientes alergénicos en los alimentos requiere la selección e identificación del analito diana. En el caso de la leche, como ya se ha indicado, todas las proteínas (caseínas, α -LA, β -LG, etc.) poseen capacidad alergénica (Monaci et al., 2006), por lo que el desarrollo de los métodos inmunológicos se ha dirigido indistintamente a la utilización como base del método de anticuerpos obtenidos bien frente a proteínas individuales como caseínas o β -LG o bien anticuerpos obtenidos frente a las proteínas totales de la leche. Así, podemos encontrar entre los trabajos publicados varios sistemas ELISA que utilizan anticuerpos obtenidos frente a β -LG, debido a que las β -LG son el principal alérgeno presente en el suero de leche y representan el 0,2-0,4% de la leche bovina. Como ejemplos podemos citar, el ELISA tipo sándwich desarrollado para la detección de niveles bajos de leche en alimentos infantiles, con una sensibilidad capaz de detectar niveles de 1-2 μ g/l (Mäkinen-Kiljunen y Palosuo, 1992), un ELISA indirecto con anticuerpos monoclonales frente a β -LG (Venien et al., 1997) y, recientemente, varios trabajos sobre el desarrollo y evaluación de sistemas ELISA capaces de detectar niveles bajos de β -LG, en alimentos, consiguiendo niveles de detección entre 0,2-1 ppm (De Luis et al., 2009) (Frantisek et al., 2009) (Peláez-Lorenzo et al., 2010).

Simultáneamente, se han desarrollado y validado sistemas ELISA basados en la utilización de anticuerpos frente a las caseínas. Por ejemplo: i) un ELISA para la detección de contaminaciones de leche en alimentos mediante anticuerpos policlonales anticaseína, con una sensibilidad capaz de detectar niveles de 0,5 ppm de caseína (Hefle y Lambrecht, 2004); ii) un ELISA capaz de detectar niveles del orden de 1-1,5 ppm de caseína en alimentos procesados como purés de patatas, sopas deshidratadas, mezcla de harinas y mezclas de especias (Sletten et al., 2005); o iii) estudios de colaboración para la validación de kits comerciales ELISA sándwich desarrollados para detectar caseína y proteínas totales de leche en alimentos (Matsuda et al., 2007). Recientemente, se ha publicado un estudio sobre la aplicación de un método ELISA indirecto para la detección de residuos de caseína y

caseinatos en vinos, debido a la permanencia de estas sustancias, como consecuencia de tratamientos en las distintas etapas del procesado (Patrick et al., 2009).

También es necesario tener en cuenta que la matriz influye sobre los límites de detección que se pueden alcanzar en los productos procesados, lo que depende de una serie de parámetros tales como el contenido graso, la intensidad del tratamiento térmico, el estado de maduración del alimento, etc. por lo que pueden variar de un producto a otro.

Actualmente, se pueden encontrar disponibles en el mercado diversos kits ELISA desarrollados por distintas casas comerciales, destinados a la detección de residuos de leche en todo tipo de alimentos. Estos sistemas ELISA diseñados en formato directo o ELISA sándwich, utilizando anticuerpos frente a β -LG y/o caseínas, aseguran la detección de proteínas nativas y proteínas procesadas de la leche y declaran límites de detección del orden de 0,2 a 1 ppm. Aunque sería conveniente tener en cuenta que estos métodos estén correctamente contrastados. No obstante, actualmente los métodos de ELISA son los más recomendables para ser usados por la industria alimentaria. Las razones son que es una técnica: i) rápida; ii) de bajo coste; iii) no requiere personal altamente cualificado; iv) su sensibilidad es muy alta (0,2-1 ppm) y v) su especificidad es elevada.

Métodos de inmunolectroforesis “Inmunoblotting”

Otros métodos inmunoquímicos que incluyen la separación electroforética de las proteínas de los alimentos han sido también utilizados en la detección de residuos de proteínas lácteas en alimentos. Están basados en la separación electroforética de las proteínas alergénicas en geles de poliácridamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), bien, de acuerdo a su peso molecular (geles 1D) o simultáneamente de acuerdo a su peso molecular y a su punto isoelectrónico (geles 2D). Las proteínas una vez separadas son transferidas a una membrana de nitrocelulosa o polivinilpirrolidona y, posteriormente, revelado por inmunodetección mediante la incubación de la membrana con anticuerpos específicos monoclonales. Estos sistemas tienen como ventaja la capacidad de separar y revelar los componentes proteicos tanto en alimentos crudos como ligeramente cocinados, además la separación de las proteínas garantiza una mayor especificidad del método cuando analizamos muestras complejas. Sin embargo, la aplicación de estos métodos en alimentos fuertemente termostatizados o en productos esterilizados no es muy eficiente, ya que en ellos las proteínas se encuentran desnaturizadas y formando agregados, lo que dificulta su separación. Además, el desplegado proteico causado por el SDS en la técnica PAGE puede ocasionar la pérdida conformacional de los epítomos; esto representa una desventaja que unida a la dificultad que conlleva la realización de esta técnica, hace que en estos momentos no sea considerado un método de elección para su aplicación a los análisis rutinarios. Sin embargo, podemos encontrar publicaciones sobre su utilización como, el estudio de antígenos y alérgenos de la leche (Kim et al., 2002), y la comparación de métodos *immunoblotting* y ELISA para la detección de residuos de caseína en vinos (Patrick et al., 2009).

La transferencia *blotting* después de isoelectroenfoque (IEF), puede también utilizarse en la detección de alérgenos. En esta técnica, las proteínas se separan en geles de agarosa por IEF y una vez transferidas a membranas se sondan utilizando técnicas de inmunodetección. En contraste con el SDS-PAGE, esta técnica sí preserva la conformación de los epítomos. Estos sistemas se utilizaron para

la detección de alérgenos alimentarios (leche y del huevo), utilizando sueros humanos (Demeulemester et al., 1997).

Rocket Inmunoelectroforesis (RIE)

Este método inmunoelectroforético se basa en la aplicación de la corriente eléctrica a la inmunodifusión simple, obteniéndose resultados que se pueden cuantificar. Los anticuerpos se añaden sobre un medio gelificado que se somete a un campo eléctrico, perpendicularmente al sentido de la corriente eléctrica, sobre el que se disponen pocillos que contienen las muestras problema. La difusión electroforética del antígeno a través del gel que contiene el anticuerpo permite la aparición de líneas de precipitado en forma de conos o cohetes. La distancia entre el pocillo y la punta del cono (altura del cohete) es directamente proporcional al logaritmo de la concentración del antígeno presente en la muestra.

El método RIE fue utilizado para detectar la presencia de caseína en guantes de látex de caucho natural. La caseína se utiliza como estabilizador en la producción de guantes de látex y puede producir alergias de contacto en individuos alérgicos a las proteínas de la leche (Ylitalo et al., 1999).

En 2003 se desarrolló un método RIE utilizando un antisuero anticaseína, disponible comercialmente. Con este método, se consiguió la cuantificación de cantidades desconocidas de caseína en muestras de alimentos como resultado de establecer una correlación lineal entre la altura de los precipitados de los obtenidos y la cantidad de caseína aplicada (Moen et al., 2003). En este estudio, mediante la técnica RIE se alcanzó un límite de detección de 10 ppm para la caseína y se describió como una técnica menos cara que los kits comerciales de ELISA. A pesar de sus posibilidades, la RIE es una técnica que requiere mucho tiempo y anticuerpos de alta calidad, y que necesita, igualmente personal entrenado y especializado en este campo, por lo que no se considera un método práctico para su aplicación a la industria alimentaria.

Tiras de flujo lateral

El ensayo mediante las tiras de flujo lateral es una versión simplificada del ELISA con una tira membranosa generalmente, de nitrocelulosa, *nylon* o polivinildifluorido en la que se fijan los inmunorreactivos, antígenos o anticuerpos y sobre la que posteriormente se aplican los reactivos que van a reaccionar inmunológicamente. Estos métodos son muy sencillos en cuanto a su manejo y puede interpretarse visualmente o de una forma semicuantitativa, por ejemplo, mediante un densitómetro.

Durante la última década son muchos los sistemas desarrollados para la detección de los distintos alérgenos y existen disponibles en el mercado sistemas para la detección de otros alérgenos alimentarios como gluten, avellana y cacahuete (Hsiao-Wei et al., 2005) (Martin-Röder et al., 2009). La finalidad de estos sistemas, es su utilización como sistemas cualitativos de detección, debido a su rapidez y facilidad de manejo. Actualmente, se están desarrollando estos sistemas como indicadores de posibles contaminaciones en las instalaciones industriales.

Microarrays

El avance en el desarrollo de los sistemas *microarrays* se ha visto conducido por la necesidad del desarrollo de nuevas tecnologías, rápidas y sensibles y que necesiten la menor cantidad de muestra. Los *microarrays* consisten en microchips de reducidas dimensiones en los que se han inmovilizado

elementos moleculares específicos (por ejemplo, anticuerpos específicos a ciertos alérgenos o proteínas marcadoras de alimentos) mediante microimpresión o microinstrucción, formando una superficie conocida. Tras poner en contacto dicha superficie con los anticuerpos específicos, estos se fijan a los componentes y posteriormente se detectan revelando con precisión el perfil obtenido. Distintos sistemas de lectura, análisis de datos y *software* de procesamiento de imagen están disponibles para varias técnicas dependiendo del uso analítico de *microarray*.

El desarrollo de la tecnología de los *arrays* ha supuesto un gran avance en el diagnóstico de las alergias alimentarias, sobre todo, en el conocimiento de la reactividad cruzada entre alérgenos y de la selectividad de las sensibilizaciones, ya que es posible un análisis múltiple y rápido de los productos alergénicos de los alimentos (Talapatra et al., 2002) (Moreno-Bondi et al., 2003). Por el momento es impensable su uso de forma estandarizada por la industria alimentaria.

Harwanegg et al. (2007) han desarrollado un sistema de *microarrays* para el diagnóstico de IgE específica frente a proteínas de leche y de huevo basado en un *multiplex* biochip inmunoensayo.

Esta técnica, también asociada a la detección por infrarrojos, ha sido utilizada para el estudio de los principales alérgenos de la leche (Gaudin et al, 1991).

Biosensores

Una de las tecnologías emergentes en las últimas décadas ha sido la utilización de biosensores. Los biosensores son dispositivos de análisis compactos que incorporan un elemento de reconocimiento, biológico o biomimético, asociado a un sistema de transducción que permite amplificar y registrar en tiempo real la señal producida por la interacción específica entre el elemento de reconocimiento y el analito. La molécula diana (proteína o fragmento de ADN) es inmovilizada sobre la superficie de un sensor, la actividad producida como consecuencia de la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito puede ser medida cuantitativamente. Existen distintos tipos de traductores y su elección se hace en función de cual sea la variación en las propiedades físico-químicas que se produzcan como consecuencia de la interacción entre el analito y el elemento de reconocimiento. Los principales tipos son electroquímicos (detectan cambios en el potencial o pH), ópticos (variaciones en la resonancia de absorción (REA)), fluorescencia, luminiscencia o transductores de resonancia de plasmones superficiales (SPR), ondas de evanescencia, acústicos, termométricos y nanomecánicos.

En los últimos años se ha producido un incremento en la aplicación de biosensores al análisis de alimentos y, concretamente, en la detección de alérgenos. En 2006, Malmheden Yman et al. describen el desarrollo de un biosensor para ser utilizado con sistemas de enzimoimmunoensayo directo y sándwich para la detección de proteínas de leche y otros alérgenos como cacahuete, mariscos y sésamo en muestras de alimentos.

Un biosensor óptico basado en REA con un inmunoensayo directo fue desarrollado, como un sistema rápido de detección de B-LG en matrices de alimentos, por Hohensinner et al. en 2007.

2. Técnicas no inmunológicas

Espectrometría de masas

El desarrollo de la espectrometría de masas ha jugado un papel fundamental en el estudio e identificación de las proteínas mediante el empleo del denominado "mapeo de masas" o huella

peptídica, englobada en el área denominada como proteómica. Es el método más utilizado hasta el momento en estudios de proteómica debido a su compatibilidad con el análisis de mezclas, su extensa aplicabilidad y la relativa sencillez de interpretación de los resultados.

Actualmente, existe una potente herramienta no inmunológica (la espectrometría de masas, MALDI/TOF-MS) que, a diferencia de los métodos ELISA y otros métodos inmunológicos, permite identificar proteínas alergénicas sin necesidad de utilizar anticuerpos específicos frente a ellas. La tecnología MALDI/TOF-MS (espectrometría de masas por tiempo de vuelo con desorción e ionización con láser asistida por matriz) es una herramienta no inmunológica fiable para la detección de alérgenos en los alimentos. El método se basa en la comparación de los perfiles de las proteínas extraídas del alimento frente a los perfiles característicos (espectros de masas) de las diferentes proteínas extraídas de estándares del alérgeno. Mediante este método es posible la identificación y cuantificación del alérgeno en alimentos. El método es rápido, el manejo e interpretación rutinarios de los espectros es relativamente sencillo, la manipulación de la muestra fácil y reproducible y el costo del análisis es bajo. Sin embargo, el equipo es costoso, no accesible a cualquier laboratorio y requiere instalaciones amplias, siendo complejo el proceso de elaboración de librerías de perfiles de espectros y la calibración del equipo.

Sistema de cromatografía líquida-espectrometría de masas en tandem (cuádruplo-cuádruplo-tiempo de vuelo)

En los últimos años, el proceso de análisis en proteómica implica una sistemática de acuerdo a la cual una mezcla inicial de proteínas es separada mediante electroforesis en geles de una o dos dimensiones; posteriormente, el gel se digiere con tripsina y, por último, el digerido se analiza directamente mediante espectrometría de masas. En la mayoría de los casos, el digerido se suele analizar empleando una única técnica de ionización, siendo la ionización de electrospray (ESI) o la ionización por desorción con láser asistida por una matriz (MALDI) las más utilizadas, por tratarse de ionizaciones de tipo suave. Sin embargo, esta técnica puede verse afectada puntualmente por efectos de supresión, limitando el número de péptidos identificados en una muestra. Por ello, además de la ionización suave de un sistema de espectrometría de masas adecuado a estudios de proteómica, también se requiere la posibilidad de poder inducir fragmentaciones superiores que posibiliten el análisis de secuencias peptídicas. En este sentido, la información secuencial producida por el MALDI mediante PSD se ve superada por el empleo de ESI, o *nanospray* que acoplada a un espectrómetro de masas híbrido de cuadrupolo-cuadrupolo-tiempo de vuelo ortogonal produce una información secuencial de mejor calidad. Además, es capaz de detectar péptidos que han podido quedar suprimidos en los espectros de MALDI, lo que resulta ideal en los estudios de proteómica.

Podemos encontrar la aplicación de estas metodologías en el campo analítico de los alérgenos de la leche, en estudios para la detección y cuantificación de las proteínas del suero (Hubber y Premstaller, 1999), el sistema de cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas utilizando ionización por *nanoelectrospray* con cuadrupolo tiempo de vuelo para la detección de caseína en alimentos (Weber et al. 2006), o un método desarrollado de espectrometría de masas, utilizando extracción en fase sólida para detectar trazas de alérgenos de leche en muestras de zumos de frutas (Monaci y Van Hengel, 2008).

3. Técnicas basadas en la detección de ADN

Como alternativa a los métodos de detección de las proteínas alergénicas, se pueden utilizar métodos basados en la detección de dianas que no poseen potencial alergénico, pero que podrían servir como marcadores indirectos para la detección de ingredientes alergénicos en productos alimentarios.

Se han descrito métodos para la detección de ADN de leche mediante PCR en productos alimentarios, pero sobre todo los métodos de biología molecular se han utilizado para la identificación de la procedencia de la leche entre las distintas especies (Plath et al., 1997).

Así pues, los métodos de PCR pueden ser considerados una herramienta para la detección de la presencia de leche en mezclas de alimentos, pero en la práctica no están adaptados para la detección de los alérgenos de la leche. Por tanto, su aplicación para este fin es cuestionable, primero por la posibilidad de aparición de falsos positivos ya que, por ejemplo, la presencia de carne de vaca podría ocasionar reacciones de amplificación y segundo debido a que muchos productos contienen sólo fracciones concentradas y/o purificadas de la leche, como proteína o grasas, lo que podrían llevar a la obtención de resultados negativos en el análisis por PCR (Poms y Anklam, 2004).

A pesar de estos inconvenientes, actualmente algunas casas comerciales han desarrollado kits comerciales para la detección de alérgenos, entre ellos de leche, mediante PCR en alimentos, los cuales son de utilidad cuestionable.

Conclusiones del Comité Científico

1. Las trazas de proteínas lácteas pueden desencadenar reacciones alérgicas de potencial gravedad en las personas sensibilizadas a las mismas. Así pues se hace necesario utilizar unos métodos de análisis adecuados que permitan detectar un nivel mínimo de presencia de proteínas lácteas.
2. En la actualidad existen numerosos métodos para la detección de alérgenos lácteos.
3. De todos ellos los más recomendables para ser usados, en la actualidad, por la industria alimentaria son los métodos de ELISA. Las razones son que es una técnica: i) rápida; ii) de bajo coste; iii) no requiere personal altamente cualificado; iv) su sensibilidad es muy alta (0,2-1 ppm) y v) su especificidad es elevada. No obstante, es conveniente tener siempre en cuenta que los kits de ELISA empleados estén correctamente contrastados.
4. El hecho de disponer de tecnologías que permiten medir la presencia de trazas de proteínas lácteas no asegura la ausencia de problemas.

Referencias

- Adams, S.L., Barnett, D., Walsh, B.J., Pearce, R.J., Hill, D.J. y Howden, M.E. (1991). Human IgE-binding synthetic peptides of bovine beta-lactoglobulin and alpha-lactalbumin. In vitro cross-reactivity of allergens. *Immunology and Cell Biology*, 69, pp: 191-197.
- AESAN (2007). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición sobre Alergias Alimentarias. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 5, pp: 19-76. Disponible en: http://www.aesan.msps.es/AESAN/web/publicaciones_estudios/subdetalle/revista_aesan_5.shtml [acceso: 10-9-10].
- Allen, K.J., Davidson, G.P., Day, A.S., Hill, D.J., Kemp, A.S., Peake, J.E., Prescott, S.L., Shugg, A., Sinn, J.K. y Heine,

- R.G. (2009). Management of cow's milk protein allergy in infants and young children: an expert panel perspective. *Journal of Paediatrics and Child Health*, 45, pp: 481-486.
- Ball, G., Shelton, M.J., Walsh, B.J., Hill, D.J., Hosking, C.S. y Howden, M.E. (1994). A major continuous allergenic epitope of bovine betalactoglobulin recognized by human IgE binding. *Clinical and Experimental Allergy*, 24, pp: 758-764.
- Bernhisel-Broadbent, J., Yolken, R.H. y Sampson, H.A. (1991). Allergenicity of orally administered immunoglobulin preparations in food-allergic children. *Pediatrics*, 87, pp: 208-214.
- Besler, M., Steinhart, H. y Paschke, A. (2001). Stability of food allergens and allergenicity of processed foods. *Journal of Chromatography*, 756, pp: 207-228.
- Bollinger, M.E., Dahlquist, L.M., Mudd, K., Sonntag, C., Dillinger, L. y McKenna, K. (2006). The impact of food allergy on the daily activities of children and their families. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 96, pp: 415-421.
- Boyano-Martínez, T., García-Ara, C., Pedrosa, M., Díaz-Pena, J.M. y Quirce, S. (2009). Accidental allergic reactions in children allergic to cow's milk proteins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123, pp: 883-838.
- Bruni, F.M., Piacentini, G.L., Peroni, D.G., Bodini, A., Fasoli, E. y Boner, A.L. (2009). Cow's milk allergic children can present sensitisation to probiotics. *Acta Paediatrica*, 98, pp: 321-323.
- Burks, A.W., Laubach, S. y Jones, S.M. (2008). Oral tolerance, food allergy and immunotherapy: implications for future treatment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121, pp: 1344-1350.
- Codreanu, F., Morisset, M., Cordebar, V., Kanny, G. y Moneret-Vautrin, A. (2006). Risk of allergy to food proteins in topical medicinal agents and cosmetics. *Allergy and Immunology*, 38, pp: 126-130.
- De Luis, R., Lavilla, M., Sánchez, L., Calvo, M. y Pérez, M.D. (2009). Development and evaluation of two ELISA formats for the detection of β -lactoglobulin in model processed and commercial foods. *Food Control*, 43, pp: 235-246.
- Demeulemester, C., Leduc, V., Polack, B., Huneau, J.F., Le Guern, L., Guizard, C. y Peltre, G. (1997). Antigenes et allergenes de lait, de blanc d'oeuf, de soja. 2 - Dans les produits carnés. *Annales des Falsifications de l'Expertise Chimique et Toxicologique*, M9 (940), pp: 235-246.
- Fenaille, F., Parisod, V., Tabet, J.C. y Guy, P.A. (2005). Carbonylation of milk powder proteins as a consequence of processing conditions. *Proteomics*, 5, pp: 3097-3104.
- Fox, P.F. y McSweeney, P.L.H. (2003). *Advanced Dairy Chemistry. Vol. 2: Proteins*. Nueva York. Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Frémont, S., Kanny, G., Bieber, S., Nicolas, J.P. y Moneret-Vautrin, D.A. (1991). Identification of a masked allergen, α -lactalbumin, in baby-food cereal flour guaranteed free of cow's milk protein. *Allergy*, 51, pp: 749-754.
- García-Ara, M.C., Boyano, M.T., Díaz Pena, J.M., Martín Muñoz, F., Pascual, C., García Sánchez, G. y Martín Esteban, M. (2003). Incidencia de alergia a leche de vaca y su repercusión en el consumo de hidrolizados. *Anales de Pediatría*, 58, pp: 100-105.
- García-Ara, M.C., Boyano, M.T., Díaz Pena, J.M., Martín Muñoz, M.F. y Martín Esteban, M. (2004). Cow's milk-specific immunoglobulin E levels as predictors of clinical reactivity in the follow-up of the cow's milk allergy infants. *Clinical and Experimental Allergy*, 34, pp: 866-870.
- Gaudin, J.C., Rabesona, H., Choiset, Y., Yeretssian, G., Chobert, J.M., Sakanyan, V., Drouet Gern, J.E., Yang, E., Evrard, H.M. y Sampson, H.A. (1991). Allergic reactions to milk contaminated "nondairy" products. *The New England Journal of Medicine*, 324, pp: 976-979.
- Gern, J.E., Yang, E., Evrard, H.M. y Sampson, H.A. (1991). Allergic reactions to milk-contaminated "nondairy" products. *The New England Journal of Medicine*, 324 (14), pp: 976-979.
- Giovannacci, I., Guizard, C., Carlier, M., Duval, V., Martin, J.L. y Demeulemester, C. (2004). Species identification of meat products by ELISA. *The International Journal of Food Science & Technology*, 39, pp: 863-867.
- Harwanegg, C., Hutter, S. y Hiller, R. (2007). Allergen microarrays for the diagnosis of specific IgE against

