

revista del
Comité
Científico de la aecosan

Nº 22

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



Revista del Comité Científico de la AECOSAN

Madrid, 2015

revista del
Comité
Científico de la aecosan

Nº 22

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

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

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

Consejo Editorial Científico

Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición

Presidenta

Guillermina Font Pérez

Vicepresidenta

Ascensión Marcos Sánchez

Elena Alonso Lebrero

José Manuel Barat Baviera

María Pilar Conchello Moreno

Ramón Estruch Riba

María Antonia Ferrús Pérez

Susana Guix Arnau

Arturo Hardisson de la Torre

Ángeles Jos Gallego

Amelia Martí del Moral

Olga Martín Belloso

María Aránzazu Martínez Caballero

Alfredo Palop Gómez

Gaspar Pérez Martínez

José Luis Ríos Cañavate

Gaspar Ros Berruezo

Jesús Ángel Santos Buelga

Jesús Simal Gándara

Josep Antoni Tur Marí

Secretario técnico

Vicente Calderón Pascual

Coordinadores de la edición

Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición

Ricardo López Rodríguez

Edita

AECOSAN

Alcalá, 56. 28071. Madrid

Correo electrónico: evaluacionriesgos@msssi.es

Diseño y maquetación

Montserrat Gómez

NIPO: 690-15-001-2

ISSN: 2386-5342

Índice

Prólogo	9
Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición	
Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) sobre recomendaciones de actividad física en el marco de la Estrategia NAOS	11
Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) sobre los riesgos microbiológicos asociados al consumo de determinados alimentos por niños de 0 a 3 años	19
Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) sobre condiciones de uso de determinadas sustancias para ser empleadas en complementos alimenticios-4	79
Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) en relación a la complementación con vitamina D de la dieta de niños de 0 a 3 años	133
Colaboración	
Estudios de prospección de bisfenol A y melamina en bebidas enlatadas	151

Es para mí una gran satisfacción presentar el número 22 de la Revista del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN).

Los principios básicos en los que se basa el buen funcionamiento de nuestro Comité Científicos son la excelencia e independencia de sus miembros y la transparencia de sus informes. La Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición del Comité lleva más de 10 años aprobando informes que han servido para basar la gestión de los riesgos alimentarios en evidencias científicas sólidas y, por tanto, para proteger la salud de los consumidores. Desde la AECOSAN se hace un esfuerzo por divulgar estos informes y promover su visibilidad internacional, publicándolos en nuestro portal web de forma individual, como parte de esta Revista y traduciéndolos a inglés.

En este número hay dos informes sobre la alimentación de los niños menores de 3 años. Se trata de una población que, por una parte, es especialmente susceptible a las enfermedades transmitidas por los alimentos y, por otra, presenta requerimientos nutricionales específicos. Son dos buenos ejemplos de informes que podrán dar lugar a recomendaciones que permitan proteger la salud de este grupo de población en un momento fundamental de su desarrollo. Este número de la Revista se completa con un nuevo informe sobre el uso de diversas sustancias como posibles ingredientes de complementos alimenticios y sobre las últimas directrices sobre actividad física y su incorporación a la Estrategia NAOS.

Quiero agradecer a todos miembros del Comité Científico que han contribuido a la elaboración de estos informes su trabajo y su esfuerzo desinteresado para resolver las cuestiones planteadas desde nuestra Agencia.

Teresa Robledo de Dios

*Directora Ejecutiva de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición
Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad*

Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) sobre recomendaciones de actividad física en el marco de la Estrategia NAOS

Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición

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

Secretario técnico

Vicente Calderón Pascual

Número de referencia: AECOSAN-2015-005

Documento aprobado por la Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición del Comité Científico en su sesión plenaria de 23 de septiembre de 2015

Grupo de trabajo

Ascensión Marcos Sánchez (Coordinadora)
Ramón Estruch Riba
Amelia Marti del Moral
Josep Antoni Tur Mar

Resumen

El Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) emitió en 2014 un informe sobre objetivos y recomendaciones nutricionales y de actividad física frente a la obesidad en el marco de la Estrategia NAOS sugiriendo que “se deben elaborar estrategias nacionales y medidas intersectoriales encaminadas a la promoción de la actividad física beneficiosa para la salud en consonancia con la legislación y la práctica nacionales; es decir, debe existir una recomendación nacional sobre actividad física en beneficio de la salud” y recomendando “establecer un marco general en España que contenga unas directrices generales sobre las características de la actividad física que debe realizar cada segmento de la población para estar saludable en las diferentes etapas de la vida (infancia y adolescencia, las personas adultas y mayores) y que pueda servir de guía a las estrategias que impulsen las comunidades autónomas”.

Por otra parte, recientemente se han presentado recomendaciones nacionales sobre actividad física para la salud, reducción del sedentarismo y del tiempo de pantalla para toda la población, fruto de la colaboración entre el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad y el Ministerio de Educación, Cultura y Deportes, a través del Consejo Superior de Deportes, y dentro del marco de la Estrategia de Promoción de la Salud y Prevención en el Sistema Nacional de Salud.

El Comité Científico de la AECOSAN ha valorado ambos documentos y ha concluido que las recomendaciones recogidas en el documento “Actividad física para la salud y reducción del sedentarismo. Recomendaciones para la población”, en el marco de la Estrategia de Promoción de la Salud y Prevención en el Sistema Nacional de Salud del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad están en la línea de las realizadas por el Comité Científico de la AECOSAN en 2014 y presentan aspectos de interés por lo que pueden ser asumidas dentro de la Estrategia NAOS sobre

Nutrición, Actividad Física y Salud para, de acuerdo con sus objetivos, promover la actividad física y contribuir a invertir la tendencia ascendente de la prevalencia de la obesidad y, con ello, reducir la morbilidad y mortalidad atribuible a las enfermedades crónicas.

Palabras clave

Actividad física, NAOS, sedentarismo, salud.

Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Consumer Affairs, Food Safety and Nutrition (AECOSAN) on recommendations for physical activity within the framework of the NAOS Strategy

Abstract

The Scientific Committee of the Spanish Agency for Consumer Affairs, Food Safety and Nutrition (AECOSAN) published in 2014 a report on objectives and nutritional recommendations and physical exercise to combat obesity in the framework of the NAOS Strategy, suggesting that “national strategies and intersectorial measures should be drawn up aimed at the promotion of physical activity beneficial for health in line with national legislation and practice; that is, there should be a national recommendation for physical exercise to benefit health” and recommending “the establishment of a general framework in Spain containing certain general directives on the characteristics of the physical activity that each segment of the population should adopt in order to remain healthy during the different stages of their life (childhood and adolescence, adults and the elderly) and which might serve as a guide to the strategies promoted by the regional communities”.

In addition, national recommendations have been presented for physical activity for health, the reduction of a sedentary lifestyle and screen time for the whole population. This is the result of collaboration between the Ministry of Health, Social Services and Equality and the Ministry of Education, Culture and Sport, through the Higher Council for Sport, and within the framework of the National Health System’s Strategy for the Promotion of Health and Prevention.

The Scientific Committee of the AECOSAN has assessed both documents and concluded that the recommendations listed in the document “Physical activity for health and the reduction of a sedentary lifestyle. Recommendations for the population”, under the framework of the National Health System’s Strategy for the Promotion of Health and Prevention from the Ministry of Health, Social Services and Equality are in line with those made by the Scientific Committee of the AECOSAN in 2014 and contain areas of interest. They may therefore be assumed within the NAOS Strategy for Nutrition, Physical Activity and Health in order to, in accordance with their objectives, promote physical activity and contribute to reversing the growing trend of obesity prevalence and, consequently, to reducing the morbidity and mortality rates attributed to chronic illness.

Key words

Physical activity, NAOS, sedentary lifestyle, health.

1. Introducción

Siguiendo la línea marcada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Estrategia NAOS sobre Nutrición, Actividad Física y Salud, nacida en el año 2005, se plantea como meta fundamental fomentar una alimentación saludable y promover la actividad física como binomio indisoluble para invertir la tendencia ascendente de la prevalencia de la obesidad y, con ello, reducir la morbilidad y mortalidad atribuible a las enfermedades crónicas.

En este sentido en la Ley 17/2011, de 5 de julio, de Seguridad Alimentaria y Nutrición en su artículo 36 sobre la Estrategia NAOS se señalaba que “en la Estrategia se establecerán los objetivos nutricionales y de actividad física para la población y los de reducción de la prevalencia de obesidad”.

Posteriormente, en el 2014, el Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) emitió un informe sobre objetivos y recomendaciones nutricionales y de actividad física frente a la obesidad en el marco de la Estrategia NAOS sugiriendo que “se deben elaborar estrategias nacionales y medidas intersectoriales encaminadas a la promoción de la actividad física beneficiosa para la salud en consonancia con la legislación y la práctica nacionales; es decir, debe existir una recomendación nacional sobre actividad física en beneficio de la salud” y recomendando “establecer un marco general en España que contenga unas directrices generales sobre las características de la actividad física que debe realizar cada segmento de la población para estar saludable en las diferentes etapas de la vida (infancia y adolescencia, las personas adultas y mayores) y que pueda servir de guía a las estrategias que impulsen las comunidades autónomas” (AECOSAN, 2014).

Recientemente ha sido presentado el documento “Actividad física para la salud y reducción del sedentarismo. Recomendaciones para la población”, en el marco de la Estrategia de Promoción de la Salud y Prevención en el Sistema Nacional de Salud del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (MSSSI, 2015).

Por todo ello, y considerando que las recomendaciones sobre actividad física emitidas en el marco de la Estrategia de Promoción de la Salud y Prevención en el Sistema Nacional de Salud, están actualizadas y se basan en evidencias científicas y son coherentes con las emitidas por organismos internacionales como la OMS, se ha solicitado a la Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición del Comité Científico de la AECOSAN que valore si dichas recomendaciones son concordantes con las sugerencias realizadas por el Comité Científico en el marco de la Estrategia NAOS.

2. Objetivos y recomendaciones sobre actividad física emitidos por el Comité Científico de la AECOSAN en el marco de la Estrategia NAOS

El informe emitido por el Comité Científico relativo a objetivos y recomendaciones sobre actividad física revisó las recomendaciones y objetivos disponibles en ese momento en materia de actividad física en distintos países como Francia, el Reino Unido, los países nórdicos y los Estados Unidos, y las de la OMS.

Finalmente, las recomendaciones sobre actividad física del Comité Científico de la AECOSAN fueron:

1. Se deben elaborar estrategias nacionales y medidas intersectoriales encaminadas a la promoción de la actividad física beneficiosa para la salud en consonancia con la legislación y la

práctica nacionales; es decir, debe existir una recomendación nacional sobre actividad física en beneficio de la salud.

2. Los programas o planes de actuación para cumplir la recomendación mínima de la OMS sobre actividad física en beneficio de la salud deben tener como objetivo común aumentar:
 - El porcentaje de adultos que alcancen un mínimo de 150 minutos de actividad física de intensidad moderada por semana o 75 minutos de actividad física de intensidad elevada, o una combinación equivalente.
 - El porcentaje de niños y adolescentes que alcancen al menos 60 minutos diarios de actividad física de intensidad moderada a elevada o al menos 5 días por semana.
3. Se han de designar centros de referencia nacionales en materia de actividad física beneficiosa para la salud de conformidad con la legislación y las prácticas nacionales. Estos centros se encargarán, en particular, de coordinar el proceso para poner los datos sobre actividad física a disposición del marco de seguimiento; estos datos deben introducirse en la base de datos europea de la OMS existente sobre nutrición, obesidad y actividad física; asimismo, deben facilitar la cooperación entre servicios en relación con las políticas de “actividad física beneficiosa para la salud”.

3. Recomendaciones sobre actividad física emitidas en el marco de la Estrategia de Promoción de la Salud y Prevención en el Sistema Nacional de Salud

La Estrategia de Promoción de la Salud y Prevención en el Sistema Nacional de Salud, (MSSSI 2013), incluía dentro del apartado “Proceso de implementación”, la necesidad de dar continuidad al trabajo conjunto con el sector deportivo, reforzando los marcos de colaboración entre el sector de la salud y el de deportes, iniciados hace años con la elaboración del Plan Integral para la Actividad Física y el Deporte (Plan A+D) (CSD, 2010), cuyo primer objetivo era incrementar notablemente el nivel de práctica deportiva.

Fruto de la colaboración entre el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad y el Ministerio de Educación Cultura y Deportes, a través del el Consejo Superior de Deportes, y dentro del marco de la Estrategia de Promoción de la Salud y Prevención en el Sistema Nacional de Salud, se presentan las recomendaciones nacionales sobre actividad física para la salud, reducción del sedentarismo y del tiempo de pantalla para toda la población (MSSSI, 2015).

Estas recomendaciones se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 1. Resumen de recomendaciones sobre actividad física, sedentarismo y tiempo de pantalla					
Grupos de edad		Recomendaciones de actividad física	Observaciones	Reducir el sedentarismo	Limitar el tiempo de pantalla
Menores de 5 años	Los que aún no andan	Varias veces al día. Cualquier intensidad.	Fomentar el movimiento, el juego activo y disfrutar	Minimizar el tiempo que pasan sentados o sujetos en sillas o carritos cuando están despiertos, a menos de 1 hora seguida.	<2 años: no se recomienda pasar tiempo delante de una pantalla. De 2 de 4 años: el tiempo de pantalla debería limitarse a menos de 1 hora al día.
	Cuando ya andan	Al menos 180 minutos al día. Cualquier intensidad.	Realizar actividades y juegos que desarrollen las habilidades motrices básicas (correr, saltar, trepar, lanzar, nadar,...) en distintos ambientes (en casa, en el parque, en la piscina, etc.).		
5 a 17 años		Al menos 60 minutos al día. Intensidad moderada a vigorosa.	Incluir, al menos 3 días a la semana, actividad de intensidad vigorosa que fortalezcan músculos y mejoren masa ósea.	Reducir los periodos sedentarios prolongados. Fomentar el transporte activo y las actividades el aire libre.	Limitar el tiempo de uso de pantallas con fines recreativos a un máximo de 2 horas al día.
Personas adultas		Al menos 150 minutos de actividad moderada a la semana o 75 minutos de actividad vigorosa a la semana o una combinación equivalente de las anteriores. Estas recomendaciones pueden alcanzarse sumando periodos de al menos 10 minutos seguidos cada uno.	Realizar, al menos 2 días a la semana, actividades de fortalecimiento muscular y mejora de la masa ósea y actividades para mejorar la flexibilidad. Los mayores de 65 años, especialmente con dificultades de movilidad al menos 3 días a la semana, realizar actividades de fortalecimiento muscular para mejorar el equilibrio.	Reducir los periodos sedentarios prolongados de más de 2 horas seguidas, realizando descansos activos cada 1 o 2 horas con sesiones cortas de estiramientos o dando un breve paseo. Fomentar el transporte activo.	Limitar el tiempo delante de una pantalla.

Fuente: (MSSSI, 2015).

4. Concordancia de las recomendaciones

Las recomendaciones sobre actividad física recogidas en el documento “Actividad física para la salud y reducción del sedentarismo. Recomendaciones para la población” (MSSSI, 2015) coinciden en términos generales con las que se recogen en el anterior informe del Comité Científico de la AECOSAN ya que ambas se basan en las recomendaciones de la OMS.

No obstante, este nuevo documento arroja luz sobre algunos aspectos particulares como son recomendaciones específicas para niños menores de 5 años -según anden o no anden- y también para mujeres durante el embarazo o después del parto.

Además, el esquema general de las recomendaciones especifica tres apartados básicos: actividad física, reducir el sedentarismo y limitar el tiempo de pantalla lo que puede ayudar a clarificar los cambios en el comportamiento que se sugieren.

Otro aspecto interesante es que el documento recoge la necesidad de fomentar las actividades al aire libre. Hay evidencia de que los niveles adecuados de vitamina D (en los que la luz solar juega un papel importante), favorecen la absorción del calcio lo que repercutirá positivamente en la actividad muscular.

Conclusiones del Comité Científico

El Comité Científico de la AECOSAN concluye que las recomendaciones recogidas en el documento “Actividad física para la salud y reducción del sedentarismo. Recomendaciones para la población”, en el marco de la Estrategia de Promoción de la Salud y Prevención en el Sistema Nacional de Salud del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad están en la línea de las realizadas por el Comité Científico de la AECOSAN en 2014.

Por ello, considera que las recomendaciones del documento “Actividad física para la salud y reducción del sedentarismo. Recomendaciones para la población” pueden ser asumidas dentro de la Estrategia NAOS sobre Nutrición, Actividad Física y Salud para, de acuerdo con sus objetivos, promover la actividad física y contribuir a invertir la tendencia ascendente de la prevalencia de la obesidad y, con ello, reducir la morbilidad y mortalidad atribuible a las enfermedades crónicas.

Referencias

- AECOSAN (2014). Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición sobre objetivos y recomendaciones nutricionales y de actividad física frente a la obesidad en el marco de la Estrategia NAOS. *Revista del Comité Científico de la AECOSAN*, 19, pp: 95-209. Disponible en: http://aesan.msssi.gob.es/AESAN/docs/docs/publicaciones_estudios/revistas/comite_cientifico_19.pdf [acceso: 22-09-15].
- CSD (2010). Consejo Superior de Deportes. Plan Integral para la Actividad física y el Deporte (Plan A+D). Disponible en: <http://www.csd.gob.es/csd/sociedad/plan-integral-para-la-actividad-fisica-y-el-deporte-plan-a-d/view> [acceso: 22-09-15].
- MSSSI (2013). Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Estrategia de Promoción de la Salud y Prevención en el SNS. Disponible en: <http://www.msssi.gob.es/profesionales/saludPublica/prevPromocion/docs/EstrategiaPromocionSaludyPrevencionSNS.pdf> [acceso: 22-09-15].

MSSSI (2015). Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Actividad Física para la Salud y Reducción del Sedentarismo. Recomendaciones para la población. Estrategia de Promoción de la Salud y Prevención en el SNS. Disponible en: http://www.msssi.gob.es/profesionales/saludPublica/prevPromocion/Estrategia/Recomendaciones_ActivFisica.htm [acceso: 22-09-15].

Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) sobre los riesgos microbiológicos asociados al consumo de determinados alimentos por niños de 0 a 3 años

Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición

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

Secretario técnico

Vicente Calderón Pascual

Número de referencia: AECOSAN-2015-006

Documento aprobado por la Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición del Comité Científico en su sesión plenaria de 18 de noviembre de 2015

Grupo de trabajo

María Antonia Ferrús Pérez (Coordinadora)
Elena Alonso Lebrero
María Pilar Conchello Moreno
Susana Guix Arnau
Alfredo Palop Gómez
Gaspar Ros Berrueto
Jesús Ángel Santos Buelga
Josep Antoni Tur Marí

Resumen

Los niños menores de 3 años son especialmente susceptibles a las enfermedades transmitidas por los alimentos debido, entre otros factores, a la inmadurez de su sistema inmunitario. La incidencia de enfermedades transmitidas por alimentos en este grupo de edad es mucho mayor que en la población en general. Teniendo en cuenta el estricto control sanitario existente durante la etapa pediátrica, los lactantes y niños de corta edad constituyen un grupo de población sobre el que las medidas de prevención basadas en la comunicación del riesgo y la educación para la salud pueden ser muy eficaces.

Así pues, con el objetivo de establecer unos principios sobre los que realizar actividades de gestión y comunicación del riesgo, el Comité Científico ha elaborado un informe en el que se presentan aquellos patógenos transmitidos por alimentos de especial riesgo para lactantes y niños de corta edad, analizando en cada caso los factores que afectan a su supervivencia y crecimiento, así como las medidas de prevención más eficaces, incidiendo en aquellas que pueden ser ejercidas por los consumidores.

Se han diferenciado los principales riesgos microbiológicos para cada grupo de edad: lactantes (leche materna o preparados para lactantes), niños que consumen alimentos triturados y aquellos que tienen una alimentación completa.

En el caso de la lactancia materna, se revisan las infecciones que la contraindican de forma absoluta (brucelosis, VIH, HTLV) o relativa. Respecto a los lactantes alimentados con preparados en polvo, se incide especialmente en el riesgo de infección por *Salmonella* y *Cronobacter*, debido a que existen claras pruebas de una relación causal entre su presencia en los preparados para lactantes y el desarrollo de enfermedad en éstos, y se presentan las principales medidas higiénicas a respetar en la preparación y manipulación de biberones.

En el caso de los niños que tienen una alimentación triturada o completa, se destaca la necesidad de incluir en cualquier campaña de comunicación del riesgo instrucciones relativas a la manipulación higiénica de los alimentos en el hogar. Por último, se incluye una lista de alimentos cuyo consumo puede suponer un riesgo para este grupo de población.

Palabras clave

Lactantes, niños de corta edad, riesgos microbiológicos, *Salmonella*, *Cronobacter*, virus, patógenos alimentarios, preparados para lactantes, preparación de biberones, alimentos infantiles, prácticas higiénicas de manipulación de alimentos.

Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Consumer Affairs, Food Safety and Nutrition (AECOSAN) on the microbiological risks associated with the consumption of certain foods for children aged 0 to 3

Abstract

Children under 3 years old are particularly susceptible to foodborne diseases, due in part to the immaturity of their immune systems. The rate of foodborne diseases among this age group is much higher than it is for the general population. Considering the strict sanitary controls in place during paediatric stage, methods of prevention based on risk communication and health education might be the most effective for the infants and young children population group.

Therefore, in order to determine some basic principles for implementing management activities and risk communication, the Scientific Committee has drafted a report, examining certain foodborne pathogens which present a particularly high risk for infants and young children, in each case analyzing the factors which affect their survival and growth, as well as the most effective prevention methods, and highlighting what people can do themselves.

A distinction is made between the main microbiological risks for each age group: infants (either breastfed or fed with formulae), children on soft foods and children on solid foods.

In the case of breastfed children, infections that should absolutely be avoided are reviewed (brucellosis, HIV, HTLV), as well as ones that should generally be avoided. Meanwhile, infants fed with formulae are especially at risk of infection from *Salmonella* and *Cronobacter*, and there is clear evidence for a causal relationship between its presence in prepared infant formulae and them developing an illness. The key food hygiene precautions to take when preparing and using feeding bottles are presented.

In terms of children with a soft or solid food diet, there is an emphasis on the need to include instructions for handling food hygienically at home in risk communication campaigns. Lastly, a list of foods which present a risk to this population group is included.

Key words

Infants, young children, microbiological risks, *Salmonella*, *Cronobacter*, virus, foodborne pathogens, infant formulae, preparation of infant feeding bottles, infant food, hygienic food handling.

1. Glosario

Los términos y definiciones utilizados en el presente documento son los recogidos en la legislación vigente:

- Real Decreto 867/2008, de 23 de mayo, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria específica de los preparados para lactantes y de los preparados de continuación, por el que se traspone la Directiva 2006/141/CE (BOE, 2008):
 - Lactantes: los niños que tengan menos de 12 meses.
 - Niños de corta edad: los niños entre 1 y 3 años de edad.
 - Preparados para lactantes (PPL): los productos alimenticios destinados a la alimentación especial de los lactantes durante los primeros meses de vida, que satisfagan por sí mismos las necesidades nutritivas de estos lactantes hasta la introducción de una alimentación complementaria apropiada.
 - Preparados de continuación: los productos alimenticios destinados a la alimentación especial de los lactantes cuando se introduzca una alimentación complementaria apropiada que constituyan el principal elemento líquido de una dieta progresivamente diversificada de estos lactantes. Estos productos, como se indica en otra parte del Real Decreto, son adecuados únicamente para la alimentación especial de niños mayores de 6 meses, que solo debe ser parte de una dieta diversificada, y que no debe utilizarse como sustitutivo de la leche materna, durante los primeros 6 meses de vida y que la decisión de iniciar la alimentación complementaria, incluida cualquier excepción respecto a los 6 meses de edad, debe adoptarse únicamente siguiendo el consejo de personas independientes, cualificadas en medicina, nutrición o farmacia o de otros profesionales encargados de la asistencia materna e infantil, basándose en las necesidades específicas de crecimiento y desarrollo del lactante en cuestión. Esta información se debe proporcionar en el etiquetado de estos alimentos.
- Reglamento (CE) N° 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios (UE, 2005):
 - Alimentos destinados a los lactantes: alimentos específicamente destinados a los lactantes, tal como se definen en la Directiva 2006/141/CE.
 - Alimentos destinados a usos médicos especiales: alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales, tal como se definen en la Directiva 1999/21/CE.
- Real Decreto 490/1998, de 27 de marzo, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria específica de los alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad que traspone la Directiva 96/5/CE (BOE, 1998):
 - Alimentos elaborados a base de cereales, que se dividen en las cuatro categorías siguientes:
 - a) Cereales simples reconstituidos o que deben reconstituirse con leche u otro líquido alimenticio adecuado.
 - b) Cereales con adición de otro alimento rico en proteínas reconstituidos o que deben reconstituirse con agua u otro líquido que no contenga proteínas.
 - c) Pastas que se deben cocer en agua hirviendo o en otros líquidos apropiados antes de su consumo.

d) Bizcochos y galletas que pueden consumirse directamente o, una vez pulverizados, con adición de agua, leche u otro líquido adecuado.

– Alimentos infantiles distintos de los alimentos elaborados a base de cereales.

2. Introducción

Los niños menores de 3 años son especialmente susceptibles a las enfermedades transmitidas por los alimentos debido a diversos factores fisiológicos, como son la inmadurez de su sistema inmunitario, la menor producción de secreción gástrica (Rabet et al., 2008) o la existencia de factores de riesgo asociados a su comportamiento específico (gateo, llevarse manos y objetos a la boca, etc.) que aumentan la probabilidad de exposición a los patógenos entéricos (Sockett y Rodgers, 2001). La incidencia de enfermedades transmitidas por alimentos en este grupo de edad es mucho mayor que en la población en general, incluso considerando que se diagnostican con mayor frecuencia (Scallan et al., 2013).

El neonato y el lactante presentan diferencias inmunológicas con el sistema inmunitario del adulto. Neonatos y niños sanos son inmunocompetentes pero, debido al estado virgen de su sistema inmunitario, reaccionan de manera diferente frente a antígenos y son menos eficientes ante ciertos patógenos, por lo que son más susceptibles a infecciones. Es decir son temporalmente menos competentes, siendo el desarrollo de esta competencia gradual y sujeto a un proceso de adaptación a través de la exposición a antígenos y patógenos.

En condiciones normales, la exposición previa no ha existido y el sistema inmunitario debe adaptarse a la vida extrauterina. Esta inexperiencia y la prevalencia de los factores supresores durante el embarazo aumentan la susceptibilidad del neonato y niño pequeño a las infecciones.

Un factor importante para la efectividad del sistema inmunitario es la edad gestacional. El neonato nacido a término (>37 semanas) es más competente que el prematuro (<37 semanas). Al nacimiento el niño ha recibido trasplacentariamente IgG materna y presenta unos niveles y un patrón de especificidad comparable al de la madre. En prematuros estos valores están disminuidos de forma proporcional a la edad gestacional. Las cifras de IgG caen durante las primeras semanas de vida tras el parto, metabolizándose y siendo sustituida progresivamente por la producida. Otras inmunoglobulinas no atraviesan la placenta, aunque el feto es capaz de sintetizar IgA e IgM en respuesta a infecciones intrauterinas (Gronlund et al., 2000).

Después del nacimiento la leche materna es la responsable, no solo de alimentar, sino de suministrar elementos protectores, la mayoría de ellos células y factores solubles que están ausentes en el neonato (Martín et al., 2003). La colonización intestinal del neonato comienza inmediatamente tras el nacimiento y es esencial para la maduración del tejido linfoide asociado al intestino. Durante la etapa del amamantamiento es el único momento en que el ser humano recibe, no solo todos los nutrientes necesarios de un único alimento, sino que este cumple con los requisitos adecuados a la situación de inmadurez funcional del aparato digestivo, renal y del sistema inmunitario del niño pequeño (Bahl et al., 2005).

En el niño sano la introducción de fórmulas artificiales para la alimentación y de la alimentación complementaria en etapas posteriores constituyen los primeros retos inmunológicos y nutricionales a los que se enfrenta el lactante y niño pequeño.

A partir de los 6 meses de edad, las necesidades de energía y nutrientes comienzan a exceder lo aportado por la leche materna, a partir de ese momento la alimentación complementaria es necesaria para cubrir las necesidades de energía y de nutrientes.

En muchos países, el período de la alimentación complementaria, de los 6 a los 23 meses, es el momento donde existe un pico de enfermedades infecciosas, incidencia de retraso en el crecimiento y deficiencias de micronutrientes (Dewey y Adu-Afanwuah, 2008).

3. Principales patógenos alimentarios que afectan a lactantes y niños de corta edad

3.1 Patógenos bacterianos

Prácticamente cualquier microorganismo patógeno de transmisión alimentaria puede afectar a los niños de corta edad. Hay que diferenciar entre los lactantes (leche materna, preparados para lactantes o preparados de continuación), los que consumen alimentos triturados y los que tienen una alimentación completa.

Respecto a los preparados en polvo, el Comité de expertos FAO/OMS (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura/Organización Mundial de la Salud) identifica tres categorías de microorganismos en base a la solidez de las pruebas de una relación causal entre su presencia en los preparados para lactantes y el desarrollo de enfermedad en éstos (FAO/OMS, 2004a, 2006):

1. Microorganismos con claras pruebas de causalidad. Estarían en esta categoría *Cronobacter* spp. y *Salmonella* spp.
2. Microorganismos para los cuales la causalidad es posible, es decir, producen enfermedad en lactantes y han sido encontrados en preparados, pero no se ha demostrado de forma convincente (epidemiológica o microbiológicamente) que el preparado contaminado sea la fuente de infección. Aquí se incluyen varias especies de la familia *Enterobacteriaceae*, como *Citrobacter* spp.
3. Microorganismos para los cuales la causalidad es menos probable, como aquellos que causan enfermedad en lactantes pero no se han identificado en los preparados o los que han sido aislados de preparados pero no se han implicado como agentes de enfermedad en lactantes. Dentro de este grupo se pueden citar *Escherichia coli*, *Serratia* spp., *Acinetobacter* spp., *Bacillus cereus*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*.

Además de los microorganismos reseñados en estos informes, también es importante considerar los datos concretos de los que disponemos referidos a nuestro país. El Sistema de Información Microbiológica (SIM) ofrece resultados de enfermedades de transmisión alimentaria distribuidos por grupos de edad y así, se puede observar que en los niños menores de 1 año, además de los microorganismos ya citados, aparecen reseñados *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* y *Yersinia enterocolitica*, junto con los protozoos *Cryptosporidium* y *Giardia lamblia* (SIM, 2015). Finalmente, se podrían incluir en este listado otros microorganismos que no se han mencionado pero que se

reconocen como causa importante de enfermedad pediátrica en países desarrollados, sobre todo *Shigella* spp., *Aeromonas caviae* y *Aeromonas hydrophila* (Wilcox et al., 1992) (van Pelt et al., 2003) (Koehler et al., 2006).

En el caso de los niños que tienen una alimentación sólida (en los estudios epidemiológicos es habitual separar el grupo de edad de niños entre 1 y 4 años), los microorganismos reflejados en el SIM y en estudios llevados a cabo en países desarrollados citan como más frecuentes *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Shigella* spp., algunos tipos patógenos de *E. coli* y *Listeria monocytogenes* (Van Pelt et al., 2003) (Koehler et al., 2006).

3.1.1 *Cronobacter* spp.

Cronobacter spp. es un género de bacterias Gram negativas perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, cuyos miembros son considerados patógenos oportunistas. Este género (anteriormente denominado *Enterobacter sakazakii* y reclasificado en 2007) está integrado en la actualidad por siete especies: *C. sakazakii*, *C. turicensis*, *C. malonaticus*, *C. muytjensii*, *C. dublinensis*, *C. universalis* y *C. condimentii*. Con los datos actuales, no se puede descartar a ninguna de las especies como carente de riesgo para neonatos y lactantes (FAO/OMS, 2008a).

Cronobacter causa una enfermedad grave en recién nacidos, que cursa con meningitis, septicemia y enterocolitis necrotizante, y que se ha relacionado frecuentemente con los preparados para lactantes (PPL). Los síntomas comienzan con fiebre, falta de apetito, llanto o apatía. En la población adulta, los síntomas pueden incluir fiebre, diarreas e infección de las vías urinarias. Si bien puede afectar a todos los grupos de edad, la inmensa mayoría de los casos se observan en bebés de menos de 28 días (EFSA, 2004). Los niños prematuros, con bajo peso al nacimiento o con inmunodeficiencia forman parte del grupo de alto riesgo. Se han descrito tasas de mortalidad del 40 al 80 % y los supervivientes padecen habitualmente secuelas neurológicas severas (Bowen y Braden, 2006) (Friedemann, 2009) (Holy y Forsythe, 2014). La enfermedad suele responder a la terapia con antibióticos, si bien varios autores han notificado una resistencia creciente (FAO/OMS, 2004a). Hasta 2008 se notificaron unos 120 casos en todo el mundo en niños de hasta 3 años de edad (FAO/OMS, 2008a), si bien se sospecha que pueden ser muchos más (Iversen y Forsythe, 2003). De éstos, 6 fueron diagnosticados en niños de 6 a 11 meses de edad y 2 en niños de 1 a 3 años (FAO/OMS, 2008a) y, en al menos 27 de ellos, el desenlace fue la muerte. A partir de la base de datos del Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos se podría estimar que se producen 6 nuevos casos de infección por *Cronobacter* cada año en todo el mundo (Healy et al., 2010).

Se cree que la principal vía de transmisión es la oral. No se ha determinado la dosis infectiva, pero se estima que puede ser baja (10-100 microorganismos). No obstante, su amplia distribución lleva a pensar que el consumo de bajos números de microorganismos en PPL y alimentos de continuación por parte de bebés y niños sanos no acarrea enfermedad (EFSA, 2004). La posible transmisión vertical se ha desestimado, al no aislarse el microorganismo del tracto intestinal o de la vagina de madres de niños infectados (Iversen y Forsythe, 2003). Tampoco se ha documentado la transmisión entre lactantes o a través del medio ambiente (FAO/OMS, 2004a). Hasta la fecha, no se han identificado los mecanismos moleculares específicos de la patogenicidad de *Cronobacter*,

si bien algunas cepas producen compuestos similares a las enterotoxinas (Pagotto et al., 2003). Además, parecen existir diferencias entre la virulencia de los aislamientos clínicos, ambientales y en alimentos (FAO/OMS, 2008a). El hecho de que el estómago de los recién nacidos y, en particular, de los prematuros, sea menos ácido que el de los adultos, podría contribuir a la supervivencia de *Cronobacter* en los lactantes.

Su temperatura mínima de crecimiento se encuentra entre 5,5 y 8 °C y la máxima entre 41 y 45 °C, si bien algunas cepas son capaces de multiplicarse a 47 °C, estimándose la temperatura óptima entre 37 y 43 °C, dependiendo del medio de cultivo (Iversen et al., 2004). Puede crecer a valores de pH entre 3,9 y 9,0 (Breeuwer et al., 2003) (Dancer et al., 2009) y a valores de actividad de agua de hasta 0,94 (Dancer et al., 2009). Además, muchas cepas producen un exopolisacárido que les permite crear biopelículas y resistir en condiciones adversas en distintas superficies (Iversen et al., 2004).

No existe consenso sobre si es más tolerante a los tratamientos térmicos que otras bacterias no formadoras de esporas. Se ha sugerido que *Cronobacter* es uno de los miembros más termorresistentes de la familia *Enterobacteriaceae* (Nazarowec-White y Farber, 1997b) (Dancer et al., 2009), si bien se ha demostrado que su resistencia al calor varía ampliamente entre las distintas cepas, encontrándose valores *D* comprendidos entre 0,1 y 15 min a 58 °C y valores *z* entre 3,1 y 10,9 °C en PPL y distintos medios de laboratorio (Nazarowec-White y Farber, 1997b) (Asakura et al., 2007) (Al-Holy et al., 2009) (Arroyo et al., 2009) (Dancer et al., 2009) (Osaili et al., 2009) (Huertas et al., 2015), encontrándose esta termorresistencia afectada por distintos factores, tales como el medio de cultivo, la fase de crecimiento o la aplicación de un choque térmico previo (Gadjosova et al., 2011).

Se considera un microorganismo ubicuo, habiéndose aislado de una gran variedad de fuentes, incluidos alimentos muy distintos, tanto de origen vegetal como animal, materias primas deshidratadas mezcladas, aguas residuales y distintos ambientes en hogares, hospitales y líneas de producción de alimentos (Norberg et al., 2012). Su prevalencia es mayor en alimentos deshidratados. Su principal ventaja competitiva frente a otros microorganismos causantes de enfermedades transmitidas por los alimentos con los que comparte límites de crecimiento aproximadamente similares en cuanto a temperatura, pH y actividad de agua, es su elevada resistencia a la desecación, que le hace especialmente relevante en ambientes secos, como los que se encuentran en los PPL y en las plantas de procesado. De hecho, se ha confirmado que *Cronobacter* es más resistente al estrés osmótico y a la desecación que otras enterobacterias (Breeuwer et al., 2003).

Los PPL y los preparados de continuación han sido asociadas epidemiológicamente a brotes de enfermedad causados por *Cronobacter*. Los procesos de fabricación de ambos tipos de alimentos son esencialmente idénticos, con la única diferencia de que en los preparados de continuación el número de ingredientes empleados es más amplio. Distintos estudios revelan su presencia a frecuencias variables, desde un 0 a un 14 % en PPL y otros alimentos para recién nacidos (Muytjens et al., 1988) (Nazarowec-White y Farber, 1997a) (Iversen y Forsythe, 2004) (Kandhai et al., 2010) (Sonbol et al., 2013) (Li et al., 2014) (Pan et al., 2014). En cualquier caso, *Cronobacter* está generalmente presente en los PPL a niveles muy bajos (entre 0,36 y 66,0 ufc/100 g) (Muytjens et al., 1988) (Forsythe, 2005). No obstante, según la FAO y la OMS, los niveles bajos de *Cronobacter* presentes en los PPL, incluso cuando son inferiores a 3 ufc/100 g, pueden dar lugar a infecciones (FAO/OMS, 2004a). Aun

así, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) destacó, ya en 2004, que la producción a gran escala de PPL y preparados de continuación, ambos distribuidos mundialmente, unido al número relativamente bajo de casos en neonatos y niños, son indicativos de que los productos son habitualmente seguros. Aunque los PPL constituyen la principal fuente de este microorganismo, no es la única, ya que se han diagnosticado casos en niños que no se alimentaron con PPL (Stoll et al., 2004). Además, se han documentado casos en adultos.

La contaminación de PPL con *Cronobacter* puede producirse durante el proceso productivo (Asakura et al., 2007). Existe un amplio consenso en que *Cronobacter*, a pesar de su elevada resistencia al calor, no es capaz de sobrevivir a los tratamientos de pasterización que se aplican habitualmente durante el procesado de los PPL. Así pues, la contaminación tiene lugar muy probablemente tras el tratamiento térmico (Iversen y Forsythe, 2004), bien por la adición de materias primas y nutrientes sensibles al calor (vitaminas, minerales, etc.) tras la pasterización, bien por contaminación a partir de equipos y líneas de procesado y envasado, o bien por manipuladores de alimentos portadores del microorganismo. Otra fuente de contaminación la constituyen los utensilios contaminados (tales como batidoras o cucharas) que se puedan emplear a nivel doméstico en la preparación de los PPL (Noriega et al., 1990).

Cronobacter no es capaz de multiplicarse en los PPL deshidratados, pero se ha mostrado capaz de sobrevivir durante procesos de deshidratación industrial (Arku et al., 2008) y distintos estudios han puesto de manifiesto su capacidad para sobrevivir en ambientes secos durante periodos prolongados de tiempo (Mullane et al., 2008) (Terragno et al., 2009). También se ha demostrado que es capaz de sobrevivir en PPL con actividad de agua tan baja como 0,2 durante periodos de hasta dos años y medio (Caubilla-Barron y Forsythe, 2007).

Los PPL reconstituídos constituyen, en cambio, un medio idóneo para su proliferación. Algunos estudios han encontrado que *Cronobacter* puede sobrevivir al estrés térmico aplicado cuando el PPL se reconstituye con agua templada (Asakura et al., 2007) (Osaili et al., 2009). La FAO y la OMS recomiendan la reconstitución de los PPL con agua a más de 70 °C para reducir el riesgo potencial de *Cronobacter* (FAO/OMS, 2006). Esto resultaría en una reducción de su población en 4-6 ciclos logarítmicos, en función del tipo de producto (Osaili et al., 2009). Además, se ha comprobado que su exposición a un calentamiento suave o a condiciones ácidas podrían repercutir en una mayor viabilidad durante la posterior rehidratación de los PPL a temperaturas más elevadas e incluso en las condiciones ácidas del estómago (Yang et al., 2015). Una vez que los PPL se reconstituyen, *Cronobacter* se puede multiplicar dependiendo de las condiciones de preparación y almacenamiento, por este motivo se recomienda almacenarlos a temperaturas inferiores a 5 °C (FAO/OMS, 2006).

El Reglamento (CE) Nº 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimentarios, y sus posteriores modificaciones, establece un límite microbiológico máximo de ausencia de *Cronobacter* en cada una de las 30 muestras (n=30) de 10 g para los preparados deshidratados para lactantes y alimentos dietéticos deshidratados destinados a usos médicos especiales para lactantes menores de 6 meses, durante toda la vida útil del producto (UE, 2005). En los preparados de continuación se establece un criterio de higiene de los procesos para enterobacterias, con ausencia en cada una de las cinco muestras

de 10 g tomadas al final del proceso de fabricación, y, en caso de obtener algún resultado positivo, hay que realizar análisis en busca de *Cronobacter* (Anexo I).

3.1.2 *Salmonella* spp.

Salmonella, al igual que *Cronobacter*, es una causa bien conocida de enfermedades, tales como diarrea, septicemia o meningitis, en lactantes (FAO/OMS, 2004a). Al igual que en los casos de *Cronobacter*, las tasas de salmonelosis en los lactantes son más elevadas que en otros grupos (Olsen et al., 2001), lo cual es indicativo de la mayor susceptibilidad de este grupo de población. Un estudio reciente que analizaba la incidencia de los cinco principales patógenos transmitidos por alimentos en Estados Unidos, determinó que *Salmonella* es la principal causa de enfermedades bacterianas en niños menores de 5 años (Scallan et al., 2013).

La infección sistémica es una complicación que aparece aproximadamente en el 5 % de los casos, siendo más frecuente en pacientes inmunodeprimidos, especialmente aquellos que presentan alteraciones de su inmunidad celular (Chen et al., 2013). La bacteriemia secundaria se asocia a manifestaciones extraintestinales como meningitis, encefalopatía, endocarditis, neumonía, abscesos, osteomielitis, celulitis o artritis. En niños de entre 0 y 6 años con bacteriemia, el riesgo de meningitis alcanza el 24 % (Sánchez-Vargas et al., 2011). Por otra parte, un estudio reciente relaciona los antecedentes de gastroenteritis por *Salmonella* en niños con un mayor riesgo de padecer síndrome del intestino irritable en la edad adulta (Cremon et al., 2014).

Los alimentos implicados con mayor frecuencia en la transmisión de *Salmonella* incluyen la leche y derivados sin pasteurizar, carne y carne de ave cruda o poco cocinada, huevos crudos o poco cocinados, brotes crudos (alfalfa, soja, rábanos), vegetales crudos y cualquier plato preparado con alguno de los anteriores, incluyendo ensaladas, postres, salsas, etc. (Wattiau et al., 2011).

Salmonella se ha aislado en ocasiones a partir de PPL (FAO/OMS, 2004a). Entre 1995 y 2006 se vincularon al menos seis brotes de salmonelosis a productos lácteos en polvo en distintos países (FAO/OMS, 2006). La contaminación de los PPL con bajos niveles de *Salmonella* fue suficiente para provocar la infección en los lactantes. En estos casos, fallos en el proceso productivo, por ejemplo la presencia de agua en zonas normalmente secas, que permitieron la multiplicación de *Salmonella*, o la presencia de *Salmonella* en zonas de difícil acceso o limpieza, fueron identificadas como origen de la contaminación (FAO/OMS, 2006).

No obstante, y a diferencia de otros brotes causados por *Salmonella*, no se ha podido demostrar de manera convincente desde un punto de vista epidemiológico o microbiológico que los PPL sean la fuente o el vehículo de la infección en casos esporádicos (FAO/OMS, 2004a). Además, en los estudios realizados sobre PPL, raramente se ha detectado *Salmonella*. En un estudio de Muytjens et al. (1988) no se encontró *Salmonella* en ninguna de las 141 muestras analizadas.

Tal y como ocurre con *Cronobacter*, *Salmonella* tampoco es capaz de multiplicarse en los PPL deshidratados, pero puede igualmente sobrevivir en ellos durante largos periodos de tiempo. Una vez reconstituido, el PPL es un medio óptimo para el crecimiento de *Salmonella*. El almacenamiento de los PPL reconstituidos a temperaturas inferiores a 5 °C evitaría igualmente la multiplicación de *Salmonella* (FAO/OMS, 2006).

Salmonella se excreta en las heces tras la infección durante un periodo de unas 5 semanas, que es más prolongado en niños menores de 5 años (Sánchez-Vargas et al., 2011). Como en el caso de todos los patógenos entéricos una buena higiene y las buenas prácticas en la manipulación de alimentos son clave para evitar la transmisión.

El Reglamento (CE) N° 2073/2005 establece un criterio microbiológico de seguridad alimentaria de ausencia de *Salmonella* en cada una de las 30 muestras (n=30) de 25 gramos para los preparados deshidratados para lactantes y alimentos dietéticos deshidratados destinados a usos médicos especiales para lactantes menores de 6 meses, así como en los preparados deshidratados de continuación, durante toda la vida útil de estos productos (UE, 2005) (Anexo I).

3.1.3 *Listeria monocytogenes*

Es una bacteria Gram positiva, no esporulada, que produce una enfermedad de transmisión alimentaria muy grave (FAO/OMS, 2004b).

En la Unión Europea (UE), la listeriosis es una enfermedad de transmisión alimentaria relativamente poco frecuente pero muy grave, en comparación con otros procesos transmitidos por alimentos, como la salmonelosis. Además, presenta elevadas tasas de morbilidad, hospitalización y mortalidad en grupos poblacionales vulnerables (EFSA, 2013). La tasa de mortalidad puede alcanzar el 20-30 %. *Listeria monocytogenes* es un patógeno oportunista que casi siempre afecta a personas con patologías subyacentes graves que cursan con inmunodepresión. En los neonatos la forma más grave y precoz es la granulomatosis infantiséptica, que cursa con abscesos y granulomas diseminados con especial predominio en hígado, bazo, pulmón y cerebro. Existe una forma neonatal más tardía y frecuente, que aparece entre la 1ª y 8ª semana de vida del niño, en la que el contagio probablemente se ha producido en el canal del parto. En ella el cuadro más frecuente es meningitis, con letargia, rechazo del alimento e irritabilidad.