- components of cow's milk and egg in a multiplex biochip-based immunoassay. *Methods in Molecular Biology*, 385, pp: 145-157.
- Hefle, S.L. y Lambrecht, D.M. (2004). Validated sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for casein and its application to retail and milk-allergic complaint foods. *Journal of Food Protection*, 67, pp: 1933-1938.
- Hohensinner, V., Maier, I. y Pittner, F. (2007). A 'gold cluster-linked immunosorbent assay': Optical near-field biosensor chip for the detection of allergenic β -lactoglobulin in processed milk matrices. *Journal of Biotechnology*, 130, pp: 385-388.
- Hsiao-Wei, W., Wlodzimierz, B.W., DeCory, T.R. y Durst, R.A. (2005). Development of a competitive liposome-based lateral flow assay for the rapid detection of the allergenic peanut protein Ara h1. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382, pp: 1217-1216.
- Huber, C.G. y Premstaller, A. (1999). Evaluation of volatile eluents and electrolytes for high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry and capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry of proteins. I. Liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 849, pp: 161-173.
- Huppertz, T. y Kelly, A.L. (2009). Properties and constituents of cow's milk. En libro: A.Y. Tamime, Ed., *Milk Processing and Quality Management*. Nueva Delhi, India: Blackwell Publishing.
- Järvinen, K.M., Beyer, K., Vila, L., Chatchatee, P., Busse, P.J. y Sampson, H.A. (2002). B-cell epitopes as a screening instrument for persistent cow's milk allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 110, pp: 293-297.
- Järvinen, K.M., Sicherer, S.H., Sampson, H.A. y Nowak-Węgrzyn, A. (2008). Use of multiple doses of epinephrine in food-induced anaphylaxis in children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 122, pp: 133-138.
- Johansson, S.G., Hourihane, J.O. y Bousquet, J. (2001). A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy*, 56, pp: 813-824.
- Johansson, S.G., Bieber, T. y Dahl, R. (2004). Revised nomenclature for allergy for global use: report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, 2003. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113, pp: 832-836.
- Juárez, M. (1985). Composición y factores de variabilidad de la leche. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 4, pp: 47-56.
- Kim, T.E., Park, S.W., Noh, G. y Lee, S. (2002). Comparison of skim prick test results between crude allergen extracts from foods and commercial allergen extracts in atopic dermatitis by double-blind placebo-controlled food challenge for milk, egg, and soybean. *Yonsei Medical Journal*, 43, pp: 613-620.
- Kohno, Y., Honma, K., Saito, K., Shimojo, N., Tsunoo, H., Kaminogawa, S. y Niimi, H. (1994). Preferential recognition of primary protein structures of alpha-casein by IgG and IgE antibodies of patients with milk allergy. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 73, pp: 419-422.
- Larramendi, C.H., Marco, F.M., García-Abujeta, J.L., Mateo, M., de la Vega, A. y Sempere, J.M. (2006). Acute allergic reaction to an iron compound in a milk-allergic patient. *Pediatric Allergy and Immunology*, 17, pp: 230-233.
- MacDougall, C.F., Cant, A.J. y Colver, A.F. (2002). How dangerous is food allergy in childhood? The incidence of severe and fatal allergic reactions across the UK and Ireland. *Archives of Disease in Childhood*, 86, pp: 236-239.
- Mäkinen-Kiljunen, S. y Palosuo, T. (1992). A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for determination of bovine β -lactoglobulin in infant feeding formulas and in human milk. *Allergy*, 47, pp: 347-352.
- Malmheden-Yman, I., Eriksson, A., Johansson, M.A. y Hellenas, K.E. (2006). "Food Allergen Detection with Biosensor Immunoassay" *The Journal of AOAC International*, 89 (3), pp: 856-861.
- Martelli, A., De Chiara, A., Corvo, M., Restani, P. y Fiocchi, A. (2002). Beef allergy in children with cow's milk allergy; cow's milk allergy in children with beef allergy. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 89, pp: 38-43.
- Martin-Röder, S., Vieths, S. y Holzauser, T. (2009). Commercial lateral flow devices for rapid detection of peanut (*Arachis hypogaea*) and hazelnut (*Corylus avellana*) cross-contamination in the industrial production of cookies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395, pp: 103-109.

- Martins, P., Borrego, L.M., Pires, G., Pinto, P.L., Afonso, A.R. y Rosado-Pinto, J. (2005). Sheep and goat's milk allergy-a case study. *Allergy*, 60, pp: 130-131.
- Matsuda, R., Yoshioka, Y., Akiyama, H., Aburatani, K., Watanabe, Y., Matsumoto, T., Morishita, N., Sato, H., Mishima, T., Gamo, R., Kihira, Y. y Maitani, T. (2007). Interlaboratory Evaluation of Two Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kits for the Detection of Egg, Milk, Wheat, Buckwheat, and Peanut in Foods. *The Journal of AOAC International*, 89, pp: 856-861.
- Moen, L.H., Plassen, C., Miller, I., Gutleb, A.C. y Egaas, E. (2003). Rocket immunoelectrophoresis (RIE) as a tool to identify trace amounts of casein in food-an old method that out passes a modern commercial ELISA. XXII Congreso de la Academia Europea de Alergología e Inmunología Clínica; Paris, June 7-11, 603.
- Monaci, L., Tregoeat, V., Van Hengel, A.J. y Anklam, E. (2003). Milk allergens, their characteristics and their detection: A review. *European Food Research and Technology*, 223, pp: 149-179.
- Monaci, L. y Van Hengel, A.J. (2008). Development of a method for the quantification of whey allergen traces in mixed-fruit juices based on liquid chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1192, pp: 113-120.
- Moneret-Vautrin, D.A. y Kanny, G. (2004). Update on threshold doses of food allergens: implications for patients and the food industry. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 4, pp: 215-219.
- Moreno-Bondí, M.C., Alaire, J.P. y Vo-Dinh, T. (2003). Multi-analyte analysis system using an antibody-based biochip. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 375, pp: 120-124.
- Nowak-Węgrzyn, A., Conover-Walker, M. y Wood, R.A. (2001). Food-Allergic Reactions in Schools and Preschools. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 155, pp: 790-795.
- Paschke, A. y Besler, M. (2002). Stability of bovine allergen during food processing. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 89, pp: 16-20.
- Patrick, W., Hans, S. y Angelika, P. (2009). Determination of the bovine food allergen casein in white wines by quantitative indirect ELISA, SDS-PAGE, Western blot and immunostaining. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, pp: 8399-8405.
- Peláez Lorenzo, C., Díez-Masa, J.C., Vasallo, I. y de Frutos, M. (2010). Development of an optimized ELISA and a sample preparation method for the detection of beta-lactoglobulin traces in baby foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, pp: 1664-1671.
- Plath, A., Krause, I. y Einspanier, R. (1993). Species identification in dairy products by three different DNA-based techniques. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung*, 14, pp: 437-441.
- Poms, R.L. y Anklam, E. (2004). Polymerase Chain Reaction Techniques for Food Allergen Detection. *Journal of AOAC International*, 87, pp: 1391-1397.
- Real Decreto 1334/1999, de 31 de julio, por el que se aprueba la Norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios. BOE 202 de 24 de agosto de 1999, pp: 31410-31418.
- Real Decreto 1245/2008, de 18 de julio, por el que se modifica la norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios, aprobada por el Real Decreto 1334/1999, de 31 de julio. BOE 184 de 31 de julio de 2008, pp: 32976-32978.
- Restani, P., Velonà, T., Plebani, A., Ugazio, A.G., Poesi, C., Muraro, A. y Galli, C.L. (1995). Evaluation by SDS-PAGE and immunoblotting of residual antigenicity in hydrolysed protein formulas. *Clinical and Experimental Allergy*, 25, pp: 651-658.
- Roberts, G., Patel, N., Levi-Schaffer, F., Habibi, P. y Lack, G. (2003). Food allergy as a risk factor for life-threatening asthma in childhood: a case-controlled study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 112, pp: 168-174.
- Rona, R.J., Keil, T., Summers, C., Gislason, D., Zuidmeer, L., Sodergren, E., Sigurdardottir, S.T., Lindner, T., Goldhahn, K., Dahlstrom, J., McBride, D. y Madsen, C. (2007). The prevalence of food allergy: a meta-analysis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120, pp: 638-646.
- Roth-Walter, F., Berin, M.C., Arnaboldi, P., Escalante, C.R., Dahan, S., Rauch, J., Jensen-Jarolim, E. y Mayer, L.

- (2008). Pasteurization of milk proteins promotes allergic sensitization by enhancing uptake through Peyer's patches. *Allergy*, 63, pp: 882-890.
- Sampson, H.A. y Anderson, J.A. (2000). Summary and recommendations: Classification of gastrointestinal manifestations due to immunologic reactions to foods in infants and young children. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 30, pp: 87-94.
- Sanz, J., Martorell, A., Michavila, A., Nieto, A. y Grupo de Trabajo para Alergia Alimentaria. (2001). Estudio de la incidencia mediada por IgE frente a la proteína de leche de vaca en el primer año de vida. *Anales de Pediatría*, 53, pp: 536-539.
- Sletten, G.B., Lovberg, K.E., Moen, L.H., Skarpeid, H.J. y Egaas, E. (2005). A comparison of time-resolved fluoroimmunoassay and ELISA in the detection of casein in foodstuffs. *Food and Agricultural Immunology*, 16, pp: 235-243.
- Talapatra, A., Rouse, R. y Hardiman, G. (2002). Protein microarrays: challenges and promises. *Pharmacogenomics*, 3, pp: 527-536.
- Teufel, M., Biedermann, T., Rapps, N., Hausteiner, C., Henningsen, P., Enck, P. y Zipfel, S. (2007). Psychological burden of food allergy. *World Journal of Gastroenterology*, 13, pp: 3456-3465.
- UE (2000). Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de marzo de 2000, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios. DO L 109 de 6 de mayo de 2000, pp: 29-42.
- UE (2003). Directiva 2003/89/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 10 de noviembre de 2003, en lo que respecta a la indicación de los ingredientes presentes en los productos alimenticios. DO L 308 de 25 de noviembre de 2003, pp: 15-18.
- UE (2007). Directiva 2007/68/CE de la Comisión, de 27 de noviembre de 2007, que modifica el anexo III bis de la Directiva 2000/13/EC del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que se refiere a determinados ingredientes alimentarios. DO L 310 de 28 de noviembre de 2007, pp: 11-14.
- Vanto, T., Helpplä, S., Juntunen-Backman, K., Kalimo, K., Klemola, T., Korpela, R. y Koskinen, P. (2004). Prediction of the development of tolerance to milk in children with cow's milk hypersensitivity. *Journal of Pediatrics*, 144, pp: 218-222.
- Venien, A., Leveux, D., Astier, C., Briand, L., Chobert, J.M. y Haertle, T. (1997). Production and Epitopic Characterization of Monoclonal Antibodies Against Bovine β -lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*, 80, pp: 1977-1987.
- Wal, J.M. (1998). Cow's milk allergens. *Allergy*, 53, pp: 1013-1022.
- Wal, J.M. (2004). Bovine milk allergenicity. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 93, pp: 2-11.
- Walsh, B.J., Elliot, C., Baker, R.S., Barnett, D., Burley, R.W., Hil, D.J. y Howden, M.E. (1987). Allergenic cross-reactivity of egg-white and egg-yolk proteins. An in vitro study. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*, 84, pp: 228-232.
- Walstra, P., Wouters, J.T.M. y Geurts, T.J. (2006). *Dairy Science and Technology*, Part I, 2ª ed. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Warner, J.O. (2005). European Food Labelling Legislation. A nightmare for food manufacturers and allergy sufferers alike. *Pediatric Allergy and Immunology*, 16, pp: 1-2.
- Weber, D., Raymond, P., Ben-Rejeb, S. y Lau, B. (2006). Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method using capillary liquid chromatography and nanoelectrospray ionization-quadrupole time-of-flight hybrid mass spectrometer for the detection of milk allergens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, pp: 1604-1610.
- Ylitalo, L., Mäkinen-Kiljunen, S., Turjanmaa, K., Palosuo, T. y Reunala, T. (1999). Cow's milk casein, a hidden allergen in natural rubber latex gloves. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 104, pp: 177-180.
- Zapatero, L., Alonso, E., Fuentes, V. y Martínez, M.I. (2008). Oral desensitization in children with cow's milk allergy. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 8, pp: 389-96.

Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación al efecto de la reducción de la sal en la seguridad microbiológica de los productos cárnicos curados

Miembros del Comité Científico

Andreu Palou Oliver, Juan José Badiola Díez, Arturo Anadón Navarro, Albert Bosch Navarro, Juan Francisco Cacho Palomar, Ana María Cameán Fernández, Alberto Cepeda Sáez, Lucas Domínguez Rodríguez, Rosaura Farré Rovira, Manuela Juárez Iglesias, Francisco Martín Bermudo, Manuel Martín Esteban, Albert Más Barón, Teresa Ortega Hernández-Agero, Andrés Otero Carballeira, Perfecto Paseiro Losada, Daniel Ramón Vidal, Elías Rodríguez Ferri, M^a Carmen Vidal Carou, Gonzalo Zurera Cosano

Secretario

Jesús Campos Amado

Número de referencia: AESAN-2010-010

Documento aprobado por el Comité Científico en su sesión plenaria de 28 de septiembre de 2010

Grupo de Trabajo

Gonzalo Zurera Cosano (Coordinador)

Andrés Otero Carballeira

Elena Carrasco Jiménez (C. Externa)

Fernando Pérez Rodríguez (C. Externo)

Antonio Valero Díaz (C. Externo)

59

revista del comité científico nº 13

Resumen

El plan de reducción del consumo de sal a través de los alimentos constituye actualmente uno de los principales retos planteados por los distintos Estados miembros de la Unión Europea (UE) debido al aumento progresivo de la incidencia de enfermedades cardiovasculares en la población. En el caso de España, la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) inició en 2008 un plan de reducción con unos objetivos concretos que permitieran pasar progresivamente de la ingesta actual de 9,7 g/día a una ingesta inferior a 8,0 g/día en el año 2014. Entre las distintas categorías de alimentos identificadas que contribuyen en mayor medida a la ingesta de sal en la dieta, se encuentran los productos cárnicos curados. Sin embargo, dichos productos poseen en líneas generales un complejo sistema de conservación que hace que la reducción de su contenido en sal tenga que ser evaluada y gestionada de forma individual, ya que podrían producirse modificaciones organolépticas, tecnológicas y, especialmente, microbiológicas como consecuencia de la reducción de sal en la formulación del producto. En el presente informe se pretende dar respuesta al impacto de la reducción de un 20% del contenido en sal (NaCl) sobre la seguridad microbiológica de productos cárnicos curados. Para abordar el problema se recurrió a la aplicación de modelos de predicción del comportamiento de los microorganismos patógenos de interés, seleccionados en función de sus posibilidades de crecer bajo las condiciones más permisivas que puedan presentarse en estos productos cárnicos (baja concentración de sal y elevada a_w). Se cuantificó el efecto de la reducción de sal en el comportamiento de los patógenos seleccionados a partir de comparación entre las tasas de crecimiento y fases de latencia, obtenidas de modelos predictivos existentes, bajo distintas condiciones de temperatura (4, 7, 10, 15 y 25 °C), pH (5,0; 6,0 y 7,0) y % de NaCl en fase acuosa (2,0; 4,0; 6,0 y 8,0) con y sin reducción del 20% del contenido de sal. Para valorar el impacto de la reducción, se propone como índice el tiempo de incremento o t_{inc} , definido como el tiempo necesario para que una población microbiana aumente en n unidades logarítmicas. La sensibilidad de los distintos patógenos a la reducción de sal en

los productos estudiados viene dada por la relación entre el porcentaje de sal añadida en fase acuosa y el porcentaje de reducción del t_{inc} al reducir la sal en el producto un 20%.

Los resultados mostraron que los patógenos más sensibles a las modificaciones de la concentración de sal fueron *Clostridium botulinum* proteolítico de entre los patógenos anaerobios obligados, y *Yersinia enterocolitica* de entre los patógenos aerobios facultativos. Se concluye que el riesgo microbiológico podría incrementarse si no se realiza un adecuado ajuste de otros factores estabilizadores. Para dicho ajuste, se discuten las posibles medidas de gestión de la seguridad microbiológica a aplicar en los productos cárnicos con sal reducida, como la modificación de las condiciones de procesado y almacenamiento y la sustitución total o parcial del NaCl con otras sales u otros agentes antimicrobianos. En definitiva, la magnitud del efecto de una reducción de sal en productos cárnicos es difícil de cuantificar, por lo que en la aplicación de modelos de predicción junto con la realización de ensayos de inoculación, se hacen necesarios para demostrar que la formulación ensayada dará como resultado un producto seguro durante su vida comercial.

Palabras clave

Reducción sal, dieta, productos cárnicos curados, riesgo microbiológico, seguridad alimentaria.

Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) in relation to the effect of salt reduction on the microbiological safety of cured meat products.

Abstract

The plan to reduce salt consumption through food intake is currently one of the main challenges posed by the different EU Member States due to the gradual increase in the incidence of cardiovascular diseases among the general population. In the case of Spain, in 2008 the Spanish Food Safety and Nutrition Agency (AESAN) started a salt reduction plan with certain specific goals enabling intake to go down gradually from the current value of 9.7 g/day to an intake of less than 8.0 g/day by 2014. The various categories of foodstuffs identified as contributing the most to salt intake through the diet include cured meat products. However, generally speaking, these products have a complex conservation system that means that any reduction in their salt content has to be evaluated and managed individually, as there might be organoleptic, technological and, in particular, microbiological modifications as a consequence of reducing the amount of salt in the product's formulation. The present report attempts to respond to the impact of a 20% reduction in the salt (NaCl) content on the microbiological safety of cured meat products. In order to deal with this problem, resource was had to the application of models to predict the behaviour of the pathogens of interest, selected on the basis of their potential for growing in the more permissive conditions that might arise in the said meat products (low concentration of salt and raised a_w). The effect of a salt reduction on the behaviour of the selected pathogens was quantified by comparing the growth rates and latency phases obtained from the models existing in Combase Predictor under different temperature conditions (4, 7, 10, 15 and 25 °C), pH (5.0, 6.0 and 7.0) and the % of NaCl in the aqueous phase (2.0, 4.0, 6.0 and 8.0%)

with and without the 20% reduction in the salt content. Proposals for an index to assess the impact of reducing salt content include incremental time or t_{inc} , defined as the time needed for a microbial population to increase by n logarithmic units. The sensitivity of the various pathogens to salt reduction in the products studied is given by the relationship between the percentage of salt added in aqueous phase and the percentage reduction in t_{inc} when salt in the product is reduced by 20%.

The results showed that the pathogens most sensitive to modifications in salt concentration were proteolytic *Clostridium botulinum* among obligatory anaerobic pathogens and *Yersinia enterocolitica* among the optional aerobic pathogens. It is concluded that the microbiological risk might increase unless an adequate adjustment is made to other stabilizing factors. For this adjustment, we discuss the possible microbiological safety management measures to be applied to meat products with reduced salt, such as alterations in their processing and storage conditions and the total or partial replacement of NaCl by other salts or other anti-microbial agents. In short, the magnitude of the effect of a salt reduction in meat products is difficult to quantify, therefore, the application of prediction models together with the performance of inoculation assays are necessary to demonstrate that the formulation assayed will result in a product that is safe throughout its commercial life.

Key words

Salt reduction, diet, cured meat products, microbiological risk, food safety.

Introducción

En su informe de salud del año 2002, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que aproximadamente el 62% de las enfermedades cerebro-vasculares y el 49% de la enfermedad isquémica cardiaca era atribuible a la presión arterial elevada (Presión arterial sistólica >115 mmHg.). En España, la mortalidad directamente ocasionada por la enfermedad hipertensiva ha sufrido un aumento mantenido. La prevalencia de hipertensión arterial en España en el año 2002 se estimó en torno a un 35%, aunque llegaba al 40% en edades medias y al 68% en mayores de 65 años, afectando a unos 10 millones de personas. Así, el 33% de las muertes ocurridas en España se atribuyen a enfermedades cardiovasculares (123.867 fallecimientos en 2004). Este hecho genera un aumento del gasto sanitario como consecuencia del tratamiento de enfermedades cardiovasculares. En concreto, en España el gasto está por encima de cuatro billones de euros anuales (7% del gasto sanitario global) (European Cardiovascular Disease Statistics, 2005).

Uno de los principales factores implicados en el origen de la hipertensión arterial (HTA) primaria es el excesivo consumo de sodio, que se ingiere en la dieta en forma de cloruro sódico (sal común), de manera que por cada 2,5 g de sal se ingiere 1 g de sodio. La sensibilidad al sodio puede variar de forma individual, tal como se pone de manifiesto en diferentes estudios, en los que se sugiere que el aumento de la presión arterial en pacientes afectados del síndrome metabólico, es superior en aquéllos más sensibles a la sal (Hoffmann y Cubeddu, 2007) (Chen et al., 2009), y que los procesos cardiovasculares adversos ocurren más frecuentemente en pacientes con hipertensión sensible al sodio (Morimoto et al., 1997). Por otra parte son numerosos los estudios realizados sobre los beneficios económicos, sociales y de mejora de la calidad de vida en la población, derivados de la disminución del contenido de sal en la dieta (Beaglehole et al., 2007) (Dall et al., 2009a) (Dall et al., 2009b) (Palar y Sturm 2009). Estos y otros datos han llevado a las autoridades sanitarias a considerar la reducción del contenido de sal de los alimentos como urgente (Havas et al., 2007).

Se han lanzado y reforzado varias campañas de reducción de consumo de sal para abordar cómo la población percibe tal amenaza para salud pública. La Acción Mundial en Sal y Salud (WASH) ha fijado un objetivo de reducción de la ingesta de sal en la dieta de 10-15 g/día a 5 g/día, establecido por la OMS (World Action on Salt and Health, 2009), mientras que la Administración competente en legislación alimentaria en Reino Unido, la *Food Standards Agency* (FSA), ha fijado un nivel de consumo de no más de 6 g de sal al día (Anon, 2009). En Estados Unidos, el Centro para la Ciencia y el Interés Público (CSPI) ha solicitado a la FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) la revocación del estatus de sustancia GRAS para el cloruro sódico y reclasificarla como un aditivo alimentario (FDA, 2007).

Tanto las instituciones internacionales (OMS, FAO, UE) como los gobiernos de muchos países están basando parte de sus acciones e intervenciones para la prevención de enfermedades crónicas, en medidas de prevención primaria como es la reducción de la ingesta de sal. Es necesario que ésta se lleve a cabo desde todos los enfoques posibles; el contenido medio en sal en los alimentos, la adición de sal durante la elaboración y consumo de los alimentos (entre el 70% y el 75% de la sal que tomamos no proviene de la comida preparada en casa, sino de productos elaborados), o la concienciación de los ciudadanos para poder obtener resultados satisfactorios.

Los Estados miembros se han mostrado a favor de aplicar políticas para la reducción de consumo de sal a través de la educación sanitaria y de fomentar acciones con la industria alimentaria, con vistas a reformular la composición de aquellos productos elaborados que aportan más sal a nuestra dieta. La Unión Europea (UE) ha llegado a un principio de acuerdo, para reducir en un 16% la cantidad de sal en varios grupos de productos elaborados, que son aquéllos que aportan más sal a la dieta; productos cárnicos curados, quesos y pan. La medida se basa en las evidencias científicas que relacionan el consumo de sal con la hipertensión arterial y las enfermedades cardiovasculares, así como en un informe aprobado por la Eurocámara que recomienda reducir su presencia en la dieta. Esta iniciativa, en línea con las ya iniciadas en varios países europeos con resultados positivos (Reino Unido, Finlandia, y otros), se enmarca también en la política impulsada desde la UE (DGSANCO-Comisión Europea) tanto indirectamente en el Libro Blanco de "La Estrategia para Europa sobre Nutrición, Sobrepeso y Obesidad" de la Comisión Europea, como en las recomendaciones establecidas por el Grupo de trabajo de alto nivel en nutrición y actividad física de la Comisión Europea y la DGSANCO de la Comisión, que considera prioritario abordar la reducción de sal en los países europeos con flexibilidad y respeto en su ejecución a las particularidades propias de cada Estado miembro.

En España, la AESAN se planteó a finales del año 2008 desarrollar un plan de reducción del consumo de sal en la población, con unos objetivos concretos de reducción que permitieran alcanzar progresivamente las recomendaciones de la OMS respecto de la ingesta de sal en la población de 5 g/ persona/día (AESAN, 2009). En este Plan, como objetivo intermedio entre el consumo actual (9,7 g/ persona/día) y el máximo recomendado por la OMS, se ha propuesto reducir la ingesta de sal a menos de 8,0 g/día en el año 2014.

Para hacer una propuesta ajustada a la realidad española, la AESAN consideró como primer paso imprescindible conocer la situación actual con objeto de poder evaluar posteriormente su impacto. Para ello llevó a cabo un estudio para la obtención de datos a nivel nacional relacionados con el consumo de sal en la población, con los grupos de alimentos con mayor contenido en sal y los que aportan más sodio a la dieta y tratar de conocer el consumo medio de sal en la población española y sus principales fuentes alimentarias de forma rigurosa y representativa (AESAN, 2009).

La adición de sal a los alimentos ha constituido un tema de debate en el sector industrial, siendo particularmente el sector cárnico el más afectado, dada la gran variedad de productos que contempla. En otros países, como Irlanda o Estados Unidos, los productos cárnicos procesados contribuyen en más de un 20% de la ingesta diaria de sodio (Engstrom et al., 1997). Sin embargo, llevar a cabo una reducción del contenido en sal puede tener consecuencias negativas tanto de tipo tecnológico, dado que la sal afecta a las propiedades físico-químicas y organolépticas de este tipo de productos, como de tipo higiénico-sanitario. A este respecto, la sal tiene un papel fundamental en la conservación y ampliación de la vida útil de los productos cárnicos (Desmond, 2006). La reducción del contenido en sal reduce la vida útil (Sofos, 1985) debido a la proliferación de microorganismos alterantes y/o patógenos (Whiting et al., 1984). Los trabajos científicos elaborados hasta la fecha, demuestran que es necesario realizar un estudio preliminar acerca de las implicaciones sobre la seguridad microbiológica antes de proceder a una reducción del contenido en sal, o bien, sustituirla por otros ingredientes alternativos.

Por tanto, y como una consecuencia lógica basada en el principio de cautela, el Presidente de la AESAN plantea a su Comité Científico, una consulta sobre las consecuencias derivadas de la reducción de un 20% del contenido de sal en productos cárnicos, sobre la seguridad microbiológica de estos productos.

La sal y los productos cárnicos

Aunque los componentes de la sal (cloruro sódico) son esenciales en la dieta en pequeñas cantidades, en el caso del sodio, una cantidad excesiva puede generar problemas de salud, siendo uno de los factores de riesgo que contribuyen a una presión arterial elevada y a incrementar el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares.

Aunque la sal es la mayor fuente de sodio en nuestros alimentos, el sodio es también un componente de otros ingredientes tales como el bicarbonato de sodio, utilizado en productos de panadería, nitrato sódico, nitrito sódico usados como agentes del curado en productos cárnicos, o el monoglutamato sódico utilizado como potenciador del sabor. Conocer, por tanto, la ingesta total de sodio procedente de los alimentos no es fácil. Además, existen problemas metodológicos, como es la dificultad de controlar la ingesta o la representatividad de la muestra seleccionada (Brown et al., 2009).

La ingesta media de sal por persona en España, estimada a partir de la excreción de sodio en orina de 24 horas, es de 9,7 g/día (AESAN, 2009). Del estudio realizado en España acerca de la ingesta de sodio a través de la dieta, se dedujo lo siguiente:

- El 87,5% de la población ingiere más de 5 g de sal/día.
- El 20% de la sal ingerida se añade en el cocinado/mesa.
- El 72% de la sal ingerida se encuentra en alimentos procesados (sal oculta), especialmente en:
 - Productos cárnicos curados (26,2%).
 - Pan y panes especiales (19,1%).
 - Quesos (6,7%).
 - Platos preparados (4,9%).

Estos cuatro grupos de alimentos determinan casi el 60% de la sal ingerida. Entre los alimentos en los que ha analizado el contenido en sal y en los que pretende proponer objetivos de reducción, se incluyen los productos cárnicos curados.

1. El sistema de conservación de los productos cárnicos

Para comprender la implicación de la reducción de la sal en la seguridad microbiológica de los productos cárnicos es muy importante comprender los sistemas de conservación a los que son sometidos, que dependerá del tipo de producto cárnico.

Aunque los tipos de productos cárnicos son numerosos y variados, muchos de ellos se encuadran en dos grupos de productos alimenticios ya acuñados en la terminología de los tecnólogos de los alimentos: los productos cárnicos de humedad intermedia y los productos cárnicos autoestables, que tienen características comunes y diferentes entre sí.

Un producto cárnico autoestable debe tener un $\text{pH} < 5,2$, una $a_w < 0,95$ (Boyle et al., 1993), y ser

sometido a un tratamiento térmico de pasteurización, por lo que no es necesario su almacenamiento en condiciones de refrigeración.

Con carácter general, los productos cárnicos de humedad intermedia se definen como aquellos que son estables a temperatura ambiente básicamente por reducción de su a_w . Estos productos presentan un contenido acuoso intermedio entre los frescos y los deshidratados, y no precisan de refrigeración durante su etapa de almacenamiento y distribución (Troller, 1986).

La elaboración de productos cárnicos de humedad intermedia ha constituido un excelente procedimiento de conservación de los alimentos, practicado por el hombre desde la prehistoria, consistente en reducir la disponibilidad del agua del alimento para inhibir o retardar el crecimiento de los microorganismos, asegurando su estabilidad. En los alimentos frescos la disminución de la disponibilidad del agua por parte de los microorganismos, o lo que es lo mismo, la reducción de la actividad de agua (a_w) se logra básicamente desecando parcialmente el producto y/o adicionándole determinados humectantes (deshidratación osmótica).

Aunque se han propuesto diferentes intervalos de contenido en humedad y de actividad de agua, la opinión más generalizada es la de considerar productos cárnicos de humedad intermedia a aquellos que se encuentran en el intervalo entre 0,60 y 0,90 de a_w ($< 0,60$ se corresponderían con los de humedad baja, $> 0,90$ con los de humedad alta e incluso dentro de éstos, $> 0,99$ con los de humedad muy alta) (Fernández-Salguero, 1995) (Tabla 1).

Los productos cárnicos de humedad intermedia constituyen una parte muy importante de los productos procesados consumidos por la población española, contribuyendo en un alto porcentaje a la ingesta de sodio total en la dieta. Por esta razón, son objeto de estudio en el presente informe.

Tabla 1. Cloruro sódico (%), actividad del agua (a_w) y pH de productos cárnicos de humedad intermedia españoles seleccionados

Productos	^a NaCl%	^a a_w	^b a_w	^a pH
Cecina	9,0 ± 0,2	0,859 ± 0,036	0,948	5,92 ± 0,08
Chorizo extra	3,9 ± 0,6	0,872 ± 0,041	0,939	5,33 ± 0,39
Chorizo primera	3,9 ± 0,2	0,894 ± 0,016	0,920	5,34 ± 0,49
Jamón curado	5,5 ± 0,4	0,909 ± 0,004	0,916	5,99 ± 0,13
Lomo embuchado	4,7 ± 1,0	0,883 ± 0,022	0,919	5,78 ± 0,11
Morcilla	2,9 ± 0,4	0,847 ± 0,053	0,934	5,08 ± 0,13
Morcilla de cebolla	2,3 ± 0,1	0,869 ± 0,015	0,894	6,37 ± 0,08
Morcón	4,1 ± 0,2	0,817 ± 0,055	0,908	5,35 ± 0,19
Salami extra	3,7 ± 0,6	0,887 ± 0,026	0,930	4,87 ± 0,18
Salami primera	4,0 ± 0,3	0,846 ± 0,008	0,859	5,11 ± 0,04
Salchichón extra	4,6 ± 0,4	0,879 ± 0,022	0,915	5,01 ± 0,29
Salchichón primera	4,8 ± 0,5	0,850 ± 0,068	0,962	5,43 ± 0,46
Salchichón segunda	3,9 ± 0,7	0,801 ± 0,037	0,850	4,84 ± 0,28
Salchichón tercera	4,3 ± 0,4	0,784 ± 0,040	0,862	4,83 ± 0,17
Sobrasada	2,3 ± 0,1	0,828 ± 0,004	0,835	4,72 ± 0,03

^aMedia ± desviación típica.

^b95% percentil de la distribución normal construida con la media y desviación estándar de a_w .

Adaptada de (Fernández-Salguero 1995).

Entre estos productos se pueden diferenciar tres grupos principales, los productos no picados y curados, los picados y fermentados, y los escaldados y desecados. Los productos no picados y madurados como el jamón curado, el lomo embuchado y la cecina, son estables durante el almacenamiento y distribución en función de la acción simultánea de los siguientes factores: una a_w media inferior a 0,91, que en el caso de la cecina es de 0,859, un pH inferior a 6,0 y la presencia de diferentes conservantes como son la sal y los nitritos en el jamón curado. Además, el proceso de elaboración se realiza en condiciones de refrigeración. En la cecina, además del curado intervienen los componentes del humo, y en el lomo embuchado, además de los anteriores se adicionan especias y antioxidantes como el ácido ascórbico y su sal sódica (ascorbato sódico).

En los productos picados y fermentados como el chorizo, el morcón, el salchichón, el salami y la sobrasada, la a_w oscila entre 0,894 para el chorizo primera clase hasta 0,784 en el caso del salchichón de tercera clase, encontrándose el pH en el intervalo entre 5,43 y 4,72. Además de los anteriores factores barrera participan la flora competitiva, un bajo potencial redox (Eh) y los conservantes. Las sales nitrificantes juegan un papel fundamental en la conservación y seguridad de estos productos y en algunos casos también se adicionan antioxidantes e incluso ácido sórbico como antimicótico. El nitrito añadido con la sal del curado inhibe, entre otros patógenos, a las salmonelas, y junto a otros solutos (particularmente los de bajo peso molecular) hacen descender la a_w desde 0,99 a 0,96-0,97 lo que provoca también la inhibición de la mayoría de los microorganismos aerobios Gram negativos (muy

sensibles a las reducciones de la a_w) con lo que se favorece el crecimiento de la flora láctica, micrococcos y estafilococos no patógenos. El crecimiento de estos microorganismos hace descender el potencial redox y el pH del producto, que a su vez inhibe a los organismos aeróbicos como los *Pseudomonas* y favorece de nuevo la selección de la flora competitiva, fundamentalmente ácido-láctica. De esta forma, la estabilidad se alcanza durante la elaboración por una secuencia de cinco factores barrera: conservantes, bajo Eh, flora competitiva, pH y actividad de agua. Estos factores inhiben eficazmente el crecimiento de microorganismos causantes de toxiinfecciones alimentarias (*Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *C. botulinum*) así como otras bacterias causantes de alteraciones negativas en el producto (Leistner, 1992).

2. Mecanismos de acción de la sal frente a los microorganismos

La sal es el ingrediente más crítico en la elaboración de productos cárnicos curados después de la carne, empleándose cantidades que oscilan entre el 1 y el 5%. Los productos cárnicos madurados contienen una concentración mayor de sal que los frescos. Entre las distintas funciones de la sal adicionada se destaca su capacidad como conservante, siendo el ingrediente antimicrobiano más versátil y económico usado en los alimentos y de hecho continúa siendo hoy día uno de los más efectivos para el desarrollo de productos alimenticios seguros (Taormina, 2010).

La sal no posee ninguna acción específica antimicrobiana, pero sí desarrolla un efecto bacteriostático general, retardando el crecimiento microbiano en mayor o menor medida en función de la concentración utilizada. A concentraciones suficientemente elevadas, la sal produce un desequilibrio osmótico en las células microbianas, produciendo la salida de agua de las células a través de las membranas semipermeables, dando lugar a la retracción y reducción del volumen citoplasmático debida a la pérdida de agua, fenómeno conocido como plasmólisis. La plasmólisis no depende del soluto empleado, sino de la osmolaridad del medio (Csonka, 1989). Sin embargo, entre los solutos presentes en la fase acuosa de la carne, el NaCl parece ejercer el mayor grado de control sobre el crecimiento microbiano (Gutiérrez et al., 1995). Puesto que las células deben mantener un nivel adecuado de agua en el citoplasma para el normal funcionamiento celular, recurren a la acumulación activa de iones, o a la captura o síntesis de solutos compatibles. La energía invertida en estas actividades reduce el crecimiento, pudiendo anularse por completo. La tolerancia a la sal varía entre las especies microbianas, disminuyendo bajo condiciones sub-óptimas de pH, temperatura, potencial redox, disponibilidad de nutrientes u otros agentes antimicrobianos.

La acción conservante de la sal consiste en algo más que la deshidratación. El sulfato de magnesio posee un mayor efecto deshidratante sobre las proteínas que el NaCl, pero no ejerce mayor efecto bacteriostático frente a *S. aureus* que el NaCl (Rockwell y Ebertz, 1924). Para estos autores, entre los factores implicados en las propiedades conservantes del NaCl se incluye la toxicidad del Cl^- , la eliminación del oxígeno del medio, aumentando la sensibilización de los microorganismos al CO_2 , y la interferencia con la acción de los enzimas proteolíticos.

La acción de la sal está relacionada con su concentración en la fase acuosa, lo que explica, por ejemplo, que en los productos sometidos a procesos de secado (jamones crudo curados, salchichones fermentados), sea necesario utilizar el frío al comienzo de la fabricación, cuando el contenido en agua

es todavía elevado, mientras que al final del proceso, con un contenido en agua reducido (y elevada concentración de sal en agua) resulta prácticamente innecesario.

La relación existente entre el contenido de Na y sal (entendida como NaCl); la relación entre el porcentaje de sal en la fase acuosa y el porcentaje de sal añadida (sal en carne/agua en carne); así como entre el contenido de sal y la actividad de agua a_w se calcula de la siguiente forma:

Peso molecular Na: 22,99

Peso molecular Cl: 35,45

Peso molecular NaCl: 58,44

$$\text{NaCl (g)} = 2,54 \times \text{Na (g)} \text{ ó }$$

$$\text{Na (g)} = 0,39 \times \text{NaCl (g)}$$

$$\% \text{ sal en fase acuosa} = \frac{\% \text{ sal en carne}}{\% \text{ agua en carne}} \times 100$$

La relación entre el contenido de sal y la actividad de agua (a_w) fue establecida por Resnik y Chiffie (1988):

$$a_w = 1 - \frac{\% \text{ NaCl} \times (5,2471 + 0,12206 \times \% \text{ NaCl})}{1.000}$$

Para describir el grado de tolerancia o resistencia de los microorganismos al NaCl, se han utilizado diferentes términos como halófilo, tolerante a la sal, resistente a la sal, halófilo facultativo, etc. El término halotolerante podría ser considerado sinónimo de tolerante a la sal, y ambos términos son intercambiables con el de halófilo facultativo. Ejemplos de bacterias patógenas que responden a alguno de estos términos son *Listeria monocytogenes* (tolerante a la sal), *Staphylococcus aureus* (resistente a la sal) y *Vibrio parahaemolyticus* (halófilo). Los microorganismos tolerantes a la sal y los halófilos son también denominados xerotolerantes o xerófilos, pero estos últimos son usados más a menudo en condiciones de baja a_w generada por elevados niveles de azúcares (Taormina, 2010).

Consecuencias microbiológicas de la reducción de sal en productos cárnicos

1. Posibilidades de reducir el contenido en sal en productos cárnicos curados

Para desarrollar el plan de reducción del consumo de sal en la población, la AESAN se planteó como objetivo de reducción, alcanzar progresivamente las recomendaciones de la OMS respecto de la ingesta de sal en torno a 5 g/persona/día. Las medidas propuestas en el mencionado plan pasan necesariamente por:

1. Desarrollo de campañas de educación y concienciación.
2. Disminución del consumo de alimentos procesados a favor de los productos frescos.
3. Disminución de la cantidad de sal añadida: en el cocinado y en la mesa (salero).
4. Elección de productos con un menor contenido en sal: etiquetado nutricional obligatorio, fácil de interpretar (sal en lugar de sodio).
5. Reformulación de productos alimentarios para disminuir el contenido en sal y búsqueda de alternativas de sustitución.

En aquellos alimentos en los que la sal forma parte de su sistema de conservación, se ha considerado que la reducción en el nivel de sal requerirá del necesario ajuste de alguna de las propiedades intrínsecas o extrínsecas del alimento para asegurar el mismo nivel de seguridad alimentaria. Estos ajustes pueden clasificarse como sigue:

- Reducción de la vida comercial.
- Modificación de las condiciones de procesado.
- Sustitución del cloruro sódico con otro tipo de cloruros.
- Reducción del contenido de cloruro sódico, compensando parte de su funcionalidad con algún aditivo.

La reducción de sal acompañada de la reformulación de un producto para proporcionar la misma seguridad, debe ser viable económica y tecnológicamente, y ha de ser aceptada por el consumidor, desde el punto de vista sensorial y de confianza. El paladar es muy tradicional, de modo que la reducción de sal en alimentos procesados ha de ser paulatina. La tolerancia a la sal está relacionada con el grado de exposición, de forma que cuando se reduce el consumo de sal, los receptores para el sabor salado se vuelven más sensibles, por lo que la reducción gradual de sal en alimentos no produciría rechazo por parte del consumidor. Por otra parte, el consumidor es reactivo a lo desconocido, demostrándose que la información que aparece en el etiquetado de ciertos alimentos sobre otros ingredientes alternativos, no generan la suficiente confianza en el consumidor (Searby, 2006).

La disminución de sal en productos cárnicos se puede conseguir haciendo una selección de la materia prima, modificando los procesos tecnológicos y añadiendo sustancias que compensen la reducción salina (Angus et al., 2005). Gran parte de las investigaciones actuales, van encaminadas a tratar de permitir la disminución del contenido de sal de los productos cárnicos, sin alterar sus principales cualidades, en respuesta a la demanda de productos saludables y al reemplazamiento del NaCl por otras sales como: KCl, MgCl₂, CaCl₂, MgSO₄, etc. (Blesa et al., 2008).

Un programa de disminución de sal debe precisar el nivel de reducción que se pretende alcanzar en relación a los niveles de sal que existen actualmente en las diferentes categorías de productos cárnicos. Es importante agrupar a los productos cárnicos en categorías suficientemente homogéneas y amplias que no supongan un proceso de difícil consecución. Dentro de cada categoría, los de menor contenido en sal indican los porcentajes de reducción que potencialmente podrían alcanzarse, teniendo en cuenta las posibles variaciones derivadas de los ingredientes utilizados o del método de elaboración.

El informe NAOS señala dos maneras de afrontar este proceso de reducción: a) fijando niveles máximos de sal para cada categoría de alimentos o b) estableciendo porcentajes de reducción desde el contenido medio de sal en cada categoría.