Listeria monocytogenes está muy distribuida por el medio ambiente y puede contaminar los alimentos en diversas etapas de la cadena alimentaria. Los tratamientos térmicos habituales de preparación de alimentos (>65 °C) son suficientes para eliminarla, pero, debido a su ubicuidad, puede recontaminar los alimentos tras el procesado; esto, unido a su capacidad de desarrollarse a temperaturas de refrigeración, hace que algunos productos listos para el consumo, especialmente los que tienen una duración media o prolongada (semiconservas de pescado, productos cárnicos tratados térmicamente, quesos blandos), sean particularmente peligrosos (FAO/OMS, 2004b) (EFSA, 2013). El Reglamento (CE) N° 2073/2005 establece un criterio microbiológico de seguridad alimentaria para este microorganismo para los alimentos listos para el consumo destinados a lactantes en el que se exige la ausencia en 25 gramos del producto a lo largo de toda su vida útil (UE, 2005) (Anexo I). Para los alimentos listos para el consumo no destinados a lactantes el límite máximo es de 100 ufc/g durante la vida útil de los alimentos, teniendo en cuenta que el riesgo de desarrollo de listeriosis por la ingesta de alimentos contaminados con recuentos inferiores a este límite para la población en general es muy bajo (FAO/OMS, 2004b) (UE, 2005).

3.1.4 *Campylobacter* spp.

Campylobacter spp. es el principal agente zoonótico bacteriano a nivel mundial (EFSA, 2005) (Epps et al., 2013). Las especies del grupo termofílico (*C. jejuni* y *C. coli*) están muy extendidas por todo el medio ambiente y su reservorio principal se encuentra en el tracto digestivo de las aves y también de algunos mamíferos, como el cerdo y, en menor medida vacuno y otros rumiantes (EFSA, 2005). Su capacidad de supervivencia en el medio ambiente es limitada, ya que es incapaz de crecer por debajo de 30 °C y necesita concentraciones de oxígeno reducidas (5 % de forma óptima); además es sensible a la desecación, el cloruro sódico en concentraciones por encima del 2 %, pH inferior a 4,9 y numerosos desinfectantes, así como a los tratamientos térmicos de pasteurización o cocinado completo (Park, 2002). La mayor parte de las infecciones por *Campylobacter* son esporádicas y los brotes son infrecuentes. La carne de ave es la principal vía de transmisión de la enfermedad, bien por el consumo de carne contaminada insuficientemente cocinada o por contaminación cruzada a partir de ella (Acheson y Allos, 2001) (FAO/OMS, 2009). En los países desarrollados hay una distribución de casos con una tasa más elevada en niños menores de 1 año (Acheson y Allos, 2001) y en el caso de España, los datos del SIM muestran también un elevado número de casos en niños entre 1 y 4 años.

La campilobacteriosis cursa como una enfermedad gastrointestinal similar a la producida por otros patógenos entéricos y en la mayoría de los casos es autolimitada. Ocasionalmente pueden aparecer complicaciones gastrointestinales o sistémicas, que, aunque sean infrecuentes, se dan con mayor probabilidad en niños pequeños (EFSA, 2005). La mortalidad de la infección es baja; sin embargo, la posibilidad de que se desarrollen secuelas graves, como artritis reactiva o síndrome de Guillain-Barré, y las terribles consecuencias que estas secuelas pueden producir en la población infantil, obligan a extremar las precauciones para evitar su transmisión (EFSA, 2005).

En el caso de los neonatos, la mayoría experimenta una enfermedad moderada, aunque la infección evoluciona con mayor frecuencia que en los adultos hacia la sepsis neonatal o la aparición de meningoencefalitis. Esta última complicación, más frecuente en el caso de *C. fetus*, puede ser fatal o dejar secuelas neurológicas muy graves (Smith, 2002). En neonatos la mortalidad por *Campylobacter* alcanza el 2,5 % (McDonald y Gruslin, 2001).

Las medidas preventivas más eficaces en el hogar son las buenas prácticas de higiene personal (lavado de manos) y evitar la contaminación cruzada en la manipulación de alimentos crudos, con especial atención a la carne de ave.

3.1.5 *Escherichia coli*

Todos los grupos patógenos de *Escherichia coli* son agentes de enfermedad gastrointestinal en niños. Se sabe que la dosis infectiva en niños menores de 5 años es mucho menor que para los adultos. Además, se ha demostrado que el periodo de eliminación por heces una vez desaparecidos los síntomas es mayor que en los adultos, lo que implica un mayor riesgo de adquisición de la enfermedad en escuelas y guarderías (Woteki y Kineman, 2008). La mayor parte los grupos patógenos de *Escherichia coli* son infrecuentes en los países desarrollados, ya que su reservorio principal son los humanos y la transmisión está relacionada con la presencia de contaminación de

origen fecal en las aguas y la falta de medidas higiénicas en la preparación de alimentos (Nataro y Kaper, 1998) (Kaper et al., 2004). Sin embargo, las cepas productoras de toxinas Shiga (STEC/EHEC) y las cepas atípicas de *Escherichia coli* enteropatógeno (aEPEC) están asociadas a animales de abasto, principalmente ganado lechero, y se transmiten frecuentemente por alimentos de origen animal (Nataro y Kaper, 1998) (Trabulsi et al., 2002).

El 5-10 % de los pacientes infectados por EHEC desarrollan síndrome urémico hemolítico (SUH), con una mortalidad del 3-5 %. El SUH es la primera causa de fallo renal agudo en niños pequeños y se asocia a complicaciones neurológicas severas (convulsiones, coma, etc.) en el 25 % de los casos, y a fallo renal crónico en aproximadamente el 50 % de los supervivientes (Lim et al., 2010).

Los principales brotes de infección por EHEC se asocian al consumo de carne de vacuno poco cocinada, especialmente hamburguesas, derivados cárnicos poco cocinados como salami o salchichas, leche sin pasteurizar, brotes crudos, espinacas frescas, tomates, lechugas y zumo de manzana no pasteurizado (Ferens y Hovde, 2011). En este sentido, el consumo de leche cruda es una práctica de riesgo, ya que hay reseñados casos de SUH por esta causa en niños (Allerberger et al., 2003). Un estudio realizado en Francia sobre casos pediátricos de SUH durante un período de 1 año reveló que *Escherichia coli* O157 fue el principal agente de esta enfermedad y que la mayor incidencia se daba en niños menores de 1 año, seguidos del grupo de edad hasta 5 años (en conjunto, los niños menores de 5 años suponían el 81 % de los casos). Algunos de los casos de enfermedad también se relacionaron con el consumo de productos lácteos elaborados con leche cruda (Decludt et al., 2000). Los niños menores de 5 años también son más susceptibles al desarrollo de enfermedad como consecuencia de la transmisión secundaria en el hogar cuando hay personas que padecen gastroenteritis (Parry y Salmon, 1998). Por tanto, como medidas preventivas se debe evitar el consumo de alimentos crudos de origen animal y reforzar las buenas prácticas de higiene personal.

3.1.6 *Clostridium botulinum*

Clostridium botulinum es un bacilo Gram positivo anaerobio capaz de formar esporas. Se distinguen siete subtipos en función de la neurotoxina que producen, siendo cuatro de ellos los que provocan la enfermedad en humanos, y solo dos, el A y el B, los responsables de la mayoría de casos de botulismo infantil. El botulismo infantil afecta a niños con edades comprendidas entre menos de 1 semana y menos de 1 año, aunque el 95 % de los casos ocurren en niños de menos de 6 meses (AECOSAN, 2011).

El botulismo infantil tiene lugar cuando el niño ingiere esporas de *Clostridium botulinum*, tras lo cual germinan y se multiplican en el tubo digestivo, liberando la toxina botulínica que pasa al torrente sanguíneo. La toxina botulínica se une a los receptores colinérgicos de las terminaciones nerviosas en las uniones neuromusculares, impidiendo su normal funcionamiento. Se considera que la dosis infectiva mínima de *Clostridium botulinum* está comprendida entre 10 y 100 esporas (AECOSAN, 2011). La sintomatología incluye una combinación de hipotonía, debilidad y parálisis flácida de la musculatura esquelética, si bien es posible observar un amplio rango de presentaciones clínicas. Los niños son particularmente sensibles a la colonización por *Clostridium botulinum* debido a la inmadurez de su microbiota intestinal (Rosow y Strober, 2015).

En la mayoría de los casos de botulismo infantil la fuente de los esporas de *Clostridium botulinum* no se ha identificado (AECOSAN, 2011). En muchos pacientes en los que no se encontró el origen de la infección, se presume que podría ser el resultado de la inhalación de esporas adheridas a partículas de polvo microscópico presentes en el aire. Así, los niños que residen en zonas rurales tienen un mayor riesgo de contraer botulismo infantil que los de las áreas urbanas, presumiblemente por su mayor exposición a las partículas de polvo (Rosow y Strober, 2015).

En un caso de botulismo infantil ocurrido en Reino Unido se sospechó entre otros alimentos, de un PPL, si bien no se obtuvieron resultados concluyentes sobre su vinculación (Anon, 2001). De hecho, no se ha confirmado ningún caso de botulismo infantil a partir de PPL o alimentos de continuación (EFSA, 2004). No obstante, *Clostridium botulinum* se ha encontrado de manera ocasional en mieles, las cuales son un ingrediente habitual de los alimentos de continuación (Rosow y Strober, 2015). Los datos epidemiológicos actuales permiten considerar que el riesgo de padecer la enfermedad es bajo en niños menores de 12 meses si se evita el consumo de miel y/o infusiones de especies vegetales (AECOSAN, 2011).

3.1.7 *Clostridium difficile*

Clostridium difficile es la principal causa de diarrea nosocomial en adultos en países desarrollados, si bien su prevalencia en niños de menos de 2 años no está clara, ya que coloniza frecuentemente su tracto intestinal, habitualmente sin manifestaciones clínicas, lo que dificulta su diagnóstico (Santiago et al., 2015). La colonización del tracto intestinal por parte de *Clostridium difficile* se produce poco después del nacimiento y aumenta progresivamente durante el primer año, sobrepasando el 70 % de los niños menores de 2 años (Enoch et al., 2011).

En los casos de niños infectados en los que aparecen síntomas, éstos cursan con una diarrea ligera y autolimitante, si bien en grupos de riesgo puede derivar en una colitis pseudomembranosa (Enoch et al., 2011). La frecuencia de presentación de *Clostridium difficile* en niños hospitalizados con diarrea es de tres casos por cada 1 000 admisiones hospitalarias (Enoch et al., 2011) (Santiago et al., 2015), siendo especialmente destacada en niños de menos de 2 años y con otra enfermedad subyacente o a los que se ha administrado antibióticos.

Entre las vías de transmisión se citan especialmente la materna, la infección cruzada entre pacientes y a través del ambiente (Enoch et al., 2011), pero no se ha relacionado con la ingesta de PPL contaminados.

3.1.8 *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens es una especie anaerobia aerotolerante, Gram positiva esporulada productora de diversas toxinas. La mayoría de toxiinfecciones alimentarias son causadas por el tipo toxigénico A, aunque menos del 5 % de las cepas de *Clostridium perfringens* son portadoras del gen responsable de la producción de la enterotoxina A (cpe). El tipo toxigénico C causa una enteritis necrotizante severa poco frecuente.

La toxiinfección por *Clostridium perfringens* cursa como una gastroenteritis autolimitada con diarrea acuosa, malestar general y dolor abdominal, de baja mortalidad. Los niños y los ancianos son más susceptibles que la población general (McClane et al., 2013).

Las esporas sobreviven a la refrigeración y congelación con una reducción de menos de 1 logaritmo después de 6 meses. El calentamiento a 70 °C durante 2 minutos durante el cocinado destruye las células vegetativas, pero no las esporas.

La enterotoxina se produce durante la fase de esporulación. Dado que se trata de una proteína termolábil, que se inactiva a 60 °C durante 5 minutos, la intoxicación raramente se produce por ingestión de toxina preformada. Clásicamente, la enfermedad aparece cuando un alimento contaminado con esporas e insuficientemente cocinado se enfría lentamente. Las esporas germinan y las células vegetativas se reproducen hasta alcanzar la dosis infectiva. Cuando el alimento es ingerido se produce la esporulación en el intestino y la liberación de la enterotoxina (McClane et al., 2013).

Clostridium perfringens es ubicuo y se distribuye extensamente en suelo, polvo y vegetación. También coloniza el intestino de seres humanos y animales. La principal fuente de infección son alimentos cárnicos y las aves de corral poco cocinados y manipulados deficitariamente, que están implicadas hasta en el 90 % de los brotes (Grass et al., 2013). La prevención pasa por una cocción completa y un almacenamiento adecuado de los platos hasta su consumo (McClane et al., 2013).

La bacteria no se ha relacionado con la aparición de brotes por consumo de PPL. En algún trabajo se ha detectado la presencia de altas concentraciones de *Clostridium perfringens* en el intestino de recién nacidos pretérmino que desarrollaron enterocolitis necrotizante (De la Cochetiere et al., 2004). Sin embargo, no está claro si su presencia se relaciona con la aparición de la enfermedad o es una consecuencia de la disbiosis que la acompaña (Cilieborg et al., 2012).

3.1.9 *Yersinia* spp.

El género *Yersinia* está actualmente constituido por 18 especies de bacterias Gram negativas, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Dentro de este género se incluyen dos especies enteropatógenas, que son *Y. pseudotuberculosis* y algunos tipos de *Y. enterocolitica*; aunque esta última es la que se asocia a infecciones humanas con más frecuencia, la incidencia de *Y. pseudotuberculosis* ha aumentado en algunas partes del norte de Europa (EFSA, 2007). *Y. enterocolitica* es una bacteria psicrotrofa, capaz de multiplicarse a temperaturas de refrigeración y se divide en seis biotipos (1A, 1B, 2, 3, 4 y 5) caracterizados por sus propiedades bioquímicas. Todas las cepas patógenas son portadoras de un plásmido de virulencia, denominado pYV y, en función de la presencia de otros factores de virulencia, se distinguen tres tipos patógenos: de alta patogenicidad, de patogenicidad moderada y no patógenas (EFSA, 2007) (Robins-Browne, 2007). En Europa se aíslan principalmente cepas de patogenicidad moderada, correspondientes a los serotipos O:3 (biotipo 4) y O:9 (biotipo 2), con una incidencia alta en niños menores de 5 años (Rosner et al., 2012). La infección cursa como una gastroenteritis con diarrea que se autolimita, pero puede dar lugar a complicaciones graves, como infecciones agudas recurrentes, pseudoapendicitis y septicemia, o secuelas a largo plazo, como artritis reactiva (EFSA, 2007) (Bottone, 2015). Se considera que el cerdo es el principal reservorio de cepas patógenas y el consumo de carne de cerdo y productos derivados que no han sido tratados térmicamente de un modo adecuado es una causa frecuente de aparición de casos esporádicos (Rosner et al., 2012). También se ha relacionado con leche y productos lácteos pasterizados, pero contaminados tras el tratamiento térmico, posiblemente por el

uso de agua contaminada (EFSA, 2007). En un amplio estudio llevado a cabo en Alemania por Rosner et al. (2012) se observó que el consumo de carne de cerdo picada poco cocinada era el principal factor de riesgo en la aparición de casos de yersiniosis y la preparación en el hogar contribuye a incrementar este riesgo. Teniendo en cuenta estos aspectos, la principal medida preventiva sería la educación de los consumidores sobre los peligros asociados al consumo y manipulación de los productos derivados del cerdo.

3.1.10 *Citrobacter* spp.

Las especies del género *Citrobacter* pueden causar infecciones en neonatos y en niños y adultos inmunodeprimidos (Doran, 1999). Son bacterias Gram negativas, pertenecientes a la familia de las enterobacterias, y que tienen una distribución amplia, encontrándose en el tracto gastrointestinal del hombre y de los animales, y también en el medio ambiente (suelo, agua y alimentos).

Citrobacter freundii ha provocado varios brotes nosocomiales y en uno de ellos, ocurrido en una unidad de cuidados intensivos para neonatos, el vehículo de transmisión fue un PPL, aunque la fuente de contaminación del mismo no se llegó a dilucidar (Thurm y Gericke, 1994). En general se considera que la infección se transmite verticalmente desde la madre al neonato, pero hay grandes lagunas en el conocimiento de estas vías de transmisión. La enfermedad que produce puede tener consecuencias muy graves, desarrollando frecuentemente sepsis y meningitis, con tasas de mortalidad que alcanzan el 30 % (Doran, 1999).

3.1.11 *Shigella* spp.

Las bacterias del género *Shigella* son enterobacterias que producen una enfermedad gastrointestinal grave, shigelosis, caracterizada por cursar con diarrea sanguinolenta que puede desembocar en disentería. Aunque puede producir enfermedad en cualquier individuo, la mayor frecuencia se da en niños menores de 4 años (Lampel y Maurelli, 2007). El reservorio principal son los humanos, por lo que su transmisión se produce por la vía fecal-oral y persona a persona, pudiendo contaminar prácticamente cualquier alimento (Warren et al., 2006). Teniendo en cuenta estos aspectos y la baja dosis infectiva que presentan, la prevención pasa por el respeto a las buenas prácticas higiénicas.

3.1.12 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus es un microorganismo Gram positivo, esporulado y con una distribución muy amplia en el medio ambiente. Es un contaminante frecuente de la leche, a la que accede a través de la contaminación ambiental y de los equipos de ordeño. El proceso de producción de leche en polvo y productos similares puede no ser suficiente para inactivar todas las esporas; adicionalmente muchas cepas son de naturaleza psicrotrofa, capaces de multiplicarse en condiciones de refrigeración. Todo ello hace que este tipo de productos presenten porcentajes elevados de contaminación, aunque los recuentos son generalmente bajos (Becker et al., 1994). Además, también está presente en cereales utilizados en alimentación infantil (Becker et al., 1994) (Granum y Lund, 1997). La ingestión de un número bajo de células o esporas no se considera perjudicial, pero la germinación de esporas o la multiplicación de células vegetativas en el alimento preparado puede dar lugar a

una concentración peligrosa del microorganismo (superior a 10^5 ufc/g) (Kramer y Gilbert, 1989). Por todo ello, pese a que no se han reportado brotes de enfermedad asociados a leche en polvo u otros productos de alimentación infantil, es posible que la manipulación incorrecta de estos productos (principalmente el abuso de temperatura de alimentos reconstituidos) permita el desarrollo de este microorganismo (Becker et al., 1994) (EFSA, 2004). En la UE existe un criterio de higiene de los procesos para los preparados deshidratados para lactantes y alimentos dietéticos deshidratados destinados a usos médicos especiales para lactantes menores de 6 meses con un plan de muestreo de tres clases ($n=5$, $c=1$, $m=50$ ufc/g y $M=500$ ufc/g), que se considera satisfactorio si, al final del proceso de fabricación, las cinco muestras ($n=5$) presentan valores inferiores o iguales a 50 ufc/g (m), aceptable si una de esas cinco muestras ($c=1$) presenta recuentos entre 50 (m) y 500 ufc/g (M) e insatisfactorio si una de esas cinco muestras presenta valores superiores a 500 ufc/g o más de una de esas cinco muestras presenta valores entre 50 y 500 ufc/g (UE, 2005) (Anexo I). De forma preventiva se recomienda el consumo rápido de los alimentos cocinados o su refrigeración inmediata, minimizando el tiempo de permanencia en el intervalo de temperatura 10-50 °C (Kramer y Gilbert, 1989).

3.1.13 *Aeromonas* spp.

El género *Aeromonas* comprende especies de bacterias Gram negativas, de distribución muy amplia, aunque generalmente se relacionan con el medio acuático. Aparece como contaminante en aguas de consumo y en numerosos alimentos de diversos orígenes, incluida la leche y los productos lácteos (Isonhood y Drake, 2002) (Janda y Abbott, 2010). Algunas especies se consideran patógenas para los humanos, produciendo casos esporádicos de enfermedad gastrointestinal que ocasionalmente puede dar lugar a complicaciones extraintestinales (Wilcox et al., 1992) (Janda y Abbott, 2010). *Aeromonas caviae* es la especie más importante como agente de enfermedad en niños, sobre todo menores de 3 años, con un pico estacional en los meses más cálidos (Wilcox et al., 1992). Debido a las lagunas que existen en el conocimiento sobre las vías de transmisión de este microorganismo es difícil establecer medidas preventivas, pero es importante prestar especial atención al uso de agua potable, sobre todo en los meses cálidos, en la preparación de todos los alimentos que vayan a ser consumidos por niños.

3.1.14 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es una bacteria que produce una intoxicación alimentaria leve y se relaciona frecuentemente con la leche y los productos lácteos (Le Loir et al., 2003). Hay reseñados algunos brotes importantes relacionados con leche en polvo, aunque no afectaron a niños pequeños, y se atribuyeron a las deficiencias higiénicas y abuso de temperaturas en la leche líquida, antes del secado (Anderson y Stone, 1955) (Asao et al., 2003).

Por otra parte, se está prestando atención a las infecciones producidas por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), por su capacidad de resistencia a antibióticos β -lactámicos y la gravedad de las enfermedades que puede producir, sobre todo en pacientes hospitalizados o inmunodeprimidos (Doyle et al., 2012). En los últimos años se han descrito brotes de intoxicación

alimentaria producidos por MRSA, que aunque no implica mayor virulencia de la enfermedad, despierta la preocupación por la diseminación de estos microorganismos, que pueden producir infecciones graves y difíciles de tratar (Jones et al., 2002). También se han detectado cepas de MRSA en los animales de abasto que se pueden transmitir a los alimentos derivados, pero no parece que el riesgo de enfermedad humana se incremente por este motivo (EFSA, 2009).

Las medidas preventivas son bien conocidas y se centran en la formación de los manipuladores en prácticas higiénicas y en el uso correcto de los tratamientos térmicos y mantenimiento de las condiciones de refrigeración (Doyle et al., 2012).

3.1.15 Otros microorganismos

Otras especies de la familia *Enterobacteriaceae*, como *Citrobacter diversus*, *Citrobacter koseri*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pantoea agglomerans*, *Escherichia vulneris*, *Hafnia alvei*, *Serratia marcescens* y *Enterobacter cloacae*, se han encontrado igualmente en PPL, pero no se ha demostrado de manera convincente que, desde el punto de vista epidemiológico o microbiológico, los PPL sean el vehículo y la fuente de la infección (FAO/OMS, 2004a). Estas especies, no obstante, tienen cada vez más importancia como patógenos neonatales y deberían también ser considerados como patógenos oportunistas (EFSA, 2004).

También se ha atribuido a los PPL la vehiculización de una cepa de *Bacillus licheniformis* productora de una toxina de características similares a la toxina emética de *Bacillus cereus* (EFSA, 2004). Tampoco en estos casos se pudo demostrar claramente la relación con los PPL.

3.2 Principales patógenos víricos alimentarios

Los virus entéricos son virus de transmisión fecal-oral y pueden estar presentes en alimentos y aguas que hayan sufrido contaminación con materia fecal. Entre ellos destacan diversos agentes causantes de gastroenteritis como los Norovirus (NoV), Sapovirus (SaV), Astrovirus (AstV), Rotavirus (RV) y Adenovirus (AdV), así como los agentes de las hepatitis entéricas (A y E), causantes de hepatitis aguda (Koopmans y Duizer, 2004) (Newell et al., 2010) (BIOHAZ, 2011). Con menor frecuencia, a través de agua y alimentos también pueden transmitirse infecciones de enterovirus, los cuales pueden causar distintas manifestaciones clínicas, desde diarrea a meningitis o sarpullidos (Muehlenbachs et al., 2015). Por lo general, todos ellos son patógenos de mayor incidencia en la población infantil, a excepción del virus de la hepatitis A (HAV), el cual en niños menores de 6 años suele causar infecciones asintomáticas. Aparte de los virus citados, otros virus como el de la gripe aviar, el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, el virus MERS o el virus Nipah se han incluido también en algunos informes como virus potencialmente transmisibles por alimentos a la población general (FAO/OMS, 2008b). Aunque el impacto de estos virus sobre la salud podría ser importante, no los comentaremos en el presente informe por la baja frecuencia con la que se podrían llegar a producir casos. Nos centraremos en los virus productores de gastroenteritis y hepatitis.

Los alimentos que presentan un mayor riesgo de estar contaminados de origen con algún patógeno vírico son los moluscos bivalvos, las verduras frescas que se consumen en ensalada y las frutas tipo baya que han sido irrigados con aguas contaminadas con materia fecal. Todos estos alimen-

tos suelen consumirse crudos o poco cocinados, incrementando al máximo el riesgo de infección. En ocasiones también se comercializan en forma congelada, sin que ello disminuya el riesgo de transmitir la infección. Recientemente, debido a que determinadas cepas del virus de la hepatitis E pueden infectar animales como el cerdo o el jabalí, entre otros, se han documentado casos de adultos contagiados por consumo de carne de cerdo o de caza, cruda o poco cocinada (Van der Poel, 2014). Finalmente, cualquier otro alimento puede también contaminarse por una manipulación higiénica deficiente por parte de manipuladores, tanto sintomáticos como asintomáticos, excretores de virus. Puesto que las dosis infectivas de los patógenos víricos son muy bajas, a pesar de que un virus nunca podrá multiplicarse en el alimento, niveles mínimos de contaminación pueden ser suficientes para transmitir la infección.

Por lo tanto, si se desea extremar las precauciones para prevenir este tipo de infecciones en niños de corta edad deberemos evitar alimentarlos con estos alimentos a no ser que estén completamente cocinados, y hay que tener en cuenta que la congelación no disminuye el riesgo de una infección vírica. Por otro lado, en el hogar, las buenas prácticas de higiene personal (lavado de manos) y evitar la contaminación cruzada en la manipulación de alimentos crudos son esenciales.

3.2.1 Rotavirus

Los rotavirus del grupo A son la primera causa de hospitalización por gastroenteritis en niños de corta edad y causan más de 450 000 muertes en niños menores de 5 años en países en vías de desarrollo (Ruggeri y Fiore, 2012). En estos países se estima que prácticamente todos los niños sufren una infección por rotavirus antes de los 2 años. Desde 2006, muchos países recomiendan la vacunación contra rotavirus a los niños de corta edad con alguna de las dos vacunas atenuadas disponibles (RotaTeq® de Merck y Rotarix® de GlaxoSmithKline), pero en la mayoría de países es una vacuna optativa y su precio es elevado. Desde 2009, la OMS recomienda la inclusión de esta vacuna en los programas de inmunización de todos los países. A pesar de la gran diversidad de cepas circulantes, parece que tanto la infección como la vacunación protegen contra gastroenteritis futuras por la mayoría de las cepas víricas que circulan en la población (Jiang et al., 2010) (Wang et al., 2010), aunque tampoco se descarta que en adultos se puedan producir infecciones asintomáticas.

A pesar de su impacto, las vías de transmisión distintas de la transmisión persona-persona no se han caracterizado en detalle, pero se sabe que rotavirus es un virus muy estable en el medio ambiente, en aguas, sobre alimentos y sobre superficies. En los países en vías de desarrollo rotavirus puede transmitirse por agua con contaminación fecal y la utilización de biberones reconstituidos con agua de poca calidad parece una fuente de contagio probable. Por otro lado, puesto que los adultos sanos pueden actuar como reservorio, es importante también extremar las buenas prácticas de higiene personal durante la preparación de alimentos para niños de corta edad. A pesar de que muchas de las cepas que circulan actualmente tienen un origen zoonótico, se cree que la transmisión de rotavirus de animales al hombre no ocurre con frecuencia.

En los países con climas templados las infecciones por rotavirus en niños presentan una marcada estacionalidad con mayor incidencia en los meses fríos. Aunque la mayoría de casos declarados son infecciones esporádicas, también se han documentado brotes epidémicos en colegios, guarde-

rías, hospitales y geriátricos. La fuente de contagio en algunos de estos brotes ha sido el agua de bebida contaminada con una elevada carga viral debido a una contaminación accidental (Gallay et al., 2010) (Räsänen et al., 2010). Alimentos contaminados tras la cocción también se han reportado como causa de un brote en un sanatorio de madres e hijos en Alemania (Mayr et al., 2009).

3.2.2 Norovirus (NoV)

Después de rotavirus, los NoV se consideran la segunda causa más común de gastroenteritis aguda no bacteriana en niños, y debido al uso de la vacuna contra rotavirus en muchos países, es posible que pronto lleguen a ocupar el primer puesto. Se estima que en países industrializados causan el 12 % de las hospitalizaciones por gastroenteritis en niños menores de 5 años. En países en vías de desarrollo se estima que causan 218 000 muertes infantiles (Patel et al., 2008). Los NoV afectan a todos los grupos de edad y su incidencia es elevada en todo el mundo, tanto en forma de brotes epidémicos como casos esporádicos, que muchas veces se infravaloran por falta de datos. La mayoría de infecciones no suelen ser graves y se resuelven pasadas unas 24-60 horas. Algunos estudios lo señalan como el agente causante de más del 50 % de todas las toxiinfecciones alimentarias (Scallan et al., 2011) (Robilotti et al., 2015.). En cuanto a los brotes, distintos estudios indican que el porcentaje de brotes que son de origen alimentario oscila entre el 12 y el 54 % (FAO/OMS, 2008b) (Sabria et al., 2014), pero existen pocos datos acerca de cuál sería este porcentaje teniendo en cuenta únicamente las infecciones infantiles. El mayor brote alimentario en Europa durante el año 2012 fue un brote de NoV en Alemania asociado al consumo de fresas congeladas, que afectó a casi 11 000 individuos, la mayoría de ellos en edad escolar y preescolar.

En comparación con los niños de entre 2 y 4 años, en niños menores de 2 años se ha observado una mayor duración de la gastroenteritis (7 días versus 3,5 días) y una mayor gravedad (Murata et al., 2007). En neonatos se han descrito infecciones por NoV que se han complicado hasta enterocolitis necrotizante, causando la muerte en algunos casos (Turcios-Ruiz et al., 2008) (Stuart et al., 2010). En uno de estos brotes, una de las cuidadoras reportó haber tenido síntomas de gastroenteritis los días próximos al brote (Turcios-Ruiz et al., 2008).

3.2.3 Otros virus productores de gastroenteritis

Siguiendo a rotavirus y norovirus, existe una lista muy larga de otros virus causantes de gastroenteritis aguda en niños, entre los cuales los mejor conocidos son los Adenovirus entéricos (tipos 40 y 41), los Astrovirus y los Sapovirus (Koopmans y Duizer, 2004) (Carter, 2005). Además, durante los últimos años se han descubierto otros agentes etiológicos de gastroenteritis infantiles como los Aichivirus (Kitajima y Gerba, 2015) o los Picobirnavirus (Ganesh et al., 2012). La mayoría suelen causar gastroenteritis únicamente en niños, y aunque los adultos también pueden sufrir infección, muchas veces suele ser asintomática. Existen pocos estudios sistemáticos que aporten datos sobre la prevalencia de cada uno de estos agentes como causa de gastroenteritis en niños, sobre todo debido a que muchos únicamente se identifican a nivel de laboratorios de investigación y a que el diagnóstico tampoco se hace por igual en todos los países (Guarino et al., 2008). Al igual que para rotavirus y NoV, suelen presentar también una mayor incidencia durante los meses fríos y aunque son virus de

transmisión fecal-oral, el papel que juegan los alimentos en la transmisión de la infección no está bien documentado. Puesto que la mayoría puede causar infecciones asintomáticas, una posible vía de transmisión es por manipulación de alimentos durante su preparación cuando las normas de higiene personal son deficientes. Aunque el estudio no se remitía exclusivamente a virus, entre los principales factores de riesgo en niños con gastroenteritis en países industrializados se identificaron los siguientes: viajes recientes al extranjero, contacto con personas sintomáticas (en especial en guarderías), hospitalización, contacto con perros con diarrea, consumo de productos que contienen leche en polvo, bajo nivel educativo de los padres y diagnóstico anterior de distintos tipos de enfermedades atópicas (Ethelberg et al., 2006). Para las gastroenteritis víricas, el contacto con individuos sintomáticos fue el factor de riesgo más importante.

3.2.4 Virus causantes de hepatitis agudas

Las hepatitis agudas que pueden tener un origen alimentario son las causadas por el virus de la hepatitis A (HAV) y el virus de la hepatitis E (HEV).

En países en vías de desarrollo, el HAV es endémico y la mayoría de niños se infectan de forma asintomática quedando inmunizados de por vida (Pintó et al., 2010). Según la OMS, únicamente el 10 % de los niños menores de 6 años sufren ictericia. En países industrializados con estándares mayores de higiene, el virus ya no circula y cada vez es más frecuente incluir la vacunación contra HAV en el calendario sistemático de inmunización. El Comité Asesor de Vacunas de la Asociación Española de Pediatría recomienda la vacuna contra HAV en determinados grupos de riesgo, y desde el año 2015, la vacuna se utiliza de forma universal en Cataluña y en las ciudades de Ceuta y Melilla. Entre las medidas de prevención para el HAV destacarían la vacunación de los niños por un lado, así como también el evitar dar alimentos de riesgo que estén crudos. Puesto que el virus ya no circula en la mayoría de países industrializados, es poco probable que los alimentos nacionales lleguen a contaminarse, pero el riesgo es significativo si hablamos de alimentos importados de regiones endémicas (Collier et al., 2014) (Guzmán-Herrador et al., 2014) (Terio et al., 2015). Además, también cabe estar alerta al aumento de casos sintomáticos en niños menores de 5 años que se ha observado en nuestro país asociados a un determinado genotipo del virus (D'Andrea et al., 2015).

Los datos sobre si las infecciones por HEV en niños son también asintomáticas no son concluyentes. Mientras que en la página web de la OMS se indica que las infecciones en niños suelen ser asintomáticas (OMS, 2005), según otras fuentes las infecciones por HEV cursan con sintomatología y pueden ser especialmente graves en niños menores de 2 años (Sayed et al., 2015). Las infecciones por HEV en regiones endémicas se transmiten principalmente por la ruta fecal-oral, a menudo en forma de brotes de origen hídrico, pero en países desarrollados no endémicos como Europa, el número de infecciones autóctonas está incrementando y se cree que esto es en parte debido a la transmisión de determinados genotipos que también infectan cerdos y otros animales (Hoofnagle et al., 2012). Así, el HEV se considera hoy en día un patógeno zoonótico de transmisión alimentaria emergente. Aunque el consumo de productos derivados del cerdo poco cocinados está descrito como un factor de riesgo para la hepatitis E, se desconoce qué porcentaje de infecciones tendrían este origen (BIOHAZ, 2011). Finalmente, aunque

en China existe una vacuna contra HEV aprobada desde 2012, ésta no se comercializa aún en ningún otro país. Las mejores estrategias de prevención siguen siendo el consumo de alimentos bien cocinados y manipulados siguiendo unas buenas normas de higiene. Además de los productos derivados del cerdo, y del mismo modo que ocurre con los otros virus entéricos, el virus HEV también se ha detectado en alimentos en contacto con agua contaminada fecalmente como el marisco, las frutas tipo baya y ensaladas, y la mala gestión de purines o estiércol de cerdo o su utilización como fertilizantes también podría aumentar el riesgo de contaminación de los cultivos (BIOHAZ, 2011).

3.3 Principales parásitos

Las principales vías de transmisión de los parásitos patógenos son el agua y la contaminación persona-persona a través de la ruta fecal-oral. De acuerdo con los datos del SIM, los protozoos parásitos pertenecientes a los géneros *Cryptosporidium* y *Giardia* se encuentran dentro de los agentes de enfermedad de transmisión alimentaria que afectan al grupo de edad 1-4 años. También se ha observado en España que los niños de corta edad pueden ser portadores asintomáticos frecuentes de estos microorganismos (Mateo et al., 2014).

El cuadro clínico causado por otros parásitos de transmisión alimentaria no es significativamente diferente en niños al que presentan los adultos, y el pronóstico de la enfermedad parece relacionarse más con el estado inmunitario del paciente que con la edad del mismo. Así, por ejemplo, la toxoplasmosis congénita, es una infección trasplacentaria del feto y las medidas de prevención se dirigen fundamentalmente a las madres gestantes. El seguimiento de las buenas prácticas higiénicas en la preparación de alimentos y el cocinado completo de los mismos es la medida preventiva más eficaz para evitar estos peligros.

3.3.1 *Cryptosporidium*

Cryptosporidium parvum y otras especies de este género son los agentes de la criptosporidiosis, una enfermedad gastrointestinal que se caracteriza por cursar con diarrea y molestias abdominales y que puede prolongarse durante varias semanas. El ciclo de vida del protozoo se completa en un solo huésped y culmina con la eliminación de ooquistes maduros (es decir, plenamente infecciosos) por las heces. Estos ooquistes pueden contaminar las aguas y permanecer viables durante períodos prolongados de tiempo (hasta 6 meses) o transmitirse por contacto directo o a través de la manipulación incorrecta de los alimentos (Nichols, 2000) (Dawson, 2005).

La mayor parte de los casos de criptosporidiosis en España se dan en los meses cálidos, posiblemente asociado al uso recreativo de las aguas, y el grupo de edad más afectado son los niños entre 0 y 4 años (Semenza y Nichols, 2007). Se han registrado algunos brotes que afectan a niños en edad preescolar, como el ocurrido en Guadarrama en 1998, asociado al consumo de agua de traída deficientemente tratada (Rodríguez et al., 2000).

Los quistes son bastante resistentes a los desinfectantes, sobre todo los basados en cloro. También son parcialmente resistentes a la congelación hasta -20 °C. Los tratamientos más efectivos para su eliminación son la desecación y el tratamiento térmico (cocinado completo de los alimen-

tos, pasterización, ebullición del agua), además de las buenas prácticas higiénicas en el hogar (Doyle, 2003) (Dawson, 2005).

3.3.2 *Giardia*

Giardia intestinalis (también denominado *G. lamblia* o *G. duodenalis*) es el parásito intestinal más frecuente en los países desarrollados, con cerca de 1 000 casos declarados anualmente en España, de acuerdo con los datos del SIM. La giardiasis se produce como consecuencia de la ingestión de quistes, que se transmiten por la vía fecal-oral, bien a través de aguas contaminadas, de alimentos manipulados incorrectamente o por el contacto directo con personas portadoras (Doyle, 2003) (Dawson, 2005). La enfermedad cursa con síntomas gastrointestinales (náuseas, diarrea) acompañados de dolor abdominal, hinchazón y flatulencia. La diarrea puede durar varios días o semanas e ir acompañada de pérdida de peso.

En nuestro país, los niños de menos de 5 años de edad son el grupo de edad más afectado. Además, varios brotes registrados de giardiasis han ocurrido en escuelas y centros educativos, principalmente por transmisión directa persona-persona, aunque también ha habido brotes relacionados con el consumo de agua (Carmena, 2012).

Los quistes de *Giardia* son bastante resistentes a los tratamientos de cloración, aunque menos que los de *Cryptosporidium*, y por tanto es de aplicación lo ya comentado respecto a los tratamientos para la eliminación de este último (Doyle, 2003) (Dawson, 2005).

4. Riesgos microbiológicos de la lactancia materna

La leche materna no es un producto estéril y contiene con frecuencia bacterias que se encuentran en la piel materna. La lactancia materna en un niño sano lleva consigo la saludable colonización bacteriana de éste. La lactancia materna es el método óptimo de alimentación del lactante. La OMS recomienda la lactancia materna exclusiva hasta los 6 meses de edad, y acompañada de alimentos complementarios apropiados hasta los 2 o más años de edad.

En la práctica, son muy pocas las infecciones que contraindican la lactancia (Díaz-Gómez, 2005). La presencia de infección clínica en una madre lactante presupone generalmente que el niño está ya expuesto al mismo tiempo a ese patógeno, el cese del amamantamiento no tiene, pues, efecto preventivo y no debe recomendarse de rutina. En términos generales las enfermedades comunes, bacterianas, fúngicas y víricas si no comprometen la salud materna no constituyen contraindicación para la lactancia.

4.1 Principales patógenos que pueden transmitirse a través de la leche materna

A continuación se repasan algunos de los principales tipos de enfermedad infecciosa que pueden desaconsejar la lactancia. Se puede clasificar entre unas pocas contraindicaciones y unas situaciones que deben valorarse individualmente. Las recomendaciones incluidas en este apartado no deben sustituir, en ningún caso, las instrucciones del pediatra.

4.1.1 Enfermedades bacterianas

4.1.1.1 Brucelosis

Se puede transmitir a través de la leche humana. Si la madre ha sido diagnosticada cuando ya ha comenzado la lactancia es muy probable que el niño esté contagiado y ambos necesiten tratamiento. No hay acuerdo sobre la necesidad de suspender la alimentación al pecho hasta que finalice el tratamiento (Díaz-Gómez, 2005).

4.1.1.2 Enfermedad de Lyme

Si bien la espiroqueta *Borrelia burgdorferi* se ha aislado en leche materna no se ha comprobado la transmisión de la enfermedad. Si se diagnostica tras el parto debe iniciarse tratamiento inmediatamente así como al niño si se presenta síntomas. Una vez iniciado el tratamiento materno puede continuarse con la lactancia.

4.1.1.3 Infecciones bacterianas graves

Cuando la madre sufre un cuadro de sepsis u otra infección grave, los gérmenes pueden pasar a la leche, pero el niño también recibe a través de ella anticuerpos frente al microorganismo causante de la infección, así como antibióticos administrados a la madre. Es razonable establecer que la afectación del estado general materno debe primar sobre el mantenimiento del amamantamiento de forma transitoria o permanente. Si la enfermedad produce una importante afección del estado general de la madre se puede suspender la lactancia durante las primeras fases del tratamiento, continuándola después, a juicio del médico (Díaz-Gómez, 2005).

4.1.2 Enfermedades víricas

Cuando la madre sufre una infección vírica, el virus pocas veces se transmite a la leche materna y representa un riesgo para el bebé. Aparte de la transmisión a través de la leche, el bebé también podría contagiarse al mamar por el contacto directo con lesiones en el pecho y el pezón. No obstante, solo en caso de enfermedades potencialmente graves para el bebé se considerará interrumpir la lactancia materna.

La tabla 1 resume los principales patógenos víricos que presentan un potencial riesgo de transmitirse por estas vías y para los cuales se dispone de información (Lanari et al., 2012) (Civardi et al., 2013). La decisión siempre debe sopesarse frente a los numerosos e importantes beneficios que supone la lactancia materna para el niño, teniendo en cuenta el riesgo de transmisión y la gravedad de la posible enfermedad. En países en vías de desarrollo, los beneficios de la lactancia materna siempre compensan cualquier riesgo a excepción de madres infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) pero únicamente en determinadas circunstancias. En estos países se calcula que la lactancia materna reduce en más de un 20 % el riesgo de mortalidad por otras causas (Edmond et al., 2006). En los países industrializados, la mortalidad por malnutrición y otras infecciones es muchísimo menor, y la lactancia materna está contraindicada en determinados casos: la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus linfotrópico de células T humano (HTLV) (AAP, 2012). Si se considera necesaria la interrupción temporal de la lactancia, se

aconsejará a la madre que se extraiga la leche de forma manual o con sacaleches con frecuencia, para no cortar la producción y poder reanudar la alimentación al pecho sin problemas.

En determinadas circunstancias es posible recurrir a bancos de leche materna para alimentar al bebé. Las mujeres que han dado positivas para el VIH, el virus de la hepatitis B ó C, el HTLV o la sífilis, o aquellas que presentan un riesgo mayor para la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob no deberían donar leche materna (NICE, 2010).

El riesgo de transmisión del VIH a través de la leche materna oscila entre el 15 y el 44 % y recientemente se ha visto que un tratamiento con antirretrovirales reduce el riesgo de transmisión (OMS, 2007). En países industrializados, la lactancia está contraindicada en madres seropositivas para el VIH, pero en países en vías de desarrollo esto no es siempre así. Desde 2010, la OMS recomienda que si las mujeres infectadas por el VIH pueden recibir un tratamiento con antirretrovirales, den el pecho hasta que el bebé tenga 12 meses (OMS, 2010).

El riesgo de transmisión del virus linfotrópico de células T humano de tipo 1 (HTLV-I) a través de la leche también es elevado, de alrededor del 20 % cuando la lactancia dura 6 meses o más (Moriuchi et al., 2013). Este virus es un retrovirus oncogénico que infecta los linfocitos T CD4 y que puede acabar induciendo linfomas y mielopatías (Moriuchi et al., 2013). Se estima que 10-20 millones de personas están infectadas, concentradas en Japón, África Central y Occidental, el Caribe, América Central y América del Sur, y se calcula que el riesgo de sufrir un linfoma de células T del adulto entre los individuos infectados es del 5 %. La transmisión vertical de HTLV ocurre principalmente a través de la leche materna, pero al igual que ocurre con el VIH, únicamente se desaconseja interrumpir la lactancia materna por este motivo en países industrializados y en situaciones en las que puede garantizarse una correcta nutrición del bebé mediante lactancia artificial.

Aunque la transmisión de citomegalovirus (CMV) a través de la leche materna también se ha demostrado, con datos que oscilan entre el 4 y el 38 % (Hamprecht et al., 2001) (Hayashi et al., 2011) (Lanzieri et al., 2013), la mayoría de infecciones en los niños son asintomáticas. La probabilidad de infección y enfermedad por CMV en niños que nacen a término es muy baja, probablemente gracias a la transferencia de anticuerpos contra el virus durante el embarazo. Las únicas situaciones en las que la lactancia en madres seropositivas estaría contraindicada serían en niños prematuros o niños que nacen con un peso inferior a 1,5 kg (Lanzieri et al., 2013), en los cuales, las infecciones por CMV pueden ocasionar hepatopatía, trombocitopenia, neutropenia, petequias, el síndrome de dificultad respiratoria y el síndrome sepsis-like.

Para otras infecciones de la misma familia, como por ejemplo el virus herpes simplex o el virus de la varicela, únicamente se desaconseja la lactancia en casos en los que la infección de la madre sea muy reciente, como por ejemplo, en el caso de que existan lesiones herpéticas en los pechos de la madre o pezones agrietados. Si la madre se infecta por varicela 5 días antes del parto o 2 días después, se aconseja mantener al bebé alejado de ella para disminuir el riesgo de contagio, pero no hay problema en extraer su leche y alimentar al bebé. Frente a infecciones de la madre con el virus de la rubeola o el sarampión la situación sería parecida, aunque existen muchos menos datos disponibles. En general la lactancia únicamente se desaconsejaría durante una infección primaria de la madre, cuando las concentraciones de virus en la leche pueden ser mayores. Tampoco existe

ningún riesgo elevado en vacunar a las madres lactantes contra infecciones como la varicela, la rubeola, las paperas o el sarampión, vacunas que son todas ellas atenuadas. Aunque existen pocos estudios recientes sobre el tema, en algunos casos se ha demostrado que el virus atenuado puede transmitirse a través de la leche al niño, pero no se han reportado infecciones graves en los lactantes (Alain et al., 2012).