2. Riesgo microbiológico derivado de la reducción de sal en los productos cárnicos

Los cambios en la formulación de un producto, por pequeños que sean, pueden afectar la estabilidad microbiológica del mismo, haciendo necesaria una evaluación de la seguridad de dicho producto una vez reformulado. En el caso de añadir nuevos componentes para compensar una disminución de sal,

será necesario evaluar cualquier cambio asociado a la carga microbiana del producto. La reducción del contenido de sal en un producto alimenticio, no suele tener consecuencias sobre la prevalencia de los microorganismos ni sobre las especies microbianas presentes inicialmente en el alimento, pero puede afectar a su supervivencia y crecimiento. La magnitud del crecimiento de un microorganismo patógeno asociado a la reducción de sal en un alimento dependerá del papel que juegue la sal en la estabilidad de dicho producto. Es decir, hay alimentos cuya estabilidad microbiológica no se verá afectada por la reducción de sal como ocurre con los alimentos congelados; los tratados por el calor, los acidificados ($\text{pH} < 3,8$), o los alimentos con bajos valores de actividad de agua ($a_w < 0,86$), siempre que la a_w no esté relacionada con el contenido de sal. Por lo tanto, el efecto inhibitorio de la sal variará en función de las características del alimento, de los agentes conservantes añadidos, de las condiciones de procesado y del microorganismo de que se trate, lo que hace difícil el hecho de establecer recomendaciones sobre los niveles de sal en alimentos.

Determinadas técnicas de conservación poco agresivas pueden prevenir el crecimiento de determinados microorganismos. Un correcto almacenamiento refrigerado previene el crecimiento de *Bacillus cereus* (cepas mesófilas), *Campylobacter*, cepas proteolíticas de *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus* y *Vibrio* en alimentos. Un tratamiento de pasteurización de 70 °C/2 minutos o su equivalente producirá una reducción 6D en el número de patógenos no esporulados, y por tanto su eliminación en aquellos productos en los que no existe contaminación post-proceso.

El uso de estas estrategias de conservación para inhibir el crecimiento de patógenos da como resultado alimentos seguros independientemente de su contenido en sal. Sin embargo, el uso de estos sistemas de conservación puede resultar inadecuado si la calidad del producto, textura, sabor, nutrientes, etc., se ve amenazada. Para garantizar su seguridad preservando su calidad sensorial y nutricional, muchos alimentos requieren del empleo de una combinación de métodos/factores de conservación, como son el tratamiento térmico, temperatura de almacenamiento, tiempo de almacenamiento, a_w , pH, potencial redox, uso de atmósferas modificadas, conservantes como cloruro sódico, nitritos o ácidos orgánicos o la presencia de microorganismos competitivos (bio-conservación). En consonancia con este hecho, la FSA (*Food Standard Agency*, 2003) del Reino Unido, presentó un informe en el que subraya la necesidad de emplear un sistema multifactorial para preservar la seguridad de los productos cárnicos elaborados. Además, añade que la magnitud del efecto de la reducción de sal en alimentos es difícil de predecir debido a que los complejos sistemas de conservación no son completamente conocidos (Stringer y Pin, 2005).

El posible riesgo asociado a la reducción de sal en productos cárnicos, puede analizarse desde el conocimiento de las condiciones que previenen el crecimiento de patógenos, empleando modelos predictivos que estimen el posible crecimiento bajo las condiciones que imperan en estos productos, realizando ensayos de inoculación de patógenos en el alimento, o una combinación de los dos. Los ensayos de inoculación son específicos para cada grupo de condiciones en cada producto, y pueden variar significativamente al modificar las condiciones de formulación y el tipo de microorganismo. Esta vía es costosa, laboriosa y necesitaría semanas para la obtención de datos. La posibilidad de disponer modelos de predicción, nos proporciona una vía rápida, fácil y económica de predecir las consecuencias del cambio en la formulación.

Es importante recordar que el efecto inhibidor de la sal sobre los microorganismos, tiene lugar en la fase acuosa del alimento. Es decir, que el contenido en sal en la fase acuosa del alimento es el verdadero agente inhibidor. Por tanto, la reducción de sal referida al peso del alimento, tendrá un gran impacto sobre la a_w en aquellos alimentos con bajo contenido de humedad. Incluso dentro de una misma categoría de producto, se pueden observar diferencias apreciables. Por ejemplo, la concentración de sal en fase acuosa de diferentes tipos de salchichón sujetos a idéntica reducción de sal por 100 g, se muestra en la Tabla 2. El efecto reductor de la sal por gramo de alimento aumenta cuanto menor es su contenido acuoso. La variabilidad en el contenido en humedad entre los distintos tipos de salchichón refleja la cantidad de grasa en el producto. Una tendencia hacia la reducción de grasa en productos cárnicos indirectamente incrementaría la cantidad de sal necesaria para mantener la seguridad del producto.

Tabla 2. Efecto del contenido acuoso de salchichón perteneciente a distintas categorías sobre la concentración de sal en fase acuosa

Producto	^a Contenido acuoso (%)	Sal en alimento (%)	Sal en fase acuosa (%)	^b Sal en alimento (%)	^b Sal en fase acuosa (%)	Reducción en fase acuosa (%)
Salchichón Extra	38,1	4,8	12,6	3,8	10,0	2,6
Salchichón 1 ^a	31,8	4,8	15,1	3,8	12,1	3,1
Salchichón 2 ^a	28,7	4,8	16,7	3,8	13,3	3,4
Salchichón 3 ^a	26,4	4,8	18,2	3,8	14,5	3,7

^aDatos publicados por Fernández-Salguero et al. (1994).

^bConcentración resultante de una reducción del 20% de sal.

Desde un enfoque probabilístico, se podría modelar el porcentaje de sal añadida a un producto concreto, y conocer su equivalencia en porcentaje de sal en la fase acuosa del alimento. Por ejemplo, si se conoce que al salchichón Extra se le adiciona sal con una concentración media del 4,8% y una desviación típica del 1%, asumiendo que la concentración de sal es una variable que se ajusta a una distribución normal, el 50% de las unidades de salchichón tendrían una concentración inferior a 4,8% de sal en producto, equivalente aproximadamente a un 12,6% de sal en fase acuosa. Se puede representar gráficamente la probabilidad asociada a las distintas concentraciones de sal (en producto y en fase acuosa), como se observa en la Figura 1.

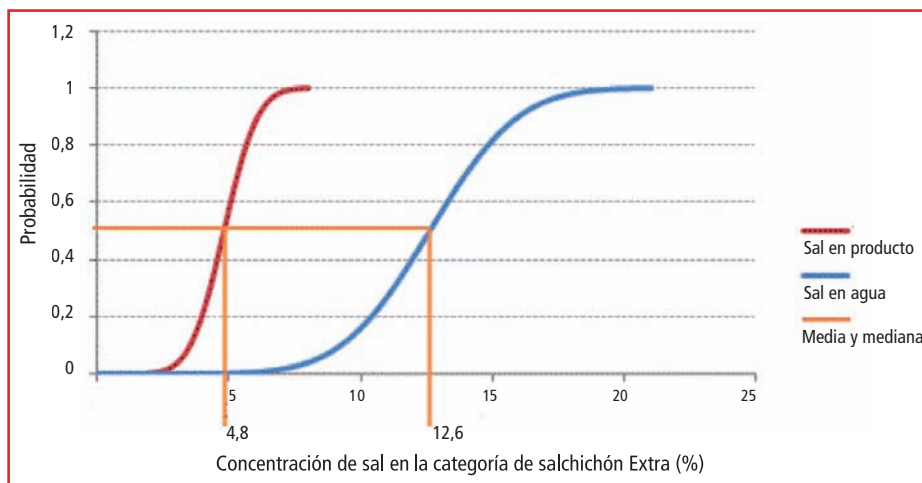


Figura 1. Variabilidad de la concentración de sal (%) como probabilidad acumulada en la categoría de salchichón Extra, asumiendo una distribución normal (4,8; 1) para la concentración de sal en producto.

Como se ha comentado, el riesgo potencial que pueda estar asociado a una disminución en la reducción de sal, puede evaluarse desde el conocimiento de las condiciones limitantes para los patógenos, empleando modelos predictivos o realizando ensayos de inoculación. En el presente informe se procede a la evaluación del riesgo mediante la aplicación de modelos predictivos.

3. Selección de microorganismos patógenos de interés en productos cárnicos curados

Los microorganismos de interés en el presente estudio serán aquéllos cuya presencia en los productos cárnicos es posible y cuyo crecimiento es compatible con las características de los productos cárnicos curados objeto de estudio. Para comprobar la compatibilidad del crecimiento de distintos patógenos en estos productos, se ha calculado su porcentaje de sal en fase acuosa a partir de los datos presentados en el informe del Plan de reducción del consumo de sal de la estrategia NAOS (AESAN, 2009) (Tabla 3).

Tabla 3. Contenido de sal en productos curados

Categoría de producto	Media%	Mediana%	Mínimo%	Máximo%
Chorizo	3,26	3,51	2,60	3,81
Fuet	3,68	3,71	3,35	4,09
Jamón	4,49	4,58	1,13	7,81
Salchichón	2,94	3,01	1,74	4,02

Con estos datos de sal (media), se ha calculado el porcentaje de sal en fase acuosa sin y con reducción de sal del 20%, teniendo en cuenta la humedad de los distintos productos cárnicos hallada por Fernández-Salguero et al. (1994) y Fernández-Salguero (1995). Se ha seleccionado un escenario de peor caso (95% percentil) para la humedad en las distintas categorías de productos curados (Tabla 4), considerando una distribución normal $N(\mu, \sigma)$ para la humedad de cada categoría de producto.

Tabla 4. Contenido de sal en productos curados y en su fase acuosa

Categoría	^a Humedad	Humedad peor caso (95% perc)	^b Media sal	Media -20% sal	Media sal fase acuosa	Media -20% sal en fase acuosa
Chorizo	37,3 ± 8,2	50,8	3,26	2,61	6,42%	5,13%
Jamón curado	47,6 ± 5,1	56,0	4,49	3,59	8,02%	6,41%
Salchichón	38,1 ± 3,0	43,0	2,94	2,35	6,84%	5,46%

^aDatos de Fernández-Salguero (1995).^bDatos del documento NAOS (AESAN, 2009).

Atendiendo a los valores más permisivos para el crecimiento microbiano (baja concentración de sal y elevada a_w) de los productos cárnicos curados, se han identificado los microorganismos que no son capaces de crecer en dichas condiciones permisivas, por lo que no serán relevantes para un estudio posterior. Según la Tabla 4, el valor más bajo de sal en fase acuosa (media-20%) es del 5,13%, mientras que el valor más alto de a_w (peor caso) según la Tabla 1 es el correspondiente al salchichón de 1ª categoría y la cecina (0,962 y 0,948, respectivamente). Dados estos valores, los microorganismos cuya a_w mínima para crecer sea superior a 0,962 o tolere, como máximo, una concentración de sal de 5,13%, serán excluidos para el siguiente estudio. En la Tabla 5 se identifican en gris los microorganismos incapaces de crecer a las condiciones de los productos curados. Por el contrario, los no coloreados son los que presentan una tolerancia a la sal superior a 5,13% (en fase acuosa) y son capaces de crecer en un alimento con a_w de hasta 0,962, por lo que han sido seleccionados para un estudio comparativo en el siguiente apartado.

Tabla 5. Condiciones limitantes de crecimiento para microorganismos patógenos

Microorganismo	T mín (°C)	a_w mín	NaCl máx (%)	pH mín	Oxígeno
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0	0,97	5	4,5	Aerobio facultativo
<i>Bacillus cereus</i>	4,10*	0,93	11	5,0	Aerobio facultativo
<i>Campylobacter jejuni</i>	32	0,98	3	4,9	Microaerófilo
<i>C. botulinum proteolítico</i>	10	0,94	10	4,6	Anaerobio obligado
<i>C. botulinum no proteolítico</i>	3	0,97	5	5,0	Anaerobio obligado
<i>Clostridium perfringens</i>	12	0,95	7	5,0	Anaerobio obligado
<i>Escherichia coli</i> (VTEC)	7	0,95	8	4,0	Aerobio facultativo
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	0,92	12	4,3	Aerobio facultativo
<i>Salmonella</i> spp.	5	0,93	11	3,8	Aerobio facultativo
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	0,86	19	4,0	Aerobio facultativo
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-2	0,95	7	4,2	Aerobio facultativo

*cepas psicrotrofas y mesófilas.

En gris se destaca a los patógenos incapaces de crecer debido al valor de % sal máxima tolerable y a_w de los productos cárnicos curados de la Tabla 1.

Adaptada de *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Vol I and II. Ed B.L.Lund. T.C. Baird-Parker and G.W. Gould. Aspen House Inc., Maryland 2000.

4. Cuantificación del efecto de la reducción de sal sobre el crecimiento microbiano en productos cárnicos curados mediante la aplicación de modelos predictivos

El efecto de la reducción de sal sobre un microorganismo sólo será cuantificable si podemos comparar dicho efecto antes y después de dicha reducción. En el presente estudio se aborda una reducción homogénea de sal, es decir, que el porcentaje de sal adicionado a los productos cárnicos curados disminuiría un 20%. Se considera que esta reducción es alcanzable, sin gran perjuicio para el sector cárnico. En la Figura 2 se muestra cómo la distribución de la concentración de sal, se desplazará hacia la izquierda de forma homogénea tras la reducción generalizada de un 20% de sal.

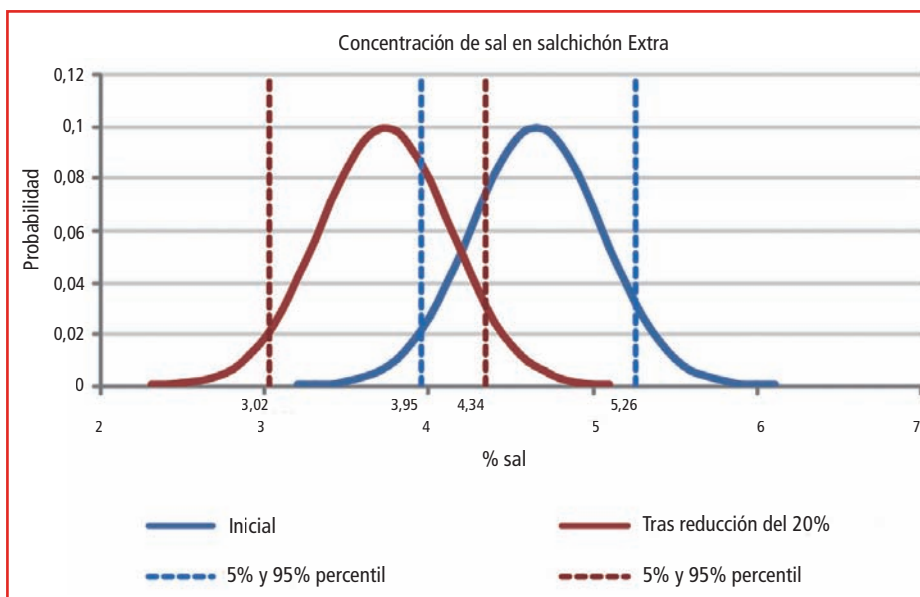
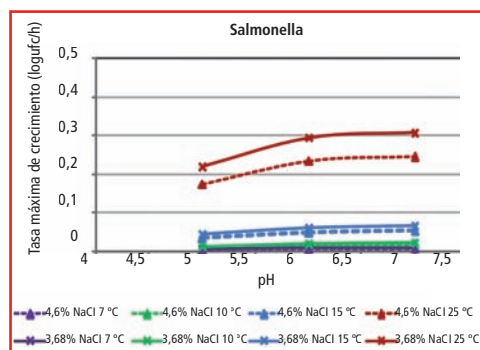
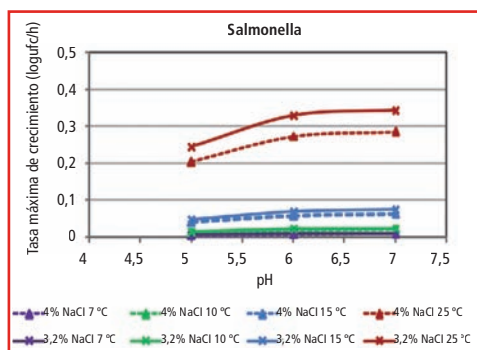
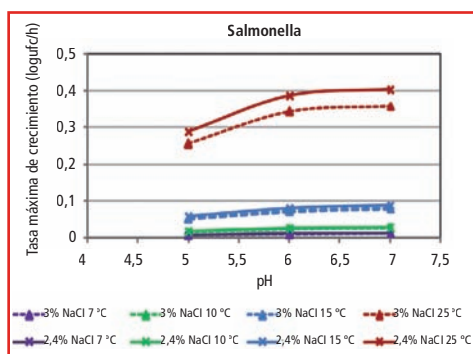
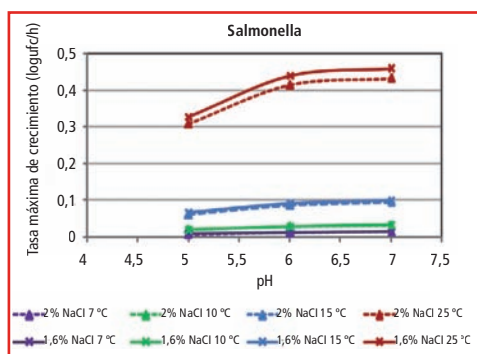


Figura 2. Concentración de sal inicial (azul) y después de reducir un 20% (rojo) en salchichón. Distribución de concentración de sal inicial $N(4,6, 0,4)$ a partir de datos de Fernández-Salguero (1995).

La microbiología predictiva permite obtener estimaciones del efecto de diferentes factores ambientales sobre el comportamiento de un microorganismo, la sal entre ellos. En la actualidad existe gran variedad de modelos predictivos, muchos de ellos incorporados en programas informáticos gratuitos y de fácil empleo, como son *ComBase Predictor* (www.combase.cc), generado en el *Institute of Food Research* (IFR, Norwich, UK) y *Pathogen Modeling Program* (www.arserrc.gov/mfs/pathogen.htm), desarrollado por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA). Cada uno de estos programas incorpora un conjunto de modelos de crecimiento e inactivación de varios patógenos de interés en alimentos. El *Optiform®_Listeria Control Model 2007* (PURAC, the Netherlands) es un modelo terciario específicamente diseñado para predecir el crecimiento de *L. monocytogenes* en productos cárnicos listos para el consumo a diferentes niveles de lactato sódico, lactato potásico, diacetato sódico, cloruro sódico y humedad.

Para modelar el efecto de la reducción de la concentración de sal sobre el crecimiento de un patógeno, es necesario conocer parámetros como el pH, la temperatura o el porcentaje de sal (ó a_w) del producto. Con ayuda de *Combase Predictor*, se han obtenido predicciones de la tasa de crecimiento (μ_{max} ; h^{-1}) y fase de latencia (lag; h) de distintos patógenos seleccionados bajo diferentes condiciones de temperatura (4, 7, 10, 15 y 25 °C), pH (5,0; 6,0 y 7,0), y porcentajes de sal (2, 4, 6, 8%). Se calculó una reducción del 20% sobre el porcentaje de sal anterior, y con las mismas condiciones de temperatura y pH se volvió a calcular las tasas de crecimiento y fases de latencia.

Como cabía esperar, los valores de los parámetros de crecimiento son sensiblemente diferentes ante una reducción del 20% de sal para todos los microorganismos de interés en los productos cárnicos curados. Como ejemplo se muestra el comportamiento de *Salmonella* spp. en la Figura 3. Similares observaciones han sido puestas de manifiesto para diversos microorganismos y diferentes concentraciones de sal (Doyle y Glass, 2010).



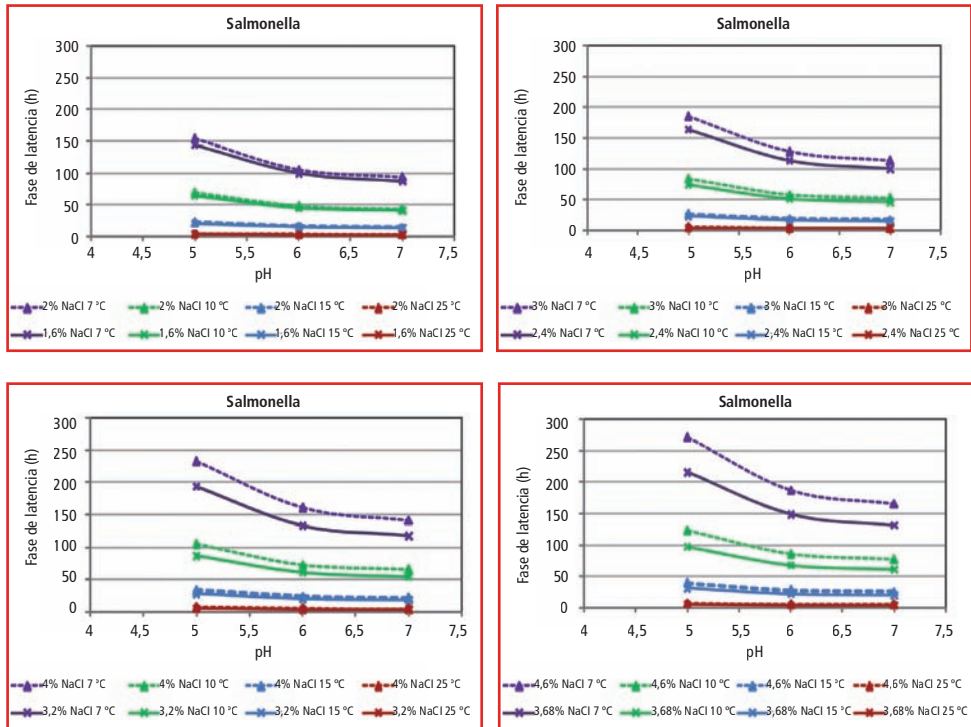


Figura 3. Efecto de la reducción del 20% del contenido de NaCl (2, 3, 4 y 4,6%) sobre la tasa máxima de crecimiento ($\mu_{\max}$) y fase de latencia (h) para *Salmonella* spp. a diferentes condiciones de pH (5, 6 y 7) y temperatura (7, 10, 15 y 25 °C).

Con estos parámetros cinéticos ($\mu_{\max}$ y lag), se calculó el tiempo en incrementar la concentración bacteriana n unidades logarítmicas (t_{inc}) empleando la siguiente fórmula:

$$t_{\text{inc}} = \frac{\frac{\Delta \log}{\mu_{\max}} + \lambda}{24}$$

donde t_{inc} (días) es el tiempo en incrementar n unidades logarítmicas, $\Delta \log$ = incremento de n unidades logarítmicas, y $\mu_{\max}$ y λ son la tasa máxima de crecimiento (h^{-1}) y fase de latencia (h), respectivamente.

Comparando el t_{inc} obtenido antes y después de la reducción de sal, se puede calcular la reducción del t_{inc} causada por la disminución de sal, cuya fórmula es:

$$\% \text{ reducción del } t_{\text{inc}} = \left(1 - \left(\frac{t_{\text{inc}} \text{ a concentraciones de sal reducida}}{t_{\text{inc}} \text{ a concentraciones de sal inicial}} \right) \right) \times 100$$

El tiempo de incremento logarítmico (t_{inc}) para conseguir un aumento de la población microbiana de 10, 100, 1.000 o más veces (1, 2, 3 o más unidades logarítmicas), dependerá de las condiciones que imperan en el alimento y en el propio ambiente.

Cuando la sal añadida a un producto se ha reducido un determinado porcentaje, por ejemplo, el 20%, se crea un microambiente más favorable para el crecimiento de los microorganismos, reduciéndose por tanto el t_{inc} . La magnitud del efecto de esta reducción en el t_{inc} depende principalmente del contenido en sal de partida (en fase acuosa). La Tabla 6 ilustra cómo el porcentaje de reducción del t_{inc} para *Salmonella* spp. es muy similar en las distintas condiciones de temperatura, pH, e incremento logarítmico del microorganismo y sensiblemente diferente cuando se modifica el contenido en sal de partida (en fase acuosa).

Tabla 6. Porcentajes de reducción del t_{inc} para *Salmonella* spp.

T	pH	NaCl	NaCl -20%	t_{inc} 0,5 unidades (NaCl)	t_{inc} 0.5 unidades (NaCl-20%)	% reducción del t_{inc}	t_{inc} 2 unidades (NaCl)	t_{inc} 2 unidades (NaCl-20%)	% reducción del t_{inc}
7	5	2	1,60	8,708	8,190	6,0%	15,652	14,700	6,1%
10	5	2	1,60	3,928	3,692	6,0%	7,053	6,640	5,9%
15	5	2	1,60	1,254	1,181	5,8%	2,254	2,122	5,9%
25	5	2	1,60	0,254	0,239	5,9%	0,457	0,430	5,9%
7	6	2	1,60	5,988	5,656	5,6%	10,759	10,152	5,6%
10	6	2	1,60	2,738	2,579	5,8%	4,923	4,635	5,9%
15	6	2	1,60	0,894	0,842	5,8%	1,608	1,513	5,9%
25	6	2	1,60	0,189	0,178	5,7%	0,341	0,321	5,8%
7	7	2	1,60	5,296	4,985	5,9%	9,519	8,965	5,8%
10	7	2	1,60	2,454	2,311	5,9%	4,414	4,154	5,9%
15	7	2	1,60	0,820	0,774	5,6%	1,475	1,389	5,8%
25	7	2	1,60	0,181	0,171	5,7%	0,326	0,307	5,8%
7	5	4	3,20	13,191	10,949	17,0%	23,784	19,629	17,5%
10	5	4	3,20	5,952	4,958	16,7%	10,687	8,913	16,6%
15	5	4	3,20	1,897	1,582	16,6%	3,414	2,842	16,8%
25	5	4	3,20	0,385	0,321	16,8%	0,693	0,576	16,8%
7	6	4	3,20	9,087	7,560	16,8%	16,355	13,570	17,0%
10	6	4	3,20	4,148	3,473	16,3%	7,455	6,226	16,5%
15	6	4	3,20	1,355	1,130	16,6%	2,436	2,029	16,7%
25	6	4	3,20	0,287	0,240	16,4%	0,517	0,431	16,6%
7	7	4	3,20	8,039	6,695	16,7%	14,483	12,037	16,9%
10	7	4	3,20	3,720	3,107	16,5%	6,696	5,577	16,7%
15	7	4	3,20	1,240	1,034	16,6%	2,232	1,858	16,7%
25	7	4	3,20	0,275	0,229	16,6%	0,495	0,412	16,7%

Datos calculados a partir de estimaciones de tasa máxima de crecimiento y fase de latencia proporcionadas por el software ComBase Predictor.

Por tanto, en caso de que existan patógenos en el producto, el t_{inc} se vería reducido en función del contenido de sal inicial del producto, pudiéndose establecer una relación matemática entre el porcentaje de reducción del t_{inc} (debido a la reducción de sal del 20%) y el porcentaje de sal en la fase acuosa del producto.

Cada microorganismo con potencial para estar presente en el alimento, y con capacidad para crecer a concentraciones de sal compatibles con las que se encuentran en la fase acuosa del alimento, posee una mayor o menor sensibilidad a la reducción de sal, por lo que el riesgo derivado de una reducción de sal, vendría determinada por i) la probabilidad de aparición de patógenos en los productos estudiados, y por ii) una mayor reducción del t_{inc} de entre los patógenos presentes en los mismos.

i) La probabilidad de aparición de patógenos en el alimento es fundamental para evaluar la seguridad de los alimentos, presentando una mayor repercusión cuando su contenido en sal disminuye.

Los informes históricos de cada empresa alimentaria con información microbiológica de sus productos serán los recursos para evaluar la probabilidad de aparición de patógenos en los productos que elabora.

ii) La reducción del t_{inc} más alta de entre los patógenos de interés en los productos estudiados viene dada por la pendiente de la recta de regresión que se obtiene al representar la reducción del t_{inc} frente al porcentaje de sal añadida (en fase acuosa) (Figura 4).

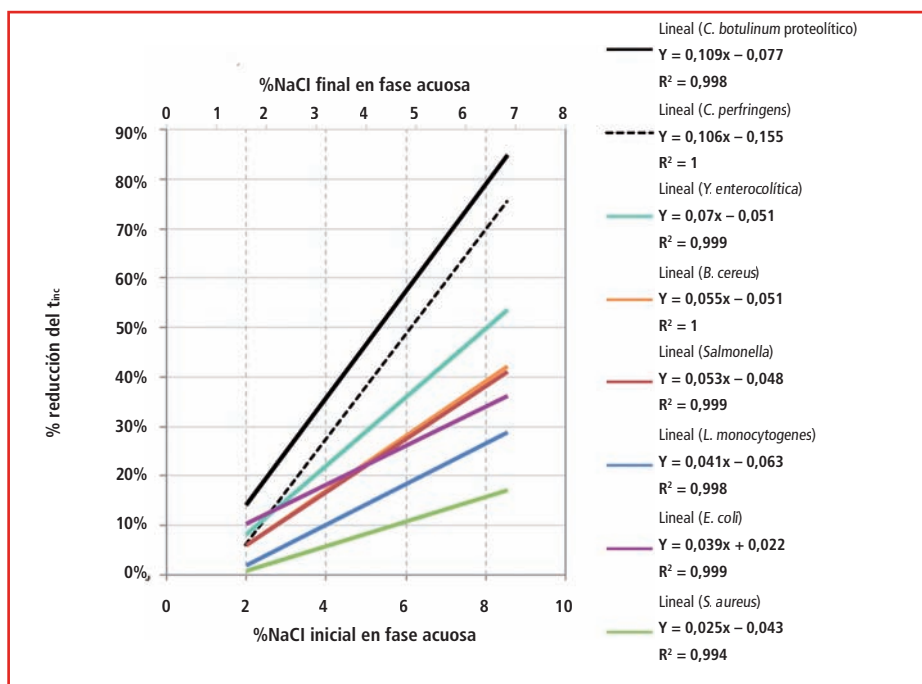


Figura 4. Rectas de regresión representando la reducción del t_{inc} para los patógenos seleccionados, causada por una reducción del 20% de sal inicial en fase acuosa (%).

Como se comentó anteriormente, los datos representados se han calculado a partir de datos de crecimiento (tasa de crecimiento y fase de latencia) proporcionados por el software *ComBase Predictor* (www.combase.cc). A mayor porcentaje de NaCl inicial se observa un mayor valor del % de reducción del t_{inc} , que será tanto mayor cuanto mayor sea la pendiente de la curva.

5. Limitaciones de los modelos predictivos

A pesar de la evolución significativa de los modelos predictivos en los últimos años, siguen existiendo ciertas limitaciones en su aplicación, ya que el control de todos los factores inherentes a los alimentos y microorganismos es complejo. Por lo tanto, las predicciones de los modelos, en general, deben ser interpretadas con precaución y no deben reemplazar por completo las evaluaciones individuales de los productos, especialmente a los que han sido sometidos a cambios substanciales en su formulación (Black y Davidson, 2008).

Muchos de los modelos disponibles actualmente están basados en tres factores ambientales considerados como los más influyentes sobre el crecimiento microbiano, como son temperatura, pH y concentración de NaCl en fase acuosa. Los modelos que incorporen factores adicionales tendrán, por tanto, una mayor flexibilidad en su aplicación. Algunos de los modelos de *ComBase Predictor* contemplan un cuarto factor (por ejemplo, dióxido de carbono, ácido láctico, etc.) para algunos microorganismos, pudiendo considerar el efecto combinado de varios factores, hasta un máximo de cuatro. Sin embargo, en muchas ocasiones son más de cuatro los factores (extrínsecos e intrínsecos) que operan en un alimento.

Aunque teóricamente es posible obtener un modelo con todos los factores ambientales que pueden ser representativos en un alimento, el desarrollo de los mismos depende en gran medida de la cantidad y calidad de los datos que los integran. Si se incrementa el número de variables a considerar en el modelo, aumentarán asimismo las combinaciones de factores que deben realizarse para construir una ecuación matemática. Los datos disponibles en *Combase* (base de datos) nos pueden proporcionar información valiosa sobre el efecto combinado de múltiples factores sobre el crecimiento y/o inhibición de microorganismos, pero el desarrollo de un modelo predictivo a partir de dicha información se hace sumamente complejo al no haber datos de todas las posibles interacciones entre las variables seleccionadas. Los modelos predictivos han de emplearse dentro del rango de condiciones ambientales bajo las cuales se diseñaron, ya que en caso contrario, se extrapolarían las estimaciones dando como resultado previsible predicciones erróneas.

Otras limitaciones de los modelos predictivos son que muchos de ellos (así como los incluidos en *Combase Predictor*) están elaborados en caldo de cultivo y no directamente sobre alimentos. La supervivencia y crecimiento de los microorganismos en los alimentos no depende tan sólo de su composición química y condiciones de almacenamiento, sino también de la estructura del alimento. En el caso de los productos cárnicos, de estructura heterogénea, el crecimiento de los microorganismos está determinado por el posicionamiento de las bacterias en el alimento. Ante esta situación, los modelos predictivos realizados sobre caldo de cultivo, tienden a sobreestimar el crecimiento microbiano en alimentos sólidos.

Por último, cabe resaltar que los modelos incluidos en *Combase Predictor* no consideran la influencia de los microorganismos alterantes o de los *stárters* sobre el crecimiento de los patógenos.

Esta limitación hace que las predicciones calculadas sean más conservadoras, ya que distintos grupos microbianos alterantes o stárters (por ejemplo, mohos y levaduras, bacterias ácido lácticas) ejercen un efecto bacteriostático sobre el crecimiento de varios patógenos, como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis* (Maragkoudakis et al., 2009) ó *Staphylococcus aureus* (Castellano et al., 2008).

Los modelos predictivos empleados en el presente informe poseen un dominio, es decir, un rango de valores para cada factor que no necesariamente se corresponden con los valores limitantes para el crecimiento de los microorganismos de la Tabla 5. Así, para algunos microorganismos, se han realizado extrapolaciones para poder representar la Figura 4 con valores para el eje de abscisas de hasta el 8,5% sal inicial en fase acuosa. En la Tabla 7 se presenta el dominio de los modelos aplicados en el presente informe con *ComBase Predictor*.

Tabla 7. Dominio de los modelos predictivos de crecimiento (*ComBase Predictor*) de los patógenos seleccionados

Patógeno	Temperatura (°C)	pH	Sal (%)
<i>C. botulinum</i> proteolítico	14,0-40,0	4,7-7,2	0,0-7,5
<i>C. perfringens</i>	15,0-52,0	5,0-8,0	0,0-5,0
<i>Y. enterocolítica</i> *	-1,0-37,0	4,4-7,2	0,0-7,0
<i>B. cereus</i>	5,0-34,0	4,9-7,4	0,0-9,4
<i>Salmonella</i> *	7,0-40,0	3,9-7,4	0,0-4,6
<i>E. coli</i> *	10,0-42,0	4,5-7,5	0,0-6,5
<i>L. monocytogenes</i> *	1,0-40,0	4,4-7,5	0,0-10,2
<i>S. aureus</i>	7,5-30,0	4,4-7,1	0,0-13,5

*Estos modelos incluyen como factor adicional CO₂.

Como se puede comprobar, sólo los modelos para *B. cereus*, *L. monocytogenes* y *S. aureus* contemplan un % sal por encima de 8,5% (en fase acuosa). Los modelos de *ComBase Predictor* establecen como límite superior del rango de interpolación de sal (%), un valor inferior al tolerado por los patógenos (Tabla 5).

A pesar de estas limitaciones, el uso de los modelos predictivos puede proporcionar información rápida y eficaz acerca del comportamiento microbiano bajo condiciones ambientales determinadas, sobre todo si la información que se desea es de tipo relativo (por ejemplo, incrementos, reducciones...). Los modelos predictivos constituyen una herramienta de trabajo para la toma de decisiones en la industria alimentaria.

1. Modificación de las condiciones de procesado y almacenamiento

La reducción de la concentración de sal en el producto final podría llevar consigo la adopción de procesos tecnológicos alternativos para mantener el aroma, sabor y textura de producto cárnico original, así como su seguridad microbiológica.

Por ejemplo, el envasado de los productos cárnicos al vacío o en atmósfera modificada ejerce un efecto bacteriostático sobre los microorganismos. En este sentido, cabe la posibilidad de reducir el contenido en sal del producto y envasarlo posteriormente. No obstante, las carnes curadas deben ser envasadas en atmósferas anaerobias dado que la presencia de otras sales adicionadas durante el curado hace que el alimento sea más susceptible de sufrir alteración de tipo químico por rancidez oxidativa.

Otros estudios han sugerido un proceso de secado por aire de carnes procesadas, de forma que se consiga una reducción de la a_w que inhiba el crecimiento microbiano (Konstance y Panzer, 1985). Sin embargo, hay que tener en cuenta las posibles modificaciones organolépticas del producto final.

Por último, existe la opción de mejorar la calidad de la materia prima y la higiene del proceso, salvaguardando la seguridad microbiológica del producto final. Asimismo, la utilización de aerosoles u otras sustancias antimicrobianas pueden prevenir la alteración de los productos que poseen un contenido en sal reducido.

Durante el almacenamiento de los productos cárnicos, la microbiota presente puede desarrollarse cuando el contenido del producto en sal es reducido. Por tanto, como se ha visto anteriormente, el tiempo en que un patógeno potencial incrementa n unidades logarítmicas (t_{inc}) será menor si el contenido de sal en el producto cárnico se ve reducido.

Como se puede ver en la Figura 4, se ha hallado una relación lineal entre el porcentaje de sal (en fase acuosa) en el producto y la reducción del t_{inc} , que varía según el microorganismo. En la práctica y también desde el punto de vista legislativo, durante el almacenamiento de alimentos listos para consumo, el microorganismo con mayor trascendencia para la seguridad de este tipo de alimentos es *Listeria monocytogenes*. En efecto, *L. monocytogenes* es un microorganismo ubicuo, muy resistente, con capacidad para formar *biofilms* y crecer en condiciones de refrigeración.

En el Reglamento (CE) N° 2073/2005 (UE, 2005), relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, se establece el límite microbiológico de 100 ufc/g de *L. monocytogenes* en alimentos listos para consumo, siempre y cuando el explotador de la empresa alimentaria sea capaz de demostrar que no se supera dicha concentración a lo largo de su vida comercial. Si esto se ha conseguido demostrar para un determinado producto cárnico crudo curado con una determinada concentración de sal, cuando se reduce dicha concentración, habría que volver a demostrarlo, pues las condiciones son más favorables para el crecimiento del microorganismo. Para demostrar que *L. monocytogenes* no excede el límite de 100 ufc/g durante su vida comercial, además de los ensayos de inoculación del patógeno en el alimento, el empleo del concepto t_{inc} nos proporcionará una excelente aproximación para la gestión de la seguridad del producto. Para *L. monocytogenes*, la Figura 4 muestra la recta de regresión calculada a partir de datos de concentración inicial (en fase acuosa) y del t_{inc} . Así, por ejemplo, para un producto cárnico curado con una concentración de sal inicial (en fase acuosa) del

6%, por aplicación de la recta de regresión, cuando se reduce en un 20% (de un 6 a un 4,8% de sal), el porcentaje de reducción del t_{inc} sería del 18%; en otras palabras, el patógeno tardaría teóricamente un 18% menos en incrementar n unidades logarítmicas. Por tanto, cabe la posibilidad de adaptar la vida comercial del producto con respecto al comportamiento de *L. monocytogenes* frente a las nuevas concentraciones de sal, asimilando el porcentaje de reducción del t_{inc} como porcentaje de reducción de vida comercial.

2. Sustitución y/o reducción del cloruro sódico con otro tipo de cloruros

El NaCl es un aditivo multifuncional que afecta a la estabilidad microbiológica, el aroma, la textura y la capacidad de retención de agua. Esta naturaleza multifuncional hace muy difícil encontrar un sustitutivo directo para la sal, por lo que podría necesitarse el empleo de varios ingredientes.

Es conocido que los efectos de la sal sobre la solubilidad de las proteínas y la retención del agua se deben principalmente a la fuerza iónica del ión cloruro, por lo que podría sustituirse el cloruro sódico por otros cloruros como el de potasio, calcio, magnesio o litio sin pérdida de funcionalidad. Se ha demostrado que la sustitución en un rango del 25-40% del NaCl por otro tipo de sal no tiene ningún efecto significativo sobre el sabor y la textura de los productos cárnicos (Desmond, 2006).

El sustituto más frecuente es el cloruro potásico (KCl). El ión potasio es un osmoprotector acumulado por microorganismos como *L. monocytogenes* (Pachett et al., 1992). Se ha descrito que se puede sustituir el 35-50% de NaCl con KCl en productos cárnicos sin pérdida de funcionalidad, aunque niveles por encima del 50% pueden producir sabores amargos o metálicos (Collins, 1997). Asimismo, altos niveles de K puede tener consecuencias negativas sobre personas que padezcan insuficiencia renal. Cabe mencionar que los efectos osmóticos de las diferentes sales dependerán de su concentración molar y no de su peso. Así, en términos de peso, el KCl es menos efectivo que el NaCl. En lo que respecta a la estabilidad microbiológica, se ha indicado que KCl puede tener un efecto antimicrobiano similar a NaCl a molalidad equivalente sobre patógenos como *L. monocytogenes* y *S. aureus* (Cerrutti et al., 2001) (Boziaris et al., 2007) (Bidlas y Lambert, 2008). Con respecto a otras sales de cloruro, se ha comprobado que reducciones inferiores al 33% en el contenido de NaCl en productos cárnicos cocidos junto a la formulación de sales de $CaCl_2$ y $MgCl_2$ no afecta significativamente a la estabilidad del producto frente a *Lactobacillus sakei* (Samapundo et al., 2010a) y frente a *L. monocytogenes* (Samapundo et al., 2010b). En este sentido, se ha comprobado que $CaCl_2$ tiene una capacidad antimicrobiana superior al $MgCl_2$ y NaCl. Terrell et al. (1983) hallaron que la sustitución de NaCl (2,5%) por KCl o $CaCl_2$ no ejerció ninguna influencia sobre el crecimiento de microorganismos alterantes en carne picada de cerdo, como *Micrococcus* o *Moraxella*, y sólo *Lactobacillus* creció levemente en condiciones de refrigeración.

La utilización de mezclas de sales de cloruro puede ser considerado como una alternativa eficaz para reducir el contenido en sodio de los productos cárnicos (Ruusunen et al., 2002). Algunas de estas mezclas forman parte de productos comerciales, como por ejemplo Pansalt®, Lo® o Morton Lite Salt®, entre otras (Taormina, 2010). En el caso de esta última mezcla comercial (60:40 NaCl:KCl), se han hecho estudios sobre jamón curado, comprobándose que se conservan el sabor y aroma originales.

3. Utilización de otras sales

La adición de fosfatos a productos cárnicos se ha convertido en una práctica habitual al incrementar la capacidad de retención de agua. Los polifosfatos también solubilizan las proteínas, aunque empleando un mecanismo diferente al de la sal. Experimentos realizados en jamones bajos en sal mostraron que el uso del 1,8% de fosfato sódico o de 1,4% de fosfato potásico no difiere en cuanto a apariencia, textura y aroma (Ruusunen et al., 2002). Los fosfatos también influyen sobre el crecimiento bacteriano en productos cárnicos, siendo unos más inhibitorios que otros (Tompkin, 1984).

El ión fosfato se encuentra formando mayoritariamente sales de sodio, contribuyendo, por tanto, de manera importante al sodio total del alimento. Por ejemplo, el fosfato trisódico puede aportar concentraciones de Na de 42 mg por 100 g de alimento, de ahí que podamos afirmar que este tipo de sales no son el sustitutivo más adecuado para NaCl (Taormina, 2010).