Aunque el riesgo de transmisión del virus de la hepatitis B ó C a través de la leche no es cero, no se han reportado casos de transmisión de estas infecciones a través de la leche. El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) y la Academia Americana de Pediatría (AAP) consideran que las infecciones por estos virus no contraindican la lactancia materna, aunque también se ha señalado que sería prudente suspender temporalmente la lactancia si la madre infectada tiene grietas con sangrado en los pezones. Los niños nacidos de madres infectadas con el virus de la hepatitis B deberían recibir inmunización pasiva y activa contra el virus en las 12 primeras horas de vida. La segunda dosis se debería administrar a los 1-2 meses, y la tercera a los 6 meses, pero no existe la necesidad de retrasar la lactancia materna hasta que el bebé esté completamente inmunizado.

En mujeres embarazadas infectadas por HEV, la infección puede transmitirse al feto y causar una mortalidad elevada (Krain et al., 2014), pero no se ha reportado ningún caso de transmisión a través de la leche materna y por lo tanto la lactancia no está contraindicada. Además, los anticuerpos presentes en la leche materna pueden contribuir a proteger al niño de la infección. La situación podría ser similar para el HAV, y en ningún caso se desaconsejaría la lactancia.

Finalmente, para madres infectadas con el virus West Nile (WNV) los datos que existen también son muy escasos. La transmisión a través de la leche no puede descartarse, pero los únicos casos en los que se ha confirmado, no se ha detectado enfermedad sintomática en el lactante (Hinckley et al., 2007).

Tabla 1. Patógenos que potencialmente pueden transmitirse al bebé a través de la leche materna y que están mejor documentados			
Patógeno	Presencia en la leche materna	Riesgo de transmisión	Indicación lactancia materna
Patógenos bacterianos			
<i>Brucella</i> spp. (brucelosis)	Sí	Posible	Desaconsejada si la madre no recibe tratamiento
<i>Borrelia burgdorferi</i> (enfermedad de Lyme)	Sí	Muy Bajo	Desaconsejada en países industrializados si la madre no recibe tratamiento
Patógenos víricos			
VIH	Sí	Considerable	Desaconsejada en países industrializados
HTLV (I y II)	Sí	Considerable	Desaconsejada en países industrializados
Citomegalovirus (CMV)	Sí	Considerable	Aconsejada excepto en niños prematuros o con alguna inmunodeficiencia, y en madres con infección primaria en curso
Varizella Zoster Virus (VZV)	Sí	Posible	Aconsejada excepto si existen lesiones en los pezones
Herpes Simplex Virus (HSV)	n.d.	n.d.	Aconsejada excepto si existen lesiones herpéticas en los pechos
Virus Hepatitis B (HBV)	Sí	Bajo	Aconsejada excepto en madres con infección primaria en curso
Virus Hepatitis C (HCV)	Sí	Bajo	Aconsejada excepto en caso de lesiones en los pezones y madres con infección primaria en curso
Virus Hepatitis A (HAV)	n.d.	Muy Bajo	Aconsejada
Virus West Nile (WNV)	Sí	Muy bajo	Aconsejada

n.d.: información no disponible. **Adaptado de:** (Civardi et al., 2013).

4.1.3 Otros patógenos no transmitidos por la leche materna que potencialmente pueden transmitirse al bebé durante el amamantamiento. Recomendaciones sobre la conveniencia de la lactancia materna

En ocasiones, debido al estrecho contacto entre la madre y el bebé, determinadas infecciones de la madre pueden transmitirse al bebé por vías distintas a la leche materna, como por ejemplo por vía respiratoria o por vía fecal-oral. Aunque se deben extremar las precauciones y las medidas de higiene para evitar el contagio, la mayoría de infecciones agudas comunes no contraindican la lactancia. En el caso de que la madre se extraiga la leche y ella o cualquier otra persona deba manipularla, es importante seguir las buenas prácticas de higiene de manipulación de alimentos, sobre todo en casos en los que existan síntomas de infección. En la tabla 2 se resume la información disponible acerca de las recomendaciones sobre la conveniencia de la lactancia materna en situaciones de infección de la madre.

4.1.3.1 Abscesos mamarios y mastitis

La mastitis o el absceso mamario no deben constituir una indicación absoluta de retirada. En mama abscesificada y con dolor y pus se puede continuar transitoriamente con el otro pecho, evacuando el pecho afectado.

4.1.3.2 Tuberculosis activa no tratada

El bacilo de la tuberculosis no se ha aislado en la leche materna. La transmisión es por vía respiratoria. Si la tuberculosis se diagnostica durante el embarazo, debe iniciarse el tratamiento de inmediato, para evitar el riesgo de contagio. Si se diagnostica al final de la gestación o después del parto, existe controversia sobre si se debe separar al niño de la madre. La OMS aconseja no separarlos y administrar al niño isoniacida durante 6 meses si la madre llevaba menos de 2 meses de tratamiento en el momento del parto; mientras que la Asociación Americana de Pediatría y otros autores recomiendan la separación madre-hijo hasta que hayan transcurrido las 2 primeras semanas de tratamiento y la madre ya no sea contagiosa (Díaz-Gómez, 2005).

4.1.3.3 Toxiinfecciones alimentarias

No existe evidencia de que estas enfermedades se transmitan por la leche materna a no ser que cursen con bacteriemia. Por otra parte, el lactante ya ha estado expuesto al contagio por su contacto con la madre durante el periodo prodrómico. Cuando la madre se encuentra en el periodo sintomático ha formado anticuerpos que le puede transmitir a su hijo a través de la leche, protegiéndolo frente a la infección o disminuyendo la gravedad de los síntomas. En estos casos, se puede continuar con la alimentación al pecho y administrar tratamiento a la madre, si lo requiere. Durante el periodo de infectividad la madre deberá extremar las medidas de higiene personal.

La única contraindicación aparecería si la intoxicación es sistémica (fiebre entérica por *Salmonella*, por ejemplo); en ese caso se recomienda evitar la lactancia materna.

4.1.3.4 Infecciones respiratorias

Cuando se contraen estas enfermedades, el cuerpo de inmediato produce anticuerpos que pasan directamente a la leche materna. La transmisión se produce por vía respiratoria, no a través de la leche, por lo que se deberán tomar medidas de prevención (mascarillas, lavado de manos, etc.) sin que sea necesario evitar la lactancia.

4.1.3.5 Enfermedades cutáneas o de transmisión sexual

Prácticamente ninguna de las enfermedades de transmisión sexual se transmite a través de la leche materna. La presencia de lesiones cutáneas de sífilis o herpes en el pecho o en el pezón contraindica la lactancia materna, ya que pueden contener treponemas o virus (Díaz-Gómez, 2005).

No existe indicación de interrumpir la lactancia, ni siquiera de forma temporal, en caso de infecciones urinarias u otras enfermedades, siempre que el estado general de la madre lo permita y respetando la valoración médica (Lamounier et al., 2004).

4.1.3.6 Malaria

La lactancia debe continuarse si las condiciones clínicas de la madre lo permiten. Debe mantenerse precaución con la medicación antimalárica que es compatible con el amamantamiento salvo en casos de déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, G6PD, con retirada de quinina.

4.1.3.7 Enfermedad de Chagas

La transmisión del *Trypanosoma* a través de leche materna es excepcional. El tratamiento térmico inactiva al parásito por lo que tras la extracción puede utilizarse este procedimiento en fase aguda de la enfermedad seguido de su administración posterior.

4.1.3.8 Escabiosis

Infestación cutánea por el parásito *Sarcoptes scabiei* o arador de la sarna. Muy contagiosa por contacto directo mantenido. Cuando se diagnostica a la madre o al lactante lo más probable es que ambos la padezcan, por lo que no tiene objeto separarlos. Si la sarna es diagnosticada justo en el momento del parto, conviene aislar al recién nacido de la madre durante el primer día mientras hace efecto la dosis del tratamiento, manteniendo la lactancia por medio de extracción manual o con sacaleches y administrando al recién nacido lo extraído. Se deben tratar todas las personas infectadas y convivientes para evitar reinfecciones.

4.1.3.9 Candidiasis

La candidiasis vaginal puede producir una colonización en el niño. Debe ser tratada con antifúngicos en la madre pero con las debidas medidas de higiene no está indicada la retirada de la lactancia materna.

Tabla 2. Otras infecciones que potencialmente pueden transmitirse al bebé durante el amamantamiento y recomendaciones sobre la conveniencia de la lactancia materna

Recomendaciones	
Bacterias	
Mastitis y abscesos	Continuar alimentación al seno extremando precauciones higiénicas. Puede ser necesario descartar leche del seno infectado
Tuberculosis	Posponer lactancia hasta que la madre haya recibido al menos 2 semanas de tratamiento
Infección urinaria	Continuar alimentación al seno
Infección pared abdominal postcesárea	Continuar alimentación al seno
Diarrea bacteriana	Continuar alimentación al seno extremando precauciones higiénicas
Otras infecciones bacterianas sin compromiso general	Continuar alimentación al seno extremando precauciones higiénicas
Parásitos	
Malaria	Continuar alimentación al seno
Enfermedad de Chagas	Continuar alimentación al seno
Otros parásitos, escabiosis	Evitar contacto cutáneo seno-boca hasta curación. Extremar precauciones higiénicas
Hongos	
	Continuar alimentación al seno extremando precauciones higiénicas

4.1.4 Resumen: contraindicaciones de la lactancia materna

Se puede clasificar entre unas pocas contraindicaciones y unas situaciones que deben valorarse individualmente.

4.1.4.1 Contraindicaciones

VIH, virus de leucemias humana de células T, citomegalovirus en neonatos pretérminos.

4.1.4.2 Valoración individualizada

Tuberculosis activa, herpes simple, hepatitis C, brucelosis, enfermedad de Lyme, infecciones bacterianas graves, sífilis, varicela, sarampión, rubeola, parotiditis, malaria, enfermedad de Chagas, escabiosis.

4.1.4.3 Falsas contraindicaciones

Infecciones comunes, hepatitis A, hepatitis B, mastitis o absceso mamario, candidiasis vaginal.

4.1.4.4 Inmunizaciones

La lactancia no constituye una contraindicación para la administración de las vacunas, sin embar-

go su oportunidad es discutible salvo necesidades puntuales (tétanos). Parece innecesario o poco apropiado salvo en casos de lactancias muy prolongadas y riesgo alto para la madre de contraer la enfermedad.

4.2 Recomendaciones higiénicas sobre la manipulación y conservación de la leche materna

La leche materna se puede extraer manualmente o con la ayuda de un sacaleches para su posterior utilización, garantizando su conservación adecuada a temperatura ambiente, en refrigerador o en congelador, en función del tiempo que deba transcurrir hasta que se administre al bebé. La ducha diaria suele ser suficiente para garantizar la higiene de los pechos, pero sí es importante lavarse bien las manos siempre antes de la extracción. La extracción de la leche debe realizarse en un lugar higiénico y tranquilo; los baños no son lugares seguros a tal efecto. En caso de utilizar un sacaleches, todas las piezas del extractor de leche y los recipientes de recogida y almacenamiento de la leche deben limpiarse y desinfectarse antes de su uso, siguiendo las indicaciones del fabricante. El sacaleches debe ser de uso personal. Según el Comité de Lactancia Materna de la Asociación Española de Pediatría, la leche materna extraída puede conservarse a una temperatura de 4 °C durante 8 días, a 19-22 °C durante 10 horas, a 25 °C entre 4-6 horas, y a 30-38 °C máximo 4 horas (AEP, 2012). Para su almacenamiento es recomendable utilizar envases de vidrio correctamente lavados o bolsas comerciales destinadas a tal efecto. Lo ideal es enfriar rápidamente la leche extraída (en un recipiente con agua fría) y después congelarla lo antes posible. Si se realiza la extracción en casa y la leche no se va a utilizar ese mismo día, lo mejor es congelarla. Si se realiza la extracción fuera de casa, puede conservarse en una neverita portátil con frigolines y congelarla en cuanto se llegue a casa. En caso de que la leche estuviera contaminada de forma intrínseca o extrínseca con algún microorganismo patógeno, la congelación reduciría la contaminación, pero no la eliminaría completamente.

La leche se puede descongelar sumergiendo el recipiente en otro con agua caliente, o a temperatura ambiente, y siempre es preferible evitar el uso del microondas porque la distribución de la temperatura no es uniforme. En caso de que la leche materna deba ser transportada hasta una guardería o escuela infantil, ésta debería haber sido extraída o descongelada ese día o el día anterior y mantenerse refrigerada durante su transporte y durante el tiempo necesario hasta ser administrada.

5. Prácticas de riesgo en la preparación y manipulación de preparados de leche en polvo para lactantes (PPL), y medidas de higiene para minimizar dichos riesgos

5.1 Factores de riesgo microbiológico en PPL

La prevención y lucha eficaces contra las enfermedades de origen alimentario se basan en identificar los peligros vinculados a la producción, tratamiento y preparación de los alimentos, evaluar sus riesgos y determinar las operaciones en las que resulten eficaces ciertos métodos de control. En este sentido, resulta esencial el conocimiento de los factores que contribuyen a causar brotes de

enfermedades alimentarias así como el conocimiento de los resultados de investigaciones aplicadas sobre la ecología, multiplicación e inactivación de los patógenos transmitidos por los alimentos (Bryan, 1992).

En general el riesgo de enfermedades de transmisión alimentaria (ETAs) se relaciona con cuatro factores principales (Bryan, 1992):

1. Propiedades del alimento, en relación a su historia epidemiológica y a sus características y posibilidades para permitir la supervivencia y el desarrollo de patógenos.
2. Operaciones de preparación, en relación a los métodos que suelen aplicarse en su fabricación y manipulación posterior para conseguir la inactivación de patógenos o impedir su proliferación.
3. Volumen de alimento preparado, en relación al tiempo y a las condiciones de mantenimiento que puedan favorecer el desarrollo bacteriano durante el periodo que media entre la preparación y el consumo.
4. Susceptibilidad del consumidor, en relación a la población de destino que pueda incluir poblaciones de alto riesgo.

Los actuales procesos de fabricación de preparados para lactantes (PPL) y preparados de continuación no permiten garantizar que éstos sean estériles. Tanto la FAO como la OMS y la EFSA encuentran que el principal vector de riesgo asociado al uso de PPL en la alimentación neonatal es *Cronobacter*, si bien también se ha detectado la presencia de otros microorganismos como *Salmonella* (EFSA, 2004) (FAO/OMS, 2006). Se ha notificado la presencia de otros microorganismos en PPL, como *Citrobacter freundii*, si bien no se ha podido demostrar que dichos PPL sean el vehículo y la fuente de la infección (FAO/OMS, 2004a). Existen otros microorganismos que causan enfermedades en lactantes, pero no se han encontrado en PPL. Tal es el caso de *Clostridium botulinum* o *Clostridium difficile* (FAO/OMS, 2004a).

5.2 Vías de contaminación de los PPL

Los grupos de trabajo de expertos FAO/OMS (2004a, 2006) establecidos para evaluar el riesgo de microorganismos patógenos en preparados de leche en polvo para lactantes (PPL), identificaron diferentes tipos de microorganismos asociados a la contaminación de estos productos: *Cronobacter* spp., *Salmonella enteritidis*, *Enterobacter agglomerans*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Serratia* spp., *Acinetobacter* spp., *Bacillus cereus*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus* spp. No obstante, concluyeron que los patógenos más preocupantes son *Cronobacter* y *Salmonella*. Por ello el estudio que se expone a continuación hace referencia preferentemente a estos dos patógenos entendiendo que la mayoría de las consideraciones establecidas son aplicables a otros agentes patógenos potencialmente presentes en los PPL.

La contaminación microbiana de los PPL puede ocurrir por dos vías: intrínseca, durante el proceso de elaboración y/o extrínseca, durante la reconstitución y manipulación del preparado en polvo.

La Red Internacional de Autoridades de Inocuidad de los Alimentos (INFOSAN, 2005) señala que en el 50-80 % de los casos, la fórmula infantil en polvo es tanto la fuente como el vehículo de la infección producida por *Cronobacter*, y en el 20-50 % es el vehículo, pero la fuente de origen es la falta de higiene durante la reconstitución y manipulación.

Al contrario que ocurre con *Cronobacter*, es poco probable que los casos de salmonelosis en lactantes se deban a una contaminación intrínseca de los PPL (FAO/OMS, 2004a).

5.2.1 Contaminación intrínseca

Aunque existen fórmulas infantiles líquidas estériles, los preparados de leche en polvo para lactantes (PPL) son los productos más utilizados como fuente de alimentación de este grupo poblacional. Los procesos de fabricación que se aplican actualmente no garantizan la obtención de un preparado en polvo estéril sin alterar sus propiedades nutricionales, y por consiguiente, su inocuidad microbiológica depende del cumplimiento estricto de las buenas prácticas de higiene durante todo el proceso de fabricación.

Para garantizar la inocuidad del producto durante su vida útil, las empresas que elaboren preparados deshidratados para lactantes y alimentos dietéticos deshidratados destinados a usos médicos especiales para lactantes menores de 6 meses, deben cumplir los criterios de seguridad alimentaria relativos a *Cronobacter* y *Salmonella* establecidos en el Reglamento (CE) N° 2073/2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios y sus posteriores modificaciones. Ello establece un límite máximo de ausencia de *Cronobacter* en cada una de las 30 muestras de 10 g y de ausencia de *Salmonella* en cada una de las 30 muestras de 25 g (Anexo I).

Este Reglamento establece también criterios microbiológicos de higiene del proceso relativos a Enterobacteriáceas (ausencia en cada una de las 10 muestras de 10 g) y presuntos *Bacillus cereus* ($n=5$, $c=1$, $m=50$ ufc/g y $M=500$ ufc/g) que deben cumplir las industrias al final del proceso de fabricación (Anexo I), así como la obligación de éstas de tomar muestras de equipos y zonas de trabajo para garantizar el cumplimiento de dichos criterios microbiológicos.

Un estudio reciente (Parra et al., 2015) informa de recuentos de aerobios mesófilos considerados inaceptables ($>10\ 000$ a $<50\ 000$ ufc/g) en el 8 % de las muestras de PPL procedentes de diferentes países (Chile, México y Holanda). Asimismo, destaca los recuentos de enterobacterias obtenidos en siete muestras leche en polvo para prematuros con <100 ufc/g (dos muestras), de 100 a 500 ufc/g (cuatro muestras) y 1 000 ufc/g (una muestra). Además se identificó *Cronobacter sakazakii* en dos lotes de leche para lactantes producida en Chile.

La presencia de enterobacterias en las PPL refleja condiciones deficientes de higiene en el entorno de fabricación y se ha demostrado que se relaciona con la presencia de patógenos asociados a infecciones en lactantes (Reich et al., 2010), por lo que su ausencia debe ser considerada como un factor de seguridad, especialmente en el caso de productos destinados a la alimentación de niños prematuros, recién nacidos de bajo peso e inmunocomprometidos.

Diversas revisiones publicadas en los últimos años (FAO/OMS, 2004a) (Gurtler et al., 2005) (Strydom et al., 2012) (Holy y Forsythe, 2014) (Huertas et al., 2015) incluyen referencias bibliográficas que revelan la presencia de *Cronobacter* en PPL comerciales, con prevalencias que oscilan entre

el 0 y el 18 %. En el periodo 2006-2009, *Cronobacter* fue detectado en porcentajes del 0,4 % (Eslovaquia) y del 5 % (Austria) en PPL dispuestos para la venta en países de la Unión Europea (Helwich et al., 2012).

La detección del patógeno en envases de PPL sin abrir demuestra la vía de contaminación intrínseca durante el proceso de fabricación del producto (Holy y Forsythe, 2014).

Si bien los niveles de contaminación detectados en la mayoría de los casos son inferiores a 1 ufc/g, la positividad de *Cronobacter* en PPL es considerada un riesgo significativo de infección teniendo en cuenta, por una parte, la baja dosis infectiva asociada a este patógeno (10-100 organismos) y el consumo de cantidades variables de leche varias veces al día y, por otra, la facilidad de proliferar en el producto rehidratado.

La FAO/OMS (2004a) estimó que una disminución significativa de la frecuencia de la contaminación de los preparados en polvo para lactantes podía reducir el riesgo relativo de *Cronobacter* entre cuatro o cinco veces.

Al contrario que ocurre con *Cronobacter*, raramente se ha detectado *Salmonella* en los preparados en polvo para lactantes (Muytjens et al., 1988). Sin embargo, los PPL también han estado implicados en brotes de salmonelosis en niños. Sirva de ejemplo el brote de gastroenteritis por *Salmonella* Poona declarado en España en 2010-2011, el cual se asoció con significación estadística al consumo de dos marcas de leche en polvo fabricadas en la misma empresa, aunque los resultados analíticos llevados a cabo en el entorno de producción fueron negativos para *Salmonella* (ISCIII, 2011).

Asimismo, se ha sugerido que la contaminación intrínseca del producto ha sido la causa de otros brotes de salmonelosis en lactantes, siendo común a todos ellos el bajo nivel de *Salmonella* detectado en la leche implicada, lo que hace más difícil su detección en los controles rutinarios (Cahill et al., 2008).

Los PPL se fabrican a partir de diversos ingredientes: leche, proteína de soja, hidratos de carbono, grasas, minerales y vitaminas entre otros, mediante tres tipos de procesos diferentes: proceso de mezcla en húmedo, proceso de mezcla en seco y proceso combinado.

Dependiendo del proceso aplicado se pueden identificar diversos factores de riesgo que potencialmente derivarían en la contaminación del producto obtenido. Entre estos factores se incluyen los siguientes:

5.2.1.1 Tratamiento térmico

En el proceso de mezcla en húmedo todos los ingredientes se manejan en fase líquida, se someten a tratamiento térmico de pasteurización y posteriormente a secado hasta obtener el producto en polvo.

Diversos estudios ponen de manifiesto que el tratamiento de pasteurización aplicado en el proceso de elaboración de PPL es suficiente para inactivar *Cronobacter sakazakii* y otras enterobacterias presentes (Fu et al., 2011), si bien se ha demostrado que la resistencia al calor de este patógeno puede variar en función de la cepa, el pH, la actividad de agua y el estrés térmico (Arroyo et al., 2009). Por otra parte, las combinaciones de tiempo y temperatura utilizadas para lograr la pasteurización deberían tener en cuenta propiedades del producto como el contenido de grasas, la materia

seca o los sólidos totales, por la posible repercusión que pudieran tener sobre la resistencia térmica de los microorganismos patógenos objeto de interés.

En uno de los estudios más recientes (Huertas et al., 2015) se establecieron tratamientos de 58 °C /2,99 minutos o 62 °C/0,17 minutos para conseguir una reducción de 5 logaritmos de una cepa de *Cronobacter sakazakii* especialmente tolerante al estrés.

Asimismo, el tratamiento térmico aplicado en el proceso de fabricación de PPL se considera suficiente para la inactivación de otros microorganismos patógenos vegetativos como *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* o *Staphylococcus aureus*, mientras que los patógenos esporulados como *Bacillus cereus* y *Clostridium botulinum*, se inactivan en parte, dependiendo de las condiciones de elaboración (FAO/OMS, 2004a).

Considerando que los procesos de pasteurización utilizados en el proceso de fabricación mediante la mezcla en húmedo son de magnitud suficiente para eliminar los patógenos, la contaminación del producto con *Cronobacter* o *Salmonella* en este tipo de proceso se debe a una nueva contaminación posterior al tratamiento térmico (FAO/OMS, 2004a).

5.2.1.2 Ingredientes añadidos durante el proceso de fabricación

En el proceso de mezcla en seco, los ingredientes preparados por separado se mezclan en seco hasta conseguir la formulación del producto, y en el proceso combinado, algunos de los ingredientes se incorporan a la mezcla líquida y se someten al proceso térmico de pasteurización, mientras que otros ingredientes como las vitaminas, minerales o hidratos de carbono, se añaden después del tratamiento térmico, en la fase de mezclado.

En ambos casos el fabricante no puede garantizar la inactivación microbiana en los ingredientes añadidos, los cuales se convierten en una fuente potencial de contaminación del producto. *Cronobacter* se ha aislado de diferentes ingredientes tales como leche desnatada en polvo, lactosa, lecitina, pero es el almidón el que presenta la mayor tasa de prevalencia (FAO/OMS, 2004a).

En estos casos, la seguridad del producto final depende del cumplimiento riguroso por parte de los proveedores, de las normas de higiene y seguridad alimentarias necesarias para garantizar que los ingredientes cumplan los mismos requisitos microbiológicos exigidos a los preparados en polvo ya terminados.

5.2.1.3 Entorno de elaboración durante el secado o envasado

Tras el tratamiento térmico el principal factor de riesgo de contaminación se refiere al entorno de elaboración durante las fases en seco del proceso (secado y envasado). Durante el proceso de secado, la mezcla líquida se seca de manera casi instantánea en el aire caliente, el polvo resultante se enfría, tamiza y transporta a silos de almacenamiento o directamente a las operaciones de envasado. Todo este proceso constituye un factor de riesgo de contaminación, especialmente en el caso de los patógenos más ubicuos como *Cronobacter*.

Aunque todavía se desconoce el reservorio habitual de *Cronobacter*, el hecho de haber sido aislado de una gran variedad de ambientes (alimentos, instalaciones de producción de leche en polvo y en otras plantas de producción de alimentos y hogares) refleja su carácter ubicuo.

Diversos estudios ponen de manifiesto el riesgo de recontaminación con *Cronobacter* a partir del entorno de elaboración. En un estudio llevado a cabo por Reich et al. (2010) se analizaron un total de 867 muestras obtenidas de 12 localizaciones diferentes de una planta de procesado de PPL, detectándose *Cronobacter* en 33 muestras de polvo recogidas en instalaciones implicadas en el proceso de secado hasta el envasado; por el contrario las 175 muestras de superficies analizadas dieron resultados negativos. No obstante, en todas las muestras analizadas se encontraron *Enterobacteriaceae* con <100 ufc/g excepto en siete localizaciones que mostraron recuentos >500 ufc/g, coincidiendo en cinco de ellas con resultado positivo a *Cronobacter*.

Otros estudios advierten de la importancia que tiene la correcta instalación y mantenimiento de los filtros de aire (Mullane et al., 2008), o la limpieza y desinfección de las partes externas del equipo y el entorno que circunda las líneas de procesado (Craven et al., 2010), para reducir la diseminación de *Cronobacter* y otros peligros biológicos en el entorno de producción de los PPL.

La capacidad de osmotolerancia que presenta *Cronobacter* puede estar relacionada con su persistencia en el ambiente y con el riesgo de contaminación postelaboración de los preparados para lactantes (FAO/OMS, 2004a).

Otro de los aspectos que debe recibir especial atención es el hecho de que *Cronobacter* y otras enterobacterias son microorganismos que pueden sobrevivir adheridos sobre las superficies internas del equipo que está en contacto directo con el producto, lo que aumenta el riesgo de recontaminación tras la aplicación del tratamiento térmico de inactivación.

Por otra parte, *C. sakazakii* también ha sido aislada del tracto intestinal de la mosca *Stomoxys calcitrans*, que tiene una distribución mundial (Hamilton et al., 2003) (Mramba et al., 2006) y de la mosca de la fruta mexicana *Anastrepha ludens* (Kuzina et al., 2001), estos hallazgos convierten a los insectos en una fuente secundaria de contaminación y su presencia en el entorno de fabricación en un factor de riesgo adicional.

La prevención de la contaminación intrínseca se centra en los siguientes aspectos:

1. Tratamiento térmico de pasteurización para reducir las formas vegetativas de patógenos hasta un nivel en el que no son una amenaza para la salud.
2. Control de la calidad microbiológica de las materias primas incorporadas al producto tras la pasteurización, mediante una selección cuidadosa de los ingredientes, la realización de inspecciones para evaluar los procesos de los proveedores, el control y la vigilancia de los procedimientos y las evaluaciones periódicas de los ingredientes adquiridos.
3. Programas de vigilancia medioambiental para reducir los niveles de enterobacterias en el entorno y ambiente de proceso (equipos y líneas de procesado).
4. Etiquetado de los preparados en polvo para lactantes que incluya la información de que no son productos estériles.

5.2.2 Contaminación extrínseca

La contaminación extrínseca es la que se produce por malas prácticas higiénicas en la manipulación, preparación o administración de los PPL tanto en el entorno doméstico como hospitalario.

En este caso los factores de riesgo se pueden dividir en tres grupos: 1) factores asociados a la

contaminación del producto; 2) factores asociados a la supervivencia de patógenos en el producto en polvo; y 3) factores asociados a la proliferación de patógenos en el producto en polvo rehidratado.

5.2.2.1 Factores de riesgo asociados a la contaminación de la leche

En el entorno doméstico los principales factores de riesgo que propician la contaminación del producto una vez abierto el envase son los materiales utilizados en la preparación y administración de la leche, el agua utilizada para la rehidratación y el personal implicado en la preparación.

Biberón y materiales utilizados en la preparación

Cronobacter se ha aislado de diferentes utensilios, mezcladores y cucharas utilizados para la preparación de fórmulas para lactantes (FAO/OMS, 2004a), así como del entorno de preparación del biberón en el hogar (Kandhai et al., 2004).

Como se ha indicado previamente algunas bacterias patógenas tienen gran facilidad para formar biopelículas haciéndose más resistentes a la inactivación por agentes físicos (temperatura y desecación) y químicos (detergentes y desinfectantes) (Beuchat et al., 2009). Se ha demostrado experimentalmente la capacidad de *Cronobacter* de adherirse a materiales inertes usados habitualmente en la preparación de alimentos para lactantes, tales como silicona, látex, policarbonato, acero inoxidable, vidrio o cloruro de polivinilo (Iversen et al., 2004) (Hurrell et al., 2009).

Asimismo, se ha observado que la formación de biopelículas se ve favorecida por la disponibilidad de nutrientes en el medio, y que la temperatura puede jugar un papel importante siendo estimulada a 25 °C e inhibida a 12 °C, aún en presencia de nutrientes (Kim et al., 2007) (Beuchat et al., 2009). Otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* como *Salmonella* y *Escherichia coli* también se asocian con la formación de biopelículas sobre superficies inertes (Zogaj et al., 2003).

De esta manera las bacterias patógenas persisten en la superficie de los materiales utilizados en la preparación de la leche o en el propio biberón, convirtiéndose en fuente de contaminación cruzada aunque no se aprecien restos de leche.

En un estudio de evaluación microbiológica en la preparación de PPL en medio hospitalario en Francia (Tudela et al., 2008) se detectaron especies de *Bacillus* en el 54 % de preparados para prematuros y en el 19 % de otros tipos, así como la presencia en dos muestras de estafilococos coagulasa negativo y en otra *Clostridium bif fermentans*. Además en el 4,3 % de las superficies analizadas se encontraron microorganismos como *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bulkkholderia cepacia* y *Staphylococcus aureus*.

Estos resultados ponen de manifiesto la gran importancia que tiene la limpieza exhaustiva de materiales en contacto con el producto, como medida preventiva para impedir el desarrollo de biopelículas y evitar su persistencia en el entorno de preparación de la leche.

Por otra parte está demostrado que los alimentos crudos tanto de origen animal como vegetal son reservorio de patógenos como *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* o *Staphylococcus aureus*. También *Cronobacter* se ha aislado de diversos alimentos de origen animal y vegetal como carne, queso, hierbas y especias

y ensaladas listas para el consumo entre otros (Holy y Forsythe, 2014). En consecuencia los alimentos deben ser considerados fuentes potenciales de contaminación cruzada en el entorno de manipulación del preparado en polvo en el hogar, bien a través de las manos del personal y superficies o mediante utensilios o trapos de cocina.

La evaluación del riesgo elaborada por la FAO/OMS (2004a) estimó una reducción del riesgo relativo de infección por *Cronobacter* de 1,2 veces atribuible a la mejora de la higiene en el entorno de preparación de las fórmulas en polvo.

La OMS (2007) recomienda la esterilización del biberón y de todos los materiales utilizados en su preparación después de su uso, mediante un esterilizador comercial (siguiendo las instrucciones del fabricante), olla a presión o agua hirviendo. Antes del proceso de esterilización todo el material debe lavarse con agua jabonosa caliente y se utilizará un cepillo especial y específico para retirar los restos de leche de los biberones y tetinas. Asimismo, se deben utilizar trapos de cocina limpios y mantener limpias las superficies que se vaya a utilizar en la preparación.

Agua de reconstitución

La preparación de PPL para el consumo requiere la reconstitución del preparado mediante la adición de agua y posterior agitación hasta obtener una mezcla homogénea.

La OMS (2008) en “Las guías para la calidad del agua potable” establece que el agua de consumo (agua potable), no ocasiona ningún riesgo significativo para la salud cuando se consume durante toda una vida, teniendo en cuenta las diferentes vulnerabilidades que pueden presentar las personas en las distintas etapas de su vida. No obstante, una consecuencia de la diversa vulnerabilidad de las personas a los agentes patógenos es que la exposición a agua de consumo de una calidad particular puede producir efectos sobre la salud diferentes en poblaciones diferentes. Por ello, en el caso de lactantes y niños de corta de edad y debido a su sensibilidad a microorganismos cuya presencia en el agua de consumo normalmente no sería preocupante, se deban tomar precauciones adicionales.

Los principales riesgos microbianos asociados al agua de consumo se refieren a patógenos fecales (bacterias, virus, protozoos y helmintos). La destrucción de estos agentes mediante un proceso de desinfección es incuestionable para el suministro de agua potable, sin embargo, la desinfección química habitual mediante productos como el cloro, no garantiza la seguridad del agua, habida cuenta de su limitada eficacia frente a protozoos patógenos y frente a algunos virus. Las condiciones normales de cloración reducen un 99,9 % el riesgo de infección por *Escherichia coli*, Rotavirus, hepatitis A y poliovirus tipo 1. Sin embargo la dosis debe ser 150 veces superior para inactivar los quistes de *Giardia* y 7×10^6 veces superior para inactivar los ooquistes de *Cryptosporidium* (OMS, 1996).

Por esta razón la verificación de la calidad microbiológica del agua medida como ausencia de indicadores de contaminación fecal (*Escherichia coli*) no implica necesariamente que no haya presencia de estos patógenos.

En un estudio llevado a cabo en España (Castro-Hermida et al., 2015) se informa de la detección de parásitos en agua de bebida de la región de Galicia, *Cryptosporidium* spp. en el 40,1 % y *Giardia*

duodenalis en el 33,8 % de las muestras analizadas por PCR. Asimismo ambos parásitos se han detectado en agua de suministro de la ciudad de Sao Paulo en Brasil, en concentraciones que varían de 0,1 a 97 quistes/l de *Giardia* en el 49,5 %, y entre 0,1 y 6 ooquistes/l de *Cryptosporidium* en el 9,2 % de las muestras de agua analizadas (Sato et al., 2013).

Llama también la atención el incremento de casos de criptosporidiosis notificados en 2012 en el Reino Unido, Holanda y Alemania. Aunque no se han determinado las causas, se baraja la contaminación de agua embotellada como uno de los factores implicados (ECDC, 2012).

No existe evidencia de que *Cronobacter* sea transmitida a través del agua de consumo, aunque es posible que pudiera estar presente en agua con calidad deficiente. En una revisión recientemente publicada (Holy y Forsythe, 2014) se destaca la importancia que puede tener el agua como vehículo de transmisión de *Cronobacter* y la falta de atención sobre este posible reservorio del patógeno. No obstante, el patógeno es sensible a los desinfectantes y su presencia puede ser evitada con un tratamiento adecuado de desinfección.

Desde el punto de vista toxicológico, el agua embotellada es apta para la preparación de biberones, pero ello no es sinónimo a asegurar que ésta sea estéril y por tanto libre de microorganismos.

Algunas investigaciones llevadas a cabo para comparar la calidad microbiológica del agua de suministro y agua mineral embotellada indican que el empleo de agua embotellada no supone una mayor garantía para la inocuidad de la leche reconstituida, a no ser que se trate de agua esterilizada (Zamberlan da Silva et al., 2008). Varga (2011) investigó la calidad microbiológica de 246 muestras de agua mineral embotellada no carbonatada procedente de Austria, Croacia, Francia, Alemania e Italia y encontraron coliformes en el 9,3 %, *Escherichia coli* en el 2,8 %, *Enterococcus* spp. en el 0,8 % y *Pseudomonas aeruginosa* en el 2,4 %; por el contrario todas las muestras dieron resultados negativos para anaerobios sulfito reductores. También destacan la obtención de recuentos superiores a 100 ufc/ml de microorganismos a 22 y a 37 °C en el 24 y 20 % de las muestras, respectivamente.

Según el CDC (1995), la ebullición del agua para la preparación de la leche en polvo durante un minuto aseguraría la inactivación de protozoos, bacterias y virus. En este mismo sentido, la OMS recomienda hervir el agua durante 1 minuto (desde que empieza a hervir en la superficie) y añadir 1 minuto por cada 1 000 metros por encima del nivel del mar.

Por todo lo expuesto anteriormente, es conveniente incluir la práctica de ebullición tanto del agua de grifo como del agua envasada, que se vaya a utilizar en la reconstitución de los PPL. Se trata de una medida adicional para asegurar la destrucción de la microbiota no patógena que pueda estar presente en el agua, que normalmente no sería preocupante, pero que podría suponer un problema en el caso de lactante debido a su menor capacidad inmune.

Personal

Los manipuladores de alimentos pueden ser portadores de *Cronobacter*, *Salmonella* y otros patógenos, de forma que al manipular los alimentos, sin tener en cuenta unas buenas prácticas de higiene, se pueden contaminar los alimentos.

En un estudio llevado a cabo en Holanda en el periodo 2001 a 2005 para determinar los posibles reservorios de *Cronobacter*, se aisló el patógeno en una de 98 muestras de heces y en una de 116 muestras de piel de personal manipulador, estos resultados apuntan la posibilidad de que el personal puede constituir una fuente potencial de contaminación de la leche en polvo durante su manipulación (Kandhai et al., 2010).

Asimismo, las personas infectadas o portadoras asintomáticas de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* o *Shigella*, infectadas por norovirus o por otros virus como el virus de la hepatitis A incluso durante el período de incubación, constituyen un factor de riesgo especialmente en el caso de manipulación de alimentos que no se someten a tratamiento térmico previo al consumo y destinados a población de riesgo como los lactantes.

5.2.2.2 Factores de riesgo asociados a la supervivencia de agentes patógenos en PPL

Tanto *Cronobacter* como *Salmonella* tienen la capacidad de sobrevivir en alimentos secos durante largos periodos de tiempo permaneciendo en estado latente y recuperando la capacidad de crecer cuando las condiciones ambientales son favorables.

Cronobacter ha demostrado tener una mayor tolerancia a la desecación en comparación con otras enterobacterias tales como *Escherichia coli* y *Salmonella* (Breeuwer et al., 2003). Esta tolerancia a la desecación está bien documentada en la bibliografía científica, hay evidencia de que puede sobrevivir en leche para lactantes con actividad de agua entre 0,25 y 0,5 (Strydom et al., 2012) (Huertas et al., 2015) y se ha demostrado que puede mantenerse en los PPL hasta 2,5 años (Barron et al., 2007). Por otra parte, *Cronobacter* ha demostrado tener una resistencia significativa a pH ácidos (FAO/OMS, 2004a, 2006).

Una vez reconocida la resistencia de estos patógenos a la desecación y su viabilidad en el producto en polvo durante largo periodo de tiempo, el interés para su control se centra en la posibilidad de inactivación durante el proceso de reconstitución de la leche y en impedir su multiplicación en el producto reconstituido.

De acuerdo con la evaluación de riesgo elaborada por FAO/OMS (2004a), los dos factores que darían lugar a la mayor reducción del riesgo asociado con *Salmonella* y *Cronobacter* son la duración del tiempo de consumo y la inclusión de un tratamiento bactericida en el momento de la rehidratación.

A continuación se exponen los principales factores de riesgo relacionados con la capacidad de supervivencia de patógenos en la preparación en polvo y en el producto rehidratado.

Condiciones de conservación del producto en polvo

Beuchat et al. (2009) observaron que la capacidad de *Cronobacter* de sobrevivir en leche en polvo para lactantes, era mayor cuanto menor era la disponibilidad de agua libre en el medio y cuanto menor era la temperatura de conservación (30, 21 y 4 °C). Por el contrario no encontraron diferencias en la capacidad de supervivencia en función de la composición del PPL.

Aunque se ha demostrado experimentalmente la disminución de *Cronobacter* durante la vida útil de la leche en polvo para lactantes, ésta es muy lenta (0,001 log₁₀ ufc por día) y no implica una reducción significativa del riesgo relativo (FAO/OMS, 2006).

Por otra parte, no parece probable que el contenido de humedad que pudieran alcanzar los preparados en polvo después de abiertos, durante el almacenamiento, aumente lo suficiente para favorecer el crecimiento de los patógenos que hubieran contaminado el producto (FAO/OMS, 2004a). No obstante, se recomienda que el producto en polvo se mantenga bien cerrado, en ambiente seco, con humedad relativa inferior a 70 %, a una temperatura inferior a 20 °C y durante un tiempo máximo de 1 mes (Vargas-Leguás et al., 2009).

Temperatura del agua de reconstitución

La temperatura del agua que se añade para la rehidratación de los PPL puede jugar un papel importante en el control del riesgo asociado a *Cronobacter*, y son muchos los estudios que relacionan este factor con el riesgo de supervivencia del patógeno y su posterior proliferación en la leche reconstituida.

Aunque las especies del género *Cronobacter* han sido consideradas más termotolerantes que otras enterobacterias (Nazarowec-White y Farber, 1997b), la mayoría de los estudios de resistencia térmica muestran en general valores D relativamente bajos (a 58 °C): 0,27-0,5 minutos (Breeuwer et al., 2003); 2,6 minutos (Iversen et al., 2004); 4,2 minutos (Nazarowec-White y Farber, 1997b) y 9,9 minutos en el caso de una cepa especialmente resistente al calor (Edelson-Mammel y Buchanan, 2004). Estas diferencias pueden ser debidas a la influencia de la cepa. Se ha demostrado en PPL reconstituidos a 56-70 °C, que la resistencia térmica de 12 cepas distintas de *Cronobacter* puede variar hasta 20 veces (Edelson-Mammel y Buchanan, 2004), llegándose a la conclusión de que existen dos tipos distintos de fenotipos de resistencia al calor (FAO/OMS, 2004a). A 70 °C el valor D estimado para *Cronobacter* en los PPL es de 0,07 minutos (Edelson-Mammel y Buchanan, 2004).

La bibliografía científica recoge diversos estudios dirigidos a conocer los factores que pueden influir en la resistencia térmica de *Cronobacter* en el proceso de rehidratación. En general, los resultados obtenidos demostraron que 1) el almacenamiento prolongado del PPL incrementaba la susceptibilidad del patógeno al calor durante el proceso de rehidratación con agua caliente (Osaili et al., 2008); 2) el choque térmico a temperaturas inferiores a 47 °C durante 15 minutos mejoraron la tolerancia térmica (Chang et al., 2009); y 3) las células en fase estacionaria mantenidas entre 20 y 37 °C (D60=0,9 min) resultaron ser más resistentes que las mantenidas a 10 °C (D60=0,2 min) y además la resistencia térmica aumentaba a pH neutro y contenido bajo de agua libre (Shaker et al., 2007) (Arroyo et al., 2009).

Otros estudios se han centrado en estudiar la supervivencia de *Cronobacter* en la leche reconstituida en función de la temperatura del agua añadida. Osaili et al. (2008, 2009) obtuvieron una reducción de 5,3 log₁₀ con agua a 70 °C y de 6 log₁₀ cuando se añadía agua caliente a 80-100 °C. Resultados similares son aportados por Edelson-Mammel y Buchanan (2004) con reducciones de 1 y ≥4 log₁₀ con agua a 60 y 70 °C, respectivamente. Otros estudios recientes ponen de evidencia que si bien la reconstitución de la leche con agua a 70 °C supone una reducción significativa de la población de *Cronobacter*, los microorganismos que sobreviven pueden multiplicarse hasta 1,57x10³ ufc/ml después de 24 horas a temperatura ambiente (Huertas et al., 2015).

También es posible que el agua caliente (70 °C) pueda activar esporas de bacterias patógenas presentes en la preparación, las cuales podrán multiplicarse si se mantienen las tomas preparadas por encima de la temperatura de refrigeración durante periodos prolongados de tiempo (OMS, 2007).

La evaluación del riesgo llevada a cabo por la FAO/OMS (2004a) estima una reducción del riesgo relativo por *Cronobacter* de 10 000 veces cuando se aplica un tratamiento capaz de reducir 4 ciclos logarítmicos su población inicial. Por el contrario, en términos de riesgo, la rehidratación con agua a 40-50 °C constituye el peor escenario comparado con temperaturas del agua inferiores a 40 °C (FAO/OMS, 2006).

Aun considerando la existencia de cepas de *Cronobacter* con una mayor termotolerancia que la mayoría de las enterobacterias (Edelson-Mammel y Buchanan, 2004), la FAO/OMS (2004a, 2006) concluyó que la inactivación de *Cronobacter* puede lograrse en poco tiempo con temperaturas superiores a 70 °C y recomienda la rehidratación con agua a 70 °C para reducir el riesgo de infección en lactantes (OMS, 2007).

5.2.2.3 Factores de riesgo asociados a la proliferación de patógenos

Como se ha expuesto anteriormente, *Cronobacter* sobrevive en el producto en polvo durante largos periodos de tiempo y una vez reconstituido el producto, incluso a 70 °C, puede multiplicarse fácilmente dependiendo de la temperatura del medio (Huertas et al., 2015).

Iversen y Forsythe (2003) señalaron que *Cronobacter* puede crecer a temperaturas entre 6-47 °C, con una temperatura óptima de crecimiento de 39 °C; sin embargo, algunas cepas se inhiben a temperaturas superiores a 44 °C (Nazarowec-White y Farber, 1997a) (Iversen et al., 2004) y otras son capaces de crecer a 5 °C (Nazarowec-White y Farber, 1997b). A 4 °C tanto *Cronobacter* como otras enterobacterias patógenas permanecen inactivos.

La capacidad de crecimiento es también mayor a pH 7,2 mientras que se inhibe ligeramente a pH 11,0 (Fu et al., 2011). La resistencia de *Cronobacter* al estrés osmótico se refleja en la capacidad de crecer a una actividad de agua de 0,94.

A continuación se señalan los principales factores de riesgo relacionados con la proliferación de patógenos en la leche rehidratada.

Enfriamiento del producto reconstituido

El trabajo de Huertas et al. (2015) pone de manifiesto algunos factores de riesgo relacionados con la proliferación de *Cronobacter* en los PPL reconstituidos hasta el momento del consumo. Evaluaron el efecto del proceso de enfriamiento del preparado rehidratado con agua a 70 °C hasta alcanzar la temperatura óptima de 37 °C para su administración al lactante. Partiendo de una concentración inicial de 1,4 log₁₀ ufc/ml, comprobaron que después de 24 horas a temperatura ambiente, la leche sometida a un proceso lento de enfriamiento con agua del grifo presentaba recuentos más bajos (2,82 log₁₀ ufc/ml) que la leche sometida a un proceso rápido con agua refrigerada (5,39 log₁₀ ufc/ml). Estos resultados demuestran que el proceso de enfriamiento de la leche reconstituida con agua caliente a 70 °C puede tener un impacto importante en la supervivencia y posterior crecimiento

de *Cronobacter* y que para disminuir el riesgo de infección es más recomendable la práctica de enfriamiento con agua del grifo hasta alcanzar la temperatura óptima para la administración, de aproximadamente 37 °C.