Los ácidos orgánicos y sus sales se han empleado extensamente como aditivos para la conservación de alimentos. Sus efectos antimicrobianos se deben, por un lado, a la disminución del pH, y por otro lado, a la inhibición metabólica causada por las moléculas no disociadas. La forma no disociada es capaz de difundir a través de la membrana celular, disociándose dentro de las células, y liberando protones que acidifican el citoplasma. Las células gastan energía eliminando el exceso de protones y manteniendo el pH neutro interno. La efectividad de los ácidos orgánicos depende del pH, siendo normalmente más efectivos en alimentos ácidos que en neutros. También los ácidos orgánicos reducen la a_w hasta un 0,01, con los niveles de formulación empleados en la industria. Además, ciertas concentraciones intensifican el aroma salado de productos cárnicos (Price, 1997), aunque a partir de cierto nivel, podrían generar aromas ácidos, sobre todo en el caso del ácido acético.

Se ha demostrado que el lactato puede retrasar el crecimiento de *L. monocytogenes* y *C. botulinum*, siendo efectivo en cárnicos curados, además de extender su vida comercial (Glass et al., 2007a, 2007b) (Seman et al., 2008). Existe una amplia oferta de productos comerciales de cócteles o mezclas de sales de ácidos orgánicos que actualmente están disponibles en el mercado, siendo esto una demostración clara de la viabilidad tecnológica de este tipo de sustitutivos. Se apunta que puede existir una acción sinérgica entre distintas sales para frenar el crecimiento microbiano como por ejemplo, entre las sales de lactato y diacetato (Devlieghere et al., 2009). La combinación de diacetato potásico y lactato sódico es la base de varios productos PURAC® comercializados con los nombres Purasal® y Opto.Form PD 4. Estos productos han sido usados satisfactoriamente como sustitutivos de NaCl, hasta niveles del 40%, manteniendo las características propias del producto, y mostrando un importante efecto inhibitorio sobre *L. monocytogenes*. Además, PURAC® ha desarrollado una aplicación informática que permite la valoración previa del efecto de la sustitución del NaCl por sus productos comerciales (por ejemplo, PURAC FCC 80) sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* teniendo también en cuenta otros factores en el alimento (pH, % humedad, etc.) junto a las condiciones de almacenamiento del mismo (temperatura y tiempo) (Doyle y Glass, 2010).

Los ascorbatos, que aunque se usan principalmente para acelerar el desarrollo de la pigmentación de los productos curados, y como agentes antioxidantes, también contribuyen a la estabilidad bacteriológica. Por otro lado, el sorbato, propionato y benzoato han mostrado una importante capacidad antimicrobiana contra mohos, levaduras y algunas bacterias, concretamente contra *S. aureus* y *Salmonella*, si bien su

uso se encuentra restringido a ciertos tipos de alimentos como es el caso del ácido sórbico, utilizado en bebidas isotónicas, y alimentos fermentados como los encurtidos (Chipley, 2005) (Stopforth et al., 2005).

4. Otros antibacterianos

La utilización de los *films* comestibles de pululano, que contienen el antimicrobiano sakacina A, han demostrado la efectividad en el control del crecimiento de *Listeria monocytogenes*.

El pululano, es un polisacárido polimérico formado a partir del almidón por el hongo *Aureobasidium pullulans*, que no tiene color, ni sabor, y es resistente al aceite y muy impermeable al oxígeno. Los *films* producidos con pululano muestran una mayor actividad antimicrobiana y una mejor regulación de la migración de moléculas antimicrobianas desde el *film* al interior del alimento, comparado con la adición directa de la sakacina A en productos cárnicos listos para su consumo.

La sakacina A es una bacteriocina producida por una cepa de *Lactobacillus*. Se produce de forma natural por organismos asociados con las carnes frescas, durante los procesos de fermentación y cuando se aplica a carnes, se limita el crecimiento de *Listeria monocytogenes*.

Conclusiones del Comité Científico

1. La reducción de la ingesta de sal tiene un efecto beneficioso en la prevención de la hipertensión arterial y las enfermedades cardiovasculares.
2. La aplicación del Plan de Reducción de sal (NaCl) en productos cárnicos curados, sin utilizar otro medio conservante en su lugar, puede representar un riesgo microbiológico que es necesario evaluar de forma individual para cada tipo de producto.
Podría ser necesario reformular estos productos o reducir su vida comercial para mantener un nivel similar de seguridad a la de los productos actualmente elaborados. Si la reducción de sal produce un aumento en la velocidad de crecimiento de microorganismos patógenos, el riesgo de contraer una enfermedad alimentaria podría incrementarse si no se realiza un adecuado ajuste de otros factores estabilizadores. Adicionalmente, siempre que se identifique un nuevo peligro, cualquier cambio en la formulación, procesado o condiciones de almacenamiento que pueda afectar a la seguridad o vida comercial de un producto, debe ser reevaluado y gestionado, tomando las medidas oportunas.
3. La magnitud del efecto de una reducción de sal en productos cárnicos curados es difícil de cuantificar, dado su complejo sistema de conservación. El efecto antimicrobiano de la sal variará con respecto a un determinado microorganismo, las condiciones ambientales, la presencia de otros conservantes y de otros microorganismos, así como de las condiciones de procesado y conservación. Por este motivo es difícil hacer recomendaciones globales sobre los niveles de seguridad microbiológica derivados de una reducción de la sal en estos productos.
4. Las medidas de gestión de la seguridad microbiológica para paliar la reducción de sal deberían basarse en el comportamiento de aquellos microorganismos patógenos cuyo crecimiento se ve más favorecido por la reducción del contenido de sal. Para valorar la sensibilidad de éstos a los cambios en la concentración de sal, se propone como parámetro la reducción del tiempo de incremento logarítmico (reducción del t_{inc}), siendo los más afectados *C. botulinum* proteolítico de entre los patógenos anaerobios obligados, y *Y. enterocolitica* de entre los patógenos aerobios facultativos.

En todo caso, los datos históricos de prevalencia de patógenos en los productos cárnicos de cada empresa alimentaria, serán primordiales para seleccionar el microorganismo patógeno en que han de basar sus medidas de gestión. Igualmente, cabe la posibilidad de adaptar la vida comercial del producto teniendo en cuenta el comportamiento de un determinado microorganismo a las nuevas concentraciones de sal, como es *L. monocytogenes*, traduciendo el porcentaje de reducción del tinc como porcentaje de reducción de vida comercial.

5. La aplicación de modelos de predicción y/o la realización de ensayos de inoculación son los procedimientos más adecuados para valorar si la formulación empleada para la elaboración de los productos cárnicos curados (con su contenido en sal reducido) y las condiciones de procesado y almacenamiento seleccionadas son apropiadas para obtener un producto seguro, en relación con los peligros microbiológicos, durante su vida comercial.

Referencias

- AESAN (2009). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Plan de reducción del consumo de sal. Estrategia NAOS. Disponible en: http://www.naos.aesan.msps.es/naos/ficheros/estrategia/Memoria_Plan_de_reduccion_del_consumo_de_sal_-_Jornadas_de_debate.pdf [acceso: 26-3-2009].
- Angus, F., Phelps, T., Clegg, S., Narain, C., den Ridder, C. y Kilcast, D. (2005). Salt in processed foods: Collaborative research project. Leatherhead Food International.
- Anonymous (2009). Disponible en: <http://www.salt.gov.uk/> [acceso: 26-3-2009].
- Beaglehole, R., Ebrahim, S., Reddy, S., Voute, J. y Leeder, S. (2007). Prevention of chronic diseases: a call to action. *The Lancet*, 370, pp: 2152-2157.
- Bidlas, E. y Lambert, R.J.W. (2008). Comparing the antimicrobial effectiveness of NaCl and KCl with a view to salt/sodium replacement. *International Journal of Food Microbiology*, 124, pp: 98-102.
- Black, D.G. y Davidson, P.M. (2008). Use of modeling to enhance the microbiological safety of the food system. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7, pp: 159-167.
- Blesa, E., Aliño, M., Barat, J.M., Grau, R., Toldrá, F. y Pagán, M.J. (2008). Microbiology and physico-chemical changes of dry-cured ham during the post-salting stage as affected by partial replacement of NaCl by other salts. *Journal of Meat Science*, 78, pp: 135-142.
- Boyle, E.A.E., Sofos, J.N. y Schmidt, G.R. (1993). Depression of aw by soluble and insoluble solids in alginate restructured beef heart meat. *Journal of Food Science*, 58, pp: 959-967.
- Bozaris, I.S., Skandamis, P.N., Anastasiadi, M. y Nychas, G.J.E. (2007). Effect of NaCl and KCl on fate and growth/no growth interfaces of *Listeria monocytogenes* Schott A at different pH and nisin concentrations. *Journal of Applied Microbiology*, 102, pp: 796-805.
- Brown, I.J., Tzoulaki, I., Candeias, V. y Elliott, P. (2009). Salt intakes around the world: implications for public health. *International Journal of Epidemiology*, 38, pp: 791-813.
- Castellano, P., Belfiore, C., Fadda, S. y Vignolo. (2008). A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Journal of Meat Science*, 79, pp: 483-499.
- Cerrutti, P., Terebiznik, M.R., de Huergo, M.S., Jagus, R. y Pilosof, A.M.R. (2001). Combined effect of water activity and pH on inhibition of *Escherichia coli* by nisin. *Journal of Food Protection*, 64, pp: 1510-1514.
- Chen, J., Gu, D., Huang, J., Rao, D.C., Jaquish, C.E., Hixson, J.E., Chen, C.S., Chen, J., Lu, F., Hu, D., Rice, T., Kelly, T.N., Hamm, L.L., Whelton, P.K., y He, J. (2009). Metabolic syndrome and salt sensitivity of blood pressure in non-diabetic people in China: a dietary intervention study. *The Lancet*, 373, pp: 829-835.
- Chipley, J.R. (2005). Sodium benzoate and benzoic acid. En libro: Antimicrobials in food. Davidson, P.M., Sofos, J.N. y Branen, A.L. editors. New York: Taylor & Francis, pp: 11-48.

- Collins, J.E. (1997). Reducing salt (sodium) levels in processed meat, poultry and fish products. En libro: *Production and processing of healthy meat, poultry and fish products*. Ed. A.M. Pearson and T.R. Dutson. London, Blackie Academic and Professional, 14, pp: 282-287.
- Csonka, L.N. (1989). Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 53, pp: 121-147.
- Dall, T.M., Fulgoni, V.L., Zhang, Y.D., Reimers, K.J., Packard, P.T. y Astwood, J.D. (2009a). Potential health benefits and medical cost savings from calorie, sodium and saturated fat reductions in the American diet. *American Journal of Health Promotion*, 23, pp: 412-422.
- Dall, T.M., Fulgoni, V.L., Zhang, Y.D., Reimers, K.J., Packard, P.T. y Astwood, J.D. (2009b). Potential national productivity implications of calorie and sodium reductions in the American diet. *American Journal of Health Promotion*, 23, pp: 423-430.
- Desmond, E. (2006). Reducing salt: a challenge for meat industry. *Journal of Meat Science*, 74, pp: 188-196.
- Devlieghere, F., Vermeiren, L., Bontenbal, E., Lamers, P.P. y Debevere, J. (2009). Reducing salt intake from meat products by combined use of lactate and diacetate salts without affecting microbial stability. *International Journal of Food Science & Technology*, 44, pp: 337-41.
- Doyle, M.E. y Glass, K.A. (2010). Sodium Reduction and Its Effect on Food Safety, Food Quality and Human Health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, pp: 44-56.
- Engstrom, A., Tobelmann, R.C. y Albertson, A.M. (1997). Sodium intake trends and food choices. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 65, pp: 704S-707S.
- European Cardiovascular Disease Statistics. (2005). British Heart Foundation Health Promotion Research Group. Department of Public Health, University of Oxford (United Kingdom).
- FDA (2007). Food and Drug Administration, U.S. Department of Health and Human Services. "Salt and Sodium; Petition to Revise the Regulatory Status of Salt and Establish Food Labeling Requirements Regarding Salt and Sodium; Public Hearing; Request for Comments." 21 CFR Part. 15.
- Fernández-Salguero, J., Gómez, R. y Carmona, M.A. (1994). Water activity of Spanish intermediate-moisture meat products. *Journal of Meat Science*, 38, pp: 341-346.
- Fernández-Salguero, J. (1995). Conservación de productos cárnicos por aplicación de factores combinados: Productos españoles de humedad intermedia y alta. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, 35, pp: 233-246.
- Food Standards Agency (2003). Disponible en: <http://www.food.gov.uk/multimedia/spreadsheets/saltmodel.xls>
- Glass, K.A., McDonnell, L.M., Rassel, R.C. y Zierke, K.L. (2007a). Controlling *Listeria monocytogenes* on sliced ham and turkey products using benzoate, propionate, and sorbate. *Journal of Food Protection*, 70, pp: 2306-2312.
- Glass, K., Preston, D. y Veessenmeyer, J. (2007b). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in turkey and pork-beef bologna by combinations of sorbate, benzoate, and propionate. *Journal of Food Protection*, 70, pp: 214-217.
- Gutiérrez, C., Abee, T., y Booth, I.R. (1995). Physiology of the osmotic stress response in microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 28, pp: 233-244.
- Havas, S., Dickinson, B.D., y Wilson, M. (2007). The urgent need to reduce sodium consumption. *Journal of the American Medical Association*, 298, pp: 1439-1441.
- Hoffmann, I., y Cubeddu, L. (2007). Increased blood pressure reactivity to dietary salt in patients with the metabolic syndrome. *Journal of Human Hypertension*, 21, pp: 438-444.
- Konstance, R.P. y Panzer, C.C. (1985). Air drying bacon slices to reduce aw: an aniclostrial alternative to sodium nitrite. *Journal of Food Science*, 50, pp: 862-868.
- Leistner, L. (1992). Food preservation by combined methods. *Food Research International*, 25, pp: 151-158.
- Maragkoudakis, P.A., Mountzouris, K.C., Psyras, D., Cremonese, S., Fischer, J., Cantor, M.D. y Tsakalidou, E. (2009). Functional properties of novel protective lactic acid bacteria and application in raw chicken meat against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. *International Journal of Food Microbiology*, 130, pp: 219-226.

- Morimoto, A., Uzu, T., Fujii, T., Nishimura, M., Kuroda, S., Nakamura, S., Inenaga, T., y Kimura, G. (1997). Sodium sensitivity and cardiovascular events in patients with essential hypertension. *The Lancet*, 350, pp: 1734-1737.
- OMS (2002). Organización Mundial de la Salud. Reducing Risks, Promoting Healthy Life. Informe de salud del año 2002. Ginebra.
- Pachett, R.A., Kelly, A.F. y Kroll, R.G. (1992). Effect of sodium-chloride on the intracellular solute pools of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, pp: 3959-3963.
- Palar, K. y Sturm, R. (2009). Potential societal savings from reduced sodium consumption in the U.S. adult population. *American Journal of Health Promotion*, 24, pp: 49-57.
- Price, J.F. (1997). Low fat/salt cured meat products. En libro: *Production and processing of healthy meat, poultry and fish products*. Ed. A.M. Pearson and T.R. Dutson. London, Blackie Academic and Professional, 12, pp: 242-256.
- Resnik, S.L. y Chirife, J. (1988). Proposed theoretical aw values at various temperatures for selected solutions to be used as reference sources in the range of microbial growth. *Journal of Food Protection*, 51, pp: 419-423.
- Rockwell, G.E., y Ebertz, E.G. (1924). How salt preserves. *Journal of Infectious Diseases*, 35, pp: 573-575.
- Ruusunen, M., Niemisto, M. y Puolanne, E. (2002). Sodium reduction in cooked meat products by using commercial potassium phosphate mixtures. *Agricultural and Food Science in Finland*, 11, pp: 199-207.
- Samapundo, S., Ampofo-Asiama, J., Anthierens, T., Xhaferi, R., Van Bree, I., Szczepaniak, S., Goemaere, O., Steen, L., Dhooge, M., Paelinck, H., Dewettinck, K. y Devlieghere, F. (2010a). Influence of NaCl reduction and replacement on the growth of *Lactobacillus sakei* in broth, cooked ham and white sauce. *International Journal of Food Microbiology*, 143, pp: 9-16.
- Samapundo, S., Ampofo-Asiama, J., Anthierens, T., Xhaferi, R., Van Bree, I., Szczepaniak, S., Goemaere, O., Steen, L., Dhooge, M., Paelinck, H., Dewettinck, K. y Devlieghere, F. (2010b). Influence of NaCl reduction and replacement on the growth of *Listeria monocytogenes* in broth, cooked ham and white sauce. *Journal of Applied Microbiology*. In press.
- Searby, L. (2006). Pass the salt. *International Food Ingredients*, 1, pp: 6-8.
- Seman, D.L., Quickert, S.C., Borger, A.C. y Meyer, J.D. (2008). Inhibition of *Listeria monocytogenes* growth in cured ready-to-eat meat products by use of sodium benzoate and sodium diacetate. *Journal of Food Protection*, 71, pp: 1386-1392.
- Sofos, J.N. (1985). Influence of sodium tripolyphosphate on the binding and antimicrobial properties of reduced NaCl comminuted meat products. *Journal of Food Science*, 50, pp: 1379.
- Stopforth, J.D., Sofos, J.N. y Busta, F.F. (2005). Sorbic acid and sorbates. En libro: Davidson, P.M., Sofos, J.N., Branan, A.L., editors. *Antimicrobials in food*. New York. Taylor & Francis, pp: 49-90.
- Stringer, S.C. y Pin, C. (2005). Microbial risks associated with salt reduction in certain foods and alternative options for preservation. Technical Report. Institute of Food Research.
- Taormina, P.J. (2010). Implications of salt and sodium reduction on microbial food safety. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50, pp: 209-227.
- Terrell, R.N., Quintanilla, M., Vanderzant, C. y Gardner, F.A. (1983). Effects of reduction or replacement of sodium-chloride on growth of *Micrococcus*, *Moraxella* and *Lactobacillus* inoculated ground pork. *Journal of Food Science*, 48, pp: 122-124.
- Tompin, R.B. (1984). Indirect antimicrobial effects in foods: Phosphate. *Journal of Food Safety*, 6, pp: 13-27.
- Troller, J.A. (1986). Water relations of foodborne bacterial pathogens. An updated review. *Journal of Food Protection*, 49, pp: 656-670.
- UE (2005). Reglamento (CE) N° 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. DO L 338 de 22 de diciembre de 2005, pp: 1-26.
- Whiting, R.C., Benedict, R.C., Kunsch, C.A. y Woychik, J.H. (1984). Effect of sodium chloride levels in frankfurters on the growth of *Clostridium sporogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Science*, 49, pp: 351-355.
- World Action on Salt and Health (2009). Disponible en: <http://www.worldactiononsalt.com/> [acceso: 26-3-2009].

Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los envases activos e inteligentes

Miembros del Comité Científico

Andreu Palou Oliver, Juan José Badiola Díez, Arturo Anadón Navarro, Albert Bosch Navarro, Juan Francisco Cacho Palomar, Ana María Cameán Fernández, Alberto Cepeda Sáez, Lucas Domínguez Rodríguez, Rosaura Farré Rovira, Manuela Juárez Iglesias, Francisco Martín Bermudo, Manuel Martín Esteban, Albert Más Barón, Teresa Ortega Hernández-Agero, Andrés Otero Carballeira, Perfecto Paseiro Losada, Daniel Ramón Vidal, Elías Rodríguez Ferri, M^a Carmen Vidal Carou, Gonzalo Zurera Cosano

Secretario

Jesús Campos Amado

Número de referencia: AESAN-2010-011

Documento aprobado por el Comité Científico en su sesión plenaria de 28 de septiembre de 2010

Grupo de Trabajo

Perfecto Paseiro Losada (Coordinador)
Juan Francisco Cacho Palomar
Manuela Juárez Iglesias
Teresa Ortega Hernández-Agero
Cristina Nerín de la Puerta (C. Externa)
Ricardo López Rodríguez (AESAN)

89

revista del comité científico nº 13

Resumen

Los envases activos, a diferencia de los envases tradicionales a los que se exige que sean totalmente inertes, están diseñados para interactuar de forma activa y continua con su contenido, su finalidad es ampliar el tiempo de conservación o mantener o mejorar el estado de los alimentos envasados.

Los envases activos incluyen sistemas que absorben/eliminan o regulan compuestos que afectan desfavorablemente a la vida comercial de un producto alimenticio, tales como el oxígeno, etileno, humedad o aquellos que pueden ocasionar olores o sabores desagradables en los alimentos. Otros sistemas liberan sustancias químicas como conservantes, antioxidantes, colorantes, aromas, etc.

Los envases inteligentes monitorizan las condiciones del alimento envasado, para dar información acerca de la calidad del mismo durante el transporte y el almacenamiento.

Los envases inteligentes incluyen sistemas que informan fácilmente mediante indicaciones visuales de parámetros de interés del alimento, por ejemplo de la rotura de la cadena de frío, proporcionando indicación sobre la historia de la temperatura a la que estuvo expuesto el producto y del tiempo de exposición, de alteraciones no deseadas en la atmósfera interior de productos envasados al vacío o en atmósfera protectora o de alteraciones en la calidad del alimento, tanto químicas como microbiológicas.

Su utilización está regulada a nivel europeo básicamente por los Reglamentos (CE) N° 1935/2004 y 450/2009.

Palabras clave

Envases, activos, inteligentes, alimentos.

Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) on active & intelligent packaging.

Abstract

Active packaging, unlike traditional packaging which is required to be totally inert, is designed to interact actively and continuously with its content, with the purpose of extending the shelf-life or maintaining or improving the status of packaged foods.

Active packaging includes systems that absorb/eliminate or regulate compounds unfavourably affecting the commercial life of a foodstuff, such as oxygen, ethylene and humidity or those that might cause unpleasant odours or flavours in food. Other systems release chemicals such as preservatives, anti-oxidants, colouring agents, aromas, etc.

Smart packaging can even monitor the conditions of packaged food in order to provide feedback about its quality during transport and storage.

Smart packaging includes systems that provide easy-to-read information using visual indicators on food parameters of interest, such as whether the food chain has been broken, by providing information on the history of the temperature the product has been exposed to and the duration of that exposure, undesirable alterations in the air inside vacuum-packed products or those in a protective atmosphere or chemical and microbiological alterations in the food's quality.