Tiempo de espera y conservación del producto reconstituido entre la preparación y la administración al lactante

Beuchat et al. (2009) estudiaron las condiciones de crecimiento de *Cronobacter* en PPL reconstituidos y no detectaron crecimiento cuando la leche era mantenida a 4 °C aunque el patógeno permanecía viable 72 horas después de la rehidratación. Por el contrario, dependiendo de la concentración inicial de inóculo, se alcanzaban o superaban valores de $1 \log_{10}$ ufc/ml cuando se mantenía a 12, 21 y 30 °C durante 48, 12 y 8 horas, respectivamente, independientemente del PPL.

Iversen et al. (2004) estudiaron la tasa de crecimiento de *Cronobacter* en PPL reconstituidos y comprobaron que los tiempos de generación a 6, 21 y 37 °C se correspondían con 13,7 horas, 1,7 horas y 19-21 minutos, respectivamente; estos resultados demuestran la capacidad de *Cronobacter* de crecer rápidamente si el producto se mantiene a temperatura ambiente.

Rosset et al. (2009) identificaron diversos factores de riesgo de crecimiento de *Cronobacter* en biberones preparados en medio hospitalario, entre ellos la temperatura inicial de la leche, la temperatura y tiempo de mantenimiento del biberón hasta su administración y la temperatura de recalentamiento, concluyendo que el riesgo de infección era consecuencia de la combinación de más de un factor de riesgo.

La evaluación del riesgo llevada a cabo por la FAO/OMS (2004a) estima una reducción del riesgo relativo por *Cronobacter* de 30 veces si se administra dentro de las 2 horas siguientes a la preparación, por el contrario el riesgo aumenta 30 veces después de 6 horas, 1 000 veces después de 8 horas y 30 000 si el tiempo se extiende a 10 horas.

También se ha estudiado el crecimiento de otros patógenos como *Bacillus cereus* en muestras de leche en polvo reconstituida, inoculadas experimentalmente, observándose que la leche refrigerada a 7 °C durante 24 horas mantiene el mismo nivel de concentración de *Bacillus cereus* que presentaba al inicio, mientras que después de 6 horas a 31 °C o de 12 horas a 25 °C se alcanzan niveles que se corresponden con riesgo de intoxicación alimentaria (Rodríguez Máuriz et al., 1996).

De acuerdo con la información disponible la mayoría de organismos de Salud Pública establecen medidas de control basadas en el mantenimiento de los PPL rehidratados en ambiente refrigerado a temperaturas inferiores a 5 °C durante un tiempo máximo de 24 horas, así como en desechar todo el producto que haya permanecido a temperatura ambiente o superior durante más de 2 horas.

Recalentamiento del preparado rehidratado

De acuerdo con la evaluación de riesgo elaborada por la FAO/OMS (2006), el recalentamiento de los PPL rehidratados a 37 °C se presenta como un factor que incrementa el riesgo de *Cronobacter* independientemente de la temperatura de rehidratación aplicada, excepto si se aplican temperaturas de 70 °C.

5.3 Medidas de higiene para minimizar los riesgos microbiológicos asociados a la preparación de PPL

La OMS y la FAO elaboraron en 2007 unas directrices sobre la preparación segura de los biberones. Estas directrices constituyeron la base del Código de prácticas de higiene para los preparados en polvo para lactantes y niños de corta edad (CAC/RCP 66-2008) publicado con el objetivo de proporcionar una orientación práctica y recomendaciones sobre la fabricación higiénica de los PPL y sobre la ulterior preparación, manipulación y uso higiénico del producto reconstituido.

Asimismo, diversos organismos y autoridades de salud pública han publicado recomendaciones para la manipulación segura de PPL (EFSA, 2004) (BDA, 2007) (FSAI, 2012) (NHS, 2012) (Health Canada, 2012) (ACSA, 2013) (FSA, 2006, 2010, 2013) (ANSES, 2013) (BSNA, 2013) (FDA, 2014).

A continuación se recopilan las normas de higiene recomendadas para reducir el riesgo de infección por *Cronobacter* y *Salmonella*, asociado a la manipulación, preparación y administración de PPL, entendiendo que en general son también aplicables al control de otros riesgos microbiológicos asociados a estos productos:

5.3.1 Medidas sobre el uso de preparados líquidos estériles o sometidos a descontaminación

Se debe utilizar, siempre que sea posible y viable, preparados líquidos estériles desde el punto de vista comercial, o preparados que se hayan sometido a un procedimiento eficaz de descontaminación en el lugar donde se utilicen, especialmente si van destinados a lactantes con alto riesgo.

5.3.2 Medidas en la conservación del producto en polvo

- Mantener el producto en polvo bien cerrado en ambiente seco y durante un tiempo máximo de 1 mes.
- Desechar todo producto mantenido en condiciones inadecuadas.

5.3.3 Medidas antes de la preparación del biberón

- Lavado de las manos antes de iniciar la manipulación del producto en polvo.
- Ninguna persona que presente un cuadro de diarrea o gastroenteritis debe preparar el biberón.
- Utilizar trapos limpios y limpiar las superficies de trabajo antes de ser utilizadas en la preparación del biberón. Estas prácticas previenen la contaminación cruzada con alimentos crudos u otros materiales contaminados.
- Todo el material utilizado en contacto con el preparado en polvo o rehidratado, tales como biberones, tetinas, cucharas, escobillas se debe limpiar con agua jabonosa caliente. Es necesario además utilizar escobillas especiales para eliminar los restos de leche, ya que los patógenos de mayor riesgo son capaces de producir biopelículas en las paredes de vidrio, plástico y tetinas.
- Desinfección de los utensilios y biberones antes de utilizarlos en la preparación. Esta práctica garantiza la eliminación de patógenos en las superficies en contacto con la leche y previene la contaminación cruzada siempre y cuando se mantengan protegidos de la contaminación ambiental y se manipulen en condiciones higiénicas.

5.3.4 Medidas en la reconstitución del preparado en polvo

- Tapar el recipiente que contenga el PPL inmediatamente después de su uso.
- Durante el proceso de preparación las tapas del recipiente de la leche en polvo y las cucharas se deben mantener sobre superficies limpias.
- El agua utilizada para la reconstitución de la leche debe ser agua potable y se debe hervir durante 1 minuto. Si se utiliza agua embotellada, se recomienda seguir el mismo procedimiento. Tanto el agua de la red como cualquier agua embotellada que cumplan los criterios normativos son aptas para la preparación de alimentos infantiles (AECOSAN, 2014b).
- Reconstituir el preparado en polvo con agua potable a una temperatura de 70 °C. Se recomienda usarla dentro de los 30 minutos después de hervida. El agua caliente disminuirá el número de células vegetativas patógenas potencialmente presentes.
- Enfriar el biberón bien cerrado mediante agua fría del grifo y evitando que el agua entre en la tetina.
- Evitar el uso del microondas, porque la distribución de la temperatura no es uniforme.
- Cuando no conviene o no es posible disponer de agua caliente se recomienda rehidratar el preparado en polvo con agua a 20 °C, agitar, administrarlo inmediatamente y eliminar el sobrante después de 2 horas desde su preparación.

5.3.5 Medidas en la administración y conservación del producto reconstituido

- Reducir el tiempo que media entre la preparación del preparado deshidratado lácteo y su administración. Se recomienda la preparación y consumo de manera inmediata, para impedir la posible multiplicación del microorganismo.
- El preparado reconstituido no se debe mantener a temperatura ambiente durante más de 2 horas, aunque se haya utilizado agua a temperatura no inferior a 70 °C en su preparación.
- Si no es posible el consumo inmediato es necesario mantener el preparado recién reconstituido en envases y volúmenes que permitan un enfriamiento rápido y mantenerlo a temperaturas inferiores a 5 °C durante un tiempo máximo de 24 horas.
- Después de la refrigeración se puede calentar el biberón durante un máximo de 15 minutos en un recipiente con agua caliente y desechar el sobrante recalentado que no se haya consumido en un plazo de 2 horas.
- No utilizar en ningún caso calienta biberones durante un tiempo prolongado, ya que mantiene la leche en condiciones que favorecen el crecimiento de microorganismos patógenos.
- En situaciones fuera del hogar, se recomienda no reconstituir la leche hasta el momento de la toma a no ser que se pueda garantizar el mantenimiento a temperaturas inferiores a 5 °C durante un tiempo máximo de 2 horas.

6. Riesgos microbiológicos asociados al consumo de alimentos triturados y sólidos

En la Unión Europea, los alimentos elaborados a base de cereales y los alimentos infantiles triturados para niños de corta edad están sujetos a estrictos controles. Se trata de alimentos seguros desde el punto de vista microbiológico, siempre que se respeten las Buenas Prácticas y los siste-

mas de aseguramiento de la calidad durante la producción que garanticen el cumplimiento de los requisitos microbiológicos exigidos por la legislación.

Los alimentos triturados preparados en casa pueden suponer un riesgo mucho mayor debido a factores como la mezcla de ingredientes (carnes, vegetales, frutas) el proceso de triturado, así como sus características intrínsecas (actividad de agua, pH, contenido en nutrientes) que los convierte en un medio de cultivo excelente para los microorganismos, y la alta manipulación que conlleva su preparación y conservación.

Existen numerosos documentos sobre las principales medidas higiénicas para prevenir los riesgos microbiológicos durante la preparación, almacenamiento y consumo de este tipo de alimentos.

A manera de conclusión, se sintetizan las principales medidas higiénicas (Scott, 2000) (Sockett et al., 2001) (Moore, 2008) (OMS, 2009) (Smith, 2011) (AAP, 2014) (AECOSAN, 2014a) (FDA, 2015):

6.1 Para productos comerciales

- Asegurar que el tarro está herméticamente cerrado y con el sello intacto. Cuando existe, verificar que el botón de seguridad que se encuentra en la tapa de los frascos esté hacia abajo. No usar el producto si dicho botón no salta al abrir el frasco. Descartar cualquier tarro que se observe alterado, agrietado, abombado o con la tapa oxidada.
- Seguir estrictamente las instrucciones del fabricante sobre conservación y administración del producto.
- Respetar estrictamente la fecha de consumo preferente indicada en la etiqueta.
- Si se alimenta al niño directamente del tarro no se debe guardar lo sobrante en el refrigerador. Es mejor disponer la ración habitual en un plato y refrigerar el alimento que haya quedado en el tarro. El alimento sobrante en el plato debe desecharse.
- Una vez abierto el tarro y calentado el alimento, no se debe dejar a temperatura ambiente durante más de 2 horas.

6.2 Para alimentos triturados preparados en casa y alimentos sólidos

Normas generales de higiene durante la preparación y conservación

- Utilizar agua potable tanto en la preparación de los alimentos como en la limpieza de utensilios y en el lavado de las manos.
- Lavarse las manos con jabón y agua caliente, al menos durante 20 segundos, con frecuencia, siempre antes y después de manipular los alimentos, tras contactar con cualquier material sucio (residuos, animales), y especialmente después de usar el cuarto de baño y tras cualquier contacto con material contaminado con heces (pañales, cambiador, ropa interior...).
- Ninguna persona que presente un cuadro de diarrea o gastroenteritis debe preparar estos alimentos.
- Utilizar detergente y agua caliente para lavar licuadoras, picadoras o batidoras y cualquier otro utensilio que entren en contacto con los alimentos. Enjuagar bien con agua caliente después de lavarlos.
- Evitar la contaminación cruzada, utilizando distintos utensilios para los alimentos crudos y co-

cinados. Los alimentos cocinados deben guardarse en el refrigerador en un compartimento aparte, separados de crudos.

- Lavar minuciosamente frutas y vegetales frescos con agua corriente limpia incluso si se van a pelar. Este proceso no se realizará en el momento previo a la conservación, sino inmediatamente antes de que se vayan a consumir.
- Lavar y secar la fruta antes de preparar zumos naturales.
- Almacenar las carnes crudas, carnes de aves de corral, pescados y los productos lácteos en la parte más fría del refrigerador inmediatamente después de comprarlos.
- Cocinar los alimentos, especialmente carne y pescado, asegurando que se alcanza la temperatura adecuada en toda la pieza para destruir los microorganismos presentes: se deben alcanzar 71 °C al menos durante 1 minuto (hasta que la carne cambie de color en el centro del producto).
- Debe asegurarse que el refrigerador mantiene la temperatura correcta (inferior a 5 °C).
- El recalentamiento de las comidas conservadas en frío se debe realizar por procedimientos que garanticen que se alcancen temperaturas superiores a 65-70 °C en menos de 1 hora. Además debe realizarse con la menor antelación posible al consumo.
- Deben descartarse los alimentos sobrantes recalentados.

En el caso de alimentos triturados, se extremarán estas medidas de higiene. Algunas medidas específicas son, además:

- Para preparar alimentos triturados es mejor utilizar alimentos frescos, siempre que sea posible, pero también pueden usarse alimentos congelados, si se han descongelado adecuadamente.
- Aunque pueden usarse alimentos enlatados, hay que evitar los alimentos envasados en el hogar, o aquellos cuyo envase presente alteraciones: oxidada, abollada, hinchada, con poros, etc.
- Una vez preparados y triturados, pueden conservarse en el refrigerador, en un recipiente limpio y herméticamente cerrado, durante 24-48 horas.
- Durante el periodo de enfriamiento (desde la cocción hasta su refrigeración o congelación) se mantendrán en el recipiente en el que fueron cocinados, tapados y sin manipular. El triturado se realizará inmediatamente antes de su introducción en el refrigerador o congelador.
- Congelar los triturados en un recipiente hermético, con la ración estimada para una comida. Pueden conservarse por un máximo de 3 meses (1-2 meses para purés que contengan carne o pescado; 3-6 meses para verduras) y luego deben desecharse.
- No dejar a temperatura ambiente los alimentos durante más de 2 horas. Si se realizan desplazamientos, transportar los alimentos en una nevera con aislamiento térmico.
- No guardar nuevamente en el refrigerador el alimento no consumido.

6.3 Alimentos que pueden suponer un riesgo en la alimentación de niños de corta edad

Se debe aconsejar que los niños menores de 3 años no consuman:

- Leche cruda y derivados de leche cruda.
- Quesos de pasta blanda elaborados con leche cruda.

- Frutas y hortalizas crudas que no se hayan lavado previamente.
- Brotes crudos (alfalfa, soja...).
- Zumos sin pasteurizar, a no ser que se haya preparado en el momento, a partir de fruta previamente lavada.
- Huevos no totalmente “cuajados”. Alimentos que contengan huevo crudo, incluyendo salsas y mayonesas caseras, mousses, merengues y pasteles caseros, tiramisú, helados caseros y ponches de huevo.
- Carne cruda, carne “al punto” o poco hecha. Carne ahumada o marinada que no vaya a ser cocinada posteriormente, incluyendo salchichas tipo Frankfurt. Estos alimentos deberán ser cocinados siempre de forma adecuada.
- Moluscos bivalvos crudos. Algunos autores desaconsejan cualquier tipo de pescado crudo, ahumado refrigerado o marinado que no vaya a ser cocinado posteriormente.
- Alimentos producidos por particulares para su autoconsumo (como por ejemplo productos de un huerto propio, huevos de gallinas domésticas...).
- No se recomienda que los niños menores de 1 año consuman miel.

Referencias

- Acheson, D. y Allos, B.M. (2001). *Campylobacter jejuni* Infections: Update on Emerging Issues and Trends. *Clinical Infectious Diseases*, 32 (8), pp: 1201-1206.
- ACSA (2013). Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria. Fichas de seguridad alimentaria. La preparación de biberones. Disponible en: www.gencat.cat [acceso: 2-11-15].
- AECOSAN (2011). Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre el botulismo infantil. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 14, pp: 9-26.
- AECOSAN (2014a). Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) en relación con los riesgos microbiológicos asociados al consumo de determinados alimentos por mujeres embarazadas. *Revista del Comité Científico de la AECOSAN*, 19, pp: 11-49.
- AECOSAN (2014b). Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) sobre los criterios necesarios para poder efectuar en las aguas minerales naturales la mención “indicada para la preparación de alimentos infantiles”. *Revista del Comité Científico de la AECOSAN*, 20, pp: 11-43.
- AEP (2012). Asociación Española de Pediatría. Protocolo para la alimentación con leche materna en las escuelas infantiles. Disponible en: <http://www.aeped.es/comite-lactancia-materna/documentos/protocolo-alimentacion-con-leche-materna-en-las-escuelas-infanti> [acceso: 2-11-15].
- Al-Holy, M.A., Lin, M., Abu-Ghoush, M.M., Al-Qadiri, H.M. y Rasco, B.A. (2009). Thermal resistance survival and inactivation of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered and reconstituted infant formula. *Journal of Food Safety*, 29, pp: 287-301.
- Alain, S., Dommergues, M.A., Jacquard, A.C., Caulin, E. y Launay, O. (2012). State of the art: Could nursing mothers be vaccinated with attenuated live virus vaccine? *Vaccine*, 30, pp: 4921-4926.
- Allerberger, F., Friedrich, A.W., Grif, K., Dierich, M.P., Dornbusch, H.-R., Mache, C.J. y Zimmerhackl, L.B. (2003). Hemolytic-uremic syndrome associated with enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H infection and consumption of unpasteurized cow's milk. *International Journal of Infectious Diseases*, 7 (1), pp: 42-45.

- AAP (2012). American Academy of Pediatrics. Breastfeeding and the Use of Human Milk. *Pediatrics*, 129 (3), pp: e827-e841.
- AAP (2014). American Academy of Pediatrics, and the Center for Foodborne Illness. Young Children and Foodborne Illness.
- Anderson, P.H.R. y Stone, D.M. (1955). Staphylococcal Food Poisoning Associated with Spray-Dried Milk. *Epidemiology & Infection*, 53 (4), pp: 387-397.
- Anon (2001). Infant botulism: update. *CDR Weekly*, 11 (33), pp: 4.
- ANSES (2013). Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. Infant feeding bottles: how should they be prepared and stored? Using dried infant formula. Disponible en: www.anses.fr/en/content/infant-feeding-bottles-how-should-they-be-prepared-and-stored [acceso: 2-11-15].
- Arku, B., Mullane, N., Fox, M., Fanning, S. y Jordan, K. (2008). *Enterobacter sakazakii* survives spray drying. *International Journal of Dairy Technology*, 61, pp: 102-108.
- Arroyo, C., Condón, S. y Pagán, R. (2009). Thermobacteriological characterization of *Enterobacter sakazakii*. *International Journal of Food Microbiology*, 136, pp: 110-118.
- Asakura, H., Morita-Ishihara, T., Yamamoto, S. y Igimi, S. (2007). Genetic characterization of thermal tolerance in *Enterobacter sakazakii*. *Microbiology and Immunology*, 51, pp: 671-677.
- Asao, T., Kumeda, Y., Kawai, T., Shibata, T., Oda, H., Haruki, K. y Kozaki, S. (2003). An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiology & Infection*, 130 (1), pp: 33-40.
- Bahl, R., Frost, C., Kirkwood, B.R., Edmond, K., Martinez, J., Bhandari, N. y Arthur, P. (2005). Infant feeding patterns and risks of death and hospitalization in the first half of infancy: multicentre cohort study. *Bulletin of the World Health Organization*, 83, pp: 418-426.
- Barron, J.C. y Forsythe, S.J. (2007). Dry stress and survival time of *Enterobacter sakazakii* and other Enterobacteriaceae in dehydrated powdered infant formula. *Journal of Food Protection*, 70, pp: 2111-2117.
- BDA (2007). British Dietetic Association. Guidelines for making up special feeds for infants and children in hospital. Disponible en: www.food.gov.uk [acceso: 2-11-15].
- Becker, H., Schaller, G., von Wiese, W. y Terplan, G. (1994). *Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products. *International Journal of Food Microbiology*, 23 (1), pp: 1-15.
- Beuchat, L.R., Kim, H., Gurtler, J.B., Lin, L., Ryu J. y Richards G.M. (2009). *Cronobacter sakazakii* in foods and factors affecting its survival, growth, and inactivation. *International Journal of Food Microbiology*, 136, pp: 204-213.
- BIOHAZ (2011). Panel on Biological Hazards. European Food Safety Authority. Scientific Opinion on an update on the present knowledge on the occurrence and control of foodborne viruses. *The EFSA Journal*, 9.
- BOE (1998). Real Decreto 490/1998, de 27 de marzo, por el que se aprueba la Reglamentación técnico-sanitaria específica de los alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad. BOE Nº 83 de 7 de abril de 1998, pp: 11638-11643.
- BOE (2008). Real Decreto 867/2008, de 23 de mayo, por el que se aprueba la Reglamentación técnico-sanitaria específica de los preparados para lactantes y de los preparados de continuación. BOE Nº 31 de 30 de mayo de 2008, pp: 25121-25137.
- Bottone, E.J. (2015). *Yersinia enterocolitica*: Revisitation of an Enduring Human Pathogen. *Clinical Microbiology Newsletter*, 37 (1), pp: 1-8.
- Bowen, A.B. y Braden, C.R. (2006). Invasive *Enterobacter sakazakii* disease in infants. *Emerging Infectious Diseases*, 12, pp: 1185-1189.
- Breeuwer, P., Lardeau, A., Peterz, M. y Joosten, H.M. 2003. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. *Journal of Applied Microbiology*, 95, pp: 967-973.
- Bryan, F.L. (1992). Evaluaciones por análisis de peligros en puntos críticos de control: guía para identificar

peligros y evaluar riesgos relacionados con la preparación y la conservación de alimentos. Organización Mundial de la Salud. Ginebra.

- BSNA (2013). British Specialist Nutrition Association. Chief Medical Officer Re-States Advice on the Safe Preparation of Infant Formula. Disponible en: www.bsna.co.uk/news/91293/Chief_Medical_Officer_ReStates_Advice_on_the_Safe_Preparation_of_Infant_Formula_ [acceso: 2-11-15].
- CAC (2008). *Codex Alimentarius*. Código de prácticas de higiene para los preparados en polvo para lactantes y niños pequeños (CAC/RCP 66-2008). Disponible en: www.codexalimentarius.org [acceso: 2-11-15].
- Cahill, S.M., Wachsmuth, I.K., Costarrica, M.L. y Ben Embarek, P.K. (2008). Powdered Infant Formula as a Source of *Salmonella* Infection in Infants. *Clinical Infectious Diseases*, 46, pp: 268-273.
- Carmena, D. (2012). Current situation of Giardia infection in Spain: Implications for public health. *World Journal of Clinical Infectious Diseases*, 2 (1), pp: 1.
- Carter, M.J. (2005). Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *Journal of Applied Microbiology*, 98, pp: 1354-1380.
- Castro-Hermida, J., González-Warleta, M. y Mezo, M. (2015). *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* as pathogenic contaminants of water in Galicia, Spain: The need for safe drinking water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 218, pp: 132-138.
- Caubilla-Barron, J. Y Forsythe, S.J. (2007). Dry stress and survival time of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* in dehydrated powdered infant formula. *Journal of Food Protection*, 70, pp: 2111-2117.
- CDC (1995). Centers for Disease Control. Assessing the public health threat associated with waterborne cryptosporidiosis: Report of a Workshop. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 44 (RR-6), pp: 1-18.
- Chang, C.H., Chiang, M.L. y Chou, C.C. (2009). The effect of temperature and length of heat shock treatment on the thermal tolerance and cell leakage of *Cronobacter sakazakii* BCRC 13988. *International Journal of Food Microbiology*, 134, pp: 184-189.
- Chen, H.M., Wang, Y., Su, L.H. y Chiu, C.H. (2013). Nontyphoid *Salmonella* infection: Microbiology, clinical features, and antimicrobial therapy. *Pediatrics and Neonatology*, 54, pp: 147-152.
- Cilieborg, M.S., Boye, M. y Sangild, P.T. (2012). Bacterial colonization and gut development in preterm neonates. *Early Human Development*, 88 (1), pp: S41-49.
- Civardi, E., Garofoli, F., Tzialla, C., Paolillo, P., Bollani, L. y Stronati, M. (2013). Microorganisms in human milk: lights and shadows. *Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 26 (2), pp: 30-34.
- Collier, M.G., Khudyakov, Y.E., Selvage, D., Adams-Cameron, M., Epton, E., Cronquist, A., Jervis, R.H., Lamba, K., Kimura, A.C., Sowadsky, R., Hassan, R., Park, S.Y., Garza, E., Elliott, A.J., Rotstein, D.S., Beal, J., Kuntz, T., Lance, S.E., Dreisch, R., Wise, M.E., Nelson, N.P., Suryaprasad, A., Drobeniuc, J., Holmberg, S.D. y Xu, F. (2014). Outbreak of hepatitis A in the USA associated with frozen pomegranate arils imported from Turkey: an epidemiological case study. *The Lancet Infectious Diseases*, 14, pp: 976-981.
- Craven, H.M., McAuley, C.M., Duffy, L.L. y Fegan, N. (2010). Distribution, prevalence and persistence of *Cronobacter (enterobacter sakazakii)* in the nonprocessing and processing environments of five milk powder factories. *Journal of Applied Microbiology*, 109, pp: 1044-1052.
- Cremon, C., Stanghellini, V., Pallotti, F., Fogacci, E., Bellacosa, L., Morselli-Labate, A.M., Paccapelo, A., Di Nardo, G., Cogliandro, R.F., De Giorgio, R., Corinaldesi, R. y Barbara, G. (2014). *Salmonellosis* Gastroenteritis During Childhood Is a Risk Factor for Irritable Bowel Syndrome in Adulthood. *Gastroenterology*, 147, pp: 69-77.
- Dancer, G.I., Mah, J.H., Rhee, M.S., Hwang, I.G. y Kang, D.H. (2009). Resistance of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) to environmental stresses. *Journal of Applied Microbiology*, 107, pp: 1606-1614.
- D'Andrea, L., Pérez-Rodríguez, F.J., de Castellarnau, M., Manzanares, S., Lite, J., Guix, S., Bosch, A. y Pinto, R.M. (2015). Hepatitis A virus genotype distribution during a decade of universal vaccination of preadolescents. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, pp: 6842-6854.
- Dawson, D. (2005). Foodborne protozoan parasites. *International Journal of Food Microbiology*, 103 (2), pp: 207-

- De la Cochetiere, M.F., Piloquet, H., des Robert, C., Darmaun, D., Galmiche, J.P. y Roze, J.C. (2004). Early intestinal bacterial colonization and necrotizing enterocolitis in premature infants: the putative role of *Clostridium*. *Pediatric Research*, 56 (3), pp: 366-370.
- Decludt, B., Bouvet, P., Mariani-Kurkdjian, P., Grimont, F., Grimont, P.A., Hubert, B. y Loirat, C. (2000). Haemolytic uraemic syndrome and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in children in France. *Epidemiology and Infection*, 124 (2), pp: 215-220.
- Dewey, K.G. y Adu-Afarwuah, S. (2008). Systematic review of the efficacy and effectiveness of Complementary feeding interventions in developing countries. *Maternal and Child Nutrition*, 4 (s1), pp: 24-85.
- Díaz-Gómez, N.M. (2005). ¿En qué situaciones está contraindicada la lactancia materna? *Acta Pediatra Española*, 63, pp: 321-327.
- Doran, T.I. (1999). The Role of Citrobacter in Clinical Disease of Children: Review. *Clinical Infectious Diseases*, 28 (2), pp: 384-394.
- Doyle, M.P. (2003). Foodborne parasites. Wisconsin: Food Research Institute. Disponible en: https://fri.wisc.edu/files/Briefs_File/parasites.pdf [acceso: 4-11-15].
- Doyle, M.E., Hartmann, F.A. y Lee Wong, A.C. (2012). Methicillin-resistant staphylococci: implications for our food supply? *Animal Health Research Reviews*, 13 (2), pp: 157-180.
- ECDC (2012). European Centre for Disease Prevention and Control. Increased *Cryptosporidium* infections in the Netherlands, United Kingdom and Germany in 2012. Stockholm. Disponible en: www.ecdc.europa.eu [acceso: 4-11-15].
- Edelson-Mammel, S.G. y Buchanan, R.L. (2004). Thermal inactivation of *Enterobacter sakazakii* in rehydrated infant formula. *Journal of Food Protection*, 67, pp: 60-63.
- Edmond, K.M., Zandoh, C., Quigley, M.A., Amenga-Etego, S., Owusu-Agyei, S. y Kirkwood, B.R. (2006). Delayed Breastfeeding Initiation Increases Risk of Neonatal Mortality. *Pediatrics*, 117, pp: e380-e386.
- EFSA (2004). European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on biological hazards (BIOHAZ) related to the microbiological risks in infant formulae and follow-on formulae. *The EFSA Journal*, 113, pp: 1-35.
- EFSA (2005). European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on biological hazards (BIOHAZ) related to *Campylobacter* in animals and foodstuffs. *The EFSA Journal*, 173, pp: 1-10.
- EFSA (2007). European Food Safety Authority. Monitoring and identification of human enteropathogenic *Yersinia* spp. *The EFSA Journal*, 595, pp: 1-30.
- EFSA (2009). European Food Safety Authority. Scientific Opinion of the BIOHAZ Panel: Assessment of the Public Health significance of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in animals and foods. *The EFSA Journal*, 993, pp: 1-73.
- EFSA (2013). European Food Safety Authority. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Listeria monocytogenes* in certain ready-to-eat foods in the EU, 2010-2011 Part A: *Listeria monocytogenes* prevalence estimates. *The EFSA Journal*, 11 (6), pp: 3241.
- Enoch, D.A., Butler, M.J., Pai, S., Aliyu, S.H. y Karas, J.A. (2011). *Clostridium difficile* in children: Colonisation and disease. *Journal of Infection*, 63 (2), pp: 105-113.
- Epps, S.V.R., Harvey, R.B., Hume, M.E., Phillips, T.D., Anderson, R.C. y Nisbet, D.J. (2013). Foodborne *Campylobacter*: Infections, Metabolism, Pathogenesis and Reservoirs. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10 (12), pp: 6292-6304.
- Ethelberg, S., Olesen, B., Neimann, J., Schiellerup, P., Helms, M., Jensen, C., Böttiger, B., Olsen, K.E.P., Scheutz, F., Gerner-Smidt, P. y Mølbak, K. (2006). Risk Factors for Diarrhea Among Children in an Industrialized Country. *Epidemiology*, 17, pp: 24-30.
- FAO/OMS (2004a). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura/Organización Mundial de la Salud. *Enterobacter sakazakii* y otros microorganismos en los preparados en polvo para lactantes: informe de la reunión. Roma: FAO.

- FAO/OMS (2004b). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura/Organización Mundial de la Salud. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Roma: FAO.
- FAO/OMS (2006). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura/Organización Mundial de la Salud. *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula: Meeting report. Roma: FAO.
- FAO/OMS (2007). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura/Organización Mundial de la Salud. Guidelines for the safe preparation, storage and handling of powdered infant formula. Disponible en: <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/pif2007/en/> [acceso: 4-11-15].
- FAO/OMS (2008a). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura/Organización Mundial de la Salud. *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered follow-up formulae: Meeting Report. Roma: FAO.
- FAO/OMS (2008b). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura/Organización Mundial de la Salud. Virus in food: Scientific advice to support risk management activities.
- FAO/OMS (2009). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura/Organización Mundial de la Salud. *Salmonella* and *campylobacter* in chicken meat. ROMA: FAO.
- FDA (2014). Food and Drug Administration. Consumer Health Information. FDA Takes Final Step on Infant Formula Protections. Disponible en: www.fda.gov/ForConsumers/ConsumerUpdates [acceso: 4-11-15].
- FDA (2015). Food and Drug Administration. Consumer Health Information. Infants & Toddlers. Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/PeopleAtRisk/ucm047530.htm> [acceso: 4-11-15].
- Ferens, W.A. y Hovde, C.J. (2011). *Escherichia coli* O157:H7: Animal reservoir and sources of human infection. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8, pp: 465-487.
- Forsythe, S. (2005). *Enterobacter sakazakii* and other bacteria in powdered infant milk formula. *Maternal and Child Nutrition*, 1, pp: 44-50.
- Friedemann, M. (2009). Epidemiology of invasive neonatal *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) infections. *European Journal of Clinical Microbiology*, 28, pp: 1297-1304.
- FSA (2006). Food Standards Agency. Guidance for health professionals on safe preparation, storage and handling of powdered infant formula. Disponible en: www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/formulaguidance.pdf [acceso: 4-11-15].
- FSA (2010). Food Standards Agency. FSA reminds parents of advice on making up infant formula. Disponible en: <http://www.food.gov.uk> [acceso: 4-11-15].
- FSA (2013). Food Standards Agency. Safe preparation of powdered infant formula. Disponible en: <http://www.food.gov.uk> [acceso: 4-11-15].
- FSAI (2012). Food Safety Authority of Ireland. Guidance Note No. 22. Information Relevant to the Development of Guidance Material for the Safe Feeding of Reconstituted Powdered Infant Formula (Revision 2). Disponible en: www.fsai.ie [acceso: 4-11-15].
- Fu, S., Gao, J., Liu, Y. y Chen, H. (2011). Isolation of *Cronobacter* spp. Isolates from Infant Formulas and Their Survival in the Production Process of Infant Formula. *Czech Journal of Food Sciences*, 29 (4), pp: 391-399.
- Gajdosova, J., Benedikovicova, K., Kamodyova, N., Tothova, L., Kaclikova, E., Stuchlik, S., Turna, J. y Drahovska, H. (2011). Analysis of the DNA region mediating increased thermotolerance at 58°C in *Cronobacter* spp. and other enterobacterial strains. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 100, pp: 279-289.
- Gallay, A., De Valk, H., Cournot, M., Ladeuil, B., Hemery, C., Castor, C., Bon, F., Mégraud, F., Le Cann, P. y Desenclos, J.C. (2010). A large multi-pathogen waterborne community outbreak linked to faecal contamination of a groundwater system, France, 2000. *Clinical Microbiology and Infection*, 12, pp: 561-570.
- Ganesh, B., Banyai, K., Martella, V., Jakab, F., Masachessi, G. y Kobayashi, N. (2012). Picobirnavirus infections: viral persistence and zoonotic potential. *Reviews in Medical Virology*, 22, pp: 245-256.
- Granum, P.E. y Lund, T. (1997). *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Letters*, 157 (2), pp: 223-228.

- Grass, J.E., Gould, L.H. y Mahon, B.E. (2013). Epidemiology of foodborne disease outbreaks caused by *Clostridium perfringens*, United States, 1998-2010. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10 (2), pp: 131-136.
- Gronlund, M., Arvilommi, H., Kero, P., Lehtonen, O. y Isolauri, E. (2000). Importance of intestinal colonisation in the maturation of humoral immunity in early infancy: a prospective follow up study of healthy infants aged 0-6 months. *Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition*, 83 (3), pp: F186-F192.
- Guarino, A., Albano, F., Ashkenazi, S., Gendrel, D., Hoekstra, J.H., Shamir, R. y Szajewska, H. (2008). European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition/European Society for Paediatric Infectious Diseases evidence-based guidelines for the management of acute gastroenteritis in children in Europe: executive summary. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 46, pp: 619-621.
- Gurtler, J.B., Kornacki, J.L. y Beuchat, L.R. (2005). *Enterobacter sakazakii*: a coliform of increased concern to infant health. *International Journal of Food Microbiology*, 104, pp: 1-34.
- Guzmán-Herrador, B., Jensvoll, L., Einoder-Moreno, M., Lange, H., Myking, S., Nygard, K., Stene-Johansen, K. y Vold, L. (2014). Ongoing hepatitis A outbreak in Europe 2013 to 2014: imported berry mix cake suspected to be the source of infection in Norway. *Euro Surveill*, 19.
- Hamilton, J.V., Lehane, M.J. y Braig, H.R. (2003). Isolation of *Enterobacter sakazakii* from Midgut of Stomoxys calcitrans. *Emerging Infectious Diseases*, 9 (10), pp: 1355-1356.
- Hamprecht, K., Maschmann, J., Vochem, M., Dietz, K., Speer, C.P. y Jahn, G. (2001). Epidemiology of transmission of cytomegalovirus from mother to preterm infant by breastfeeding. *Lancet*, 357, pp: 513-518.
- Hayashi, S., Kimura, H., Oshiro, M., Kato, Y., Yasuda, A., Suzuki, C., Watanabe, Y., Morishima, T. y Hayakawa, M. (2011). Transmission of cytomegalovirus via breast milk in extremely premature infants. *Journal of Perinatology*, 31, pp: 440-445.
- Health Canada (2012). Preparing and handling powdered infant formula. Disponible en: www.healthycanadians.gc.ca/eating-nutrition/safety-salubrite/formula-nourrisson-eng.php [acceso: 4-11-15].
- Healy, B., Cooney, S., O'Brien, S., Iversen, C., Whyte, P., Nally, J., Callanan, J.J. y Fanning, S. (2010). *Cronobacter (Enterobacter sakazakii)*: an oportunistic foodborne pathogen. *Foodborne Pathogen and Disease*, 7, pp: 339-350.
- Helwigh, B., Korsgaard, H., Grønland, A.J., Sørensen, A.H., Jensen, A.N., Boel, J. y Borck Høg, B. (2009). External Scientific Report Microbiological contaminants in food in the European Union in 2004-2009. Technical University of Denmark. Supporting Publications 2012: EN-249.
- Helwigh, B., Korsgaard, H., Anne, J., Grønland, A.J., Sørensen, A.H., Jensen, A.N., Boel, J. y Høg, B.B. (2012). Microbiological contaminants in food in the European Union in 2004-2009. Technical University of Denmark. Supporting Publications 2012: EN-249.
- Hinckley, A.F., O'Leary, D.R. y Hayes, E.B. (2007). Transmission of West Nile Virus Through Human Breast Milk Seems to Be Rare. *Pediatrics*, 119, pp: e666-e671.
- Holy, O. y Forsythe, S. (2014). Cronobacter spp. Emerging cause of healthcare-associated infection. *Journal of Hospital Infection*, 86, pp: 169-177.
- Hoofnagle, J.H., Nelson, K.E. y Purcell, R.H. (2012). Hepatitis E. *The New England Journal of Medicine*, 367, pp: 1237-1244.
- Huertas, J.P., Álvarez-Ordóñez, A., Morrissey, R., Ros-Chumillas, M., Esteban, M.D., Maté, J., Palop, A. y Hill, C. (2015). Heat resistance of *Cronobacter sakazakii* DPC 6529 and its behavior in reconstituted powdered infant formula. *Food Research International*, 69, pp: 401-409.
- Hurrell, E., Kucerova, E., Loughlin, M., Caubilla-Barron, J. y Forsythe, S.J. (2009). Biofilm formation on enteral feeding tubes by *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* serovars and other *Enterobacteriaceae*. *International Journal of Food Microbiology*, 136, pp: 227-231.
- INFOSAN (2005). Red Internacional de autoridades de inocuidad de los alimentos. *Enterobacter sakazakii* en las fórmulas infantiles en polvo. Nota informativa no.1/2005-*Enterobacter sakazakii*. Disponible en: www.who.int/foodsafety/fs_management/No_01_Esakazakii_Jan05_sp.pdf [acceso: 4-11-15].

- ISCI (2011). Instituto de Salud Carlos III. Brote supracomunitario de gastroenteritis por *Salmonella Poona* en 2010-2011 Centro Nacional de Epidemiología. *Boletín Epidemiológico Semanal*, 19 (13).
- Isonhood, J.H. y Drake, M. (2002). *Aeromonas* species in foods. *Journal of Food Protection*, 65 (3), pp: 575-582.
- Iversen, C. y Forsythe, S. (2003). Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, and emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends in Food Science and Technology*, 14, pp: 443-454.
- Iversen, C. y Forsythe, S. (2004). Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other Enterobacteriaceae from powdered infant formula milk and related products. *Food Microbiology*, 21, pp: 771-777.
- Iversen, C., Lane, M. y Forsythe, S.J. (2004). The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. *Letters in Applied Microbiology*, 38, pp: 378-382.
- Janda, J.M. y Abbott, S.L. (2010). The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 23 (1), pp: 35-73.
- Jiang, V., Jiang, B., Tate, J., Parashar, U.D. y Patel, M.M. (2010). Performance of rotavirus vaccines in developed and developing countries. *Hum Vaccin*, 6, pp: 532-542.
- Jones, T.F., Kellum, M.E., Porter, S.S., Bell, M. y Schaffner, W. (2002). An Outbreak of Community-Acquired Foodborne Illness Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infectious Diseases*, 8 (1), pp: 82-84.
- Kandhai, M.C., Heuvelink, A.E., Reij, M.W., Beumer, R.R., Dijk, R., van Tilburg, J.J.H.C., van Schothorst, M. y Gorris, L.G.M. (2010). A study into the occurrence of *Cronobacter* spp. in The Netherlands between 2001 and 2005. *Food Control*, 21, pp: 1127-1136.
- Kandhai, M.C., Reij, M.W., Gorris, L.G., Guillaume-Gentil, O. y Van Schothorst, M. (2004). Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households. *Lancet*, 363, pp: 39-40.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P. y Mobley, H.L.T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2 (2), pp: 123-140.
- Kim, S.H. y Park, J.H. (2007). Thermal resistance and inactivation of *Enterobacter sakazakii* isolates during rehydration of powdered infant formula. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17, pp: 364-368.
- Kitajima, M. y Gerba, C.P. (2015). Aichi virus 1: environmental occurrence and behavior. *Pathogens*, 4, pp: 256-268.
- Koehler, K.M., Lasky, T., Fein, S.B., DeLong, S.M., Hawkins, M.A., Rabatsky-Ehr, T. y Vugia, D.J. (2006). Population-Based Incidence of Infection with Selected Bacterial Enteric Pathogens in Children Younger Than Five Years of Age, 1996-1998. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 25 (2), pp: 129-134.
- Koopmans, M. y Duizer, E. (2004). Foodborne viruses: an emerging problem. *International Journal of Food Microbiology*, 90, pp: 23-41.
- Krain, L.J., Atwell, J.E., Nelson, K.E. y Labrique, A.B. (2014). Fetal and Neonatal Health Consequences of Vertically Transmitted Hepatitis E Virus Infection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 90, pp: 365-370.
- Kramer, J.M. y Gilbert, R.J. (1989). *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species, pp: 21-70. En libro: *Foodborne bacterial pathogens*. Doyle, M.P. Marcel Dekker, New York. pp: 21-70.
- Kuzina, L.V., Peloquin, J.J., Vacek, D.C. y Miller, T.A. (2001). Isolation and identification of bacteria associated with adult laboratory Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). *Current Microbiology*, 42, pp: 290-410.
- Lamounier, J.A., Moulin, Z.S. y Xavier, C.C. (2004). Recommendations for breastfeeding during maternal infections. *Journal de Pediatria*, 80 (5), pp: S181-S188.
- Lampel, K.A. y Maurelli, A.T. (2007). *Shigella* species. En libro: *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Doyle, M.P. y Beuchat, L.R., Washington, D.C., ASM Press. pp: 323-341.
- Lanari, M., Sogno Valin, P., Natale, F., Capretti, M.G. y Serra, L. (2012). Human milk, a concrete risk for infection? *Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 25 (4), pp: 75-77.
- Lanzieri, T.M., Dollard, S.C., Josephson, C.D., Schmid, D.S. y Bialek, S.R. (2013). Breast Milk-Acquired Cytomegalovirus Infection and Disease in VLBW and Premature Infants. *Pediatrics*, 131, pp: e1937-e1945.

- Le Loir, Y., Baron, F. y Gautier, M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*, 2 (1), pp: 63-76.
- Li, Y., Chen, Q., Zhao, J., Jiang, H., Lu, F., Bie, X. y Lu, Z. (2014). Isolation, identification and antimicrobial resistance of *Cronobacter* spp. Isolated from various foods in China. *Food Control*, 37, pp: 109-114.
- Lim, J.Y., Yoon, J.W. y Hovde, C.J. (2010). A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20, pp: 5-14.
- Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M.L., Xaus, J., Fernández, L. y Rodríguez, J.M. (2003). Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *Journal of Pediatrics*, 143 (6), pp: 754-758.
- Mateo, M., Mateo, M., Montoya, A., Bailo, B., Saugar, J.M., Aguilera, M. y Carmena, D. (2014). Detection and Molecular Characterization of Giardia duodenalis in Children Attending Day Care Centers in Majadahonda, Madrid, Central Spain. *Medicine*, 93 (15), pp: e75.
- Mayr, C., Strohe, G. y Contzen, M. (2009). Detection of rotavirus in food associated with a gastroenteritis outbreak in a mother and child sanatorium. *International Journal of Food Microbiology*, 135, pp: 179-182.
- McClane, B.A., Robertdon, S.I. y Li, J. (2013). *Clostridium perfringens*. En libro: *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. 4ª edición. Doyle, M.P. y Buchanan, R.L. American Society for Microbiology. pp: 465-490.
- McDonald, S.D. y Gruslin, A. (2001). A review of *Campylobacter* infection during pregnancy: A focus on *C. jejuni*. *Primary Care Update for Ob/Gyns*, 8, pp: 253-257.
- Moore, D.L. (2008). Foodborne infections. *Paediatric Child Health*, 13 (9), pp: 779-782.
- Moriuchi, H., Masuzaki, H., Doi, H. y Katamine, S. (2013). Mother-to-child Transmission of Human T-cell Lymphotropic Virus Type 1. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 32, pp: 175-177.
- Mramba, F., Broce, A. y Zurek, L. (2006). Isolation of *Enterobacter sakazakii* from stable flies, *Stomoxys calcitrans* L. (Diptera: Muscidae). *Journal of Food Protection*, 69 (3), pp: 671-673.
- Muehlenbachs, A., Bhatnagar, J. y Zaki, S.R. (2015). Tissue tropism, pathology and pathogenesis of enterovirus infection. *Journal of Pathology*, 235, pp: 217-228.
- Mullane, N.R., Healy, B., Meade, J., Whyte, P., Wall, P.G. y Fanning, S. (2008). Dissemination of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in a powdered milk protein manufacturing facility. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, pp: 5913-5917.
- Murata, T., Katsushima, N., Mizuta, K., Muraki, Y., Hongo, S. y Matsuzaki, Y. (2007). Prolonged norovirus shedding in infants <or=6 months of age with gastroenteritis. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 26, pp: 46-49.
- Muytjens, H.L., Roelofs-Willemsse, H. y Jaspar, G.H.J. (1988). Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 26, pp: 743-746.
- Nataro, J.P. y Kaper, J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11 (1), pp: 142-201.
- Nazarowec-White, M. y Farber, J.M. (1997a). Incidence, survival and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *Journal of Food Protection*, 60, pp: 226-230.
- Nazarowec-White, M. y Farber, J.M. (1997b). Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried-infant formula. *Letters in Applied Microbiology*, 24, pp: 9-13.
- Newell, D.G., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H., Opsteegh, M., Langelaar, M., Threlfall, J., Scheutz, F., der Giessen, Jv. y Kruse, H. (2010). Food-borne diseases-The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology*, 139, pp: S3-S15.
- NHS (2012). National Health Service. Guide to Bottle feeding. How to prepare infant formula and sterilise feeding equipment to minimise the risks to your baby. 2012. Disponible en: www.nhs.uk/start4life/documents/pdfs/start4life_guide_to_bottle_feeding.pdf [acceso: 4-11-15].
- NICE (2010). National Institute for Health and Care Excellence. Donor milk banks: the operation of donor milk bank services. Clinical guideline 93.
- Nichols, G.L. (2000). Food-borne protozoa. *British Medical Bulletin*, 56 (1), pp: 209-235.

- Norberg, S., Stanton, C., Ross, R.P., Hill, C., Fitzgerald, G.F. y Cotter, P.D. (2012). *Cronobacter* spp. in powdered infant formula. *Journal of Food Protection*, 75, pp: 607-620.
- Noriega, F.R., Kotloff, K.L. y Schwalbe, R.S. (1990). Nosocomial bacteremia caused by *Enterobacter sakzakii* and *Leuconostoc mesenteroides* resulting from extrinsic contamination of infant formula. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 9, pp: 447-449.
- Olsen, S.J., Bishop, R., Brenner, F.W., Roels, T.H., Bean, N., Tauxe, R.V. y Slutsker, L. (2001). The changing epidemiology of *Salmonella*: Trends in serotypes isolated from humans in the United States, 1987-1997. *Journal of Infectious Diseases*, 183, pp: 753-761.
- OMS (1996). Organización Mundial de la Salud. Protozoa. Guidelines for drinking-water quality. Vol 2. Health criteria and other supporting information. 2nd ed. Geneva. pp: 52-67.
- OMS (2007). Organización Mundial de la Salud. HIV Transmission Through Breastfeeding. A review of available evidence. Updated 2007.
- OMS (2008). Organización Mundial de la Salud. Guías para la calidad del agua potable, 3ª edición. Disponible en: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3rev/es/ [acceso: 4-11-15].
- OMS (2009). Organización Mundial de la Salud. Children's Health and the Environment. Disponible en: www.who.int/ceh. 2009. <http://www.who.int/ceh/capacity/food.pdf> [acceso: 4-11-15].
- OMS (2010). Organización Mundial de la Salud. Guidelines on HIV and infant feeding 2010. Principles and recommendations for infant feeding in the context of HIV and a summary of evidence.
- OMS (2015). Organización Mundial de la Salud. Hepatitis E. Fact sheet N° 280. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs280/en/> [acceso: 4-11-15].
- Osaili, T.M., Al-Nabulsi, A.A., Shaker, R.R., Ayyash, M.M., Olaimat, A.N., Abu Al-Hasan, A.S., Qadora, K.M. y Holley, R.A. (2008). Effects of extended dry storage of powdered infant milk formula on susceptibility of *Enterobacter sakzakii* to hot water and ionizing irradiation. *Journal of Food Protection*, 71, pp: 934-939.
- Osaili, T.M., Shaker, R.R., Al-Haddad, M.S., Al-Nabulsi, A.A., y Holley, R.A. (2009). Heat resistance of *Cronobacter* species (*Enterobacter sakzakii*) in milk and special feeding formula. *Journal of Applied Microbiology*, 107 (3), pp: 928-935.
- Pagotto, F.J., Nazarowec-White, M., Bidawid, S. y Farber, J.M. (2003). *Enterobacter sakzakii*: infectivity and enterotoxin production *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Food Protection*, 66, pp: 370-375.
- Pan, Z., Cui, J., Lyu, G., Du, X., Qin, L., Guo, Y., Xu, B., Li, W., Cui, Z. y Zhao, C. (2014). Isolation and molecular typing of *Cronobacter* spp. in commercial powdered infant formula and follow-up formula. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11, pp: 456-461.
- Park, S.F. (2002). The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 74 (3), pp: 177-188.
- Parra, J.F., Oliveras, L.V., Rodriguez, A.F., Riffo, F.S., Jackson, E. y Forsythe, S. (2015). Risk of *Cronobacter sakzakii* in powdered milk for infant nutrition. *Revista Chilena de Nutrición*, 42, pp: 83-89.
- Parry, S.M. y Salmon, R.L. (1998). Sporadic STEC O157 infection: secondary household transmission in Wales. *Emerging Infectious Diseases*, 4 (4), pp: 657-661.
- Patel, M.M., Widdowson, M.A., Glass, R.I., Akazawa, K., Vinje, J. y Parashar, U.D. (2008). Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerging Infectious Diseases*, 14, pp: 1224-1231.
- Pintó, R., Costafreda, M.I., Pérez-Rodríguez, F., D'Andrea, L. y Bosch, A. (2010). Hepatitis A Virus: State of the Art. *Food and Environmental Virology*, 2, pp: 127-135.
- Rabet, L.M., Vos, A.P. Boehm, G. y Garssen, J. (2008). Breast-Feeding and Its Role in Early Development of the Immune System in Infants: Consequences for Health Later in Life. *Journal of Nutrition*, 138, pp: 1782S-1790S.
- Räsänen, S., Lappalainen, S., Kaikkonen, S., Hämäläinen, M., Salminen, M. y Vesikari, T. (2010). Mixed viral infections causing acute gastroenteritis in children in a waterborne outbreak. *Epidemiology & Infection*, 138, pp: 1227-1234.

- Reich, F., König, R., vonWiese, W. y Klein, G. (2010). Prevalence of *Cronobacter* spp. In a powdered infant formula processing environment. *International Journal of Food Microbiology*, 140, pp: 214-217.
- Robiloti, E., Deresinski, S. y Pinsky, B.A. (2015). Norovirus. *Clinical Microbiology Reviews*, 28, pp: 134-164.
- Robins-Browne, R.M. (2007). *Yersinia enterocolitica*. En libro: *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Doyle, M.P. y Beuchat, L.R., 3ª Edición. Washington, D.C.: ASM Press. pp: 293-322.
- Rodríguez Máuriz, C., Valdés Amey, E., Lara Ortiz, C. y Vilalta Remón, A. (1996). Multiplicación del *Bacillus Cereus* inoculado en leche en polvo reconstituida. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, 10 (2), pp: 87-89.
- Rodríguez Salinas, E.P., Peña, A., José, A., Allue Tango, M., Pérez, L., Angeles, M. y José, M. (2000). Brote de Criptosporidiosis en Guadarrama. (Comunidad Autónoma de Madrid). *Revista Española de Salud Pública*, 74 (5-6), pp: 527-536.
- Rosner, B.M., Stark, K., Höhle, M. y Werber, D. (2012). Risk factors for sporadic *Yersinia enterocolitica* infections, Germany 2009-2010. *Epidemiology & Infection*, 140 (10), pp: 1738-1747.
- Rosow, L.K. y Strober, J.B. (2015). Infant botulism: review and clinical update. *Pediatrics Neurology*, 52, pp: 487-492.
- Rosset, P., Noel, V. y Morelli, E. (2007). Time-temperature profiles of infant milk formula in hospitals and analysis of *Enterobacter sakazakii* growth. *Food Control*, 18, pp: 1412-1418.
- Ruggeri, F.M. y Fiore, L. (2012). Vaccine preventable viral diseases and risks associated with waterborne transmission. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 48, pp: 460-472.
- Sabria, A., Pinto, R.M., Bosch, A., Bartolome, R., Cornejo, T., Torner, N., Martínez, A., de Simon, M., Domínguez, A. y Guix, S. (2014). Molecular and clinical epidemiology of norovirus outbreaks in Spain during the emergence of GII.4 2012 variant. *Journal of Clinical Virology*, 60, pp: 96-104.
- Sánchez-Vargas, F.M., Abu-El-Haija, M.A. y Gómez-Duarte, O. (2011). *Salmonella* infections: An update on epidemiology, management, and prevention. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 9, pp: 263-277.
- Santiago, B., Guerra, L., García-Morín, M., González, E., González, A., Izquierdo, G., Martos, A., Santos, M., Navarro, M., Hernández-Sampelayo, M.T. y Saavedra-Lozano, J. (2015). *Clostridium difficile* isolation in children hospitalized with diarrhoea. *Anales de Pediatría*, 82, pp: 417-425.
- Sato, M.I.Z., Galvani, A.T., Padula, J.A., Nardocci, A.C., de Souza Lauretto, M., Razolini, M.T. y Hachich, E.M. (2013). Assessing the infection risk of *Giardia* and *Cryptosporidium* in public drinking water delivered by surface water system in Sao Paulo State, Brazil. *Science of the Total Environment*, 442, pp: 389-396.
- Sayed, I.M., Vercouter, A-S., Abdelwahab, S.F., Vercauteren, K. y Meuleman, P. (2015). Is HEV an emerging problem in industrialized countries? *Hepatology*, 62, pp: 1883-1892.
- Scallan, E., Griffin, P.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V. y Hoekstra, R.M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States-unspecified agents. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 17, pp: 16-22.
- Scallan, E., Mahon, B.E., Hoekstra, R.M. y Griffin, P.M. (2013). Estimates of Illnesses, Hospitalizations and Deaths Caused by Major Bacterial Enteric Pathogens in Young Children in the United States. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 32 (3), pp: 217-221.
- Scott, E. (2000). Relationship between cross-contamination and the transmission of foodborne pathogens in the home. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 19 (10), pp: S111-113.
- Semenza, J.C. y Nichols, G. (2007). Cryptosporidiosis surveillance and water-borne outbreaks in Europe. Euro Surveillance: Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles. *European Communicable Disease Bulletin*, 12, pp: 120-123.
- Shaker, R., Osaili, T., Al-Omary, W., Jaradt, Z. y Al-Zuby, M. (2007). Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacter* sp. from food and food production environments. *Food Control*, 18, pp: 1241-1245.
- SIM (2015). Sistema de Información Microbiológica. Instituto de Salud Carlos III. Disponible en: <http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/sistema-informacion-microbiologica.shtml> [acceso: 4-11-15].

- Smith, A. (2011). Alimentos caseros para bebés: prepárelos de manera segura. Foodsafety.gov. Disponible en: <http://espanol.foodsafety.gov/blog/182t/alimentos-caseros-para-beb%C3%A9s.html> [acceso: 4-11-15].
- Smith, J.L. (2002). *Campylobacter jejuni* infection during pregnancy: long-term consequences of associated bacteremia, Guillain-Barré syndrome, and reactive arthritis. *Journal of Food Protection*, 65, pp: 696-708.
- Sockett, P.N. y Rodgers, F.G. (2001). Enteric and foodborne disease in children: A review of the influence of food- and environment-related risk factors. *Paediatrics & Child Health*, 6 (4), pp: 203-209.
- Sonbol, H., Joseph, S., McAuley, C.M., Craven, H.M. y Forshythe, S.J. (2013). Multilocus sequence typing of *Cronobacter* spp. from powdered infant formula and milk powder production factories. *International Dairy Journal*, 30, pp: 1-7.
- Stoll, B.J., Hansen, N., Fanaroff, A.A. y Lemons, J.A. (2004). *Enterobacter sakazakii* is a rare cause of neonatal septicemia or meningitis in VLBW infants. *Journal of Pediatrics*, 144, pp: 821-823.
- Strydom, A., Cawthorn, D.M., Cameron, M. y Witthuhn, R.C. (2012). Species of *Cronobacter*-A review of recent advances in the genus and their significance in infant formula milk. *International Dairy Journal*, 27, pp: 3-12.
- Stuart, R.L., Tan, K., Mahar, J.E., Kirkwood, C.D., Andrew Ramsden, C., Andrianopoulos, N., Jolley, D., Bawden, K., Doherty, R., Kotsanas, D., Bradford, J. y Buttery, J.P. (2010). An outbreak of necrotizing enterocolitis associated with norovirus genotype GII.3. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 29, pp: 644-647.
- Terio, V., Bottaro, M., Di Pinto, A., Catella, C., Chironna, M., Bozzo, G., Kingsley, D.H., Bonerba, E., Morea, A. y Martella, V. (2015). Outbreak of Hepatitis A in Italy Associated with Frozen Redcurrants Imported from Poland: A Case Study. *Food and Environmental Virology*, 7, pp: 1-4.
- Terragno, R., Salve, A., Pichel, M., Epsztejn, S., Brengi, S. y Binsztein, N. (2009). Characterization and subtyping of *Cronobacter* spp. from imported powdered infant formulae in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 136, pp: 193-197.
- Thurm, V. y Gericke, B. (1994). Identification of infant food as a vehicle in a nosocomial outbreak of *Citrobacter freundii*: epidemiological subtyping by allozyme, whole-cell protein and antibiotic resistance. *Journal of Applied Bacteriology*, 76 (6), pp: 553-558.
- Trabulsi, L.R., Keller, R. y Gomes, T.A.T. (2002). Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases*, 8 (5), pp: 508-513.
- Tudela, E., Croizé, J.A., Lagier, A. y Mallaret M.-R. (2008). Surveillance microbiologique des échantillons de laits infantiles et des surfaces dans une biberonnerie hospitalière. *Pathologie Biologie*, 56, pp: 272-278.
- Turcios-Ruiz, R.M., Axelrod, P., St John, K., Bullitt, E., Donahue, J., Robinson, N. y Friss, H.E. (2008). Outbreak of necrotizing enterocolitis caused by norovirus in a neonatal intensive care unit. *Journal of Pediatrics*, 153, pp: 339-344.
- 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.
- Van der Poel, W.H.M. (2014). Food and environmental routes of Hepatitis E virus transmission. *Current Opinion in Virology*, 4, pp: 91-96.
- Van Pelt, W., de Wit, M.S., Wannet, W.J.B., Ligtoet, E.J.J., Widdowson, M.A. y van Duynhoven, Y.T.H.P. (2003). Laboratory surveillance of bacterial gastroenteric pathogens in The Netherlands, 1991-2001. *Epidemiology and Infection*, 130 (3), pp: 431-441.
- Varga, L. (2011). Bacteriological quality of bottled natural mineral waters commercialized in Hungary. *Food Control*, 22, pp: 591-595.
- Vargas-Leguás, V., Rodríguez Garrido, R., Lorite Cuenca, R., Pérez-Portabella, S.Y. y Campins Martí, M. (2009). Guía para la elaboración de fórmulas infantiles en polvo en el medio hospitalario. Sistema de análisis de peligros y puntos de control críticos. *Anales de Pediatría*, 70 (6), pp: 586-593.
- Wang, F.T., Mast, T.C., Glass, R.J., Loughlin, J. y Seeger, J.D. (2010). Effectiveness of the Pentavalent Rotavirus Vaccine in Preventing Gastroenteritis in the United States. *Pediatrics*, 125, pp: e208-e213.

- Warren, B.R., Parish, M.E. y Schneider, K.R. (2006). Shigella as a Foodborne Pathogen and Current Methods for Detection in Food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46 (7), pp: 551-567.
- Wattiau, P., Boland, C. y Bertrand, S. (2011). Methodologies for *Salmonella enterica* subespecie. enterica subtyping: Gold standards and alternatives. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, pp: 7877-7885.
- Wilcox, M.H., Cook, A.M., Eley, A. y Spencer, R.C. (1992). *Aeromonas* spp as a potential cause of diarrhoea in children. *Journal of Clinical Pathology*, 45 (11), pp: 959-963.
- Woteki, C.E. y Kineman, B.D. (2008). Food Safety. En libro: *Nutrition in Pediatrics: Basic science, clinical applications*. Duggan, C., Warkins, J. y Walker, W.A. (eds.). BC Dekker.
- Yan, L., Feng, Q., Mei-ling, W. y Wei, W. (2012). Screening for Enterobacteriaceae Bacteria in Infant Formula Powder. *Journal of Northeast Agricultural University*, 19 (1), pp: 68-72.
- Yang, H.Y., Kim, S.K., Choi, S.Y., You, D.H., Lee, S.C., Bang, W.S. y Yuk, H.G. (2015). Effect of acid, desiccation and heat stresses on the viability of *Cronobacter sakazakii* during rehydration of powdered infant formula and in simulated gastric fluid. *Food Control*, 50, pp: 336-341.
- Zamberlan da Silva, M.E., Getirana Santana, R., Guilhermetti, M., Camargo Filho, I., Harua Endo, E., Ueda-Nakamura, T., Vatura Nakamura, C. y Prado Dias Filho, B. (2008). Comparison of the bacteriological quality of tap water and bottled mineral water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 211, pp: 504-505.
- Zogaj, X., Bokranz, W., Nimtz, M. y Römling, U. (2003). Production of cellulose and curli fimbriae by members of the Family Enterobacteriaceae isolated from the human gastrointestinal tract. *Infection and Immunity*, 71, pp: 4151-4158.

Anexo I. Criterios microbiológicos de seguridad y de higiene que afectan a distintos alimentos y preparados destinados a lactantes y niños de corta edad

1. Criterios de seguridad

Categoría alimentos	Microorganismo/ sus toxinas, metabolitos	Plan de toma de muestras	Límites	Método analítico de referencia	Fase en la que se aplica el criterio
Alimentos listos para el consumo destinados a los lactantes ⁴	<i>Listeria mono-cytogenes</i>	n=10 c=0	Ausencia en 25 g	EN/ISO 11290-1	Productos comercializados durante su vida útil
1.22. Preparados deshidratados para lactantes y alimentos dietéticos deshidratados destinados a usos médicos especiales para lactantes menores de 6 meses	<i>Salmonella</i>	n=30 c=0	Ausencia en 25 g	EN/ISO 6579	Productos comercializados durante su vida útil
1.23. Preparados deshidratados de continuación	<i>Salmonella</i>	n=30 c=0	Ausencia en 25 g	EN/ISO 6579	Productos comercializados durante su vida útil
1.24. Preparados deshidratados para lactantes y alimentos dietéticos deshidratados destinados a usos médicos especiales para lactantes menores de 6 meses ¹⁴	<i>Cronobacter</i> spp. (<i>Enterobacter sakazakii</i>)	n=30 c=0	Ausencia en 10 g	ISO/TS 22964	Productos comercializados durante su vida útil

⁴En circunstancias normales, no se exige realizar pruebas regulares con respecto a este criterio para los siguientes productos alimenticios listos para el consumo: • los que hayan recibido tratamiento térmico u otro proceso eficaz para eliminar *L. monocytogenes*, cuando la recontaminación no sea posible tras este tratamiento (por ejemplo, productos tratados térmicamente en su envase final), • frutas y hortalizas frescas, enteras y no transformadas, excluidas las semillas germinadas, pan, galletas y productos similares, • aguas embotelladas o envasadas, bebidas refrescantes sin alcohol, cerveza, sidra, vino, bebidas espirituosas y productos similares, • azúcar, miel y golosinas, incluidos productos de cacao y chocolate, • moluscos bivalvos vivos.

¹⁴Se realizarán en paralelo análisis para la detección de Enterobacteriáceas y de *E. sakazakii*, a menos que se haya establecido una correlación entre estos microorganismos a escala de plantas concretas. Si se detectan Enterobacteriáceas en cualquiera de las muestras tomadas de tal planta, entonces se realizarán análisis en busca de *E. sakazakii*. El fabricante tendrá que demostrar, a satisfacción de la autoridad competente, si existe tal correlación entre las Enterobacteriáceas y *E. sakazakii*.

2. Criterios de higiene

Categoría alimentos	Microorganismo/sus toxinas, metabolitos	Plan de toma de muestras	Límites	Método analítico de referencia	Fase en la que se aplica el criterio	Acción en caso de resultados insatisfactorios
2.2.9. Preparados deshidratados para lactantes y alimentos dietéticos deshidratados destinados a usos médicos especiales para lactantes menores de 6 meses	<i>Enterobacteriaceae</i>	n=10 c=0	Ausencia en 10 g	ISO 21528-1	Final del proceso de fabricación	Mejoras en la higiene de la producción para minimizar la contaminación ⁹
2.2.10. Preparados deshidratados de continuación	<i>Enterobacteriaceae</i>	n=5 c=0	Ausencia en 10 g	ISO 21528-1	Final del proceso de fabricación	Mejoras en la higiene de la producción para minimizar la contaminación
2.2.11. Preparados deshidratados para lactantes y alimentos dietéticos deshidratados destinados a usos médicos especiales para lactantes menores de 6 meses	Presunto <i>Bacillus cereus</i>	n=5 c=1	m=50 ufc/g M=500 ufc/g	EN/ISO 7932 ¹⁰	Final del proceso de fabricación	Mejoras en la higiene de la producción. Prevención de la recontaminación. Selección de las materias primas

⁹Se realizarán en paralelo análisis para la detección de Enterobacteriáceas y de *E. sakazakii* a menos que se haya establecido una correlación entre estos microorganismos a escala de plantas concretas. Si se detectan Enterobacteriáceas en cualquiera de las muestras tomadas de tal planta, entonces se realizarán análisis en busca de *E. sakazakii*. El fabricante tendrá que demostrar, a satisfacción de la autoridad competente, si existe tal correlación entre las Enterobacteriáceas y *E. sakazakii*.

¹⁰Sobre una placa de Petri de 140 mm de diámetro o tres placas de Petri de 90 mm de diámetro se siembra 1 ml de inóculo.

Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) sobre condiciones de uso de determinadas sustancias para ser empleadas en complementos alimenticios-4

Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición

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

Secretario técnico

Vicente Calderón Pascual

Número de referencia: AECOSAN-2015-008

Documento aprobado por la Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición del Comité Científico en su sesión plenaria de 18 de noviembre de 2015

Grupo de trabajo

Guillermina Font Pérez (Coordinadora)
José Manuel Barat Baviera (Coordinador de carbón activo)
Arturo Hardisson de la Torre (Coordinador de aminoácidos)
Amelia Marti del Moral (Coordinadora de ácido lipoico)
Gaspar Pérez Martínez (Coordinador de lactulosa)
José Luis Ríos Cañavate (Coordinador de monacolina)
Jesús Simal Gándara (Coordinador de hidroximetilbutirato)
Ramón Estruch Riba, Ángeles Jos Gallego,
Arantxa Martínez Caballero, Gaspar Ros Berrueto

Resumen

Los complementos alimenticios son alimentos cuyo fin es complementar la dieta normal y que consisten en fuentes concentradas de nutrientes (vitaminas y minerales) o de otras sustancias que tienen un efecto nutricional o fisiológico, en forma simple o combinada. Los complementos se comercializan en forma dosificada, se entregan al consumidor final únicamente preenvasados. En ningún caso, deben sustituir al uso de medicamentos sin una supervisión médica adecuada. Sólo deben utilizarse para complementar la dieta y, de forma general, su uso no es necesario si se sigue una dieta variada y equilibrada, a la que no pueden reemplazar.

En España los complementos alimenticios están regulados por el Real Decreto 1487/2009 que traspuso a la legislación española la Directiva 2002/46/CE relativa a la aproximación de las legislaciones de los estados miembros en materia de complementos alimenticios. Sin embargo, actualmente sólo está regulado el uso de vitaminas y minerales, por lo que se ha solicitado al Comité Científico que realice una valoración de la propuesta de autorización de la utilización de determinadas sustancias distintas de vitaminas y minerales en la fabricación de complementos alimenticios. Las sustancias propuestas por la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) son: ácido L-aspartico, L-citrulina, glicina, L-prolina, L-serina, L-arginina-L-aspartato, L-lisina-L-aspartato, L-lisina-L-glutamato, N-acetil-L-cisteína, N-acetil-L-metionina, hidroximetilbutirato, ácido lipoico, *Monascus purpureus*, carbón activo y lactulosa.

El Comité Científico ha valorado cada propuesta, analizando las características y fuentes de cada sustancia, así como la nutrición, metabolismo y seguridad y ha concluido, en cada caso, si la presentada por la AECOSAN era aceptable desde el punto de vista de su seguridad en su uso como complemento alimenticio. En ningún caso, la evaluación realizada supone un aval de la eficacia

biológica de las sustancias y dosis valoradas. El Comité Científico indica que, en todo caso es necesario que las personas que estén sometidas a tratamientos con medicamentos consulten con su médico la oportunidad o conveniencia de consumir complementos alimenticios dada la posibilidad de que existan interferencias en algunos casos.

Palabras clave

Complementos alimenticios, Ácido L-aspártico, L-citrulina, Glicina, L-prolina, L-serina, L-arginina-L-aspartato, L-lisina-L-aspartato, L-lisina-L-glutamato, N-acetil-L-cisteína, N-acetil-L-metionina, Hidroximetilbutirato, Ácido lipoico, *Monascus purpureus*, Carbón activo, Lactulosa.

Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Consumer Affairs, Food Safety and Nutrition (AECOSAN) on the conditions of use of certain substances to be used in food supplements-4

Abstract

Food supplements are foods, the purpose of which is to supplement the normal diet and which consist of concentrated nutrient sources (vitamins and minerals) or other substances with a nutritional or physiological effect, alone or in combination. The supplements are marketed in dosage form and are only supplied to the end consumer prepacked. In no event should they replace the use of medicines without suitable medical supervision. They should only be used to supplement the diet and, on the whole, their usage is not required if the individual has a varied and balanced diet, which cannot be replaced.

In Spain, food supplements are regulated by Royal Decree 1487/2009, which transposed Directive 2002/46/EC on the approximation of the laws of the Member States relating to food supplements into Spanish law. However, only the use of vitamins and minerals is currently regulated. Therefore the Scientific Committee has been asked to make an assessment of the proposal to authorise certain substances other than vitamins and minerals in the manufacture of food supplements. The substances proposed by the Spanish Agency for Consumer Affairs, Food Safety and Nutrition (AECOSAN) are food supplements, L-aspartic acid, L-citrulline, glycine, L-proline, L-serine, L-arginine-L-aspartate, L-lysine L-aspartate, L-lysine-L-glutamate, N-acetyl-L-cysteine, N-acetyl-L-methionine, hydroxymethylbutyrate, lipoic acid, *Monascus purpureus*, activated carbon and lactulose.

The Scientific Committee has assessed each proposal, analysing the characteristics and sources of each substance, and the nutrition, metabolism and safety and has concluded, in each case, whether that submitted by the AECOSAN is acceptable from a safety viewpoint for use as a food supplement. In no event is the assessment intended as a guarantee of the biological efficiency of the substances and doses assessed. The Scientific Committee states that, in any case individuals undergoing medical treatment must seek medical advice as to the suitability of taking food supplements, given the possibility of interactions in certain cases.

Key words

Food supplements, L-aspartic acid, L-citrulline, glycine, L-proline, L-serine, L-arginine L-aspartate, L-lysine-L-aspartate, L-lysine-L-glutamate, N-acetyl-L-cysteine, N-acetyl-L-methionine, hidroxy-methylbutyrate, lipoic acid, *Monascus purpureus*, activated carbon, lactulose.

1. Introducción

La Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) ha elaborado una nueva propuesta de autorización de determinadas sustancias distintas de vitaminas y minerales para ser utilizadas en la fabricación de complementos alimenticios y sus correspondientes cantidades máximas diarias para su inclusión en un nuevo anexo III del Real Decreto 1487/2009 (BOE, 2009). En este sentido, el Consejo de Dirección de la AECOSAN ha solicitado a la Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición del Comité Científico que realice, tal como ha hecho en ocasiones anteriores, una valoración de diversas propuestas de autorización de la utilización de determinadas sustancias en la fabricación de complementos alimenticios.

De acuerdo con lo ya indicado en informes anteriores, los complementos alimenticios son alimentos cuyo fin es complementar la dieta normal y que consisten en fuentes concentradas de nutrientes (vitaminas y minerales) o de otras sustancias que tienen un efecto nutricional o fisiológico, en forma simple o combinada. Los complementos se comercializan en forma dosificable en cápsulas, pastillas, tabletas, píldoras, bolsas con polvo, ampollas de líquido, botellas con cuentagotas y otras formas similares de líquidos y polvos que deben tomarse en pequeñas cantidades unitarias.

Como alimentos, están sometidos a la legislación aplicable al resto de productos alimenticios tales como el Reglamento (CE) N° 178/2002 (UE, 2002a) que fija procedimientos que influyen en la seguridad alimentaria, el Reglamento (CE) N° 1924/2006 (UE, 2006a) sobre declaraciones de propiedades nutricionales y saludables y el Reglamento (CE) N° 258/1997 (UE, 1997) sobre nuevos alimentos. No requieren una autorización previa para su comercialización sino una notificación de puesta en el mercado, aunque en algunos estados miembros de la Unión Europea como Austria, Holanda, Suecia o el Reino Unido la notificación no es obligatoria (FVO, 2011).

El Real Decreto 1487/2009, de 26 de septiembre, relativo a los complementos alimenticios traspu-so a la legislación española la Directiva 2002/46/CE (UE, 2002b) relativa a la aproximación de las legislaciones de los estados miembros en materia de complementos alimenticios y estableció, entre otras cuestiones, los requisitos para la comercialización de complementos alimenticios, incluyendo su etiquetado, presentación y publicidad. Asimismo, determina en su anexo I las vitaminas y minerales que pueden utilizarse en la fabricación de los complementos alimenticios, especificando en su anexo II las sustancias o sales que pueden utilizarse como fuentes de vitaminas y minerales para que dichos nutrientes estén disponibles para el organismo.

Con respecto a las sustancias distintas de vitaminas y minerales, en el preámbulo del Real Decreto 1487/2009 se establece que hasta que no se fijen en la Unión Europea niveles máximos de nutrientes u otras sustancias con efecto nutricional o fisiológico, a efectos de los complementos alimenticios, se tendrán en cuenta los informes pertinentes del Comité Científico de la Alimentación Humana (SCF) y de otros organismos internacionales de reconocida solvencia científica.

Además, en el preámbulo de la Directiva 2002/46/CE, se indica que en la fabricación de los complementos alimenticios pueden emplearse las sustancias que hayan sido aprobadas por el Comité Científico de la Alimentación Humana, sobre la base de los criterios mencionados, para su utilización en la fabricación de alimentos destinados a lactantes y a niños de corta edad y otros alimentos para usos nutricionales particulares.

A este respecto, el Reglamento (CE) N° 953/2009 (UE, 2009) establece las sustancias que pueden añadirse para fines de nutrición específicos en alimentos destinados a una alimentación especial y la Directiva 2006/141/CE (UE, 2006b) relativa a los preparados para lactantes y preparados de continuación y su transposición en España a través del Real Decreto 867/2008 (BOE, 2008) regula la inclusión de determinadas sustancias en la composición básica de los preparados para lactantes.

Por el momento, la Comisión Europea no tiene previsto regular la utilización de otras sustancias distintas de vitaminas y minerales en los complementos alimenticios por lo que algunos estados miembros, entre los que se encuentran Bélgica, Dinamarca o Italia, aplican disposiciones anteriores a la Directiva 2002/46/CE o han elaborado disposiciones nacionales con posterioridad. También existen informes de evaluación de la seguridad de determinadas sustancias elaborados por organismos evaluadores nacionales, como es el caso de Francia, o de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA).

Por otra parte, la aprobación de una declaración de propiedades saludables para una determinada sustancia en el marco del Reglamento (CE) N° 1924/2006 no supone un aval de su seguridad puesto que EFSA únicamente valora la relación causa efecto entre la ingesta de una determinada cantidad de una sustancia y el efecto que se pretende alegar. Por ello, la autorización de una declaración de propiedades saludables no implica que se haya evaluado su seguridad y, tal como se indica en el Reglamento por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños (artículo 13.1), esta autorización de una declaración no constituye una autorización de comercialización de la sustancia a la que concierne la declaración, ni una decisión sobre la posibilidad de utilizar la sustancia en productos alimenticios ni la clasificación de un determinado producto como alimento (UE, 2012).

Actualmente, en España es posible comercializar complementos alimenticios que contengan sustancias autorizadas en otros estados miembros por el principio de reconocimiento mutuo en la Unión Europea, que garantiza la libre circulación de mercancías y servicios sin que sea necesario armonizar las legislaciones nacionales de los estados miembros. Así pues, la venta de un producto fabricado legalmente en un Estado miembro no puede estar prohibida en otro Estado miembro, aunque las condiciones técnicas o cualitativas difieran de las impuestas a los propios productos. La única excepción se produce en casos de interés general tales como la protección de la salud, los consumidores o el medio ambiente y es el caso de los complementos alimenticios que son considerados medicamentos por la autoridad competente de un Estado miembro y que, por tanto, no pueden ser comercializados como complemento alimenticio aunque tengan esa consideración en otro Estado miembro.

El Real Decreto 1487/2009, de 26 de septiembre, relativo a los complementos alimenticios sólo contempla actualmente a las vitaminas y minerales entre las sustancias autorizadas para la fabricación de los complementos alimenticios en España. La falta de regulación relativa a la fabricación en España de complementos alimenticios que contengan sustancias distintas de vitaminas y minerales impide su fabricación a nivel nacional, aunque no su comercialización a través de la

autorización obtenida en otro Estado miembro y el correspondiente reconocimiento mutuo. Por ello, la AECOSAN ha hecho distintas peticiones de evaluación de determinadas sustancias distintas de vitaminas y minerales para ser utilizadas en la fabricación de complementos alimenticios y sus correspondientes cantidades máximas diarias para su inclusión en un nuevo anexo III del Real Decreto 1487/2009.

Como continuación de los trabajos de actualización del Real Decreto 1487/2009, de 26 de septiembre, relativo a los complementos alimenticios, la AECOSAN solicita a su Comité Científico que realice una valoración respecto a la adecuación de la utilización de distintas sustancias como complementos alimenticios con el fin de incluirlas en el anexo III de dicho Real Decreto.

2. Propuesta

La AECOSAN ha elaborado la siguiente propuesta respecto a sustancias distintas de vitaminas y minerales que podrían ser autorizadas para su utilización en la fabricación de complementos alimenticios (Tabla 1).

Tabla 1. Sustancias y cantidades máximas propuestas por la AECOSAN para su utilización en la fabricación de complementos alimenticios	
Sustancia propuesta	Cantidad máxima diaria propuesta
Ácido L-aspártico	-
L-citrulina	-
Glicina	-
L-prolina	-
L-serina	-
L-arginina-L-aspartato	-
L-lisina-L-aspartato	-
L-lisina-L-glutamato	-
N-acetil-L-cisteína	300 mg
N-acetil-L-metionina	-
Hidroximetilbutirato	3 g
Ácido lipoico	-
<i>Monascus purpureus</i>	10 mg (Monacolina k)
Carbón activo	2 g
Lactulosa	10 g

3. Evaluación de las propuestas

3.1 Consideraciones generales

En los complementos alimenticios, como en el resto de los alimentos, no se pueden realizar ninguna declaración de propiedades nutricionales y/o saludables que no esté aprobada conforme al Reglamento (CE) Nº 1924/2006.

La valoración que realiza EFSA en el marco del Reglamento (CE) N° 1924/2006 se centra únicamente en el estudio de la relación causa-efecto entre la ingesta de una determinada sustancia y el efecto que se pretende alegar (eficacia y dosis a las que se produce el efecto) y en ningún caso supone una aprobación de dicha sustancia para su uso en el ámbito alimentario ni una evaluación de su seguridad.

Por todo esto, la solicitud de informe realizada al Comité Científico respecto a las sustancias a incluir en un nuevo anexo III sobre otras sustancias que pueden utilizarse en la fabricación de complementos alimenticios (Real Decreto 1487/2009), se limita a su seguridad a las dosis propuestas para ser utilizadas en la fabricación de complementos alimenticios, dado que la eficacia de las mismas se valora y regula a nivel europeo en el ámbito del Reglamento (CE) N° 1924/2006.

Los complementos alimenticios tienen la finalidad de complementar la dieta normal y suponen un aporte adicional de vitaminas, minerales u otras sustancias con efecto nutricional o fisiológico. La aportación de una cantidad concentrada de nutrientes u otras sustancias puede suponer un riesgo de exceso de su ingesta por parte de la población que los consume. Además, en el caso de mujeres embarazadas o lactantes, niños, ancianos y enfermos, el uso de complementos alimenticios sólo debe realizarse si existen razones que lo justifiquen ya que la evaluación de la seguridad de su uso se refiere a adultos con una situación fisiológica normal.

En ningún caso deben sustituir al uso de medicamentos sin una supervisión médica adecuada. Las personas que sigan tratamientos con medicamentos que contengan sustancias presentes en complementos alimenticios deben consultar a su médico para evitar una sobredosificación.

Hay que tener en cuenta que el consumo de complementos que contengan sustancias que se encuentren de forma natural en los alimentos puede implicar una ingesta total superior a la cantidad máxima establecida para dichas sustancias en su uso como complemento alimenticio. Los complementos alimenticios sólo deben utilizarse para complementar la dieta y, de forma general, su uso no es necesario si se sigue una dieta variada y equilibrada, a la que no pueden reemplazar.

Referencias

- BOE (2008). Real Decreto 867/2008, de 23 de mayo, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria específica de los preparados para lactantes y de los preparados de continuación. BOE N° 131 de 30 de mayo de 2008, pp: 25121-25137.
- BOE (2009). Real Decreto 1487/2009, de 26 de septiembre, relativo a los complementos alimenticios. BOE N° 244 de 9 de octubre de 2009, pp: 85370-85378.
- FVO (2011). Food and Veterinary Office. Report on a desk study on official controls in the field of food supplements. Health & Consumer Directorate-General. European Commission.
- UE (1997). Reglamento (CE) N° 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de enero de 1997, sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios. DO L 43 de 14 de febrero de 1997, pp: 1-10.
- UE (2002a). Reglamento (CE) N° 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. DO L 31 de 1 de febrero de 2002, pp: 1-24.
- UE (2002b). Directiva 2002/46/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 10 de junio de 2002, relativa a la

aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de complementos alimenticios. DO L 183 de 12 de julio de 2002, pp: 51-57.

UE (2006a). Reglamento (CE) N° 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre de 2006, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos. DO L 404 de 30 de diciembre de 2006, pp: 9-25.

UE (2006b). Directiva 2006/141/CE de la Comisión, de 22 de diciembre de 2006, relativa a los preparados para lactantes y preparados de continuación y por la que se modifica la Directiva 1999/21/CE. DO L 401 de 30 de diciembre de 2006, pp: 1-33.

UE (2009). Reglamento (CE) N° 953/2009 de la Comisión, de 13 de octubre de 2009, sobre sustancias que pueden añadirse para fines de nutrición específicos en alimentos destinados a una alimentación especial. DO L 269 de 14 de octubre de 2009, pp: 9-19.

UE (2012). Reglamento (UE) N° 432/2012 de la Comisión, de 16 de mayo de 2012, por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños. DO L 136 de 25 de mayo de 2012, pp: 1-40.

4. Aminoácidos

4.1 Propuesta

La AECOSAN ha propuesto la inclusión de distintos aminoácidos en el Real Decreto 1487/2009 sin especificar una cantidad máxima diaria, salvo en el caso de la N-acetil-L-cisteína. La solicitud se basa en que están admitidos en la elaboración de alimentos destinados a usos médicos especiales, tal como se recoge en el anexo del Reglamento (CE) N° 953/2009.

4.2 Ácido L-aspártico

El ácido L-aspártico es un aminoácido no esencial, lo que indica que puede ser sintetizado en el organismo. El organismo es capaz de sintetizar el 80 % del total de los aminoácidos y el 20 % restante se debe obtener de la dieta.

El ácido L-aspártico está presente en alimentos de consumo frecuente de origen animal y vegetal, y es un metabolito del edulcorante aspartamo.

4.2.1 Características y fuentes

El ácido L-aspártico, tiene un peso molecular de 133,1 g/mol. Su fórmula estructural es la siguiente (Figura 1):

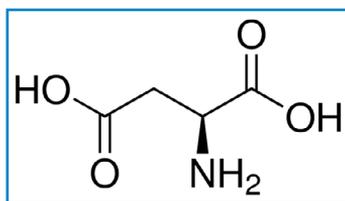


Figura 1. Fórmula estructural del ácido L-aspártico.

La concentración en el plasma sanguíneo oscila entre 0,01 y 0,3 mg/100 y en la orina (mg/24 horas) es de 165 mg, estando 2 mg en forma libre y 163 mg como conjugado (Hernández y Sastre, 1999). El ácido aspártico se encuentra en los cereales y legumbres (garbanzos, lentejas y soja), tubérculos como la patata, frutos secos como los cacahuetes y productos marinos como el salmón y las gambas.

El aditivo aspartamo, usado como edulcorante, es una fuente exógena de ácido L-aspártico, pues se metaboliza en aspártico, fenilalanina y cantidades de metanol (Gil, 2005).

4.2.2 Nutrición y metabolismo

El ácido L-aspártico, está relacionado reversiblemente con el oxalacetato mediante la enzima aspartatoaminotransferasa. Este aminoácido interviene en la síntesis de bases púricas y pirimidínicas y en la ureogénesis (Gil, 2005).

Sufre, como todos los aminoácidos, dos reacciones de biotransformación. Una reacción de transaminación, catalizada por transaminasas, por la que un aminoácido se convierte en otro. Este tipo de reacciones, se lleva a cabo en el citosol de la célula y en las mitocondrias. Las transaminasas son fundamentalmente la alanina-aminotransferasa y la aspartato-aminotransferasa, ambas requieren como cofactor el piridoxalfosfato, que es un derivado de la vitamina B₆ o piridoxina.

La segunda reacción es la desaminación oxidativa, que se lleva a cabo en las mitocondrias. En ellas, la enzima ácido glutámico-deshidrogenasa elimina el grupo amino del ácido glutámico. De esta manera, se forma urea y las cadenas carbonadas son productos de la glucolisis y del ciclo de Krebs. Así, el producto de desaminación del aspártico es el fumarato.

El ácido aspártico también interviene en el metabolismo del ADN y tiene funciones de neurotransmisor (Gil, 2005).

4.2.3 Seguridad

El exceso de ácido L-aspártico puede producir neurotoxicidad en animales y concretamente lesiones hipotalámicas en ratas (Schnainker y Olney, 1974). En humanos, según el *Food and Nutrition Board* (FNB/IOM, 2002), no se han comunicado efectos adversos al administrar suplementos de 8 g al día además del aspártico de la dieta.

Tada et al. (2008), llevaron a cabo un estudio de toxicidad subcrónica en ratas, donde los autores fijan un NOAEL (*No observed adverse effect level*) para ratas hembras de 715,2 mg/kg/día y de 696,6

mg/kg/día para ratas macho. Si se considera el NOAEL más bajo de 696,6 mg/kg/día (700 mg/kg/día) y se emplea como factor de incertidumbre 100, la IDA (ingesta diaria admisible) será de 7 mg/kg/día.

Lo que, para una persona de 70 kg, permitiría una ingestión diaria de 490 mg de ácido L-aspartico.

Hay que considerar que este aminoácido forma parte de alimentos básicos y se ingiere como metabolito del edulcorante aspartamo.

4.2.4 Conclusión

El Comité Científico concluye que, en función de la información disponible en la actualidad y teniendo en cuenta las consideraciones generales reflejadas en el presente informe, existen ensayos de toxicidad subcrónica en ratas a partir de los que se puede estimar que la ingestión diaria de 490 mg de ácido L-aspartico es admisible desde el punto de vista de su seguridad en su uso como complemento alimenticio.

Por otra parte hay que tener en cuenta que este aminoácido forma parte de alimentos básicos y también se ingiere como metabolito del edulcorante aspartamo.

Referencias

- FNB/IOM (2002). Food and Nutrition Board/Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes. Disponible en: http://www.nal.usda.gov/fnic/DRI/DRI_Energy/energy_full_report.pdf [acceso 22-09-15].
- Gil, A. (2005). En libro: *Tratado de Nutrición (tomo I)*. Madrid. Editorial Acción Médica.
- Hernández, M. y Sastre, A. (1999). En libro: *Tratado de Nutrición*. Madrid. Editorial Díaz de Santos.
- Schnainker, B. y Olney, J.W. (1974). Glutamate-type hypothalamic-pituitary syndrome in mice treated with aspartate or cysteate in infancy. *Journal of Neural Transmission*, 35, pp: 207-215.
- Tada, Y., Yano, N., Takahashi, H., Yuzawa, K., Ando, H., Kubo, Y., Nagasawa, A., Uehara, S., Ogata, A. y Nakae, D. (2008). Toxic effect of l-aspartic acid at high dose levels on kidneys and salivary glands in Fischer 344 rats detected in a 90-day feeding study. *Food and Chemical Toxicology*, 46 (8), pp: 2789-95.

4.3 L-citrulina

4.3.1 Características y fuentes

La L-citrulina es un α -aminoácido perteneciente al grupo de los aminoácidos no proteicos. Se corresponde con el ácido (2S)-2-amino-5-(carbamoilamino) pentanoico y su fórmula química es $C_6H_{13}N_3O_3$ (Figura 2):

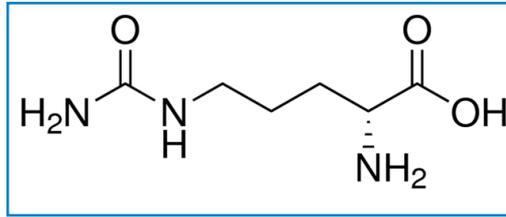


Figura 2. Fórmula estructural de la L-citrulina.

Se encuentra a niveles elevados en algunas cucurbitáceas tales como sandía, pepino, calabaza, calabacín, etc. (Kaore y Kaore, 2014), y en ciertas algas como *Grateloupia vulgaris* (Curis et al., 2005).

También está presente en verduras como las cebollas y ajos, y en alimentos proteicos como pescados, carne, legumbres y leche.

4.3.2 Nutrición y metabolismo

La L-citrulina es un aminoácido no esencial precursor de la L-arginina que forma parte del ciclo de la urea.

En el metabolismo de la citrulina libre intervienen tres enzimas: óxido nítrico sintasa (NOS) y ornitina carbamoiltransferasa (OCT) que producen citrulina, y argininosuccinato sintasa (ASS) que la transforma en arginina. La distribución tisular de estas enzimas da lugar a tres rutas metabólicas para la citrulina. En primer lugar, en el hígado la citrulina se sintetiza por la OCT y se metaboliza por la ASS para la producción de urea. En segundo lugar, en la mayoría de los tejidos que producen NO, la citrulina se recicla a arginina vía ASS para aumentar la disponibilidad de arginina para la producción de NO. Finalmente, en tercer lugar, la citrulina se sintetiza en el intestino a partir de glutamina (mediante la OCT), es liberada a la sangre y convertida a arginina en el riñón (por la ASS). De esta forma, la citrulina circulante es de hecho una forma enmascarada de la arginina para evitar ser captada por el hígado (Curis et al., 2005).

Varias proteínas contienen citrulina como resultado de una modificación post-traducciona. Estos residuos de citrulina son generados por una familia de enzimas llamadas Peptidil-Arginina Deiminadas (PADs), las cuales convierten arginina en citrulina en un proceso llamado citrulinación o deiminación. Proteínas que normalmente contienen residuos de citrulina incluyen: proteína básica de mielina (MBP), filagrina, y varias proteínas histonas, mientras que otras proteínas, tales como la fibrina y vimentina son susceptibles a la citrulinación durante la muerte celular y la inflamación de tejidos.