At european level, their use is basically regulated by EC Regulations 1935/2004 and 450/2009.

Key words

Packaging, active, intelligent, foods.

Introducción

En los últimos años se han producido una serie de cambios en las preferencias de los consumidores y en la manera en que los alimentos son producidos, transformados y comercializados.

La preferencias de los consumidores se dirigen hacia el consumo de productos alimenticios “frescos y naturales”, saludables, mínimamente procesados y convenientes, tanto desde un punto de vista nutricional –conservando todas sus propiedades nutritivas– como de su facilidad para prepararlos –listos para comer–. Por otro lado los consumidores exigen mayor calidad, seguridad e información de los productos que consumen.

En cuanto a la industria, se han producido una serie de cambios, tendentes por un lado a satisfacer las demandas de los consumidores, y por otro a adaptarse a la globalización de los mercados, lo que implica unas mayores distancias y tiempos en la distribución de los productos alimenticios, y a reducir costes mediante la centralización de las actividades de producción e investigación y el incremento de los tiempos de rotación de la producción, distribución y venta de los productos alimenticios (De Kruijf et al., 2002).

Todos estos cambios se reflejan en un incremento continuo en la demanda de la industria para aumentar la vida comercial (vida útil) de los productos alimenticios envasados y en la demanda de los consumidores para mejorar la información sobre la seguridad y la calidad de los productos que consume. Cada vez se demandan más y mejores prestaciones a los envases y los sistemas tradicionales de envasado están alcanzando su techo en estos aspectos. Para responder a estos cambios, nuevas necesidades y desafíos se desarrollan los sistemas de envasado o envases activos e inteligentes (Vermeiren et al., 1999) (Dainelli et al., 2008).

- **Envases activos.** A diferencia de los envases tradicionales, a los que se exige que sean totalmente inertes, los activos están diseñados para interaccionar de forma activa y continua con su contenido. Esta interacción implica siempre una transferencia de masa, ya sea para incorporar sustancias al contenido del envase (el alimento y su entorno) o absorber componentes del mismo. La finalidad de esta interacción es ampliar el tiempo de conservación o mantener o mejorar el estado de los alimentos.

Los materiales activos, modifican determinadas condiciones o procesos del alimento que juegan un papel determinante en la vida comercial del producto, por ejemplo procesos químicos (fenómenos de oxidación, decoloración), físicos (endurecimiento y deshidratación del pan) o microbiológicos (deterioro por microorganismos). Estas condiciones pueden ser reguladas mediante la aplicación de los sistemas activos apropiados. Dependiendo de los requerimientos del alimento el deterioro en la calidad puede ser reducido significativamente, consiguiéndose así un aumento de la vida comercial del producto (De Kruijf et al., 2002) (Paseiro et al., 2007).

Los envases activos incluyen sistemas que absorben/eliminan o regulan compuestos como el oxígeno, radicales, etileno, humedad o aquellos que pueden ocasionar olores o sabores desagradables en los alimentos. Otros sistemas liberan sustancias químicas como conservantes, antioxidantes, colorantes, aromas, etc.

Legalmente se denominan materiales y objetos activos en contacto con alimentos y se definen como los “materiales y objetos destinados a ampliar el tiempo de conservación, o a mantener o mejorar

el estado de los alimentos envasados, y que están diseñados para incorporar deliberadamente componentes que transmitan sustancias a los alimentos envasados o al entorno de éstos o que absorban sustancias de los alimentos envasados o del entorno de éstos" (UE, 2004).

- *Envases inteligentes*. Controlan el estado de los alimentos envasados o de su entorno. Son sistemas que monitorizan las condiciones del alimento envasado, para dar información acerca de la calidad del mismo durante el transporte y el almacenamiento.

El envase inteligente es capaz de suministrar información acerca de alguna condición del alimento envasado; por ejemplo, indica si hay entrada de aire en un producto envasado al vacío, fugas de gases en envases con atmósfera protectora, manifiesta la presencia de alteraciones en la calidad del alimento (aminas volátiles, microorganismos, etc.) o rotura de la cadena de frío, proporcionando indicación sobre la historia de la temperatura a la que estuvo expuesto el producto y del tiempo de exposición.

Legalmente se denominan "materiales y objetos inteligentes en contacto con alimentos" y se definen como los materiales y objetos que controlan el estado de los alimentos envasados o el entorno de éstos (UE, 2004).

El concepto de material activo o inteligente comprende un amplio rango de tecnologías que están a disposición de la industria alimentaria para ayudar a la resolución de problemas específicos. En Estados Unidos, Japón y Australia, muchos de estos conceptos ya se están aplicando con la finalidad de incrementar la vida comercial y monitorizar la calidad y seguridad de los alimentos.

En Europa, el desarrollo y la aplicación son todavía limitados. Hasta finales del 2004, una de las razones que se alegaban para este retraso eran las restricciones legislativas, pues la legislación europea era muy estricta y no permitía la entrada de estos sistemas innovadores. En la actualidad los materiales y objetos activos e inteligentes se encuentran autorizados de manera general en el marco del Reglamento (CE) Nº 1935/2004 sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos (UE, 2004), en donde se definen y se establecen los requisitos especiales que deben cumplir; y de una manera específica en el Reglamento (CE) Nº 450/2009 (UE, 2009). Sin embargo, y a pesar de esta inclusión en el marco legal europeo, la realidad es que la industria alimentaria europea está utilizando muy tímidamente estos materiales y objetos. Otras razones pueden ser la falta de información o conocimiento acerca de la aceptación de estos sistemas por los consumidores, del impacto económico-ambiental que puedan tener, de la eficacia de los mismos y de que su implementación, principalmente en el caso de los inteligentes, no depende solo de la industria alimentaria sino que requiere una mayor implicación de todos los operadores involucrados en las tareas de distribución, almacenamiento y venta de productos alimenticios al consumidor.

Envases activos

Se pueden clasificar en dos grandes grupos:

1. *Absorbedores o eliminadores*. Son aquellos que absorben sustancias químicas del interior del envase. Su acción implica una transferencia de masa desde el contenido del envase al sistema activo: absorbedores de oxígeno incluidos radicales libres de oxígeno, de etileno, de agua, de componentes que originan olores y sabores desagradables, etc.

2. *Liberadores o emisores*. Son aquellos que liberan sustancias químicas al interior del envase. Su acción implica una transferencia de masa desde el sistema o material activo al contenido del envase: agentes antimicrobianos (etanol, dióxido de carbono, ácidos sórbico, benzoico, propiónico, bacteriocinas y otros), antioxidantes, aromatizantes, saborizantes, colorantes, ingredientes alimentarios y extractos y aceites esenciales de plantas con acción antimicrobiana o antioxidante.

Comercialmente se pueden encontrar como:

- *Sistemas independientes*. Saquitos, tiras o etiquetas, constituyendo un elemento que se incorpora o adhiere al interior del envase, pero que es una parte diferenciada del mismo. Se fabrican con materiales resistentes a la rotura, generalmente permeables por una sola cara, a través de la cual se realiza la transferencia de masa, generalmente gases o vapores absorbidos o liberados por el sistema. En general, la cara permeable tiene que orientarse hacia el espacio de cabeza y no hacia el alimento, con cuyo contacto puede obstruirse y en algunos casos desactivarse completamente, especialmente si se trata de alimentos líquidos. Actualmente son los sistemas más ampliamente utilizados. Deben acompañarse de un etiquetado apropiado que permita al consumidor identificarlo como una parte no comestible y evite su consumo accidental (Ozdemir et al., 2004).
- *Sistemas integrados en el propio envase*. Las sustancias activas se incorporan en el propio material de envase, en unos casos mediante dispersión y en otros injertándolas químicamente en el propio material. Se pueden incorporar en capas intermedias de los materiales multicapa, evitando así el contacto directo de la parte activa con el alimento o bien en el material que está directamente en contacto con el alimento. A diferencia de los sistemas independientes, en este caso el sistema activo no se percibe por el consumidor como elemento diferenciado del envase, lo que evita el posible rechazo del consumidor y el riesgo de consumo accidental de su contenido (Rooney, 1995).

1. Absorbedores o eliminadores

Absorbedores de oxígeno

El oxígeno es una de las principales causas de deterioro de los productos alimenticios. La presencia de oxígeno en el interior del envase, cuando no es deseada, puede derivar de una inadecuada o insuficiente evacuación del mismo durante el proceso de envasado, de su presencia en el alimento o en el material del envase y posterior liberación al espacio de cabeza, de la permeación a través del envase y de la entrada de aire debida a un ineficiente sellado o micro perforaciones del material de envasado (De Kruijf et al., 2002).

Los absorbedores reducen y controlan de manera activa los niveles residuales de oxígeno en el interior del envase, llegando en algunos casos a conseguir valores inferiores al 0,01% de oxígeno, valores que son inalcanzables para otros sistemas de envasado.

La utilización de los absorbedores de oxígeno ralentiza: 1) los fenómenos de oxidación tales como el enranciamiento de grasas y aceites y subsiguiente aparición de malos olores y sabores, la pérdida o cambio de los colores característicos de los alimentos, la pérdida de nutrientes sensibles al oxígeno (vitaminas A, C, E, ácidos grasos insaturados, etc.), 2) el desarrollo de microorganismos, mohos y bacterias aeróbicas y 3) la infestación por insectos y vermes.

La aplicación de estos sistemas, solos o en combinación con otros sistemas tradicionales de envasado, como atmósferas modificadas y vacío, pueden extender la vida comercial de un producto alimenticio y constituyen una alternativa económica y eficaz a los sistemas tradicionales de envasado (Ozdemir et al., 2004).

Mecanismos de acción

Existen distintas tecnologías que utilizan diversos mecanismos solos o combinados (Suppakul et al., 2003) (Rooney, 2005):

- Oxidación de hierro y sales ferrosas. Están basados en hierro en polvo finamente dividido, al que se incorporan excipientes (sales y soportes minerales como cloruro sódico, silicatos y carbón activo) que proporcionan el medio adecuado para que el proceso de oxidación del hierro sea lo más efectivo posible. Pueden reducir el nivel de oxígeno residual a valores iguales o inferiores a 0,01%. Es el mecanismo más ampliamente utilizado en la actualidad y uno de los más efectivos (Smith et al., 1990).
- Oxidación de sustancias orgánicas tales como ácido ascórbico, catecol, ácidos grasos insaturados (oleico, linoleico, linolénico), colorantes fotosensibles, polímeros modificados, etc., incorporando en algunos casos metales que actúan como catalizadores del proceso de oxidación, etc.
- Oxidación enzimática. Se basan en la reacción entre un enzima (por ejemplo, glucosa oxidasa o alcohol oxidasa) y un sustrato, en la que se consume oxígeno.

La utilización de estos sistemas requiere que el material activo no esté afectado por el oxígeno antes de su utilización por la industria alimentaria. Algunos sistemas requieren una activación previa a su uso (activación por el agua, hinchamiento del polímero, acción de la luz, etc.) y otros se protegen en envases herméticos, en ausencia de aire, antes de su utilización.

Se pueden utilizar solos o combinados con otros sistemas activos que potencien su acción, por ejemplo reguladores de humedad. La selección del producto (forma, tamaño, capacidad de absorción de oxígeno, tiempo para alcanzar el equilibrio) debe ser rigurosa y adaptada a las necesidades y características de cada alimento (líquidos, sólidos, secos, grasos, contenido en agua, actividad del agua, etc.).

Campo de aplicación

Productos alimenticios sensibles al oxígeno: frutos secos, pan, y productos de bollería, pastas, pizzas, chocolates y bombones, marrón glacé, cerveza, zumos de frutas y bebidas refrescantes, productos lácteos, cárnicos y de la pesca, platos preparados, etc.

Absorbedores de radicales libres de oxígeno

Este concepto se ha introducido recientemente y puede considerarse un caso especial dentro de los absorbentes de oxígeno. Se basa en el hecho de que el proceso de oxidación tiene lugar a través de una reacción en cadena iniciada por radicales libres generados a partir del oxígeno. Así, si en lugar de eliminar el oxígeno molecular se eliminan los radicales libres a medida que se producen, el proceso de

oxidación no puede tener lugar. Aceites esenciales y componentes fenólicos han sido incorporados en materiales de envase con la finalidad de reaccionar con radicales libres de oxígeno para eliminarlos del espacio de cabeza del envase, ralentizar los procesos de oxidación e incrementar la vida comercial (Nerín et al., 2008) (Pezo et al., 2008) (Nerín, 2010).

Absorbedores de etileno

La mayoría de las frutas y vegetales liberan gas etileno después de la recolección. El etileno es una fitohormona que inicia y acelera la maduración, produce ablandamiento y la degradación de las clorofilas y conduce inevitablemente al deterioro de estos alimentos. La presencia de etileno reduce la vida comercial de las frutas y vegetales frescos o mínimamente procesados.

Mecanismos de acción

El principal se basa en la utilización de permanganato potásico, que oxida el etileno hasta dióxido de carbono y agua. El permanganato se dispone sobre sustratos adecuados que favorezcan el proceso redox (por ejemplo, incrementando la superficie específica), por ejemplo se puede utilizar alúmina, arcillas, silicagel, carbón activo, etc. Además, se pueden incorporar diversas sustancias que actúan como catalizadores del proceso.

Otros sistemas están basados en la capacidad que tienen determinados materiales de absorber el etileno, por ejemplo minerales finamente divididos y dispersados como zeolitas, silicatos, carbón activo, etc. solos o acompañados de algún agente oxidante.

En la presentación comercial, al igual que para los absorbentes de oxígeno, puede encontrarse como elementos independientes o integrados en el envase.

Campo de aplicación

Frutas y vegetales sensibles al etileno: manzanas, kiwis, plátanos, mango, tomates, cebollas, zanahorias, espárragos, etc.

Absorbedores o reguladores de humedad

Algunos productos alimenticios requieren un control del agua, ya sea en estado líquido o de vapor. La presencia de líquidos de exudación (agua, sangre u otros fluidos) en productos cárnicos y pescados desmerece la presentación de los mismos y aumenta el riesgo de deterioro del producto. Niveles elevados de agua en el interior del envase favorece el crecimiento de microorganismos, causa el ablandamiento de productos secos y crujientes como galletas pastas y bizcochos, y origina apelmazamiento y endurecimiento en leche en polvo o café liofilizado. Por otro lado, excesivas pérdidas de agua pueden favorecer la oxidación de lípidos.

Los productos envasados con un valor alto de humedad relativa en el espacio de cabeza, son susceptibles a las fluctuaciones de temperatura durante el transporte o almacenamiento lo que favorece la formación de condensados y nieblas.

Mecanismo de acción

Mediante un proceso de absorción, en unos casos eliminando el exceso de agua líquida y en otros controlando el vapor de agua en el espacio de cabeza del envase.

Se utilizan agentes altamente higroscópicos y deshidratantes. Se pueden utilizar fibras de celulosa, sales de poliacrilato, polipropilenglicol, carbohidratos, sales minerales, silicagel, montmorillonitas, tamices moleculares, óxido de calcio, etc.

Presentación comercial

Desde el punto de vista de la presentación comercial se pueden clasificar en:

- Absorbedores de agua líquida (almohadillas, hojas) generalmente compuestos de dos o más capas de materiales poliméricos, generalmente microporosos, conteniendo agentes higroscópicos (celulosas, propilenglicol, carbohidratos, etc.). Se utilizan para absorber líquidos de exudación, mejorar la presentación del producto al consumidor y evitar el crecimiento microbiano.
- Reguladores de la humedad relativa (saquitos o etiquetas) conteniendo agentes deshidratantes (por ejemplo, silicagel).

Campo de aplicación

Pescados, carnes, quesos, frutos secos, especias, productos de panadería, alimentos secos, liofilizados, frutas y vegetales cortados, etc.

Otros absorbedores

Absorbedores de dióxido de carbono

La sobrepresión que origina el dióxido de carbono que se libera después de tostar el café puede causar daños en el envase. Saquitos conteniendo óxido de calcio y un agente higroscópico se utilizan para retener como carbonato el CO_2 formado y eliminarlo del espacio de cabeza (Ozdemir et al., 2004).

Absorbedores de componentes no deseados

Los aldehídos pueden ser eliminados selectivamente, desde el espacio de cabeza del envase, utilizando polímeros absorbentes modificados con otros materiales. Las aminas formadas como consecuencia de procesos proteolíticos también pueden ser eliminadas utilizando ácidos orgánicos como cítrico y ascórbico, o mediante procesos de oxidación (Rooney, 1995) (Franzetti et al., 2001). No obstante, la eliminación de estas sustancias no está permitida cuando son indicadores del deterioro de un alimento, pues enmascararían el mismo e inducirían a error al consumidor.

El sabor amargo del limoneno, formado durante el proceso de pasteurización y almacenamiento de zumos de frutas, o de la naringinasa es eliminado con *films* que incorporan acetato de tricelulosa conteniendo enzimas específicos inmovilizados (Soares y Hotchkiss, 1998a) (Soares y Hotchkiss, 1998b).

Una disminución del contenido en lactosa y colesterol en leche puede conseguirse durante el almacenamiento inmovilizando en el envase β -galactosidasa y colesterol reductasa (López-Rubio et al., 2006).

Otros olores formados durante el transporte y almacenamiento, como mercaptanos y sulfuro de hidrogeno, también pueden ser eliminados mediante saquitos absorbedores (De Kruijf et al., 2002).

2. Liberadores o emisores

Liberadores o emisores de agentes antimicrobianos

El deterioro de los alimentos debido al crecimiento de microorganismos puede ser ralentizado mediante la liberación por el envase de agentes antimicrobianos.

Se han ensayado un elevado número de agentes (etanol, dióxido de carbono, dióxido de cloro, bacteriocinas, antibióticos, ácidos orgánicos, polisacáridos, aceites esenciales, extractos de especias, etc.) para inhibir el crecimiento de microorganismos que pueden conducir al deterioro de los productos alimenticios (Kerry, 2006).

Liberadores de etanol

El uso de etanol en el espacio de cabeza del envase actúa de manera efectiva para evitar el crecimiento de microorganismos, bacterias y mohos.

Comercialmente se utilizan en Japón y consisten en saquitos que contienen etanol absorbido o encapsulado sobre un soporte inerte, por ejemplo sílica, finamente dividido y con un grado de humedad adecuado, el sistema libera etanol al espacio de cabeza para ejercer su acción. En algunos casos se incorporan sustancias aromatizantes como vainilla para enmascarar el olor a alcohol (Labuza et al., 1989).

Se utilizan en productos de panadería, pastelería y alimentos secos o semisecos.

Liberadores de CO₂

La presencia de dióxido de carbono en el espacio de cabeza a concentraciones en el rango 10%-80% inhibe el crecimiento microbiano en los alimentos. Se pueden utilizar conjuntamente con absorbedores de oxígeno para mantener una atmósfera adecuada para la conservación de determinados productos.

Se han utilizado sistemas basados en carbonato de hierro (II) o mezclas de hidrógenocarbonato sódico y ácido ascórbico para aumentar la vida comercial de carnes frescas (Kerry et al., 2006).

Liberadores de aditivos conservadores

Hay muchas aplicaciones en la literatura sobre la incorporación a *films* y materiales plásticos de sustancias utilizadas y autorizadas como aditivos conservadores: ácidos sórbico, benzoico, propiónico (Han y Floros, 1997) (Weng y Chen, 1997) (Ouattara et al., 2000a), etil p-hidroxibenzoato y metil p-hidroxibenzoato (Dobias et al., 2000), nisina, pediocina, natamicina (Natrajan y Sheldon, 2000) (Kim et al., 2000) (Coma, 2008) y dióxido de azufre (Ozdemir y Floros, 2004).

Liberadores de extractos naturales o componentes obtenidos de los mismos

Por sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas se emplean diferentes productos naturales como aceites esenciales, extractos de plantas o componentes obtenidos de los mismos y otros productos también de origen natural como el propóleo. Por ejemplo, extractos como el etanólico de clavo (Hong et al., 2000), de semillas de uva (Coma, 2008) y de orégano o romero (Camo et al., 2008); aceites esenciales de orégano (Skandamis y Nychass, 2002), canela y canela enriquecida con cinamaldehído (Rodríguez et al., 2007) (Rodríguez et al., 2008) (Gutiérrez et al., 2009) y clavo (López et al., 2007); principios activos como alil-isotiocianato (Shin et al., 2010) (Vega-Lugo y Loong-Tak, 2009). También

se emplea el quitosán como vehículo de origen natural para la difusión controlada de estos productos (Chen et al., 1996) (Ouattara et al., 2000b) y como antimicrobiano (Sanches-Silva et al., 2010).

Liberadores de biocidas

Triclosan (Vermeiren et al., 2002), dióxido de cloro (Brody et al., 2008).

Otros sistemas

Dentro de los sistemas activos con agentes antimicrobianos también se incluyen aquellos que, en principio, no están destinados a ser liberados al contenido del envase, por ejemplo algunos sistemas que contienen iones plata y que impiden el crecimiento microbiano en la interfase plástico-alimento (Quintavalla y Vicina, 2002) (Danielli et al., 2008), enzimas inmovilizados (Vermeiren et al., 1999) o nanopartículas de plata en celulosa (Fernandez et al., 2010).

Otros liberadores o emisores

Liberadores de aditivos antioxidantes

Para ralentizar los procesos de oxidación que afectan a la calidad de los alimentos se utilizan también sistemas que liberan agentes antioxidantes al alimento y/o al espacio de cabeza, donde ejercen su acción, generalmente como eliminadores de radicales libres, ralentizando así el proceso de oxidación. Se ha demostrado la efectividad de la utilización tanto de antioxidantes sintéticos como el Terbutilhidroquinona (TBHQ), Butil hidroxianisol (BHA) y Butil hidroxitolueno (BHT), como de antioxidantes naturales como la vitamina E y los extractos naturales ricos en compuestos fenólicos y/o terpénicos (Hotchkiss, 1997) (Nerín et al., 2006) (Tovar et al., 2005) (Pereira de Abreu et al., 2010).