4.3.3 Seguridad

Son escasos los estudios de toxicidad realizados con L-citrulina. Pradilla et al. (2012) no observaron síntomas de toxicidad sistémica o neuronal en un análisis histopatológico en ratones expuestos por vía intraperitoneal hasta 200 mg/kg cada 8 horas durante 90 días.

Los estudios realizados en humanos no indican efectos tóxicos de la citrulina. Entre las dosis orales más altas usadas se encuentran 0,18 g/kg/día (aproximadamente 12,6 g/día considerando 70 kg de peso) durante 7 días (Thibault et al., 2011) y 15 g en dosis única (Moinard et al., 2008). No obstante, éste último aconsejaba una dosis de 10 g para su uso en la práctica clínica ya que dosis superiores no suponían un beneficio mayor. En estudios de suplementación a más largo plazo, por ejemplo Figueroa et al. (2015), no mencionan efectos adversos tras la administración oral de 6 g/día de L-citrulina durante 8 semanas en mujeres mayores. De igual forma, Rajantie et al. (1980) en niños tratados durante 2 años con 2-2,8 mg/día no advierten de signos de toxicidad.

EFSA ha publicado una opinión científica relativa a la verificación de una declaración de salud relativa a citrulina-malato: recuperación más rápida de la fatiga muscular tras el ejercicio, con resultado negativo (EFSA, 2014). En la solicitud se recomendaba una dosis diaria de 2-3 g para niños y 3-6 g para adultos, siendo la población diana niños sanos a partir de 6 años y adultos. Se debía tomar con las comidas, no se debía consumir durante el embarazo y lactancia, y el consumo no debía exceder de 4 semanas.

Tal y como se ha comentado previamente, la L-citrulina es un precursor de la L-arginina. A diferencia de la arginina que es extensamente captada por el hígado y metabolizada a urea, la citrulina sintetizada en el intestino pasa libremente a través del hígado, y es captada por el riñón (Osowska et al., 2004). En este órgano, aproximadamente el 80 % de la citrulina se transforma a arginina (Kaore y Kaore, 2014). Por ello, distintos autores consideran a la L-citrulina una buena alternativa a la suplementación con arginina (Hartman et al., 1994) (Osowska et al., 2004) al ser esta última catalizadora de la ureagénesis (Curis et al., 2005). Para la L-arginina, la AECOSAN propuso una cantidad máxima diaria de 3 g en su uso como complemento alimenticio (AECOSAN, 2012) a pesar de poderse establecer un *Observed Safe Level* (OSL) de 20 g/día con un nivel de confianza suficiente.

4.3.4 Conclusión

No se encuentran datos en la bibliografía científica de efectos adversos o alteraciones clínicas debidas a la ingesta oral de L-citrulina, por lo que no se puede establecer un valor de NOAEL/LOAEL para su administración oral. La AECOSAN propuso en 2012 una ingesta máxima diaria de 3 g para la L-arginina que fue considerada aceptable por el Comité Científico dado que existe un *Observed Safe Level* (OSL) de 20 g/día. Puesto que la L-citrulina es un precursor de ésta, el mismo valor, 3 g, es aceptable desde el punto de vista de su seguridad en su uso como complemento alimenticio, ya que existen estudios de suplementación con dosis mayores a largo plazo que no refieren signos de toxicidad.

Referencias

- AECOSAN (2012). Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre condiciones de uso de determinadas sustancias distintas de vitaminas, minerales y plantas para ser empleadas en complementos alimenticios-1. *Revista del Comité Científico de la AECOSAN*, 17, pp: 11-234.
- Curis, E., Nicolis, I., Moinard, C., Osowska, S., Zerrouk, N., Benazeth, S. y Cynober, L. (2005). Almost all about citrulline in mammals. *Amino Acids*, 29, pp: 177-205.
- EFSA (2014). European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to

- citrulline-malate and faster recovery from muscle fatigue after exercise pursuant to Article 13(5) of Regulation (EC) No 1924/20061. *The EFSA Journal*, 12 (5), pp: 3650.
- Figuroa, A., Álvarez-Alvarado, S., Ormsbee, M., Madzima, T.A., Campbell, J.C. y Wong, A. (2015) Impact of L-citrulline supplementation and whole-body vibration training on arterial stiffness and leg muscle function in obese postmenopausal women with high blood pressure. *Experimental Gerontology*, 63, pp: 35-40.
- Hartman, W.J., Torre, P.M. y Prior, R.L. (1994). Dietary citrulline but not ornithine counteracts dietary arginine deficiency in rats by increasing splanchnic release of citrulline. *Journal of Nutrition*, 124, pp: 1950-1960.
- Kaore, S.N. y Kaore, N.M. (2014). Capítulo 53. En libro: *Citrulline: pharmacological perspectives and role as a biomarker in diseases and toxicities. Biomarkers in Toxicology* (Elsevier). pp: 883-905.
- Moinard, C., Nicolis, I., Neveux, N., Darquy, S., Benazeth, S. y Cynober, L. (2008). Dose-ranging effects of citrulline administration on plasma amino acids and hormonal patterns in healthy subjects: the Citrudose pharmacokinetic study. *British Journal of Nutrition*, 99, pp: 855-862.
- Osowska, S., Moinard, C., Neveux, N., Loi, C. y Cynober, L. (2004). Citrulline increases arginine pools and restores nitrogen balance after massive intestinal resection. *Gut*, 53, pp: 1781-1786.
- Pradilla, G., Garzon-Muvdi, T., Ruzevick, J., Bender, M., Edwards, L., Momin, E.N., Thompson, R.C. y Tamargo, R. (2012). Systemic L-citrulline prevents cerebral vasospasm in haptoglobin 2-2 transgenic mice after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*, 70 (3), pp: 747-756.
- Rajantie, J., Simell, O., Rapola, J. y Perheentupa, J. (1980). Lysinuric protein intolerance: A two-year trial of dietary supplementation therapy with citrulline and lysine. *The Journal of Pediatrics*, 97, pp: 927-932.
- Thibault, R., Flet, L., Vavas seur, F., Lemerle, M., Ferchaud-Roucher, V., Picotf, D. y Darmaun, D. (2011). Oral citrulline does not affect whole body protein metabolism in healthy human volunteers: Results of a prospective, randomized, double-blind, cross-over study. *Clinical Nutrition*, 30, pp: 807-811.

4.4 Glicina

La glicina ha sido clasificada como un aminoácido nutricionalmente no esencial para mamíferos debido a que es sintetizado de forma endógena. Sin embargo, se conoce que la cantidad de glicina sintetizada *in vivo* puede ser en ocasiones insuficiente y en estados crónicos de insuficiencia de glicina, entre otros efectos adversos, se han descritos efectos sobre el crecimiento y el sistema inmune (De Koning et al., 2003) (Lewis et al., 2005). Por ello, en la actualidad se cuestiona considerar a la glicina como un aminoácido condicionalmente esencial en el hombre principalmente para un óptimo crecimiento (Wu et al., 2013).

4.4.1 Características y fuentes

La glicina es un aminoácido de pequeño tamaño que se coloca en el interior hidrofóbico de las proteínas. Su resto es polar, pero sin carga. La glicina posee la cadena más simple, un átomo de hidrógeno. El peso molecular de este aminoácido es 75,07 g/mol y su fórmula estructural es la siguiente (Figura 3):

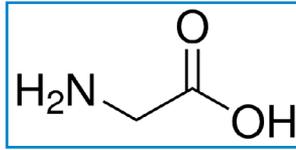


Figura 3. Fórmula estructural de la glicina.

Su punto isoeléctrico es 5,97. Se encuentra tanto en alimentos de origen animal tales como carnes, pescado, huevos y productos lácteos como en vegetales como las legumbres, verduras, patatas, frutas y cereales integrales.

La glicina tiene múltiples funciones fisiológicas. Es el principal componente del colágeno y la elastina que son las proteínas más abundantes en el organismo corporal. La glicina es el precursor de diversos e importantes metabolitos de bajo peso molecular tales como porfirinas, purinas, glutatión, grupo hemo y creatinina.

La glicina destaca como neurotransmisor inhibitorio en el SNC (Sistema Nervioso Central), jugando un papel importante en los tejidos nerviosos, así como también en la regulación epigenética. Por ello, algunos autores han descrito a la glicina como un aminoácido funcional en el campo de la nutrición (Zhong et al., 2003).

Se han identificado tres fases para la síntesis de glicina en animales y en el hombre (Wang et al., 2013). La glicina se sintetiza a partir de: 1) la serina, vía serina hidroximetiltransferasa (SHMT); 2) la colina, vía formación de sarcosina; y 3) la treonina, vía treonina dehidrogenasa.

4.4.2 Nutrición y metabolismo

El metabolismo de la glicina ocurre a través de tres fases: 1) decarboxilación y deaminación de la glicina por un sistema enzimático complejo; 2) conversión a serina por la enzima SHMT; y 3) conversión a glioxilato por la D-aminoacido oxidasa (Figura 4).

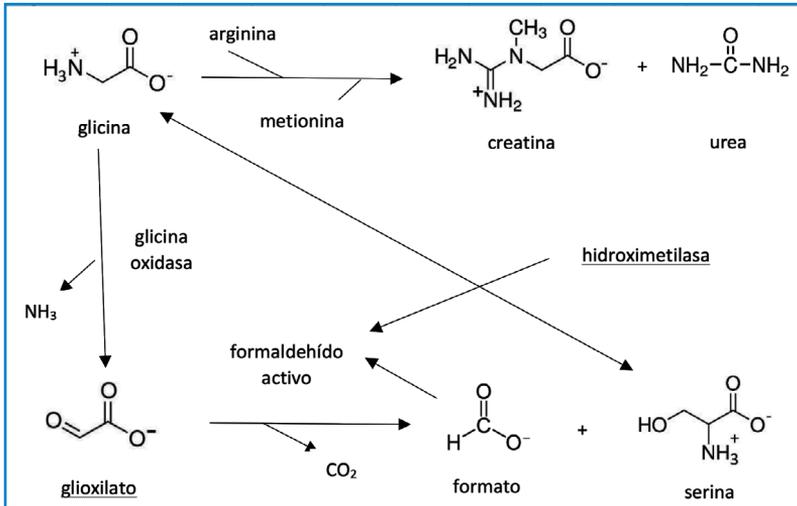


Figura 4. Metabolismo de la glicina. Fuente: (Wang et al., 1985).

La glicina y la serina tienen un metabolismo relacionado, ya que ambos derivan del ácido 3-P-glicérico, que es un intermediario de la glicólisis. Este ácido es oxidado y posteriormente transaminado para formar la 3-P-serina, que por hidrólisis del grupo fosfato formará la serina. La glicina se sintetiza a partir de la serina, en una reacción donde el tetrahidrofolato se convierte en N5,N10-Metilen tetrahidrofolato, quedando un resto de glicina (Gil, 2005).

La glicina tiene un receptor no-gabaérgico, que es común con otros aminoácidos como β -alanina, taurina, L-alanina, L-serina y prolina. Este receptor está localizado en las membranas neuronales postsinápticas (Matilla et al., 2002).

La glicina es también un aminoácido que forma parte de las reacciones de conjugación o de FASE II en la biotransformación de los tóxicos y fármacos. Mediante la enzima glicina N-acetil transferasa, forma conjugados con xenobióticos que pueden ser más fácilmente eliminados. Así, el ácido benzoico y el ácido salicílico son conjugados por la glicina (Repetto y Repetto, 2009).

4.4.3 Seguridad

Actualmente, no existen estudios suficientes de toxicidad de este aminoácido en animales y en el hombre que puedan ser objeto de un análisis para poder fijar un NOAEL. Futuros estudios podrán ayudar a elucidar la naturaleza de las alteraciones morfológicas celulares cerebrales inducidas por la administración de glicina. La *Federation of American Societies for Experimental Biology* para la *Food and Drug Administration* (FDA/FASEB, 1993) señala que el consumo de aminoácidos en forma de suplementos dietéticos puede suponer un riesgo para varios grupos de población con mujeres en edad fértil, niños, adolescentes, ancianos y personas enfermas. Hemos de tener en cuenta, que la glicina es sintetizada por el organismo y además está presente en alimentos de origen animal y vegetal. Desde el punto de vista de la seguridad, no existen datos que permitan fijar una cantidad de

ingesta diaria para el hombre. EFSA (2014) apunta que altas concentraciones de glicina del orden de 20 g/kg de alimento es segura para perros y gatos.

Se viene cuestionando sobre el papel de la glicina y otros aminoácidos excitatorios en la producción de neurodegeneración en el hombre. La aplicación de terapias a largo plazo con glicina en casos de esquizofrenia está asociada con efectos neurotóxicos. Se ha observado muerte neuronal inducida por isquemia con altos niveles de glutamato, glicina y ácido γ -amino butírico (Baker et al., 1991) (Globus et al., 1991).

Los primeros estudios realizados en animales de experimentación al objeto de recoger datos sobre la potencial neurotoxicidad de la glicina fueron realizados por Shoham et al. (1999). Ratas tratadas, como suplemento en dieta, durante 2 semanas con dosis de glicina 0,8 g/kg/día, y con dosis de 3,2 g/kg/día (cuatro veces las utilizadas en ensayos clínicos) no demostraron alteraciones morfológicas en las células cerebrales. Sin embargo, un tratamiento más prolongado, regímenes de 1 g/kg/día ó 5 g/kg/día durante 5 meses aunque no se demostró evidencia de degeneración neuronal si se observó una reducción de los canales de Ca^{++} (tipo-N, clase B) en regiones específicas cerebrales que podría ser una adaptación general al tratamiento de glicina a largo plazo (Shoham et al., 2001).

4.4.4 Conclusión

El Comité Científico considera que la información toxicológica disponible es insuficiente para determinar cuál sería la cantidad máxima diaria de glicina que se podría considerar segura en su uso como complemento alimenticio.

Referencias

- Baker, A.J., Zernon, M.H., Sheller, M.S., Yaksh, T.L., Skilling, S.R., Smullin, D.H., Larson, A.A. y Kuczenski, R. (1991). Changes in extracellular concentration of glutamate, aspartate, glycine, dopamine, serotonin, and dopamine metabolites after transient global ischemia in the rabbit brain. *Journal of Neurochemistry*, 57, pp: 1370-1379.
- De Koning, T.J., Snell, K., Duran, M., Berger, R., Poll-The, B.T. y Surtees, R. (2003). L-serine in disease and development. *Biochemical Journal*, 371 (3), pp: 653-661.
- EFSA (2014). European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the safety and efficacy of the use of amino acids (chemical group 34) when used as flavourings for all animal species. *The EFSA Journal*, 12 (5), 3670, pp: 1-19.
- FDA/FASEB. (1993). Food and Drug Administration. Center for food Safety and Applied Nutrition. Illnesses and injuries associated with the use of selected dietary supplements. Disponible en: <http://www.cfsan.fda.gov/dms/ds-ill.html> [acceso 17-04-07].
- Gil, A. (2005). El libro: *Tratado de nutrición (tomo I)*. Editorial Acción Médica. Madrid.
- Globus, M.Y.T., Ginsberg, M.D. y Busto, R. (1991). Excitotoxicity index -a biochemical marker of selective vulnerability. *Neuroscience Letters*, 127, pp: 39-42.
- Lewis, R.M., Godfrey, K.M., Jackson, A.A., Cameron, I.T. y Hanson, M.A. (2005). Low serine hydroxymethyltransferase activity in the human placenta has important implications for fetal glycine supply. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90 (3), pp: 1594-1598.
- Matilla, B., Mauriz, J.L., Culebras, J.M., González-Gallego, J. y González, P. (2002). La glicina: un nutriente antioxidante protector celular. *Nutrición Hospitalaria*, XVII (1), pp: 2-9.
- Repetto, M. y Repetto, G. (2009). En libro: *Toxicología fundamental*. Ediciones Díaz de Santos. Madrid.
- Shoham, S., Javitt, D.C. y Heresco-Levy, U. (1999). High dose glycine nutrition affects glial cell morphology in rat hippocampus and cerebellum. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 2, pp: 35-40.

Shoham, S., Javitt, D.C. y Heresco-Levy, U. (2001). Chronic high-dose glycine nutrition: effects on rat brain cell morphology. *Biological Psychiatry*, 49, pp: 876-885.

Wu, G., Wu, Z., Dai, Z., Yang, Y., Wang, W., Liu, C., Wang, B., Wang, J.W. y Ying, Y. (2013). Dietary requirements of nutritionally non-essential amino acids by animals and humans. *Amino acids*, 44, pp: 1107-1113.

Zhong, Z., Wheeler, M.D., Li, X., Froh, M., Schemmer, P. y Yin, M. (2003). L-Glycine: a novel antiinflammatory, immunomodulatory, and cytoprotective agent. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolism Care*, 6, pp: 229-240.

4.5 L-prolina

4.5.1 Características y fuentes

La L-prolina es un aminoácido proteico cuyo α -amino no es una amina primaria sino secundaria. Se corresponde con el ácido (S)-pirrolidin-2-carboxílico y su fórmula química es $C_5H_9NO_2$. Su fórmula estructural es la siguiente (Figura 5):

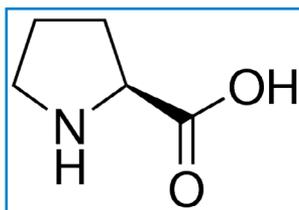


Figura 5. Fórmula estructural de la L-prolina.

Entre los alimentos ricos en L-prolina se encuentra la gelatina, la corteza de cerdo, la proteína de soja, algunos quesos o la leche en polvo.

4.5.2 Nutrición y metabolismo

La L-prolina es un aminoácido no esencial que se forma a partir de glutamato y que puede originar glutamato en su metabolización.

El semialdehído glutámico, que se forma de manera reversible a partir de glutamato mediante la glutamato quinasa y deshidrogenasa, puede transformarse reversiblemente en pirrolina-5-carboxilato para conectar con la formación de la prolina mediante la pirrolina carboxilato reductasa (Lehninger et al., 1995).

Es un aminoácido fundamental en la estructura del colágeno, sobre todo tras su formación pos-traducciona en hidroxiprolina, con el concurso de la vitamina C (Sánchez de Medina, 2010).

La hiperprolinemia es una enfermedad metabólica congénita que se produce cuando el aminoácido prolina no se puede degradar correctamente dando lugar a un aumento de sus niveles en sangre y orina. Se han descrito dos formas, la tipo I y la tipo II, debidas a deficiencias en las actividades de la prolina oxidasa y la ácido 1-pirrolina-5-carboxílico deshidrogenasa, respectivamente (Wise y Netto, 2011). En clínica estos pacientes presentan distintos fenotipos, algunos muestran defectos neurológicos, renales y/o auditivos mientras que otros son asintomáticos (Mitsubuchi et al., 2008) (Ferreira et al., 2014).

4.5.3 Seguridad

Existen diversos estudios de toxicidad de la prolina. Kampel et al. (1990) expusieron ratas por vía oral durante un mes a 50 mg/kg/día (~9 mg/día) de D-prolina y L-prolina. Se observaron cambios histopatológicos severos en el hígado (fibrosis y necrosis) y en el riñón (lesiones tubulares severas) en el grupo expuesto a D-prolina, sin embargo en el expuesto a L-prolina no se detectaron lesiones. Parámetros séricos como GOT, GPT, fosfatasa alcalina, gGT, LDH, HBDH y creatinina también estaban elevados de forma significativa en comparación con el control y el grupo expuesto a L-prolina. La toxicidad por tanto parece ser específica del isómero D, aunque los autores concluyeron que los efectos tóxicos no eran debidos a la D-prolina, ya que no se pudo detectar en los tejidos y el suero, sino a algún intermediario metabólico de la conversión de la D a la L-prolina.

Tada et al. (2010) realizaron un estudio subcrónico (90 días) por vía oral en ratas expuestas a 0; 0,625; 1,25; 2,5 y 5 % de L-prolina en la dieta. No observaron mortalidad ni signos clínicos. No obstante, sí encontraron cambios significativos en algunos parámetros de la hematología y bioquímica clínica, en el peso final de hembras 0,625 %, en el peso relativo del bazo de machos a partir de 2,5 % y en del hígado del grupo al 5 %, etc. Sin embargo, en el estudio histopatológico no encontraron daños que pudieran asociar al tratamiento. Concluyeron que los daños, aun siendo atribuibles al tratamiento eran insignificantes desde el punto de vista toxicológico. Por ello, establecieron como NOAEL la dosis administrada al grupo de 5 % de L-prolina en la dieta, 2 772,9 mg/kg/día para machos y 3 009,3 mg/kg/día para hembras (aproximadamente 194 g/día en humanos considerando el peor caso y un peso de 70 kg).

Existen evidencias desde antiguo que sugieren que la L-prolina puede actuar como modulador neuronal o transmisor en el sistema nervioso central (Takemoto y Semba, 2006). Parece haber una relación causal entre la hiperprolinemia tipo II y las manifestaciones neurológicas en la infancia (Phang et al., 2001). Se ha observado que la prolina tiene efectos adversos sobre el sistema nervioso (Nadler et al., 1988) (Moreira et al., 1989). Nadler et al. (1988) observaron que la L-prolina a una dosis de 400 nmol o mayor destruía el 32-66 % de las células piramidales y granulares en ratas a las que se les inyectó en el hipocampo, considerando a este aminoácido no sólo neuroexcitador sino también neurotóxico. También, Delwing et al. (2003) observaron que se producía estrés oxidativo en el córtex neuronal de ratas expuestas a una inyección subcutánea de 12,8 µmol/g (isómero no revelado), dosis seleccionada para alcanzar en el plasma niveles de prolina de 1-2 mM, similar a la que se encuentra en los pacientes con hiperprolinemia tipo II (Phang et al., 2001). De igual modo, se observó daño oxidativo en el ADN, proteínas y lípidos de la sangre de ratas a las que se les indujo experimentalmente una hiperprolinemia crónica, mediante la administración de entre 12,8 y 18,2 µmol/g de prolina (isómero sin identificar) entre los días 6 y 28 de vida (Ferreira et al., 2014).

Hay otros autores, sin embargo, que consideran inocua a la hiperprolinemia. Así, Hayasaka et al. (1985), en diferentes casos clínicos realizaron una suplementación con prolina durante 5 años con dosis de hasta 10 g/día durante 2 años, y no hicieron referencia alguna a efectos tóxicos.

La prolina no fue mutagénica por el test de Ames (isómero no especificado, 800 mg/kg (Green y Savage, 1978)); 2mM (L) (Sargentini y Smith, 1986), pero la L-prolina (10, 50, 100 µg/ml) sí produjo un

aumento de intercambio de cromátidas hermanas no dependiente de la concentración en linfocitos humanos (Xing y Na, 1996).

El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos alimentarios (JECFA) evaluó la L-prolina en su uso como aditivo alimentario y concluyó que no era un motivo de preocupación ya que su ingesta a través de los alimentos (5 210 mg/día) era mucho mayor (45 000 veces) que como aditivo alimentario (JECFA, 2006).

4.5.4 Conclusión

Tomando como referencia el estudio de Tada et al. (2010) por vía oral en ratas, en el que se establece como menor valor de NOAEL 2 772,9 mg/kg/día (aproximadamente 194 g/día en humanos considerando un peso de 70 kg) y utilizando un factor corrector de 1 000, dado que sí se observan alteraciones, se propone una cantidad máxima en complementos alimenticios de 2,8 mg/kg/día (aproximadamente 200 mg/día) de L-prolina en adultos. Esta recomendación se refiere a L-prolina y no a D-prolina o mezclas racémicas cuyo nivel de seguridad es menor. No se debe suministrar prolina a individuos con hiperprolinemia congénita, en especial a niños.

Referencias

- Delwing, D., Bavaresco, C.S., Wannmacher, C.M., Wajner, M., Dutra-Filho, C.S. y Wyse, A.T. (2003). Proline induces oxidative stress in cerebral cortex of rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 21, pp: 105-110.
- Ferreira, A., Scherer, E., da Cunha, A., Manfredini, V., Biancini, G., Vanzin, C., Vargas, C. y Wyse, A. (2014) Hyperprolinemia induces DNA, protein and lipid damage in blood of rats: Antioxidant protection. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 54, pp: 20-25.
- Green, N.R. y Savage, J.R. (1978). Screening of safrole, eugenol, their ninhydrin positive metabolites and selected secondary amines for potential mutagenicity. *Mutation Research*, 57, pp: 115-121.
- Hayasaka, S., Saito, T., Nakajima, H., Takahashi, O., Mizuno, K. y Tada, K. (1985) Clinical trials of vitamin B6 and proline supplementation for gyrate atrophy of the choroid and retina. *British Journal of Ophthalmology*, 69, pp: 283-290.
- JECFA (2006). Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Sixty-third meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, *WHO Food Additives Series*: 54. IPCS, WHO, Geneva.
- Kampel, D., Kupferschmidt, R. y Lubec, G. (1990). Toxicity of D-proline. En libro: *Amino Acids: Chemistry, Biology and Medicine*. Lubec, G. y Rosenthal, G.A. (Eds.), ESCOM, Leiden, The Netherlands. pp: 1164-1171.
- Lehninger, A., Nelson, D. y Cox, M. (1995). Cap. 21: Biosíntesis de aminoácidos, nucleótidos y moléculas relacionadas. En libro: *Principios de Bioquímica* (II Ed). Ediciones Omega. Barcelona. pp: 688-735.
- Mitsubuchi, H., Nakamura, K., Matsumoto, S. y Endo, F. (2008). Inborn errors of proline metabolism. *Journal of Nutrition*, 138, pp: 2016-2020.
- Moreira, J.C.F., Wannmacher, C.M.D., Costa S.M. y Wajner M. (1989). Effect of proline administration on rat behavior in aversive and nonaversive tasks. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 32, pp: 885-890.
- Nadler, J.V., Wang, A. y Hakim, A. (1988). Toxicity of L-proline toward rat hippocampal neurons. *Brain Research*, 456, pp: 168-172.
- Phang, J.M., Hu, C.A. y Valle, D. (2001). Disorders of proline and hydroxyproline metabolism. En libro: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed*. Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. y Valle, D. (Eds.), McGraw-Hill, New York. pp: 1821-1838.

- Sánchez de Medina, F. (2010). Metabolismo de los aminoácidos. En libro: *Tratado de Nutrición*. Gil A (Ed). pp: 451-484.
- Sargentini, N.J. y Smith, K.C. (1986). Mutagenesis by normal metabolites in *Escherichia coli*: Phenylalanine mutagenesis is dependent on error-prone DNA repair. *Mutation Research*, 161, pp: 113-118.
- Tada, Y., Yano, N., Takahashi, H., Yuzawa, K., Ando, H., Kubo, Y., Nagasawa, A., Ohashi, N., Ogata, A. y Nakae, D. (2010). Toxicological evaluation of L-proline in a 90-day feeding study with Fischer 344 rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 58, pp: 114-120.
- Takemoto, Y. y Semba, R. (2006) Immunohistochemical evidence for the localization of neurons containing the putative transmitter L-proline in rat brain. *Brain Research*, 1073-1074, pp: 311-315.
- Xing, W. y Na, R. (1996). Amino acids excess increase SCEs in human lymphocytes. *Mutation Research*, 372, pp: 75-78.
- Wise, A. y Netto, C. (2011). Behavioral and neurochemical effects of proline. *Metabolic Brain Disease*, 26, pp: 159-172.

4.6 L-serina

La L-serina es un aminoácido clasificado como nutricionalmente no esencial, es sintetizado endógenamente en cantidades suficientes para mantener el balance de nitrógeno sin necesidad de una ingesta en la dieta (Sucil, 1984). La L-serina juega un papel versátil en el metabolismo intermediario de células eucariotas. La L-serina no solo participa en la síntesis de proteínas sino también es precursor de otros aminoácidos y biomoléculas que son esenciales para la función, diferenciación, crecimiento y proliferación celular. L-serina participa en la síntesis de glicina, L-cisteína, fosfatidilserina, esfingolípidos y D-serina. También participa indirectamente en la biosíntesis de purinas y pirimidinas. Tal es el papel fisiológico de la L-serina en la neurobiología de los mamíferos, en la salud y en la enfermedad, que se viene sugiriendo una reevaluación como aminoácido no esencial.

4.6.1 Características y fuentes

La serina ($C_3H_7NO_3$) tiene un peso molecular de 105,09 g/mol; su estructura química se presenta en la figura 6:

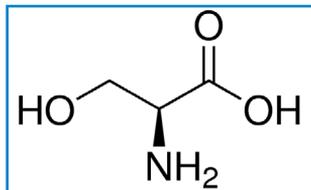


Figura 6. Estructura molecular de la serina.

La L-serina es indispensable para la síntesis de fosfatidilserina y esfingolípidos, componentes básicos de la membrana celular, importantes para el desarrollo y función del sistema nervioso (Dos Santos Fagundes et al., 2001). La L-serina funciona como un factor astrocítico esencial que promueve la diferenciación y supervivencia neuronal (Furuya y Watanabe, 2003). En el hombre, la fosfatidilserina principalmente se concentra en el cerebro donde representa el 15 % del almacén total de fosfolípidos. En general, se relaciona con la memoria y se encuentra en los productos de la soja y otros vegetales, en productos lácteos, en el huevo, en frutos secos y en la carne.

4.6.2 Nutrición y metabolismo

La biosíntesis de la serina comienza a partir del 3-fosfoglicerato, un intermedio de la fase glucolítica, con tres pasos secuenciales iniciados por la 3-fosfoglicerato dehidrogenasa (3PGDH), referida como fase fosforilada (Figura 7). También se puede obtener serina a partir de la ingesta dietaria y a partir de la degradación de proteínas y fosfolípidos. Sin embargo debido a que la permeabilidad de serina en la barrera hematoencefálica es baja, la fase fosforilada es la principal vía y particularmente importante en la síntesis y metabolismo de la serina en el cerebro. Se conoce que pacientes con deficiencia en la enzima 3PGDH presentan concentraciones plasmáticas reducidas de serina y glicina y sufren de diversos tipos de desórdenes neurológicos (De Koning et al., 1999) (Furuya, 2008).

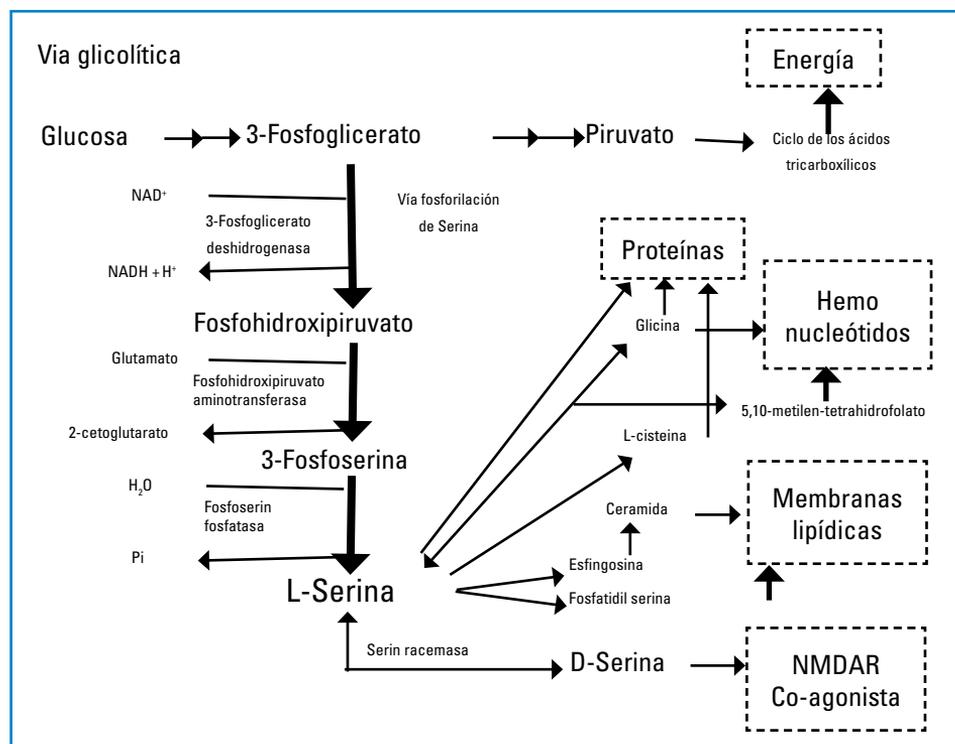


Figura 7. Síntesis de L-serina a partir del intermedio glicolítico (fase fosforilada) y su utilización para la síntesis de diversas biomoléculas. **Fuente:** (Furuya y Watanabe, 2003).

4.6.3 Seguridad

Los aminoácidos principalmente se aportan en la dieta no como aminoácidos libres sino más bien como constituyentes de proteínas. La seguridad de los aminoácidos consumidos en la dieta no presentan preocupación porque son nutrientes requeridos para la síntesis de componentes estructurales y funcionales del organismo y se consumen en grandes cantidades a partir de los alimentos como una parte esencial de la dieta. Sin embargo, recientemente, cada vez más, existe interés en el consumo de aminoácidos individuales como complementos alimenticios por sus efectos beneficiosos sobre la salud y sobre el rendimiento físico, como es el caso del aminoácido L-serina. Existe escasa información respecto a la seguridad de L-serina como suplemento dietario. Estudios en humanos señalan que cuatro sujetos sanos tratados con dosis única oral de 200 mg/kg p.c. de serina no muestran ningún efecto adverso (Pepplinkhuizen et al., 1980). Otro estudio realizado en una mujer embarazada que se le diagnosticó una deficiencia de la enzima 3PGDH en el feto, fue sometida a un tratamiento con dosis de serina de 190 mg/kg p.c., 3 dosis/día, durante las 20 semanas finales de la gestación, sin observarse en esta paciente ningún efecto adverso, ni en el feto, ni en el recién nacido (De Koning et al., 2004).

Jorissen et al. (2001, 2002) evalúan en un estudio controlado doble ciego y con placebo en humanos, sujetos sanos con alteración de la memoria asociada con la edad, la seguridad de la fosfatidilserina, derivada de la soja, a dosis de 300 y 600 mg durante 12 semanas de tratamiento. No se observaron efectos de signos de toxicidad, ni efectos en los parámetros bioquímicos y hematológicos y estos autores concluyen que como suplemento nutricional el nivel seguro observado de fosfatidilserina sería hasta dosis de 200 mg, tres veces al día.

Más recientemente Vakhapova et al. (2011) evalúan, en personas mayores con problemas de memoria, la seguridad de un tratamiento de fosfatidilserina (PS) junto con un ácido graso omega-3 (el ácido docosahexaenoico, DHA) a dosis de 300 mg PS y 79 mg DHA/día durante 15 semanas, o 100 mg PS y 26 mg DHA/día durante 30 semanas, en un ensayo clínico diseñado a doble ciego. En 157 participantes que recibieron 300 mg PS/día durante 15 semanas no se observó ningún efecto adverso. De estos pacientes, 121 participantes continuaron el tratamiento 15 semanas adicionales a dosis de 100 mg PS/día. En algunos de estos pacientes se observó una reducción de la presión sanguínea diastólica y un ligero aumento de la ganancia de peso corporal, efectos que fueron considerados leves. Como conclusión, los resultados de este estudio indican que el consumo de fosfatidilserina (PS) a dosis de 300 mg PS/día durante 15 semanas son seguras, bien toleradas y no producen efectos adversos en los parámetros estudiados (signos clínicos, parámetros bioquímicos y hematológicos). Estos resultados y dosis están en el rango de los descritos previamente por Jorissen et al. (2001, 2002), y por Richter et al. (2010, 2011).

Respecto a estudios de seguridad en animales de experimentación, Kaneko et al. (2009) realizan un estudio de toxicidad oral subcrónica, 13 semanas. En ratas, machos y hembras, tratadas vía oral con dosis de 500, 1 500 y 3 000 mg/kg p.c./día, no observaron mortalidad, ni ningún efecto referente a signos clínicos diarios, peso corporal y consumo de alimento. Tampoco observaron al final del ensayo ningún efecto adverso en los análisis hematológicos, bioquímicos en suero y orina, peso de los órganos, ni tampoco en los exámenes histopatológicos de todos los órganos. Concluyen

que a partir de este estudio se puede establecer un NOAEL de 3 000 mg/kg p.c./día. Este NOAEL relativamente alto sugiere que la L-serina pudiera ser bien tolerada en su uso a largo plazo como un suplemento dietario.

Debido a que el derivado acetilado de la L-serina (NAS) es uno de los más comunes aminoácidos N-acetilados de las proteínas y teniendo en cuenta que se ha estimado que aproximadamente el 90 % de las proteínas con residuos de serina están como N-acetilados (Driessen et al., 1985), recientemente Van de Mortel et al. (2010) evalúan la toxicidad del NAS en ratas. La toxicidad aguda oral fue evaluada a dosis límite de 2 000 mg/kg p.c., sin observarse mortalidad, ni efectos adversos. La toxicidad oral subcrónica fue evaluada también en ratas a dosis de NAS, durante 28 días, de 100, 500 y 1 000 mg/kg p.c./día, observándose un NOAEL para la toxicidad sistémica de 839,7 mg/kg p.c. y de 893,6 mg/kg p.c. para machos y hembras, respectivamente.

Lifshitz et al. (2015) realizan un ensayo de toxicidad de la reproducción y del desarrollo, sin observarse efectos adversos. Además, en otro estudio evalúan en ratas la genotoxicidad y la toxicidad subcrónica (dosis repetida 90 días) precedida de una fase de exposición del útero de una fosfatidilserina derivada de fosfolípidos de pescado (con un 49 % de fosfatidilserina); los niveles de dosis ensayados fueron 1 100, 2 200 y 3 400 mg/kg p.c./día. Los resultados demuestran que no es genotóxico, no afecta a la fertilidad o el desarrollo embrionario. No se observaron signos clínicos relacionados con el tratamiento, ni efectos en el peso corporal, ingesta de alimento y agua, parámetros hematológicos, bioquímica clínica, peso de órganos y exámenes histopatológicos para las dosis de 1 100 y 2 200 mg/kg p.c./día. En el grupo tratado con la dosis más alta (3 400 mg/kg p.c./día equivalente a 1 666 mg/kg p.c./día de fosfatidilserina) en las ratas hembras se observó en los exámenes histopatológicos una incidencia, categorizada de mínima a media, de mineralización corticomédular multifocal renal sin estar acompañada de degeneración renal, necrosis celular o cualquier otro cambio morfológico, bioquímico o fisiológico. Además también cinco ratas hembras control mostraron esta focal mineralización. Los datos generados de este estudio demuestran un NOAEL de 2 100 mg/kg/día equivalente a 1 029/kg p.c./día de fosfatidilserina.

4.6.4 Conclusión

El Comité Científico concluye que, en función de la información disponible en la actualidad y teniendo en cuenta las consideraciones generales reflejadas en el presente informe, una cantidad máxima diaria de 200 mg de L-serina, es aceptable desde el punto de vista de su seguridad en su uso como complemento alimenticio.

Referencias

- De Koning, T.J., Duran, M., Dorland, L., Gooskens, R., Van Shaftingen, E., Jacken, J., Blau, N., Berger, R. y Poll-The, B.T. (1999). Beneficial effects of L-serine and glycine in the management of seizures in 3-phosphoglycerate dehydrogenase deficiency. *Annales of Neurology*, 44, pp: 261-265.
- De Koning, T.J., Klomp, L.W.J., van Oppen, A.C.C., Beemer, F.A., Dorland, L., van den Berg, I.E.T. y Berger, R. (2004). Prenatal and postnatal treatment in 3-phosphoglycerate-dehydrogenase deficiency. *Lancet*, 364, pp: 2221-2222.
- Dos Santos Fagundes, J., Rotta, L.N., Schweigert, I.D., Valle, S.C., De Olivera, K.R., Huth Kruger, A., Souza, K.B.,

- Souza, D.O. y Perry, M.L. (2001). Glycine, serine and leucine metabolism in different regions of rat central nervous system. *Neurochemical Research*, 26, pp: 245-249.
- Driessen, H.P., De Jong, W.W., Tesser, G.I. y Bloemendal, H. (1985). The mechanism of N-terminal acetylation of proteins. *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, 18, pp: 281-325.
- Furuya, S. y Watanabe, M. (2003). Novel neuroglial and gliogial relationships mediated by L-serine metabolism. *Archives of Histology and Cytology*, 66 (2), pp: 109-121.
- Furuya, S. (2008). An essential role for de novo biosynthesis of L-serine in CNS development. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 17 (SI), pp: 312-315.
- Jorissen, B.L., Brouns, F., Van Boxtel, M.P.J., Ponds, R.W.H.M., Verhey, F.R.J., Jolles, J. y Riedel, W.J. (2001). The Influence of Soy-derived Phosphatidylserine on Age-Associated Memory Impairment. *Nutritional Neuroscience*, 4, pp: 121-134.
- Jorissen, B.L., Brouns, E., Van Boxtel, M.P.J. y Riedel, W.J. (2002). Safety of soy-derived phosphatidylserine in elderly people. *Nutricional Neuroscience*, 5 (5), pp: 337-343.
- Kaneko, I., Han, L., Iu, T., Li, J., Zhao, Y., Li, C., Yi, Y., Liang, A. y Hayamizu, K. (2009). A 13-week subchronic oral toxicity study of L-serine in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 47, pp: 2356-2360.
- Lifshitz, Y., Levi, L., Eyal, I., Cohen, T. y Tessler, S. (2015). Sub-chronic (13-week) oral toxicity study, preceded by an in utero exposure phase and genotoxicity studies with fish source phosphatidylserine in rats, *Food and Chemical Toxicology*, 86, pp: 234-244.
- Pepplinkhuizen, L., Bruinvels, J., Blom, W. y Moleman, P. (1980). Schizophrenia-like psychosis caused by a metabolic disorder. *Lancet*, 1, pp: 454-456.
- Richter, Y., Herzog, Y., Cohen, T. y Steinhart, Y. (2010). The effect of phosphatidylserine containing omega-3 fatty acids on memory abilities in subjects with subjective memory complaints: a pilot study. *Clinical Interventions in Aging*, 5, pp: 313-316.
- Richter, Y., Herzog, Y., Eyal, I. y Cohen, T. (2011). Cognitex supplementation in elderly adults with memory complaints: an uncontrolled open label trial. *Journal of Dietary Supplements*, 8, pp: 158-168.
- Sucil, K. (1984). Enzymes of serine metabolism in normal, developing and neoplastic rat tissues. *Advances in Enzyme Regulation*, 22, pp: 325-400.
- Van de Mortel, E.I.M., Shen, Z.A., Barnett, Jr.J.F., Krsmanovic, L., Myhre, A. y Delaney, B.F. (2010). Toxicology studies with N-acetyl-L-serine. *Food and Chemical Toxicology*, 48, pp: 2193-2199.
- Vakchapova, V., Richter, Y., Cohen, T., Herzog, Y. y Korczyn, A.D. (2011). Safety of phosphatidylserine containing omega-3 fatty acids in non-demented elderly: a double blind placebo-controlled trial followed by an open-label extension. *BMC Neurology*, 11, pp: 79-89.

4.7 L-arginina L-aspartato

4.7.1 Características y fuentes

Denominado también L-aspartato de L-arginina, se trata de la sal del ácido L-aspartico (o (S)-2-amino-butanodioico) de la L-arginina (o ácido (S)-2,6-diaminohexanoico) (1:1). No se encuentra como tal en los alimentos. Su fórmula molecular es $C_{10}H_{21}N_5O_6$ (Figura 8):

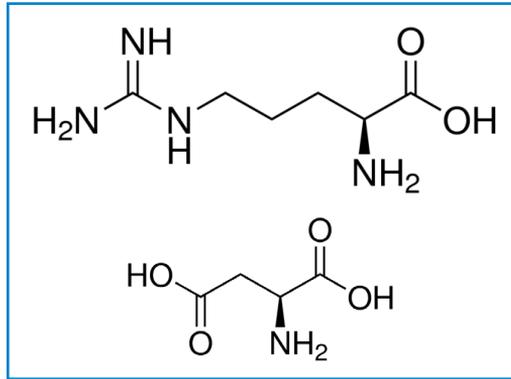


Figura 8. Estructura molecular de la L-arginina-L-aspartato.

El par de aminoácidos permanece unido por fuerzas electrostáticas a través de las cargas negativas de los grupos carboxilo y las positivas de los grupos amino.

4.7.2 Nutrición y metabolismo

Este compuesto no contiene un enlace peptídico y no requiere hidrólisis para dar lugar a los aminoácidos individuales. Se disocia en solución, tal y como ocurre en el estómago, y por tanto se absorberá en forma de aminoácidos individuales. Su biodisponibilidad y metabolismo será equivalente a la de los aminoácidos individuales (SCF, 2003). Los datos sobre la L-arginina están disponibles en un informe previo del Comité Científico de la AECOSAN (2012) y el ácido L-aspartico se encuentra descrito en este mismo documento en su sección 4.2.

4.7.3 Seguridad

La seguridad de la L-arginina fue evaluada por la AECOSAN (2012) y la del ácido L-aspartico en el presente informe.

Actualmente, el uso del L-aspartato de L-arginina está autorizado en alimentos para usos médicos especiales (UE, 2013).

Existen diversos estudios en la bibliografía sobre los efectos beneficiosos derivados de la administración de esta sustancia, por el efecto sinérgico de ambos aminoácidos en el metabolismo. Sin embargo, en la mayoría de ellos no se especifica la conexión entre ambos aminoácidos (Sallam y Steinbüchel, 2010), si se trata de una mezcla o del dipéptido, y la absorción de unos y otros tiene lugar por mecanismos diferentes (Matthews, 1972), lo que podría afectar a su biodisponibilidad. Aunque los estudios disponibles no estaban centrados en evaluar la seguridad, la mayoría tampoco hacen referencia a la detección de efectos adversos debidos al tratamiento. No obstante, Abel et al. (2005) y Colombani et al. (1999) concluyeron que no hay razones aparentes para utilizar la suplementación con aspartato de arginina como ergogénico, observando Colombani et al. (1999) que la administración de 15 g/día durante 14 días en corredores de fondo daba lugar a una reducción del

nivel plasmático de aminoácidos totales. Blazejewski et al. (2009) realizaron un ensayo en voluntarios sanos, tratados con 30 g/día de aspartato de arginina durante 21 días y observaron reacciones adversas de tipo digestivo (diarrea, flatulencias y en menor medida dolores de cabeza) así como una disminución en la secreción de IGF1 (factor de crecimiento insulínico tipo 1) y de IGFBP-3 (proteína 3 de unión al factor de crecimiento insulínico).

4.7.4 Conclusión

Si se consideran los aminoácidos individuales, para la suplementación con L-arginina se estableció un *Observed Safe Level* (OSL) de 20 g/día por lo que la propuesta de la AECOSAN de una cantidad máxima diaria de 3 g de L-arginina se consideró aceptable desde el punto de vista de su seguridad en su uso como complemento alimenticio (AECOSAN, 2012).

En relación al ácido L-aspártico el Comité Científico ha concluido (sección 4.2) que, existen ensayos de toxicidad subcrónica en ratas a partir de los que se puede estimar que la ingestión diaria de 490 mg de ácido L-aspártico es admisible desde el punto de vista de su seguridad. Por otra parte hay que tener en cuenta que este aminoácido forma parte de alimentos básicos y también se ingiere como metabolito del edulcorante aspartamo.

No obstante, para la L-arginina-L-aspartato, la información disponible sobre su seguridad es escasa y en muchos casos adolece de una adecuada caracterización de la sustancia objeto de ensayo. Por tanto, El Comité Científico considera que la información toxicológica disponible es insuficiente para determinar cuál sería la cantidad máxima diaria de L-arginina-L-aspartato que se podría considerar segura en su uso como complemento alimenticio.

Referencias

- Abel, T., Knechtle, B., Perret, C., Eser, P., von Arx, P. y Knecht, H. (2005). Influence of chronic supplementation of arginine aspartate in endurance athletes on performance and substrate metabolism-a randomized double-blind, placebo-controlled study. *International Journal of Sports Medicine*, 26, pp: 344-349.
- AECOSAN (2012). Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición sobre condiciones de uso de determinadas sustancias distintas de vitaminas, minerales y plantas para ser empleadas en complementos alimenticios-1. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 17, pp: 11-234.
- Blazejewski, S., Georges, A., Forest, K., Corcuff, J.B., Abouelfath, A., Girodet, P.O., Kamagate, M., Jacquet, A., Pillet, O., Bordenave, L. y Moore, N. (2009). The chronic oral administration of arginine aspartate decreases secretion of IGF-1 and IGFBP-3 in healthy volunteers. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 23, pp: 339-344.
- Colombani, P.C., Bitzi, R., Frey-Rindova, P., Frey, W., Arnold, M., Langhans, W. y Wenk, C. (1999). Chronic arginine aspartate supplementation in runners reduces total plasma amino acid level at rest and during a marathon run. *European Journal of Nutrition*, 38, pp: 263-270.
- Matthews, D.M. (1972). Intestinal absorption of amino acids and peptides. *Proceedings of the Nutrition Society*, 31, pp: 171-177.
- Sallam, A. y Steinbüchel, A. (2010). Dipeptides in nutrition and therapy: cyanophycin-derived dipeptides as natural alternatives and their biotechnological production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, pp: 815-828.

SCF (2003). Scientific Committee on Food. Statement of the Scientific Committee on Food on L-serine and some amino acid-amino acid salts for use in foods for particular nutritional purposes. SCF/CS/ADD/NUT/55 Final. 2 April 2003.

UE (2013). Reglamento (UE) N° 609/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo de 12 de junio de 2013 relativo a los alimentos destinados a los lactantes y niños de corta edad, los alimentos para usos médicos especiales y los sustitutivos de la dieta completa para el control de peso y por el que se derogan la Directiva 92/52/CEE del Consejo, las Directivas 96/8/CE, 1999/21/CE, 2006/125/CE y 2006/141/CE de la Comisión, la Directiva 2009/39/CE del Parlamento Europeo y del Consejo y los Reglamentos (CE) N° 41/2009 y (CE) N° 953/2009 de la Comisión. DO L 181 de 29 de junio de 2013, pp: 35-56.

4.8 L-lisina-L-aspartato

4.8.1 Características y fuentes

Denominado también L-aspartato de L-lisina, se trata de la sal del ácido L-aspártico (o (S)-2-amino-butanodioico) de la L-lisina (o ácido (S)-2,6-diaminohexanoico) (1:1). No se encuentra como tal en los alimentos. Su fórmula molecular es $C_{10}H_{21}N_3O_6$ (Figura 9):

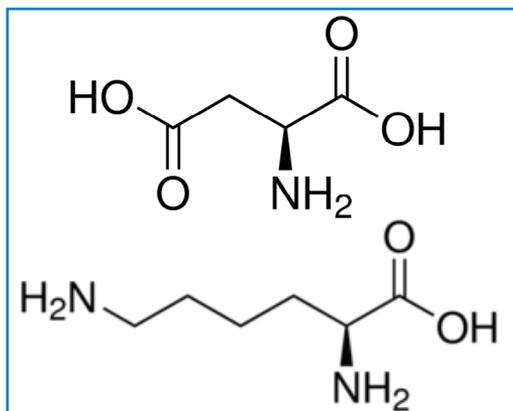


Figura 9. Estructura molecular de la L-lisina-L-aspartato.

El par de aminoácidos permanece unido por fuerzas electrostáticas a través de las cargas negativas de los grupos carboxilo y las positivas de los grupos amino.

4.8.2 Nutrición y metabolismo

Este compuesto no contiene un enlace peptídico y no requiere hidrólisis para dar lugar a los aminoácidos individuales. Se disocia en solución, tal y como ocurre en el estómago, y por tanto se absorberá en forma de aminoácidos individuales. Su biodisponibilidad y metabolismo será equivalente a la de los aminoácidos individuales (SCF, 2003). Los datos sobre la L-lisina están disponibles en un informe previo del Comité Científico de la AECOSAN (2012) y el ácido L-aspártico se encuentra descrito en este mismo documento en su sección 4.2.

4.8.3 Seguridad

La seguridad de la L-lisina fue evaluada por la AECOSAN (2012) y la del ácido L-aspartico en el presente informe.

Actualmente, el uso del L-aspartato de L-lisina está autorizado en alimentos para usos médicos especiales (UE, 2013).

Los estudios sobre preparaciones consistentes en aspartato y lisina son muy escasos (Sallam y Steinbüchel, 2010), conociéndose tan solo su uso en el tratamiento de la fatiga muscular y de las contracciones musculares involuntarias (Morelle y Lauzanne, 1984). No se dispone de información sobre una posible interacción de efectos tras su administración conjunta.

4.8.4 Conclusión

Si se consideran los aminoácidos individuales, con respecto a la L-lisina, el Comité Científico concluyó que, en función de la información disponible en dicho momento, la propuesta de la AECOSAN (2012) de una cantidad máxima diaria de 2 250 mg de L-lisina, era aceptable desde el punto de vista de su seguridad en su uso como complemento alimenticio.

En relación al ácido L-aspartico el Comité Científico ha concluido (sección 4.2) que, existen ensayos de toxicidad subcrónica en ratas a partir de los que se puede estimar que la ingestión diaria de 490 mg de ácido L-aspartico es admisible desde el punto de vista de su seguridad. Por otra parte hay que tener en cuenta que este aminoácido forma parte de alimentos básicos y también se ingiere como metabolito del edulcorante aspartamo.

No obstante, para la L-arginina-L-aspartato, el Comité Científico considera que la información toxicológica disponible es insuficiente para determinar cuál sería la cantidad máxima diaria que se podría considerar segura en su uso como complemento alimenticio.

Referencias

- AECOSAN (2012). Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre condiciones de uso de determinadas sustancias distintas de vitaminas, minerales y plantas para ser empleadas en complementos alimenticios-1. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 17, pp: 11-234.
- Morelle, J.V. y Lauzanne-Morelle, E.M.T. (1984). Derivatives of lysine and aspartic acid. US Patent 4447366.
- Sallam, A. y Steinbüchel, A. (2010). Dipeptides in nutrition and therapy: cyanophycin-derived dipeptides as natural alternatives and their biotechnological production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, pp: 815-828.
- SCF (2003). Scientific Committee on Food. Statement of the Scientific Committee on Food on L-serine and some amino acid-amino acid salts for use in foods for particular nutritional purposes. SCF/CS/ADD/NUT/55 Final. 2 April 2003.
- UE (2013). Reglamento (UE) N° 609/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo de 12 de junio de 2013 relativo a los alimentos destinados a los lactantes y niños de corta edad, los alimentos para usos médicos especiales y los sustitutivos de la dieta completa para el control de peso y por el que se derogan la Directiva 92/52/CEE del Consejo, las Directivas 96/8/CE, 1999/21/CE, 2006/125/CE y 2006/141/CE de la Comisión, la Directiva 2009/39/CE del Parlamento Europeo y del Consejo y los Reglamentos (CE) N° 41/2009 y (CE) N° 953/2009 de la Comisión. DO L 181 de 29 de junio de 2013, pp: 35-56.

4.9 L-lisina-L-glutamato

4.9.1 Características y fuentes

Denominado también L-glutamato de L-lisina, se trata de la sal del ácido L-glutámico (o ácido 2-aminopentanodioico) de la L-lisina (o ácido 2,6-diaminohexanoico) (1:1). No se encuentra como tal en los alimentos. Su fórmula molecular es $C_{11}H_{23}N_3O_6$ (Figura 10):

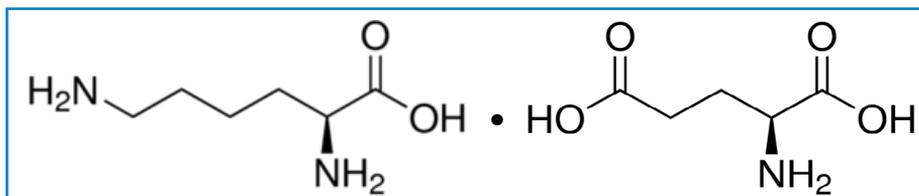


Figura 10. Estructura molecular de la L-lisina-L-glutamato.

El par de aminoácidos permanece unido por fuerzas electrostáticas a través de las cargas negativas de los grupos carboxilo y las positivas de los grupos amino.

4.9.2 Nutrición y metabolismo

Este compuesto no contiene un enlace peptídico y no requiere hidrólisis para dar lugar a los aminoácidos individuales. Se disocia en solución, tal y como ocurre en el estómago, y por tanto se absorberá en forma de aminoácidos individuales. Su biodisponibilidad y metabolismo será equivalente a la de los aminoácidos individuales (SCF, 2003). Los datos sobre ambos aminoácidos están disponibles en un informe previo del Comité Científico de la AECOSAN (2012).

4.9.3 Seguridad

La seguridad de ambos aminoácidos individuales fue evaluada por la AECOSAN (2012).

Actualmente, el uso del L-glutamato de L-lisina está autorizado en alimentos para usos médicos especiales (UE, 2013).

Los estudios sobre preparaciones consistentes en glutamato y lisina son muy escasos y no se dispone de información sobre una posible interacción de sus efectos.

4.9.4 Conclusión

Si se consideran los aminoácidos individuales, con respecto a la L-lisina, el Comité Científico concluyó que, en función de la información disponible en dicho momento, la propuesta de la AECOSAN (2012) de una cantidad máxima diaria de 2 250 mg de L-lisina, era aceptable desde el punto de vista de su seguridad en su uso como complemento alimenticio.

El Comité Científico consideró que el ácido L-glutámico se halla presente en los alimentos proteicos de la dieta, posee un nivel bajo de toxicidad y solo por encima de 1,5 g se detectan efectos adversos. Por tanto el Comité concluyó que una cantidad máxima de 1 g/día era aceptable desde

el punto de vista de su seguridad en su uso como ingrediente en los complementos alimenticios.

No obstante, para la L-lisina-L-glutamato, el Comité Científico considera que la información toxicológica disponible es insuficiente para determinar cuál sería la cantidad máxima diaria que se podría considerar segura en su uso como complemento alimenticio.

Referencias

- AECOSAN (2012). Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre condiciones de uso de determinadas sustancias distintas de vitaminas, minerales y plantas para ser empleadas en complementos alimenticios-1. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 17, pp: 11-234.
- SCF (2003). Scientific Committee on Food. Statement of the Scientific Committee on Food on L-serine and some amino acid-amino acid salts for use in foods for particular nutritional purposes. SCF/CS/ADD/NUT/55 Final. 2 April 2003.
- UE (2013). Reglamento (UE) N° 609/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo de 12 de junio de 2013 relativo a los alimentos destinados a los lactantes y niños de corta edad, los alimentos para usos médicos especiales y los sustitutivos de la dieta completa para el control de peso y por el que se derogan la Directiva 92/52/CEE del Consejo, las Directivas 96/8/CE, 1999/21/CE, 2006/125/CE y 2006/141/CE de la Comisión, la Directiva 2009/39/CE del Parlamento Europeo y del Consejo y los Reglamentos (CE) N° 41/2009 y (CE) N° 953/2009 de la Comisión. DO L 181 de 29 de junio de 2013, pp: 35-56.

4.10 N-acetil-L-cisteína

4.10.1 Propuesta

La AECOSAN ha propuesto una cantidad máxima diaria para la N-acetil-L-cisteína en complementos alimenticios de 300 mg. La propuesta se basa en que dosis superiores, se consideran medicamento en España.

4.10.2 Características y fuentes

La N-acetil-L-cisteína, N-acetil-cisteína o N-acetil-3-mercaptopalanina es un derivado acetilado de la cisteína. La cisteína es un aminoácido azufrado proteínogeno no esencial, polar e hidrosoluble (Mataix, 2002).

Es un polvo cristalino, blancuzco, muy soluble en agua y otros disolventes polares como el alcohol etílico. Su fórmula estructura molecular es la siguiente (Figura 11):

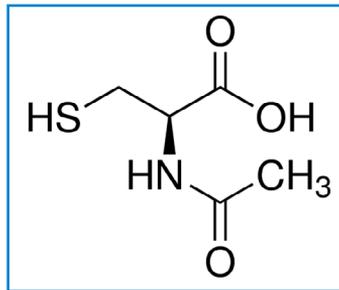


Figura 11. Estructura molecular de N-acetil-cisteína.

Su peso molecular es 163,2 g/mol. Tiene acción antioxidante por la presencia de grupos -SH en su molécula.

La L-cisteína se contempla como suplemento “anti-edad” por sus propiedades antioxidantes. Es un antioxidante indirecto, facilita la biosíntesis de glutatión, puede aumentar la actividad de la enzima glutatión-S-transferasa proporcionando glutatión para la detoxificación de peróxidos, reacción catalizada por la enzima glutatión-peroxidasa (Moldeus y Cotgreave, 1994).

La N-acetilcisteína se utiliza como agente mucolítico, ya que es capaz de romper los puentes disulfuro de las proteínas que componen las secreciones respiratorias.

Asimismo, es el antídoto del paracetamol o acetaminofeno, ya que actúa donando grupos -SH, restaurando los niveles de glutatión reducido e impidiendo que los hepatocitos sean dañados por el estrés oxidativo producido por algún metabolito tóxico del paracetamol (p-benzoquinonimina) (Brayfield, 2014).

La obtención de N-acetilcisteína se lleva a cabo acetilando el clorhidrato de L-cisteína con anhídrido acético en medio alcalino acuoso. Este compuesto se determina analíticamente por cromatografía líquida de alta resolución (EFSA, 2003).

4.10.3 Nutrición y metabolismo

Una enzima importante que contribuye a la regulación de los niveles en estado estacionario de cisteína intracelular es la cisteína dioxigenasa (CDO) expresada en altos niveles en el hígado, con bajos niveles en el riñón, cerebro y pulmón; la CDO es una metaloenzima de hierro que cataliza la adición del oxígeno molecular al grupo sulfhidrilo de la cisteína, originando el ácido cistein-sulfínico.

El catabolismo oxidativo de la cisteína a cisteinasulfinato por la CDO representa una pérdida irreversible de cisteína del *pool* de aminoácidos; cisteinasulfinato es transportada por diferentes vías que incluyen síntesis de hipotaurina/taurina, producción de sulfito/sulfato, y generación de piruvato (Figura 12). Datos *in vivo* sugieren que el hígado es el órgano con mayor contenido de expresión y actividad de CDO (García y Stipanuk, 1992). El hígado es una salvaguardia frente a la ingesta oral en dieta de un exceso de cisteína. Individuos con insuficiencia hepática o con déficit de la enzima CDO presentan un mayor riesgo a la ingesta de un exceso de cisteína.

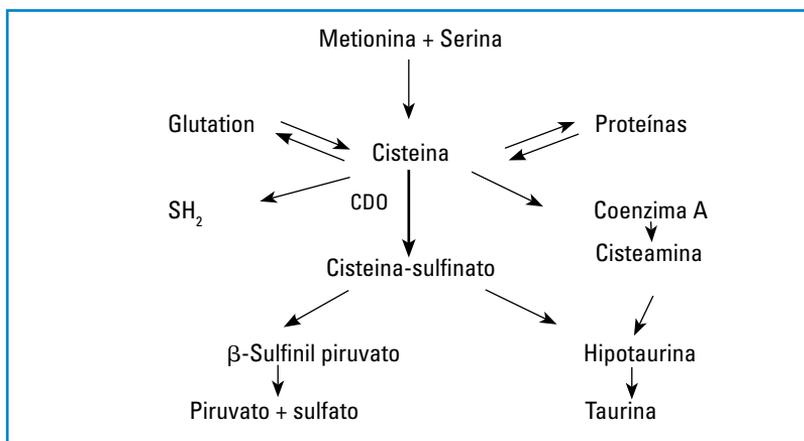


Figura 12. Principales vías del metabolismo de cisteína. **Fuente:** (Stipanuk et al., 2006).

La administración de N-acetil-L-cisteína por vía oral tanto en roedores como en humanos, tiene una absorción rápida. Tras lo cual, el compuesto se desacetila y circula por el torrente sanguíneo ligado a proteínas plasmáticas. Estudios farmacocinéticos en pacientes con desórdenes respiratorios (Rodenstein et al., 1978) demuestran que las concentraciones máximas plasmáticas se alcanzan a las 2-3 horas tras la administración oral y que entre un 13-38 % de la dosis oral administrada se recupera en la orina en 24 horas. Otros estudios, describen también en el hombre que tras administración oral de 600 mg de N-acetil-L-cisteína, se obtiene una biodisponibilidad del 6-10 % y tras administración intravenosa de 600 mg de N-acetil-L-cisteína se observa una semivida plasmática de eliminación de 2,27 horas. La administración oral de N-acetil-L-cisteína, a pesar de su baja biodisponibilidad, es clínicamente eficaz; sufre circulación entero-hepática (fenómeno de primer paso) y por ello los hepatocitos disponen de grupos tiol para la síntesis de glutatión (Borgstrom et al., 1986).

La N-acetil-L-cisteína al ser una fuente de L-cisteína, es desde el punto de vista nutricional un precursor de L-cisteína y su valor nutricional se corresponde al de este último aminoácido. La N-acetil-L-cisteína es desacetilada a L-cisteína en los tejidos. El grado de esta desacetilación puede verse afectado en presencia de otros N-acetil derivados como fuentes de sus respectivos aminoácidos. No se conoce la biodisponibilidad de L-cisteína a partir de N-acetil-L-cisteína en presencia de otros N-acetil amino derivados, dato necesario como soporte del uso de este producto (EFSA, 2003).

4.10.4 Seguridad

El hígado en los mamíferos regula el contenido de cisteína libre intracelular. Los niveles de cisteína deben ser lo suficientemente altos para la síntesis de proteínas y para la producción de otras moléculas esenciales tales como glutatión, coenzima A, taurina, y sulfuro inorgánico. Pero al mismo tiempo las concentraciones de cisteína deben ser mantenidas por debajo del umbral de citotoxicidad. Niveles tisulares de cisteína elevados pueden conducir a una autooxidación de

cisteína formando cistina, especies reactivas de oxígeno (ROS), oxidación de grupos tiol, neurotoxicidad mediada por receptores NMDA tipo glutamato, y exceso de producción de H₂S (Stipanuk et al., 2006).

La toxicidad por exceso de cisteína se ha demostrado en diversos modelos de animales (Lehmann, 1987) (Andine et al., 1991) (Lehmann et al., 1993) y altos niveles de cisteína por administración crónica están asociados con artritis reumatoide (Bradley et al., 1994) con enfermedad de Parkinson y de Alzheimer (Heafield et al., 1990), lupus eritematoso (Gordon et al., 1992), efecto cardiovascular (Ozkan et al., 2002) y complicaciones en el embarazo (El-Khairi et al., 2003).

Bonamoni y Gazzamiga (1980), revisaron los estudios de toxicidad aguda y subcrónica en ratas *Sprague-Dawley* y en perros *Beagle*. También recogieron estudios de embriotoxicidad y reproducción en ratas y conejos y test de mutagenicidad *in vitro*. Se observó que en los estudios de toxicidad crónica en ratas *Sprague-Dawley* dosis de hasta 1 000 mg/kg/día no afectaban al comportamiento, ganancia de peso, hematología, función hepática y renal ni al tiempo de coagulación y protrombina. Las necropsias y los exámenes histológicos no revelaron lesión patológica alguna. Por todo ello y considerando la dosis de 1 000 mg/kg como aquella dosis máxima para la que no se aprecia daño efecto adverso observable en roedores, el NOAEL podría ser 1 000 mg/kg. Dividiendo el NOAEL por un factor de incertidumbre de 100, y considerando 70 kg como el peso corporal del hombre, tendremos una IDA de 700 mg/día.

Los estudios disponibles en el hombre apuntan que la L-cisteína es bien tolerada, sin embargo la dosis máxima para efectos gastrointestinales tales como vómito y diarrea no ha podido ser definida. Dosis de 1,8 g/día en pacientes con hepatitis crónica originan alteraciones gastrointestinales (Beloqui et al., 1993). La dosis terapéutica como agente mucolítico es de 0,4-0,6 g/día (EFSA, 2003).

4.10.5 Conclusión

El Comité Científico concluye que, en función de la información disponible en la actualidad que establece un NOAEL y teniendo en cuenta las consideraciones generales reflejadas en el presente informe, la propuesta de la AECOSAN de una cantidad máxima diaria de 300 mg de N-acetil-L-cisteína es aceptable desde el punto de vista de su seguridad en su uso como complemento alimenticio.

Referencias

- Andine, P., Orwar, O., Jacobson, I., Sandberg, M. y Hagberg, H. (1991). Extracellular acidic sulfur-containing amino acids and gamma-glutamyl peptides in global ischemia: posts ischemic recovery of neuronal activity is paralleled by a tetrodotoxinsensitive increase in cysteine sulfinic acid in the CA1 of the rat hippocampus. *Journal of Neurochemistry*, 57, pp: 230-236.
- Beloqui, O., Prieto, J., Suarez, M., Gil, B., Qian, C.H., Garcia, N. y Civeira, M.P. (1993). N-acetyl cysteine enhances the response to interferon- α in chronic hepatitis C: a pilot study. *Journal of interferon & cytokine research*, 13, pp: 279-282.
- Bonamoni, L. y Gazzaniga, A. (1980). Toxicological, pharmacokinetic and metabolic studies on acetylcysteine. *European Journal respiratory disease*, 61 (Suppl. III), pp: 45-61.

- Borgström, L., Kagedal, B. y Paulsen, O. (1986). Pharmacokinetics of N-acetylcysteine in man. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 31, pp: 217-222.
- Bradley, H., Gough, A., Sokhi, R.S., Hassell, A., Waring, R. y Emery, P. (1994). Sulfate metabolism is abnormal in patients with rheumatoid arthritis. Confirmation by *in vivo* biochemical findings. *Journal of Rheumatology*, 21, pp: 1192-1196.
- Brayfield, A. (2014). Martindale. The complete drug reference. Pharmaceutical Press. U.K.
- EFSA (2003). European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food (AFC) on a request from the Commission related to N-acetyl-L-cysteine for use in foods for particular nutritional uses and in foods for special medical purposes. *The EFSA Journal*, 21, pp: 1-8.
- El-Khairi, L., Vollset, S.E., Refsum, H. y Ueland, P.M. (2003). Plasma total cysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine Study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 77, pp: 467-472.
- García, R.A. y Stipanuk, M.H. (1992). The splanchnic organs, liver and kidney have unique roles in the metabolism of sulfur amino acids and their metabolites in rats. *Journal of Nutrition*, 122, pp: 1693-1701.
- Gordon, C., Bradley, H., Waring, R.H. y Emery, P. (1992). Abnormal sulphur oxidation in systemic lupus erythematosus. *Lancet*, 339, pp: 25-26.
- Heafield, M.T., Fearn, S., Steventon, G.B., Waring, R.H., Williams, A.C. y Sturman, S.G. (1990). Plasma cysteine and sulphate levels in patients with motor neurone, Parkinson's and Alzheimer's disease. *Neuroscience Letter*, 110, pp: 216-220.
- Lehmann, A. (1987). Alterations in hippocampal extracellular amino acids and purine catabolites during limbic seizures induced by folate injections into the rabbit amygdala. *Neuroscience*, 22, pp: 573-578.
- Lehmann, A., Hagberg, H., Orwar, O. y Sandberg, M. (1993). Cysteine sulphinate and cysteate: mediators of cysteine toxicity in the neonatal rat brain? *European Journal of Neuroscience*, 5, pp: 1398-1412.
- Mataix, J. (2002). En libro: *Nutrición y alimentación humana (Tomo I)*. Editorial Ergon. Madrid.
- Moldeus, P. y Cotgreave, I.A. (1994). N-Acetylcysteine. *Methods in enzymology*, 34, pp: 482-492.
- Ozkan, Y., Ozkan, E. y Simsek, B. (2002). Plasma total homocysteine and cysteine levels as cardiovascular risk factors in coronary heart disease. *International Journal of Cardiology*, 82, pp: 269-277.
- Rodenstein, D., de Coster, A. y Gazzaniga, A. (1978). Pharmacokinetics of oral acetylcysteine: Absorption, binding and metabolism in patients with respiratory disorders. *Clinical Pharmacokinetics*, 3, pp: 247-254.
- Stipanuk, M.H., Dominy, J.E.Jr., Lee, J.I. y Coloso, R.M. (2006). Mammalian cysteine metabolism: new insights into regulation of cysteine metabolism. *Journal of Nutrition*, 136 (6), pp: 1652S-1659S.

4.11 N-acetil-L-metionina

4.11.1 Propuesta

La N-acetil-L-metionina es una fuente esencial del aminoácido metionina para su uso en alimentos para propósitos médicos especiales en niños con más de 1 año de edad y para adultos.

La AECOSAN ha propuesto una cantidad máxima de 2,5 mg/kg/día (175 mg/día para una persona de 70 kg) de N-acetil-L-metionina en adultos desde el punto de vista de su seguridad en su uso como complemento alimenticio.

4.11.2 Características y fuentes

Los sinónimos químicos de la N-acetil-L-metionina son: ácido L-2-acetilamino-4-metiltiobutírico o ácido-2-acetilamino-4-metiltiobutanoico. Su peso molecular es 191,25 g/mol del cual el 78 % corresponde a L-metionina. La estructura molecular es la siguiente (Figura 13):

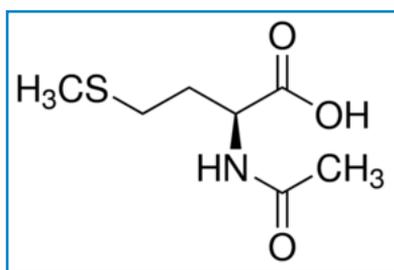


Figura 13. Fórmula estructural de la N-acetil-L-metionina.

Es un polvo blanco y cristalino con ligero olor. La N-acetil-L-metionina se obtiene por acetilación de la L-metionina. La L-metionina es un aminoácido permitido para uso en alimentos con fines nutricionales. La modificación de L-metionina a N-acetil-L-metionina mejora la palatabilidad del producto en la dieta, sin comprometer su valor biológico. La N-acetil-L-metionina esta propuesta como fuente de metionina en niños y en adultos.

4.11.3 Nutrición y metabolismo

El metabolismo de la N-acetil-L-metionina implica la hidrólisis a L-metionina por acción de la enzima acilasa-I, enzima que se encuentra en muchos tejidos (intestino, hígado y riñón) de muchos mamíferos, capaz de utilizar aminoácidos de derivados acil, endógenos y exógenos (Giardina, 1997) (Baxter et al., 2002). Esta deacetilación se ha demostrado tanto en estudios *in vivo* como *in vitro* (Francis y Smith, 1975). En humanos se ha observado que administrando cantidades equimolares por vía oral de L-metionina y N-acetil-L-metionina a voluntarios sanos, hombres y mujeres, la cantidad de metionina encontrada en plasma fue similar a partir de los 15 minutos después de la administración de los dos compuestos (Stegink et al., 1980). Estos hechos demuestran que la N-acetil-L-metionina es una buena fuente de L-metionina.

Desde el punto de vista nutricional, la ingesta diaria requerida estimada de metionina+cisteína

para niños de 7 meses hasta 18 años es del orden de 22 mg/kg p.c. y para adultos es del orden de 15-19 mg/kg p.c., que corresponde alrededor de 1 g/día para adultos de 60 kg de peso corporal (IOM, 2005). Los efectos tóxicos potenciales de la N-acetil-L-metionina radican en una excesiva ingesta de metionina que se manifiesta principalmente por una disminución de la ingesta de alimentos y de la ganancia de peso corporal junto con lesión tisular.

La L-metionina es un aminoácido esencial cuyo metabolismo implica conversión a S-adenosil L-metionina por la enzima metionina-adenosiltransferasa que principalmente se localiza en el hígado. Esta reacción viene catalizada por el ATP que dona su grupo adenosil a la metionina y forma fosfato inorgánico y pirofosfato. El compuesto formado, a su vez, dona su grupo metil y forma S-adenosil L-homocisteína y su hidrólisis origina homocisteína y adenosina. Seguidamente la L-homocisteína en combinación con serina se transforma en L-cistationina que a su vez se transforma en α -ceto-butirato y L-cisteína (Figura 14).

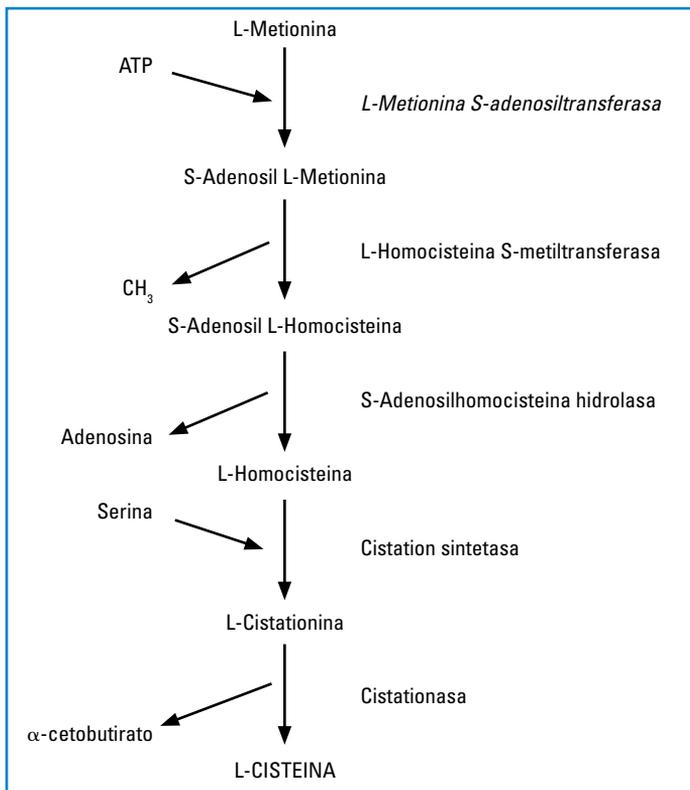


Figura 14. Metabolismo de la L-metionina. **Adaptado de:** (Laster et al., 1965).

4.11.4 Seguridad

No existen datos para caracterizar la relación dosis-respuesta para la L-metionina. Los datos sobre efectos adversos de L-metionina a partir de complementos alimenticios son considerados insuficientes para una evaluación dosis-respuesta y poder derivar un UL (límite máximo tolerable) para el hombre.

Desde 1960, se viene comunicando que niños con desórdenes de homocisteinuria sufren frecuentes trombosis arteriales y venosas (McCully, 1969). En 1985, ya se discute si la intolerancia a metionina constituye un riesgo potencial de enfermedad coronaria arterial (Murphy-Chutorian et al., 1985) y se sugiere que pacientes de edad menor a 30 años con hiperhomocisteinemia tienen una mayor probabilidad (alrededor de un 50 %) de sufrir un accidente vascular (Mudd, 1985).

Una importante cuestión en relación con la posible toxicidad de metionina es si surge como respuesta directa a la metionina o si se deriva por una carga excesiva de metionina que origina un aumento de los niveles de homocisteína y en consecuencia una disfunción vascular.

La seguridad de una carga o dosis excesivas de metionina ha sido examinada en humanos en estudios epidemiológicos. Aunque existen estudios limitados publicados la conclusión que se mantiene es que, aunque pueden originarse complicaciones transitorias de alteración de la percepción y vigilancia, no se han observado efectos adversos vasculares (Krupkova-Meixnerova et al., 2002). Dosis únicas de metionina de 7 g producen letargia, dosis de 10,5 g náuseas y vómitos (IOM, 2005). Solamente dosis elevadas, pero en administración repetida, pueden ser un factor de riesgo de enfermedad coronaria (IOM, 2005).

También se ha examinado si una ingesta alta de metionina en niños podría estar relacionada con toxicidad, concluyéndose que la hipermetioninemia es el resultado de la ingesta de una formulación con muy alto contenido de metionina, ingesta de metionina en un rango de 125-507 mg/kg/día, frente a una ingesta media de 62-97 mg/kg/día (Harvey et al., 2003). Niños con ingestas de metionina de dos a cinco veces superiores a una ingesta normal presentan efectos sobre el crecimiento y niveles plasmáticos de metionina extremadamente altos, pero sin efectos adversos a largo plazo (Garlick, 2006). Debido a que la metionina es un aminoácido indispensable y puede ser suplementado en la dieta, es apropiado preguntarse si una ingesta dietética de metionina origina un aumento de la concentración de homocisteína y con ello un riesgo cardiovascular. Diversos estudios evidencian que un incremento de homocisteína plasmática solo se observa con ingestas de hasta cinco veces la ingesta normal de metionina. Una ingesta moderada de metionina no conduce a hiperhomocisteinemia y subsiguientemente a un riesgo cardiovascular (Chambers et al., 1999).

Aunque la metionina se considera el aminoácido más tóxico en relación al crecimiento en los animales (Benevenga y Steele, 1984), no existe evidencia que apunte una toxicidad en el hombre, excepto a ingestas de altos niveles de metionina. Una dosis única de 100 mg/kg p.c. ha demostrado ser segura y corresponde con siete veces el requerimiento diario para los aminoácidos sulfuro (metionina+cisteína) (WHO, 2006). Pero si esta dosis de 100 mg/kg p.c. se administra repetidamente durante 7 días, se origina un incremento en los niveles plasmáticos de homocisteína y ha sido usada como un índice de susceptibilidad a enfermedad cardiovascular (McAuley et al., 1999). Suplementos de vitaminas B₆, B₁₂, C y ácido fólico protegen frente a los efectos de la metionina sobre los niveles de homocisteína y la función vascular (Garlick, 2006).

A pesar de que la metionina es un precursor de homocisteína y del papel de la homocisteína en la enfermedad cardiovascular, no existe evidencia de que la ingesta dietética de metionina (L-metionina o N-acetil-L-metionina) dentro de unos límites razonables pueda causar lesión cardiovascular.

No existen datos para caracterizar la relación dosis-respuesta para la L-metionina. Los datos sobre efectos adversos de L-metionina a partir de suplementos dietéticos son considerados insuficientes para una evaluación dosis-respuesta y poder derivar un UL (límite máximo tolerable) para el hombre.

A efectos de evaluación del riesgo, en ausencia de un NOAEL, o de un límite de confianza más bajo de la dosis *benchmark* (BMDL, *Benchmark dose lower bound*), la evaluación podría realizarse con el LOAEL (*Lowest observed adverse effect level*).

El *Norwegian Scientific Committee for Food Safety* (VKM) propone la ingesta de 100 mg/kg p.c. de L-metionina como el nivel más bajo de efecto adverso observable (LOAEL) basado en que en el hombre una ingesta de 100 mg/kg p.c. de L-metionina está asociada con somnolencia, vértigo y descenso o aumento de presión sanguínea (VKM, 2013).

Teniendo en cuenta que el LOAEL recomendado por el *Norwegian Scientific Committee for Food Safety* no queda justificado en un estudio dosis-respuesta, ni conocemos con exactitud la graduación de los efectos adversos detectados, se debería aplicar un factor de incertidumbre de 10 como factor de variación inter-individual del hombre y un factor de incertidumbre de 3 por extrapolar un LOAEL a un NOAEL, más un factor de 1 por no ser el LOAEL establecido en estudios dosis-respuesta, y tendríamos:

$$\text{LOAEL}/40 = 100/40 = 2,5 \text{ mg/kg p.c.}$$

Tomando como peso corporal del hombre 70 kg tendríamos una ingesta máxima recomendada de 175 mg/día.

4.11.5 Conclusión

Tomando como referencia los estudios que establecen un LOAEL de 100 mg/kg, el Comité Científico considera que una cantidad máxima de 2,5 mg/kg/día (175 mg/día para una persona de 70 kg) de N-acetil-L-metionina en adultos es aceptable desde el punto de vista de su seguridad en su uso como complemento alimenticio.

Referencias

- Baxter, J., Kim, Y. y Snowden, M. (2002). Hydrolysis of N-acetyl-L-glutamine by acylase I. *Journal of Food Science*, 66, pp: 1428-1433.
- Benevenga, N.J. y Steele, R.D. (1984). Adverse effects of excessive consumption of amino acids. *Annual Review of Nutrition*, 4, pp: 157-181.
- Chambers, J.C., McGregor, A., Jean-Marie, J., Obeid, O.A. y Kooner, J.S. (1999). Demonstration of rapid onset vascular endothelial dysfunction after hyperhomocysteinemia; an effect reversible with vitamin C therapy. *Circulation*, 99, pp: 1156-1160.
- Francis, K.T. y Smith, R.C. (1975). *In vitro* metabolism of ethionine, N-acetyl-ethionine and N-acetyl-methionine by rat liver microsomes. *Experientia*, 31, pp: 890-891.
- Garlick, P.J. (2006). Toxicity of methionine in humans. *Journal of Nutrition*, 136 (6), pp: 1722S-1725S.

- Giardina, T., Biagini, A., Dalle Ore, F., Ferre, E., Reynier, M. y Puigserver, A. (1997). The hog intestinal mucosa acylase I: subcellular localization, isolation, kinetic studies and biological function. *Biochimie*, 79, pp: 265-273.
- Harvey, M.S., Braverman, N., Pomper, M., Tezcan, K., Kronick, J., Jayakar, P. et al. (2003). Infantile hypermethioninemia and hyperhomocysteinemia due to high methionine intake: a diagnostic trap. *Molecular Genetics and Metabolism*, 79 (1), pp: 6-16.
- IOM (2005). Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein and Amino Acids. National Academic Press, 2005, Washington DC.
- Krupkova-Meixnerova, L., Vesela, K., Vitova, A., Janosikova, B., Andel, M. y Kozich, V. (2002). Methionine-loading test: evaluation of adverse effects and safety in an epidemiological study. *Clinical Nutrition*, 21 (2), pp: 151-156.
- Laster, L., Mudd, S.H., Finkelstein, J.D. e Irreverre, F. (1965). Homocystinuria due to cystathionine synthase deficiency: The metabolism of L-methionine. *Journal of Clinical Investigation*, 44 (10), pp: 1708-1719.
- McCully, K.S. (1969). Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *American Journal of Pathology*, 56, pp: 111-128.
- McAuley, D.F., Hanratty, C.G., McGurk, C., Nugent, A.G. y Johnston, G.D. (1999). Effect of methionine supplementation on endothelial function, plasma homocysteine, and lipid peroxidation. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 37, pp: 435-440.
- Mudd, S.H. (1985). Vascular disease and homocysteine metabolism. *New England Journal of Medicine*, 313, pp: 751-753.
- Murphy-Chutorian, D.R., Wexman, M.P., Grieco, A.J., Heininger, J.A., Glassman, E., Gaull, G.E., Ng, S.K., Feit, F., Wexman, K. y Fox, A.C. (1985). Methionine intolerance: a possible risk factor for coronary artery disease. *Journal of American College of Cardiology*, 6, pp: 725-730.
- Stegink, L.D., Filer, Jr.L.J. y Baker, L. (1980). Plasma methionine levels in normal adult subjects after oral loading with L-methionine and N-acetyl-L-methionine. *Journal of Nutrition*, 110, pp: 42-49.
- VKM (2013). Norwegian Scientific Committee for Food Safety. Doc. No 12-704 final 11. March 2013.
- WHO (2006). World Health Organization. Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition. Report of a Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation. WHO Technical Report Series No. 935, Geneva.

5. Hidroximetilbutirato

5.1 Propuesta

La AECOSAN ha propuesto una cantidad máxima diaria para el hidroximetilbutirato (HMB) en complementos alimenticios de 3 g. En Italia está autorizado en complementos alimenticios sin haberse establecido una cantidad máxima diaria (Italia, 2015). Además, también está autorizado como complemento alimenticio en Bélgica.

5.2 Características y fuentes

El HMB se puede suplementar en forma de una sal de calcio monohidratada (comúnmente referida como HMB cálcico) o como un ácido libre (HMB propiamente). Al comparar el ácido libre versus la sal de calcio (a niveles equivalentes de ácido libre de 0,8 g frente a 1 g de HMB cálcico), se ha observado que se alcanza una concentración plasmática máxima (C_{max}) más alta con el ácido libre (en un 76-97 %) en un tiempo (T_{max}) más corto (30 minutos); el área bajo la curva (AUC) también se incrementa en un 91-97 % (Fuller et al., 2011). En conclusión, HMB en forma ácido libre mejora la biodisponibilidad del HMB.

5.3 Nutrición y metabolismo

El HMB es un metabolito de origen natural del aminoácido leucina: la leucina se convierte en su análogo ceto (ceto isocaproato o CIC) y luego se convierte en HMB (a través de la enzima citosólica CIC dioxigenasa) (Sabourin y Bieber, 1983) (Van Koevering y Nissen, 1992). Cabe señalar que la versión mitocondrial de la CIC dioxigenasa convierte CIC en el derivado CoA del ácido isovalérico (β -hidroxiisovalerato) (Sabourin y Bieber, 1983). Todo el HMB endógeno deriva de la leucina (Van Koevering y Nissen, 1992), y la producción de HMB se correlaciona con la ingesta de leucina en la dieta (siguiendo una cinética de primer orden por parte de la CIC dioxigenasa citosólica) (Sabourin y Bieber, 1983) (Nissen et al., 1996) con cerca de un 5 % del total de leucina oxidada *in vivo* transformándose en HMB (Van Koevering y Nissen, 1992). A pesar de que la concentración plasmática de HMB es de 1-4 μ M, puede aumentar 5-10 veces después de una comida rica en leucina (Nissen et al., 1996).

5.4 Seguridad

Las pruebas toxicológicas indican que el nivel sin efecto adverso observado (NOAEL; la mayor dosis no asociada con signos tóxicos) para HMB en experimentos de ingestión oral en ratas es de 3 490 mg/kg para las ratas macho y 4 160 mg/kg para las ratas hembras (Baxter et al., 2005). Esto supone un equivalente estimado en humanos de 558 mg/kg y 665 mg/kg, respectivamente (CDER, 2005). Suponiendo un peso corporal de 70 kg equivale a 39 g (hombres) y 46 g (mujeres). Otras pruebas de toxicología con cerdos muestran que dosis de aproximadamente 5 g/kg en cerdos de más de 4 días no lograron alterar ningún parámetro bioquímico o peso de los órganos (Wilson et al., 2013).

Estudios toxicológicos en humanos señalan que aproximadamente 6 g de HMB diariamente (76 mg/kg/día) durante 8 semanas en hombres jóvenes no entrenados sometidos a ejercicio no mostró ningún efecto adverso sobre parámetros hematológicos, enzimas hepáticas y perfil lipídico así como también sobre la función renal (Gallagher et al., 2000). Además, 3 g de HMB diariamente durante un máximo de 8 semanas en jóvenes y personas de edad avanzada tampoco alteraron parámetros hematológicos en suero (Nissen et al., 2000). Esta dosis también resultó segura durante 1 año de administración (Baier et al., 2009). En general, esta dosis estándar de HMB parece ser bien tolerada durante largos períodos de tiempo (de acuerdo con estudios de metanálisis) (Rathmacher et al., 2004).

5.5 Conclusión

La forma de ácido libre se absorbe mejor que la forma cálcica, y alcanza un nivel máximo en suero más rápidamente que la sal de calcio de hidroximetilbutirato.

Hay que tener en cuenta que el hidroximetilbutirato es un metabolito de la leucina dietética en nuestro organismo y es mediador en una variedad de efectos de la leucina. Aproximadamente el 5 % de leucina en la dieta se convierte en hidroximetilbutirato en el organismo.

La suplementación con hidroximetilbutirato con hasta 3 g diarios ha demostrado ser muy bien tolerada. Se sospecha, además, que dosis más altas son igualmente seguras (pero hay menos pruebas en humanos).

El Comité Científico concluye que, en función de la información disponible en la actualidad y teniendo en cuenta las consideraciones generales reflejadas en el presente informe, la propuesta de la AECOSAN de una cantidad máxima diaria de 3 g de hidroximetilbutirato es aceptable desde el punto de vista de su seguridad en su uso como complemento alimenticio.

Referencias

- Baier, S., Johannsen, D., Abumrad, N., Rathmacher, J.A., Nissen, S. y Flakoll, P. (2009). Year-long changes in protein metabolism in elderly men and women supplemented with a nutrition cocktail of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB), L-arginine, and L-lysine. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 33 (1), pp: 71-82.
- Baxter, J.H., Carlos, J.L., Thurmond, J., Rehani, R.N., Bultman, J. y Frost, D. (2005). Dietary toxicity of calcium beta-hydroxy-beta-methyl butyrate (CaHMB). *Food and Chemical Toxicology*, 43 (12), pp: 1731-1741.
- CDER 2005). Center for Drug Evaluation and Research. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM078932.pdf> [acceso: 26-03-15].
- Fuller, J.C., Rathmacher, J.A., Baier, S.M., Abumrad, N.N., Angus, H.F. y Shar, R.L. (2011). Free acid gel form of β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) improves HMB clearance from plasma in human subjects compared with the calcium HMB salt. *British Journal of Nutrition*, 105 (3), pp: 367-72.
- Gallagher, P.M., Carrithers, J.A., Godard, M.P., Schulze, K.E. y Trappe, S.W. (2000). Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate ingestion, part II: effects on hematology, hepatic and renal function. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 32 (12), pp: 2116-2119.
- Italia (2015). Elenco sostanze ad effetto nutritivo o fisiológico impiegabili negli integratori alimentari. Disponible en: http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pagineAree_1268_listaFile_itemName_4_file.pdf [acceso: 27-09-15].
- Nissen, S., Sharp, R., Ray, M., Rathmacher, J.A., Rice, D., Fuller, J.C.Jr., Connelly, A.S. y Abumrad, N. (1996). Effect of leucine metabolite beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on muscle metabolism during resistance-exercise training. *The Journal of Applied Physiology*, 81 (5), pp: 2095-2104.
- Nissen, S., Sharp, R.L., Panton, L., Vukovich, M., Trappe, S. y Fuller, J.C. (2000). Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) supplementation in humans is safe and may decrease cardiovascular risk factors. *Journal of Nutrition*, 130 (8), pp: 1937-1945.
- Rathmacher, J.A., Nissen, S., Panton, L., Clark, R.H., Eubanks May, P., Barber, A.E., D'Olimpio, J. y Abumrad, N.N. (2004) Supplementation with a combination of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB), arginine, and glutamine is safe and could improve hematological parameters. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 28 (2), pp: 65-75.
- Sabourin, P.J. y Bieber, L.L. (1983). Formation of beta-hydroxyisovalerate by an alpha-ketoisocaproate oxygenase in human liver. *Metabolism*, 32 (2), pp: 160-164.
- Van Koeveering, M. y Nissen, S. (1992). Oxidation of leucine and alpha-ketoisocaproate to beta-hydroxy-beta-methylbutyrate in vivo. *The American Journal of Physiology*, 262 (1), pp: E27-31.
- Wilson, J.M., Fitschen, P.J., Campbell, B., Wilson, G.J., Zanchi, N., Taylor, L., Wilborn, C., Kalman, D.S., Stout, J.R., Hoffman, J.R., Ziegenfuss, T.N., López, H.L., Kreider, R.B., Smith-Ryan, A.E. y Antonio, J. (2013). International Society of Sports Nutrition Position Stand: beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB). *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 10, pp: 6.