Liberadores de aromas, colorantes y otros ingredientes alimentarios

Son sistemas que están en rápido desarrollo, ya que el consumidor demanda mayor creatividad de la industria. La incorporación de aromas que potencien la deseabilidad del alimento en el material plástico se puede utilizar para mejorar el aroma propio del producto fresco y para realzar el aroma del alimento al abrir el envase (Gutiérrez, et al., 2010) (López-Rubio et al., 2006).

En general el agente activo (sustancias químicas, extractos o componentes obtenidos de productos naturales, aditivos antioxidantes y antimicrobianos, aromas o ingredientes alimentarios) está integrado en el propio material de envase (plásticos, papel y cartón, etc.), desde donde se libera mediante difusión al alimento o al espacio de cabeza del envase. Controlando los parámetros que afectan al proceso de difusión se puede conseguir una liberación controlada del agente activo.

Envases inteligentes

Hay toda una variedad de sistemas que pertenecen a este grupo: indicadores tiempo-temperatura, indicadores de estanqueidad o de integridad del envase, indicadores de frescura e indicadores de crecimiento microbiano.

Los principales sistemas están patentados, pero solo un número limitado ha sido comercializado porque se necesitan unos requerimientos muy estrictos. La mayoría de estos indicadores deben ser fácilmente activables, exhibir un cambio o mostrar una indicación que sea fácilmente medible (cambio de color). Los cambios dependientes del tiempo y de la temperatura de exposición deben ser reproducibles e idealmente corresponderse o correlacionarse fácilmente con la pérdida de calidad o deterioro del producto alimenticio.

1. Indicadores tiempo-temperatura

Son pequeños dispositivos que muestran fácilmente cambios medibles, irreversibles y reproducibles dependientes del tiempo y/o de la temperatura.

La idea básica que subyace detrás de estos indicadores es que la calidad del alimento se deteriora tanto más rápidamente cuanto más alta es la temperatura de exposición, debido a que se aceleran las reacciones químicas, bioquímicas o el crecimiento microbiano.

Indicadores integrados tiempo-temperatura (TTI)

Muestran cambios de color que responden tanto a la temperatura como al tiempo de exposición. Sirven para monitorizar la exposición a temperaturas inadecuadas, ruptura de la cadena de frío, durante el transporte y el almacenamiento. Es fundamental que el comportamiento del indicador sea equivalente al deterioro que sufre el alimento bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura. Cuando el indicador manifieste su vencimiento, este debe corresponderse con el final de la vida útil del producto alimenticio.

Los principales mecanismos de acción incluyen reacciones químicas o enzimáticas o procesos de difusión, cuyas cinéticas dependen del tiempo y de la temperatura. Algunos sistemas se activan al disponerlos sobre el producto alimenticio a la temperatura de trabajo (hasta ese momento se almacenan ultracongelados), otros se activan por presión (comunicando los compartimentos en los que se encuentran las sustancias reactivas).

Indicadores de temperatura crítica

En ciertos casos al sobrepasar el alimento una temperatura crítica se pueden originar procesos irreversibles. Estos indicadores informan visualmente que la temperatura crítica ha sido excedida. Algunos manifiestan una respuesta acumulada en función del tiempo que se sobrepasa la temperatura límite.

2. Indicadores de estanqueidad (detectores de fugas)

Los más utilizados son los indicadores de oxígeno y dióxido de carbono que monitorizan alteraciones no deseadas en la atmósfera interior de productos envasados al vacío o en atmósfera protectora,

por ejemplo la entrada de aire o fuga de gases debidas a perforaciones o soldaduras defectuosas, eliminación insuficiente del aire durante el proceso de vacío o la acción de los absorbedores de oxígeno. Una composición inadecuada de la atmósfera interior del producto alimenticio envasado afecta a la calidad y seguridad del mismo.

La mayoría de estos indicadores asumen cambios de color como resultado de una reacción química o enzimática. Para ello se pueden utilizar indicadores redox como el azul de metileno.

3. Indicadores de humedad

Son etiquetas que indican variaciones en la humedad mediante un cambio de color. Estos indicadores pueden contener cloruro de cobalto, que reacciona con la humedad virando de azul a rosa cuando ésta aumenta, o pueden estar compuestos por cloruro de cobre, que vira de amarillo a verde (Aguirre y Herranz, 2008).

4. Indicadores de frescura

Dan una indicación acerca de algún parámetro de calidad del producto envasado, de la pérdida de frescura o del deterioro del producto alimenticio, tanto químico como bacteriológico.

En la literatura están descritos diversos mecanismos de indicación de metabolitos volátiles producidos durante el envejecimiento de los alimentos tales como diacetilo, aminas, amoníaco, sulfhídrico o indicadores de contaminación microbiana (Dainelli et al., 2008).

Aspectos legales

Los envases activos e inteligentes, al igual que todos los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos, tienen que cumplir con el Reglamento (CE) Nº 1935/2004 (UE, 2004), cuya finalidad es garantizar un elevado nivel de protección de la salud y de los intereses de los consumidores, así como garantizar el funcionamiento efectivo del mercado interior en relación con la comercialización de estos materiales.

Tienen que cumplir con los siguientes requisitos:

1. Requisitos generales

Indicados en el Artículo 3, es decir estar fabricados de conformidad con las buenas prácticas de fabricación y en las condiciones normales o previsibles de empleo no pueden ceder componentes que puedan representar un peligro para la salud humana o provocar una modificación inaceptable de la composición o una alteración de las características organolépticas de los alimentos. Además, su etiquetado no debe inducir a error a los consumidores.

2. Requisitos especiales

Materiales y objetos activos

- Pueden ocasionar modificaciones de la composición o de las características organolépticas de los alimentos siempre que cumplan con las disposiciones comunitarias aplicables a los alimentos (por ejemplo, legislación sobre aditivos, aromas y enzimas) o en su ausencia con las disposiciones nacionales.

- Las sustancias liberadas deben autorizarse y utilizarse de acuerdo con las disposiciones comunitarias correspondientes.
- Las sustancias liberadas se considerarán ingredientes alimentarios y estarán sujetos a lo dispuesto en la reglamentación sobre el etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios.
- No ocasionarán modificaciones que puedan inducir a error al consumidor.

Materiales y objetos inteligentes

No darán información sobre el estado del alimento que pueda inducir a error al consumidor.

Comunes a ambos materiales y objetos

- Convenientemente etiquetados, indicando que son activos, inteligentes o ambos.
- Etiquetado adecuado que permita al consumidor identificar las partes no comestibles.

3. Requisitos específicos

Establecidos en el Reglamento (CE) N° 450/2009 (UE, 2009).

De adecuación y eficacia

Deben ser adecuados y eficaces para el uso previsto.

De composición

Únicamente las sustancias incluidas en la lista comunitaria de sustancias autorizadas podrán utilizarse en componentes de los materiales y objetos activos e inteligentes.

Sin embargo, no necesitan ser incluidas:

- Las sustancias activas liberadas al alimento y las incorporadas a los materiales y objetos mediante implantación o inmovilización para tener un efecto tecnológico en el alimento, siempre que cumplan con las disposiciones aplicables a los alimentos. Estas sustancias no se incluirán en el valor de la migración global ni estarán sujetas a las restricciones concretas establecidas en las reglamentaciones sobre los materiales en contacto con alimentos.
- Sustancias empleadas en componentes que no estén en contacto directo con el alimento ni con su entorno y estén separados del alimento por una barrera funcional y no pertenezcan a ninguna de las dos categorías siguientes:
 - i) Sustancias clasificadas como «mutágenas», «carcinógenas» o «tóxicas para la reproducción».
 - ii) Nanopartículas.

La migración al alimento de estas sustancias no deberá exceder de 0,01 mg/kg.

Para incluir una sustancia en la lista comunitaria autorizada hay que presentar una solicitud a la Autoridad competente del Estado miembro (en España, la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN)-Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad) que incluirá, según el protocolo establecido en el Reglamento (CE) N° 1935/2004, el nombre y la dirección del solicitante y una documentación técnica que contenga la información especificada en las directrices que rigen la

evaluación de la seguridad de una sustancia, estas directrices están elaboradas y publicadas por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2009).

La lista debe incluir la identidad, restricciones o especificaciones o condiciones de uso de la sustancia o combinación de sustancias y, si es preciso, del componente o del material u objeto al que se añadan o incorporen.

Actualmente la lista inicial de sustancias autorizadas está en fase de elaboración, ya que todavía está abierto el plazo para la presentación de solicitudes, que deben acompañarse de la información que permita llevar a cabo la evaluación de la seguridad de dichas sustancias.

De etiquetado

Los materiales y objetos activos e inteligentes o sus partes, cuando puedan percibirse como comestibles, deberán etiquetarse con las palabras «NO INGERIR» y, siempre que sea técnicamente posible, figurará en ellos el siguiente símbolo.



- La información debe ser visible, claramente legible e indeleble y deberá imprimirse en caracteres con un tamaño mínimo de carácter de 3 mm.
- La sustancia activa liberada deberá considerarse un ingrediente alimentario en conformidad con la reglamentación sobre etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios.

Declaración de conformidad

En las fases de comercialización distintas del punto de venta al consumidor final, los materiales y objetos activos e inteligentes, ya estén en contacto con los alimentos o no, o los componentes destinados a la fabricación de esos materiales y objetos o las sustancias destinadas a la fabricación de los componentes deberán ir acompañados de una declaración de conformidad.

Los envases activos e inteligentes, al igual que los materiales en contacto con alimentos, son elementos que se incorporan en las etapas de la producción, transformación y distribución de los productos alimenticios, estando afectado obviamente por las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas aplicables en la Unión Europea o a nivel nacional a los alimentos en general y a la seguridad de los alimentos en particular (Reglamento (CE) Nº 178/2002). De particular interés son las disposiciones sobre:

- Aditivos, aromas y enzimas alimentarios para las sustancias liberadas y las inmovilizadas en el envase que tengan un efecto tecnológico sobre el alimento.
- Etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios, propiedades nutritivas y declaraciones nutricionales y saludables, para las sustancias liberadas, las inmovilizadas en el envase que tengan un efecto tecnológico sobre el alimento y las atmósferas modificadas.

- Higiene de los productos alimenticios.

Conclusiones del Comité Científico

En espera de la publicación de la lista inicial de sustancias autorizadas por la Comisión Europea, con sus especificaciones, restricciones y recomendaciones de uso, este Comité desea resaltar los siguientes aspectos:

- La investigación en el campo de los envases activos e inteligentes utiliza numerosas sustancias, algunas procedentes de compuestos naturales, otras sintéticas, con efecto técnico sobre el alimento, que actualmente no están autorizadas como aditivos alimentarios y por lo tanto no pueden ser liberadas a los alimentos.
- Las sustancias autorizadas y liberadas como aditivos alimentarios tienen que ajustarse estrictamente a su reglamentación y utilizarse única y exclusivamente bajo las condiciones especificadas en la misma. Las sustancias liberadas como aromas se ajustarán a su propia reglamentación.
- Las sustancias liberadas se considerarán ingredientes alimentarios y estarán sujetos a lo dispuesto en la reglamentación sobre el etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios.

Referencias

- Aguirre, R. y Herranz, N. (2008). Envases inteligentes: información y seguridad en el envase. *Infopack*, 137.
- Brody, A.L., Bugusu, B., Han, J.H., Sand, C.K. y McHugh, T.H. (2008). Scientific Status Summary. Innovative Food Packaging Solutions. *Journal of Food Sciences*, 73 (8), pp: R107-R116.
- Camo, J., Beltran, J.A. y Roncales, P. (2008). Extension of the display life of lamb with an antioxidant active packaging. *Meat Science*, 80 (4), pp: 1086-1091.
- Chen, M.C., Yeh G.H.C. y Chiang, B.H. (1996). Antimicrobial and physicochemical properties of methylcellulose and chitosan films containing a preservative. *Journal of Food Processing and Preservation*, 20 (5), pp: 379-390.
- Coma, V. (2008). Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Science*, 78, pp: 90-103.
- Dainelli, D., Gontard, N., Spyropoulos, D., Van den Beuken, E.Z. y Tobback, P. (2008). Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. *Trends in Food Science & Technology*, 19 (S1), pp: S103-S112.
- De Kruijf, N.M., Van Beest, R.R., Sipilinen-Malm, T., Paseiro, P.L. y De Meulenaer, B. (2002). Active and intelligent packaging: applications and regulatory aspects. *Food Additives & Contaminants*, 19 (4), pp: 144-162.
- Dobias, J., Chudackova, K., Voldrich, M. y Marek, M. (2000). Properties of polyethylene films with incorporated benzoic anhydride and/or ethyl and propyl esters of 4-hydroxybenzoic acid and their suitability for food packaging. *Food Additives & Contaminants*, 17 (12), pp: 1047-1053.
- EFSA (2009). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Guidelines on submission of a dossier for safety evaluation by the EFSA of active or intelligent substances present in active and intelligent materials and articles intended to come into contact with food. *The EFSA Journal*, 1208, pp: 2-11. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/fr/scdocs/doc/1208.pdf> [acceso: 21-11-10].
- Fernández, A., Picouet, P. y Lloret, E. (2010). Cellulose-silver nanoparticle hybrid materials to control spoilage-related microflora in absorbent pads located in trays of fresh-cut melon. *International Journal of Food Microbiology*, 142 (1-2), pp: 222-228.
- Franzetti, L., Piergiovanni, L. y Galli, A. (2001). Influence of Active Packaging on the Shelf-life of Minimally Processed Fish Products in a Modified Atmosphere. *Packaging Technology and Science*, 14, pp: 267-274.
- Gutiérrez, L., Sánchez, C., Batlle, R., López, P. y Nerín, C. (2009). New Antimicrobial Active Package for Bakery Products. *Trends in Food Science and Technology*, 20 (2), pp: 92-99.

- Gutiérrez, L., Escudero, A., Batlle, R. y Nerín, C. (2010). Effect of Mixed Antimicrobial Agents and Flavors in Active Packaging Films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, pp: 8564-8571.
- Han, J.H. y Floros, J.D. (1997). Casting antimicrobial packaging films and measuring their physical properties and antimicrobial activity. *Journal. Plastic Film and Sheeting*, 13, pp: 287-298.
- Hong, S.I, Park, J.D. y Kim, D.M. (2000). Antimicrobial and physical properties of food packaging films incorporated with some natural compounds. *Food Science Biotechnology* 9 (1), pp: 38-42.
- Hotchkiss, J.H. (1997). Food-packaging interactions influencing quality and safety. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 14 (6), pp: 601-607.
- Kerry, J.P., O'Grady, M.N. y Hogan, S.A. (2006). Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. *Meat Science*, 74, pp: 113-130.
- Kim, Y.M., Lee, N.K., Paik, H.D. y Dong, S.L. (2000). Migration of Bacteriocin from Bacteriocin-Coated Film and Its Antimicrobial Activity. *Food Science Biotechnology*, 9 (5), pp: 325-329.
- Labuza, T.P. y Breene, W.M. (1989). Applications of "active packaging" for improvement of shelf-life and nutritional quality of fresh and extended shelf-life foods. *Journal of Food Processing and Preservation*, 13, pp: 1-69.
- Lopez, P., Sanchez, C., Batlle, R. y Nerin, C. (2007). Development of flexible antimicrobial films using essential oils as active agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (21), pp: 8814-8824.
- Lopez-Rubio, A., Gavara, R. y Lagarón, J.M. (2006). Bioactive packaging: turning foods into healthier foods through biomaterials. *Trends in Food Science & Technology*, 17, pp: 567-575.
- Natrajan, N. y Sheldon, B.W. (2000). Efficacy of Nisin-Coated Polymer Films To Inactivate Salmonella Typhimurium on Fresh Broiler Skin. *Journal of Food Protection*, 63, pp: 1189-1196.
- Nerín, C., Tovar, L., Djenane, D., Camo, J., Salafranca, J. y Beltrán, J.A. (2006). Stabilization of Beef Meat by a New Active Packaging Containing Natural Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, pp: 7840-7846.
- Nerín, C., Tovar, L. y Salafranca, J. (2008). Behaviour of a new antioxidant active film versus oxidizable model compounds. *Journal of Food Engineering*, 84, pp: 313-320.
- Nerín, C. (2010), Antioxidant active packaging and antioxidant edible films, Chapter 31 in the book "Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications", E Decker, R Elias (eds.), Woodhead Publishing.
- Ouattara, B., Simard, R.E., Piette, G., Begin, A. y Holley, R.A. (2000a). Diffusion of acetic and propionic acids from chitosan-based antimicrobial packaging films. *Journal of Food Science*, 65 (5), pp: 768-773.
- Ouattara, B., Simard, R.E., Piette, G., Begin, A. y Holley, R.A. (2000b). Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *International Journal of Food Microbiology*, 62 (1-2), pp: 139-148.
- Ozdemir, M. y Floros, J.D. (2004). Active Food Packaging Technologies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44 (3), pp: 185-193.
- Paseiro Losada, P., Sanches Silva, A., Pereira de Abreu, D. y Cruz, J.M. (2007). Cap. XII: Envases activos e inteligentes para alimentos. Aplicación de tecnologías emergente de procesado mínimo en el sector pesquero, Cap. XII, pp: 221-233. Editado por el Centro Tecnológico del Mar-Fundación CETMAR, Vigo, ISBN: 978-84-611-4804-2.
- Pereira de Abreu, D.A., Paseiro Losada, P., Maroto, J. y Cruz, J.M. (2010). Evaluation of the effectiveness of a new active packaging film containing natural antioxidants (from barley husks) that retard lipid damage in frozen Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Food Research International*, 43, pp. 1277-1282.
- Pezo, C., Tovar, L. y Salafranca, J. (2008). Determination of the antioxidant capacity of active food packagings by in situ gas-phase hydroxyl radical generation and high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1178 (1-2), pp: 126-133.
- Quintavalla, S. y Vicina, L. (2002). Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science*, 62, pp: 373-380.
- Rodriguez, A., Batlle, R. y Nerin, C. (2007). The use of natural essential oils as antimicrobial solutions in paper packaging. *Progress in Organic Coatings*, 60 (1), pp: 33-38.

- Rodríguez, A., R. Batlle y C. Nerín (2008). The use of cinnamon-based active paper packaging against *Rhizopus stolonifer* food spoilage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, pp. 6364-6369.
- Rooney, M. (1995). Chap. 4: Active Packaging in Polymer Films. *Active Food Packaging*, Chap. 5, pp:74-110. Edited Rooney, M.L. Blackie Academic and Professional, London, ISBN: 978-0-7514-0191-2.
- Rooney, M. (2005). Chap. 8: Oxygen scavenging packaging. *Innovations in food packaging*, Chap. 5, pp:123-135. Edited by Jung Han, Elsevier Academic Press, London, ISBN: 0-12-311632-5.
- Sanches-Silva, A., Costa, H.S., Losada, P.P., Sendón, R., Sánchez-Machado, D.I., Valdez, H.S., Varona, I.A. y López-Cervantes, J. (2010). News From EU Research: Preparation of active packaging with antioxidant and antimicrobial activity based on astaxanthin and chitosan. *Nutrition Bulletin*, 35 (3), pp. 268-271.
- Shin, J., Harte, B., Ryser, E. y Selke, S. (2010). Active Packaging of Fresh Chicken Breast, with Allyl Isothiocyanate (AITC) in Combination with Modified Atmosphere Packaging (MAP) to Control the Growth of Pathogen. *Journal of Food Science*, 75 (2), pp. M65-M71.
- Skandamis, P.N. y Nychass, G.J. (2002). Preservation of fresh meat with active and modified atmosphere packaging conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 79 (1-2), pp: 35-45.
- Smith, J.P., Ramaswamy, H.S. y Simpson, B.K. (1990). Developments in food packaging technology. Part II. *Trends in Food Science & Technology*, 1, pp: 111-178.
- Soares, N.F.F. y Hotchkiss, J.H. (1998a). Bitterness reduction in grapefruit juice through active packaging. *Packaging Technology and Science*, 11, pp: 9-18.
- Soares, N.F.F. y Hotchkiss, J.H. (1998b). Naringinase immobilisation in packaging films for reducing naringin concentration in grapefruit juice. *Journal of Food Science*, 63, pp: 61-65.
- Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K., y Bigger, S.W. (2003). Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. *Journal of Food Science*, 68 (2), pp: 408-419.
- Tovar, L., Salafranca, J., Sanchez, C. y Nerin, C. (2005). Migration studies to assess the safety in use of a new antioxidant active packaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (13), pp: 5270-5275.
- UE (2004). Reglamento (CE) N° 1935/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de octubre de 2004, sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos y por el que se derogan las Directivas 80/590/CEE y 89/109/CEE. DO L 338 de 13 de noviembre de 2004, pp: 4-17.
- UE (2009). Reglamento (CE) N° 450/2009 de la Comisión, de 29 de mayo de 2009, sobre materiales y objetos activos e inteligentes destinados a entrar en contacto con alimentos. DO L 135 de 30 de mayo de 2009, pp: 3-11.
- Vega-Lugo, A.C. y Loong-Tak, L. (2009). Controlled release of allyl isothiocyanate using soy protein and poly(lactic acid) electrospun fibers. *Food Research International*, 42 (8), pp. 933-940.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F., van Beest, M., de Kruijf, N. y Debevere, J. (1999). Developments in the active packaging of foods. *Trends in Food Science & Technology*, 10 (3), pp: 77-86.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F. y Debevere, J. (2002). Effectiveness of some recent antimicrobial packaging concepts. *Food Additives and Contaminants*, 19 (5), pp: 163-171.
- Weng, Y.M. y Chen, M.J. (1997). Sorbic anhydride as antimycotic additive in polyethylene food packaging film. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 30 (5), pp: 485-487.

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

Rodríguez-Ferri, E., Badiola-Díez, J.J., Cepeda-Sáez, A., Domínguez-Rodríguez, L., Otero-Carballeira, A. y Zurera-Cosano, G. Grupo de trabajo. (2009). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre la evisceración de los lagomorfos. Revista del Comité Científico de la AESAN, 9, pp: 31-38.

Abreviatura revista: Rev. Com. Cient. AESAN.