6. Ácido lipoico

6.1 Propuesta

La AECOSAN ha propuesto la inclusión del ácido lipoico en el Real Decreto 1487/2009 sin especificar una cantidad máxima diaria. La solicitud se basa en que está autorizado en Italia sin haberse establecido una cantidad máxima diaria y con la advertencia de que si se está en tratamiento con medicamentos hipoglucemiantes se debe consultar al médico antes de su eventual uso (Italia, 2015). En Bélgica también está autorizado en complementos alimenticios sin haberse establecido una cantidad máxima diaria.

6.2 Características y fuentes

El ácido lipoico es un compuesto natural, presente tanto en el organismo como en algunos alimentos.

Químicamente el ácido alfa lipoico (ácido 1,2-ditiolano-3-pentanoico), también conocido como ácido tíoctico, es un ácido graso no esencial con una estructura bien definida que contiene dos átomos de azufre y un centro quiral, dando lugar a las formas enantioméricas R y S, tal y como muestra la figura 15:

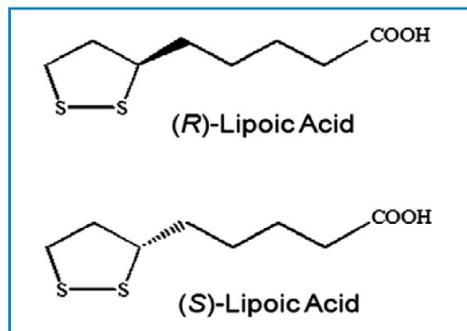


Figura 15. Estructura química del ácido lipoico con sus dos formas enantioméricas. **Fuente:** (Shay et al., 2009).

En los alimentos se presenta unido a proteínas (lipolisina) a concentraciones bajas de 0.3 mg/100 g en las fuentes naturales más ricas de origen vegetal (como espinacas) o animal (riñones). Otras fuentes son: el brócoli, la col verde, la lechuga y la acelga, y vísceras como corazón e hígado. La lipolisina también se ha encontrado en tomates, guisantes y coles de Bruselas.

El compuesto natural es la forma R mientras que en los suplementos alimenticios abunda la mezcla racémica R/S. Se presenta en equilibrio redox, la forma oxidada es un ciclo cerrado que tiene un enlace disulfuro y la forma reducida es un anillo abierto que contiene dos grupos tiol (ácido dihidrolipoico).

Se ha de destacar que el arsénico trivalente es capaz de reaccionar con el ácido lipoico. En la descarboxilación del ácido pirúvico, el arsénico trivalente, que actuaría como tóxico, es capaz de inhibir el ácido lipoico que es responsable de la transformación del piruvato en AcetilCoA. El ácido lipoico es una especie tíolica y esta característica química es aprovechada por el arsénico trivalente para reaccionar con el mismo (Figura 16).

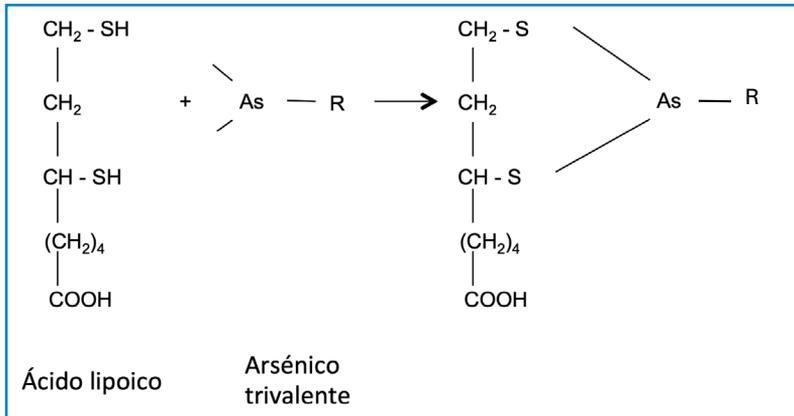


Figura 16. Reacción entre el ácido lipoico y el arsénico.

6.3 Nutrición y metabolismo

El ácido lipoico se sintetiza en el hígado, corazón y riñones (Ghibu et al., 2008), en particular en las mitocondrias mediante síntesis enzimática a partir del ácido octanoico participando de manera importante en el metabolismo energético de las mismas.

A pesar de que la síntesis de novo parece aportar la cantidad de ácido lipoico necesaria para su función en el metabolismo, también puede absorberse a partir de la dieta. De hecho el ácido lipoico se absorbe intacto a partir de las fuentes dietéticas antes citadas y se acumula de forma transitoria en diversos tejidos (hígado, corazón y músculo esquelético). Diversos estudios muestran que la biodisponibilidad depende de varios factores, si se ingiere en forma de ácido o de sal, con una comida o solo, etc. (Shay et al., 2009).

Además las células disponen de sistemas para transportar, utilizar y excretar el ácido lipoico libre (no unido a proteínas). Su transporte depende del valor de pH, acelerándose en pH ácido. Es precisamente durante el transporte, cuando tiene lugar aparentemente la conversión del ácido lipoico en dihidrolipoico, más oxidante (Takaishi et al., 2007) y que también puede ser excretado.

El destino metabólico más común para el ácido lipoico *in vivo* es la β -oxidación, siendo los principales metabolitos: el bisnorlipoato, tetranorlipoato, β -hidroxi-bisnorlipoato, o los bis-metilados mercapto-derivados (Figura 17).

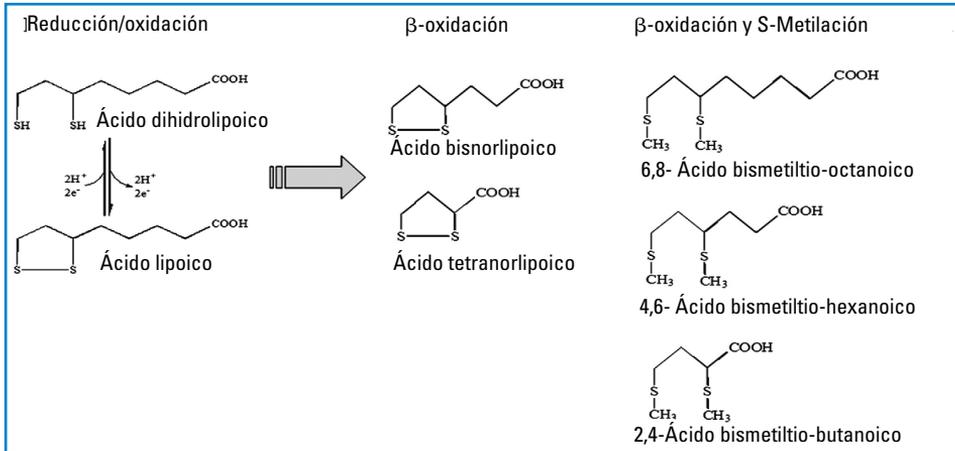


Figura 17. Metabolismo del ácido lipoico. **Fuente:** (Shay et al., 2009).

En relación a su función, su rol como cofactor está bien estudiado. Sólo se conjuga la forma R del ácido lipoico con el fin de conservar los residuos de lisina en un enlace amida, haciendo por tanto esta isoforma esencial como cofactor en los sistemas biológicos, en particular como cofactor esencial de las enzimas deshidrogenasas, principalmente de la piruvato deshidrogenasa y de la deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada (subunidad E2 de la PDH y de la KADH), y de complejo de deshidrogenasas 2-oxoglutarato (Shay et al., 2009).

Tanto el ácido lipoico como el dihidrolipoico se le han atribuido tener propiedades antioxidantes y al dihidrolipoico también propiedades prooxidantes en sistemas en los que se genera radical hidroxilo (Ghibu et al., 2008, 2009).

6.4 Seguridad

Estudios de toxicidad subcrónica en ratas, fijan un NOAEL de 60 mg/kg/día (Cremer et al., 2006). Si consideramos un NOAEL medio de 60 mg/kg/día y usamos como factor de incertidumbre 100, la IDA será de 0,6 mg/kg/día. Lo que, para una persona de 70 kg, permitiría una ingestión diaria de 42 mg de ácido lipoico.

La dosis más usada es la de 600 mg/día y es la aprobada en Japón y Alemania para la neuropatía diabética. En ese país se indica para algunas patologías desde hace más de 50 años. La dosis máxima utilizada es de 2 400 mg/día en ensayos clínicos y no se notificaron efectos adversos. Tampoco con dosis de 1 800 mg/día durante 6 meses (Costantino et al., 2014).

Sin embargo, no hay estudios suficientes que prueben su seguridad en niños, embarazadas o mujeres en periodo de lactancia, tampoco en personas con diabetes, patologías renales o hepáticas, por lo que por precaución y seguridad no se aconseja su administración en estas situaciones.

6.5 Conclusión

El Comité Científico concluye que la información toxicológica sobre el ácido lipoico es limitada. Existen ensayos clínicos en población adulta sana (excluyendo a mujeres embarazadas y en periodo de lactancia) en los que no se han notificado efectos adversos con dosis de entre 1 800 y 2 400 mg/día en periodos de tiempo inferiores a 6 meses. Además, tomando como referencia los estudios de toxicidad subcrónica en ratas que fijan un NOAEL medio de 60 mg/kg/día, el Comité Científico considera que, en función de la información disponible en la actualidad y teniendo en cuenta las consideraciones generales reflejadas en el presente informe, una cantidad máxima de 0,6 mg/kg/día (42 mg/día para una persona de 70 kg) de ácido lipoico en adultos es aceptable desde el punto de vista de su seguridad en su uso como complemento alimenticio.

Referencias

- Cremer, D.R., Rabeler, R., Roberts, A. y Lynch, B. (2006). Long-term safety of alpha-lipoic acid (ALA) consumption: A 2-year study. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 46 (3), pp: 193-201.
- Costantino, M., Guaraldi, C., Costantino, D., De Grazia, S. y Unfer, V. (2014). Peripheral neuropathy in obstetrics: efficacy and safety of α -lipoic acid supplementation. *European review for medical and pharmacological sciences*, 18 (18), pp: 2766-2771.
- Guibu, S., Richard, C., Delemasure, S., Vergely, C., Mogosan, C. y Muresan, A. (2008). An endogenous dithiol with antioxidant properties: alpha-lipoic acid, potential uses in cardiovascular diseases. *Annales de Cardiologie et de Angéiologie*, 57 (3), pp: 161-165.
- Ghibu, S., Richard, C., Vergely, C., Zeller, M., Cottin, Y. y Rochette L. (2009). Antioxidant properties of an endogenous thiol: Alpha-lipoic acid, useful in the prevention of cardiovascular diseases. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 54 (5), pp: 391-398.
- Italia (2015). Elenco sostanze ad effetto nutritivo o fisiológico impiegabili negli integratori alimentari. Disponible en: http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pagineAree_1268_listaFile_itemName_4_file.pdf [acceso: 27-09-15].
- Shay, K.P., Moreau, R.F., Smith, E.J., Smith, A.R. y Hagen, T.M. (2009). Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: Molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1790 (10), pp: 1149-1160.
- Takaishi, N., Yoshida, K., Satsu, H. y Shimizu, M. (2007). Transepithelial transport of alpha-lipoic acid across human intestinal Caco-2 cell monolayers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, pp: 5253-5259.

7. *Monascus purpureus*

7.1 Propuesta

La AECOSAN ha propuesto una cantidad máxima diaria para *Monascus purpureus* condicionada a un aporte máximo de 10 mg de monacolininas expresadas como monacolina K.

Esta propuesta se basa en la existencia de una declaración de propiedad saludable aprobada por EFSA respecto a que “la monacolina K del arroz de levadura roja contribuye a mantener niveles normales de colesterol sanguíneo”. Esta declaración solo puede utilizarse respecto a alimentos que aporten una ingesta diaria de 10 mg de monacolina K del arroz de levadura roja.

Para que un producto pueda llevar esta declaración, se informará al consumidor de que el efecto beneficioso se obtiene con una ingesta diaria de 10 mg de monacolina K procedente de preparados fermentados de arroz de levadura roja (EFSA, 2011) (UE, 2012).

7.2 Características y fuentes

La levadura roja comercial utilizada como complemento en fitoterapia se obtiene por fermentación de arroz con una mezcla de hongos del género *Monascus*, como *M. purpureus* Went (Monascaeae) y otros, que se utilizan para obtener vino de arroz. El compuesto activo principal de la levadura roja es la monacolina K, principio activo que ha sido comercializado con el nombre genérico de lovastatina. También lo producen otros hongos como *Aspergillus terreus* o *Pleurotus ostreatus*.

7.3 Nutrición y metabolismo

La monacolina K inhibe la 3-hidroxi-metil-glutaril (HMG)-CoA reductasa, enzima limitante en la biosíntesis endógena del colesterol. La monacolina K es un profármaco derivado del hexahidronaftaleno β -hidroxi- δ -lactona, que se hidroliza a ácido mevinolínico, de estructura similar a la HMG-CoA. La monacolina K se une a la HMG reductasa, bloqueando la conversión de HMG-CoA a ácido mevalónico y la subsiguiente síntesis de colesterol (Castillo y Martínez, 2007).

El compuesto inactivo se administra vía oral, se absorbe irregularmente (31 %), transformándose en los hidroxiácidos activos en mucosa intestinal e hígado. Es metabolizada por la isozima del citocromo P-450 CYP3A4, lo cual puede dar lugar a interacciones importantes (Flórez et al., 2014).

Su biodisponibilidad es muy baja (<5 %) debido a una absorción deficiente y a un metabolismo hepático de primer paso. La unión a proteínas plasmáticas es alta (95 %), y pasa las barreras hematoencefálica y placentaria. La concentración máxima en plasma se alcanza aproximadamente a las 2 horas, siendo la semivida en plasma de 2,5 a 3 horas. Se elimina por heces y orina (Flórez et al., 2014).

La dosis recomendada para la levadura roja son dos cápsulas dos veces al día. Como las cápsulas suelen contener 600 mg de una mezcla estandarizada de levadura y arroz, con un contenido de 2,4 mg de monacolina K, la dosis recomendada es 4,8 mg \times 2 dosis, es decir, 9,6 mg/día en dos tomas (Bratman y Girman, 2003).

7.4 Seguridad

Las mujeres embarazadas no deben tomar levadura roja, ni tampoco durante el periodo de lactancia, al igual que los niños menores de 12 años. Los enfermos con insuficiencia hepática o renal deben tomarla con precaución (SEFIT, 2015).

La tolerabilidad de la monacolina K, al igual que el resto de las estatinas es alta. Un porcentaje significativo (7-29 %) de pacientes tratados con estatinas presenta molestias musculares (mialgias, contracturas y pérdida de fuerza), con concentraciones séricas de enzimas musculares (por ejemplo, creatinfosfocinasa) normales o elevadas. Porcentajes menores presentan fatiga, elevación de enzimas hepáticos, neuropatía periférica, insomnio, alteraciones neurocognitivas e incluso diabetes mellitus (Stroes et al., 2015). Un reducido porcentaje de pacientes pueden presentar una miopatía inflamatoria grave inmuno-mediada. La incidencia de estos efectos se relaciona con la dosis de estatina (generalmente más de 20 mg de lovastatina o equivalente), el tipo de estatina, asociación a otros fármacos hipolipemiantes (por ejemplo, gemfibrozilo), edad, y género, entre otros factores condicionantes (Osakidetza, 2008) (Stroes et al., 2015).

Respecto a la levadura roja en el documento de consenso de la Sociedad Europea de Arteriosclerosis se considera a este producto como efectivo y bien tolerado (Stroes et al., 2015). Un meta-análisis que incluyó 13 ensayos clínicos concluyó que la levadura roja de arroz es un producto relativamente seguro como tratamiento de las dislipidemias (Li et al., 2014). No se observaron diferencias entre las cifras de creatinofosfocinasa sérica, ni tampoco en las de glucemia entre los grupos de tratamiento y los que recibieron el placebo. Aunque el tiempo de intervención de estos estudios fue relativamente prolongado (entre 4 semanas y 6 meses), las dosis equivalentes de lovastatina fueron bajas, menos de 10 mg en todos los estudios, excepto uno (Huang et al., 2007). Asimismo, se ha observado que podría ser un tratamiento efectivo y bien tolerado en pacientes que han presentado intolerancia a las estatinas (principalmente mialgias), ya que sólo un 5 % de los pacientes tratados refirieron mialgias (Osakidetza, 2008) (Halbert et al., 2010).

Por todo ello, aunque a las dosis establecidas los efectos indeseables no parecen ser relevantes, sería preciso realizar ensayos clínicos con dosis equivalentes a 10 mg/día de lovastatina durante un periodo prolongado de tiempo (1-2 años). A falta de estos estudios, se recomienda realizar un seguimiento en caso de dolor muscular. También se debe evitar el consumo de este producto con uva, ya que su nivel sérico podría aumentar 5-20 veces. Puede interactuar con inmunosupresores, antifúngicos y antibióticos (Harkness y Bratman, 2003). Debido a que los inhibidores de la HMG-CoA reductasa reducen también la síntesis de coenzima Q10, se recomienda una suplementación con CoQ10 si el consumo se realiza a largo plazo.

7.5 Conclusión

No existe una correlación directa entre la administración de monacolina K a la dosis de 10 mg y posibles efectos indeseables. Por ello, el Comité Científico concluye que la propuesta de la AECOSAN de una cantidad máxima diaria para *Monascus purpureus* condicionada a un aporte máximo de 10 mg de monacolinas expresadas como monacolina k es aceptable desde el punto de vista de su seguridad en su uso como complemento alimenticio.

Dado que monacolina K es un medicamento usado a dosis estándar de 20 y 40 mg, y que en algunos casos se aconseja la dosis inicial de 10 mg (Naci et al., 2013) (IQB, 2015), las mujeres embarazadas no deben tomar levadura roja, ni tampoco durante el periodo de lactancia, al igual que los niños menores de 12 años (Osakidetza, 2008). Los enfermos con insuficiencia hepática o renal deben tomarla con precaución y previa consulta médica.

Referencias

- Bratman, S. y Girman, A.M. (2003). En libro: *Mosby's Handbook of Herbs and Supplements, and their Therapeutic Uses*. Mosby Health Gate: St. Louis. pp: 848-851.
- Castillo, E. y Martínez, I. (2007). En libro: *Manual de Fitoterapia*. Elsevier-Masson. Barcelona. pp: 152.
- EFSA (2011). European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to monacolin K from red yeast rice and maintenance of normal blood LDL cholesterol concentrations (ID 1648, 1700) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *The EFSA Journal*, 9 (7), pp: 2304.
- Flórez, J., Armijo, J.A. y Mediavilla, A. (2014). En libro: *Farmacología Humana*, 6ª ed., Elsevier-Masson, Barcelona. pp: 864-878.

- Halbert, S.C., French, B., Gordon, R.Y., Farrar, J.T., Schmitz, K., Morris, P.B., Thompson, P.D., Rader, D.J. y Becker, D.J. (2010). Tolerability of red yeast rice (2,400 mg twice daily) versus pravastatin (20 mg twice daily) in patients with previous statin intolerance. *American Journal of Cardiology*, 105, pp: 198-204.
- Harkness, R. y Bratman, S. (2003). En libro: *Mosby's Handbook of Drug-Herb and Drug-Supplement Interactions*. Mosby Health Gate: St. Louis. pp: 237-238.
- Huang, C.F., Li, T.C., Lin, C.C., Shih, H.C. y Lai, M.M. (2007). Efficacy of *Monascus purpureus* Went rice on lowering lipid ratios in hypercholesterolemic patients. *European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation*, 14, pp: 438-440.
- IQB (2015). Instituto Químico Biológico. Mediciclopedia. Monografías: Lovastatina. Disponible en: <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/1032.htm>. [acceso: 11-06-15].
- Li, Y., Jiang, L., Jia, Z., Xin, W., Yang, S., Yang, Q. y Wang, L. (2014). A meta-analysis of red yeast rice: an effective and relatively safe alternative approach for dyslipidemia. *PLoS One*, 9, pp: e98611.
- Naci, H., Brugts, J.J., Fleurence, R. y Ades, A.E. (2013). Dose-comparative effects of different statins on serum lipid levels: a network meta-analysis of 256,827 individuals in 181 randomized controlled trials. *The European Journal of Preventive Cardiology*, 20, pp: 658-670.
- Osakidetza (2008). Guía de práctica clínica sobre el manejo de los lípidos como factor de riesgo cardiovascular. Osakidetza y Departamento de Sanidad: Vitoria. pp: 124-126, 184-252.
- SEFIT (2015). Sociedad Española de Fitoterapia. Disponible en: <http://www.fitoterapia.net/> [acceso: 11-06-15].
- Stroes, E.S., Thompson, P.D., Corsini, A., Vladutiu, G.D., Raal, F.J., Ray, K.K., Roden, M., Stein, E., Tokgözoğlu, L., Nordestgaard, B.G., Bruckert, E., De Backer, G., Krauss, R.M., Laufs, U., Santos, R.D., Hegele, R.A., Hovingh, G.K., Leiter, L.A., Mach, F., März, W., Newman, C.B., Wiklund, O., Jacobson, T.A., Catapano, A.L., Chapman, M.J. y Ginsberg, H.N. (2015). Statin-associated muscle symptoms: impact on statin therapy-European Atherosclerosis Society Consensus Panel Statement on Assessment, Aetiology and Management. *European Heart Journal*, 36, pp: 1012-1022.
- UE (2012). Reglamento (UE) N° 432/2012 de la Comisión de 16 de mayo de 2012 por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños. DO L 136 de 25 de mayo de 2012, pp: 1-40.

8. Carbón activo

8.1 Propuesta

La AECOSAN ha propuesto una cantidad máxima diaria para el carbón activo de 2 g.

Esta propuesta se basa en la autorización de una declaración de propiedad saludable en relación a que el carbón activo contribuye a reducir una flatulencia excesiva después de comer. Esta declaración solo puede utilizarse con alimentos que contengan 1 g de carbón activo por porción cuantificada. Para que un producto pueda llevar esta declaración, se informará al consumidor de que el efecto beneficioso se obtiene tomando 1 g de carbón activo por lo menos 30 minutos antes de la comida y otro gramo poco después de la comida (UE, 2012).

8.2 Características y fuentes

El carbón activo es un material inerte compuesto por carbono organizado en forma microcristalina que ha sufrido un proceso de activación dando lugar a una red densa con poros cuyos diámetros varían entre 10 y 2 000 Å (Marín, 2003). Gracias a esta disposición el carbón presenta una elevada

superficie de adsorción del orden de 300 a 2 000 m²/g (TAP, 2002) utilizándose por ello para adsorber gases y vapores de una mezcla de gases y disolver y dispersar sustancias presentes en líquidos.

Las fuentes para preparar carbón activo son numerosas y la activación puede llevarse a cabo por distintos mecanismos. Entre las fuentes de carbón activo se encuentran los huesos de animales, carne, sangre, madera dura o blanda, cáscaras de frutos, cereal, fibras vegetales, lignina, residuos procedentes de las refinerías y carbón, entre otros.

Las fuentes de carbono se tratan para obtener el carbón activado siguiendo una amplia variedad de métodos, distinguiéndose dos etapas: carbonización seguida de oxidación. En la activación se puede incluir el uso de ácidos sintéticos, bases u otras sustancias en una corriente de gases como nitrógeno, o dióxido de carbono. La calidad y el rendimiento puede mejorarse eliminando la humedad (FAO, 1985). También puede utilizarse microondas o resinas intercambiadoras de iones (FCC, 1996).

Una vez fabricado el carbón activo, se procede a su caracterización en función de su área de superficie y distribución de poro. El *Food Chemical Codex* fijó en 1996 especificaciones para el carbón activo de grado alimentario (FCC, 1996).

EFSA publicó en 2013 una opinión en relación al uso del carbón activo para su uso en contacto con los alimentos, donde concluye que el carbón activo deberá cumplir con los mismos requisitos de pureza que para el colorante Carbón Vegetal (E-153) establecidos por la Directiva 95/45/CE, con excepción del contenido de cenizas, que puede ser hasta un 10 % (p/p) (EFSA, 2013).

En relación a sus acciones, se diferencian cuatro tipos: adsorción, filtración mecánica, intercambio de iones y oxidación superficial.

8.3 Nutrición y metabolismo

El carbón activo se considera inerte desde el punto de vista nutricional, por lo que cabe esperar que no sea absorbido por el organismo.

Por otro lado, hay que tener en cuenta el gran poder absorbente del carbón activo, lo que motiva sus dos aplicaciones conocidas, su uso para combatir la aerofagia, meteorismo y flatulencia, y su empleo para tratar intoxicaciones, por su capacidad de adsorción de las sustancias tóxicas. Esta misma característica, hace desaconsejable su uso prolongado por su posible interferencia en la adsorción de algunos nutrientes.

8.4 Seguridad

Desde el punto de vista de la seguridad del uso del carbón activo, no se han encontrado estudios toxicológicos del producto que permitan la evaluación científica rigurosa de este aspecto.

Sin embargo, sí que se conoce su uso como medicamento para tratar los mismos síntomas para los que se consideraría eficaz su uso como complemento. En el caso del uso como medicamento, en la ficha técnica del mismo se indica que puede perjudicar a la motilidad intestinal. También se indica que “la investigación preclínica no ha revelado efectos tóxicos del principio activo”, sin embargo, esa investigación preclínica no es pública.

Por otro lado, desde el punto de vista de la seguridad sería necesario conocer el tamaño de

partícula del complemento alimentario, prestando especial atención a la posible presencia de nanopartículas.

8.5 Conclusión

El Comité Científico considera que la información toxicológica disponible es insuficiente para determinar cuál sería la cantidad máxima diaria de carbón activo que se podría considerar segura en su uso como complemento alimenticio.

Referencias

- FAO (1985). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Industrial charcoal making. FAO forestry paper 63. Mechanical Wood Products Branch. Forest Industries Division. FAO Forestry Department. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, 1985.
- FCC (1996). Food Chemicals Codex Committee. En libro: *Food Chemicals Codex (4th ed.)*. Washington: National Academy.
- EFSA (2013). European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the safety evaluation of the active substances iron, sodium chloride, water, silica gel, activated carbon, monosodium glutamate, potassium acid tartrate, powdered cellulose, malic acid, chabazite, hydroxypropyl cellulose, potassium carbonate, sodium thiosulfate, propylene glycol, glycerin, polyethyleneglycol sorbitan monooleate, sodium propionate and clinoptilolite for use in food contact materials. *The EFSA Journal*, 11 (4), pp: 3155.
- Marín, R. (2003). En libro: *Fisicoquímica y microbiología de los medios acuáticos. Tratamiento y control de calidad de aguas*. Díaz de Santos S.A. Madrid.
- TAP (2002). Technical Advisory Panel. Activated carbon processing. National Organic Standards Board Technical Advisory Panel Review. Disponible en: <http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/getfile?dDocName=STEL-PRDC5066960> [acceso: 8-02-15].
- UE (2012). Reglamento (UE) N° 432/2012 de la Comisión de 16 de mayo de 2012 por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños. DO L 136 de 16 de mayo de 2012, pp: 1-40.

9. Lactulosa

9.1 Propuesta

La AECOSAN ha propuesto una cantidad máxima diaria para la lactulosa de 10 g.

Esta propuesta se basa en la autorización de una declaración de propiedad saludable en relación a que la lactulosa contribuye a la aceleración del tránsito intestinal. Esta declaración sólo puede utilizarse respecto a alimentos que contengan 10 g de lactulosa por porción cuantificada. Para que un producto pueda llevar esta declaración, se informará al consumidor de que el efecto beneficioso se obtiene a partir del consumo de 10 g de lactulosa en una única ingesta (EFSA, 2010) (UE, 2012).

En cuanto a su historia de consumo como complemento alimenticio, la lactulosa tiene esta consideración en Bélgica y en Italia.

En otros países de la Unión Europea como Eslovenia, Reino Unido, Suecia y República Checa tiene un uso medicinal.

En España en este momento está considerada como un medicamento según la Agencia Española del Medicamentos y Productos Sanitarios. En las fichas técnicas de diferentes medicamentos, en todos los casos se recomiendan dosis diarias entre 10 y 20 g en una o dos tomas, llegando a 30 g/día en casos de encefalopatía hepática.

9.2 Características y fuentes

La lactulosa es un disacárido de fórmula 4-O-β-D-Galactopiranosil-β-D-fructofuranosa (EFSA, 2010).

Este hidrato de carbono no digerible, no se encuentra como tal presente en la naturaleza, aunque se puede obtener por isomerización alcalina de lactosa o por la síntesis catalizada enzimáticamente (Illanes, 2011).

En referencia a sus usos, al ser más dulce y más soluble que la lactosa, tiene aplicaciones en la repostería. Tradicionalmente se ha usado como laxante, en casos crónicos y agudos, y en el tratamiento de la hiperamonemia y la encefalopatía crónica hepática. Además se han publicado estudios en los que se muestra que su administración aumenta la proporción de bacterias que promueven la salud en el tracto gastrointestinal, tales como bifidobacterias y lactobacilos y en estudios con animales disminuye la presencia de bacterias patógenas tales como *Salmonella* (Schuster-Wolff-Bühning et al., 2010) (Bouhnik et al., 2014).

9.3 Nutrición y metabolismo

La absorción de la lactulosa en el tracto gastrointestinal es muy baja y en el hombre no es digerible debido a la falta de enzimas que puedan hidrolizarla. Debido a esto las dosis orales de solución de lactulosa llegan al colon prácticamente sin cambios. Allí se descompone por la acción de las bacterias del colon principalmente a ácido láctico y también en menor medida en ácido fórmico y acético, lo que resulta en un aumento de la presión osmótica y ligera acidificación del contenido del colon. Esto a su vez provoca un aumento en el contenido de agua de las heces y ablandamiento de las mismas.

9.4 Seguridad

La ficha de esta especialidad de la Agencia Española del Medicamentos y Productos Sanitarios, describe que “Los datos de los estudios preclínicos no muestran riesgos especiales para los seres humanos, según estudios de toxicidad de dosis única y dosis repetidas”.

Estudios en animales de laboratorio (ratón y conejo) mostraron que la lactulosa no tiene efecto teratogénico, ni adversos para la reproducción (Baglioni y Dubini, 1976). Se absorbe pobremente por el intestino en adultos (0,2-2,8 %) (Hallmann, 2000), en lactantes (menos de 1,7 %) (Dmitriev, 1997) y niños (menos del 1 %) (Miki et al., 1996), no se puede hidrolizar por los enzimas humanos y es convertida en diversos ácidos orgánicos de cadena corta principalmente por bacterias en el intestino.

La lactulosa se incluye entre los denominados laxantes osmóticos (Hallmann, 2000). En individuos sanos no se han descrito efectos adversos serios, solamente síntomas gastrointestinales menores, como hinchazón, gas, dolor de estómago, diarrea, náuseas o incluso dolor de cabeza (Gordon et

al., 2013) producto de una intolerancia que no depende de la reducción de la dosis (Als-Nielsen et al., 2004).

Por todo ello, su administración empeora las diarreas y los especialistas recomiendan que se evite en el caso de enfermedades intestinales inflamatorias crónicas por su efecto osmótico y la disminución del tiempo de tránsito. Sin embargo, dado su efecto menor se sigue utilizando en estudios de permeabilidad en estos enfermos (Van Citters y Lin, 2005), incluso la administración de 25 g de lactulosa se ha propuesto para el diagnóstico inequívoco de colon irritable (Le Neve et al., 2013).

Entre las mayores cantidades administradas que se han descrito, encontramos dos metanálisis en los que estudió su efecto frente a la encefalopatía hepática. En ellos se administraban de 30 a 120 y de 20 a 80 g diarios, respectivamente. En ninguno de los estudios se detectaron efectos adversos serios asociados a su ingesta, sólo ciertas reacciones gastrointestinales y un caso de alergia (Als-Nielsen et al., 2004) (Luo et al., 2011).

Estos datos sugieren que la ingesta diaria de hasta 10 g de lactulosa solo tendría un riesgo menor.

9.5 Conclusión

Los estudios de toxicidad realizados indican que la ingesta diaria de hasta 10 g de lactulosa solo tendría un riesgo menor en ciertos individuos con especial sensibilidad.

Por ello, el Comité Científico concluye que, en función de la información disponible en la actualidad y teniendo en cuenta las consideraciones generales reflejadas en el presente informe, la propuesta de la AECOSAN de una cantidad máxima diaria de lactulosa de 10 g en complementos alimenticios es aceptable desde el punto de vista de su seguridad en su uso como complemento alimenticio.

Referencias

- Als-Nielsen, B., Gluud, LL. y Gluud, C. (2004). Non-absorbable disaccharides for hepatic encephalopathy: systematic review of randomised trials. *British Medical Journal*, 328, pp: 1046.
- Baglioni, A. y Dubini, F. (1976). Lattulosio: valutazione tossicologica. *Bollettino chimico farmaceutico*, 115 (8), pp: 596-606.
- Bouhnik, Y., Attar, A., Joly, F.A., Riottot, M., Dyard, F. y Flourie, B. (2004). Lactulose ingestion increases faecal bifidobacterial counts: A randomised double-blind study in healthy humans. *European Journal of Clinical Nutrition*, 58, pp: 462-466.
- Dmitriev, A., Gmoshinski, I., Mazo, V., Dmitrieva, N., Uzebekova, D., Chugunova, L. y Mirgorodskaya, L. (1997). Intestinal permeability to alpha-lactalbumine of breast milk and lactulose in infants. *Gut*, 41, pp: 1.
- EFSA (2010). European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to lactulose and decreasing potentially pathogenic gastro-intestinal microorganisms (ID 806) and reduction in intestinal transit time (ID 807) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *The EFSA Journal*, 8 (10), pp: 1806.
- Gordon, M., Naidoo, K., Akobeng, A.K. y Thomas, A.G. (2013). Cochrane Review: Osmotic and stimulant laxatives for the management of childhood constipation (Review). *Evidence-Based Child Health: A Cochrane Review Journal*, 8, pp: 57-109.
- Hallmann, F. (2000). Toxicity of commonly used laxatives. *Medical Science Monitor*, 6, pp: 618-628.
- Illanes, A. (2011). Whey upgrading by enzyme biocatalysis. *Electronic Journal of Biotechnology*, 14 (6).

- Le Neve, B., Posserud, I., Bohn, L., Guyonnet, D., Rondeau, P., Tillisch, K., Naliboff, B., Mayer, E.A. y Simren, M. (2013). A Combined Nutrient and Lactulose Challenge Test allows symptom-based clustering of patients with irritable bowel syndrome. *American Journal of Gastroenterology*, 108, pp: 786-795.
- Luo, M., Li, L., Lu, C.Z. y Cao, W.K. (2011). Clinical efficacy and safety of lactulose for minimal hepatic encephalopathy: a meta-analysis. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 23, pp:1250-1257.
- Miki, K., Butler, R., Moore, D. y Davidson, G. (1996). Rapid and simultaneous quantification of rhamnose, mannitol, and lactulose in urine by HPLC for estimating intestinal permeability in pediatric practice. *Clinical Chemistry*, 42, pp: 71-75.
- Schuster-Wolff-Buhring, R., Fischer, L. y Hinrichs, J. (2010). Production and physiological action of the disaccharide lactulose. *International Dairy Journal*, 20, pp: 731-741.
- UE (2012). Reglamento (UE) N° 432/2012 por el que se establece una lista de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo. DO L 136 de 25 de mayo de 2012, pp: 1-40.
- Van Citters, G. y Lin, H. (2005). Nutrition in inflammatory bowel disease. En libro: *Inflammatory Bowel Disease: From Bench to Bedside*. Targan, S., Shanahan, F. y Karp, L. (ed.), Springer US. pp: 587-604.

Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) en relación a la complementación con vitamina D de la dieta de niños de 0 a 3 años

Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición

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

Secretario técnico

Vicente Calderón Pascual

Número de referencia: AECOSAN-2015-007

Documento aprobado por la Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición del Comité Científico en su sesión plenaria de 18 de noviembre de 2015

Grupo de trabajo

Josep Antoni Tur Marí (Coordinador)

Elena Alonso Lebrero

María Aránzazu Martínez Caballero

Gaspar Ros Berrueto

Resumen

La vitamina D es necesaria tanto para la buena salud ósea y muscular, como para diversos mecanismos fisiológicos y su déficit se relaciona con diversas patologías, por todo lo cual se recomienda una ingesta diaria que asegure unos niveles séricos de 25-hidroxicolecalciferol de 20 ng/ml (50 nmol/l). Puede obtenerse de la dieta o bien sintetizarse en la piel, pero la incidencia lumínica es distinta según los países y regiones y dicha capacidad de síntesis se reduce con la edad, por lo que podría recomendarse complementar la dieta con vitamina D. La mayor parte de los estudios relativos a la ingesta de vitamina D en niños europeos muestran que dicha ingesta es inferior a lo recomendado, razón por la cual la mayoría de los países europeos, organismos internacionales y sociedades científicas han emitido recomendaciones de complementar la dieta con vitamina D, como también han definido los niveles máximos tolerados de dicha vitamina. Se recomienda la ingesta de alimentos ricos en vitamina D, la exposición solar razonable y la práctica de actividad física al aire libre suficiente para obtener unos niveles séricos de 20 ng/ml o 50 nmol/l de 25(OH)D. En su defecto, se aconseja complementar hasta con 400 UI/día (10 µg/día) bajo estricto control médico o pediátrico, especialmente durante la lactancia materna, que podrá adaptarse según las características de cada persona, manteniéndose siempre alejados de los niveles máximos tolerados.

Palabras clave

Vitamina D, colecalciferol, 1,25-dihidroxi-colecalciferol, complemento, niños 0-3 años.

Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Consumer Affairs, Food Safety and Nutrition (AECOSAN) in relation to vitamin D supplementation in the diet of children aged 0 to 3 years

Abstract

Vitamin D is necessary for both healthy bones and muscles, and for various physiological mechanisms, and a lack of Vitamin D is associated with several illnesses. Therefore, a daily intake is recommended to ensure 25-hydroxycholecalciferol serum levels of 20 ng/ml (50 nmol/l). This can be obtained through the diet or be synthesized in the skin, but solar radiation incident vary according to country and region, and the ability to synthesize reduces with age, so diet supplementation with Vitamin D could be recommended. Most of the studies on Vitamin D intake in European children show that this intake is lower than recommended; the majority of European countries, international organizations and scientific communities therefore recommend supplementing the diet with Vitamin D, and have also defined the maximum tolerated levels of this vitamin. They recommend consuming food rich in Vitamin D, a reasonable amount of sun exposure and practising physical activities in the open air, so as to obtain 20 mg/ml or 50 nmol/l serum levels of 25(OH)D. If not, a supplement of up to 400 IU/day (10 µg/day) is recommended, under strict medical or paediatric supervision, especially during breastfeeding. The dose can be adjusted to each individual's characteristics, whilst kept below the maximum tolerated level.

Key words

Vitamin D, cholecalciferol, 1,25-dihydroxycholecalciferol, food supplements, children aged 0-3 years.

1. Introducción

Se denomina vitamina D o calciferol a un grupo de secoesteroles liposolubles, cuyas formas mayoritarias (Figura 1) son la vitamina D₂ o ergocalciferol, producida por irradiación UV de levaduras u hongos o bien se encuentra en vegetales contaminados con los anteriores (Lips, 2006) (Jäpelt y Jakobsen, 2013), y la vitamina D₃ o colecalciferol, que se sintetiza en la piel a partir de 7-dehidrocolesterol cuando ésta se expone a la acción de la radiación UV-B (Webb, 2006) dando lugar rápidamente a previtamina D₃ que, por acción de la temperatura de la piel, dará lugar a la vitamina D₃. La irradiación también puede dar lugar a los compuestos inactivos lumisterol, taquistero y suprasterol I y II (Bikle, 2011), lo cual impedirá un exceso de síntesis de vitamina D₃ por exposición solar prolongada; la previtamina D₃ puede revertir hacia 7-dehidrocolesterol cuando aumentan los niveles de la previtamina y el lumisterol puede transformarse en previtamina D₃ cuando disminuyen los niveles de la misma (Figura 2). La vitamina D₃ también puede obtenerse de la dieta, principalmente de pescados, huevos y lácteos, absorbiéndose en el intestino delgado, donde se incorporará a los quilomicrones junto a otras moléculas grasas, y alcanzará la circulación sanguínea, vía circulación linfática, metabolizándose en tejidos periféricos que expresen lipoproteínlipasa, como tejido adiposo o muscular, y pudiendo entonces actuar localmente o bien redistribuirse en otros transportadores plasmáticos, como la proteína transportadora de vitamina D (DBP), la albúmina o las lipoproteínas, para alcanzar el hígado donde iniciará su metabolismo (Haddad et al., 1993).

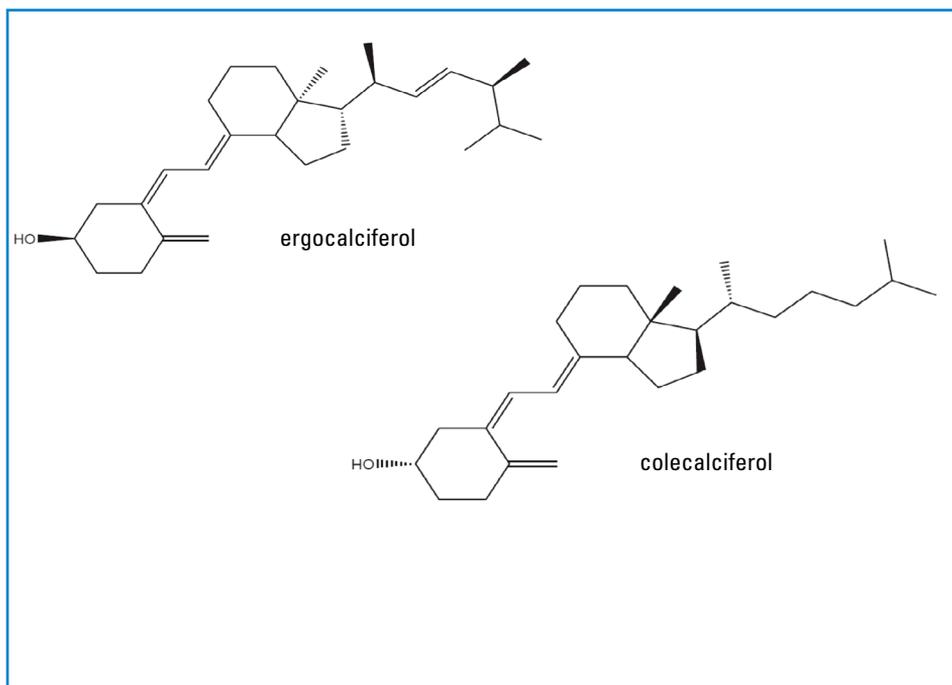


Figura 1. Estructura química de las formas mayoritarias de vitamina D. **Adaptado de:** (UK-COT, 2015).

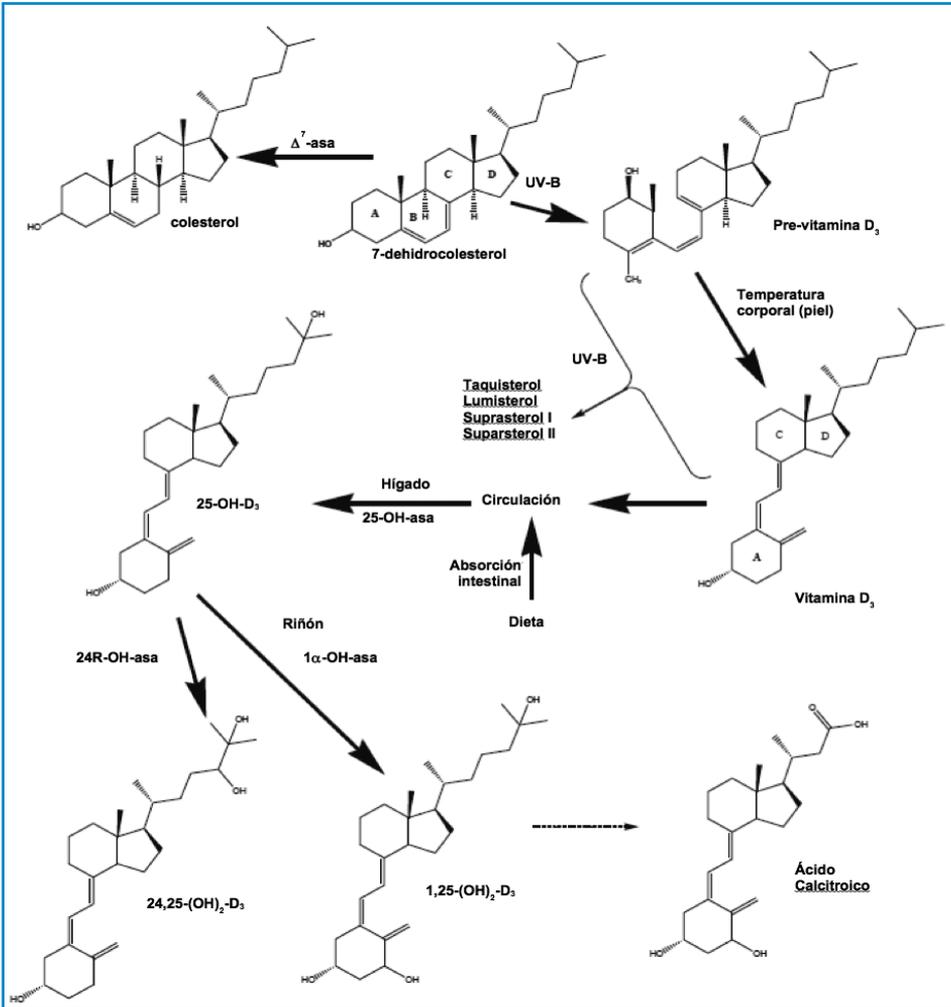


Figura 2. Ruta que sigue la vitamina D desde su síntesis o ingesta hasta su transformación metabólica. **Adaptado de:** (UK-COT, 2015).

En ausencia de complementos de la dieta, la mayor parte de la vitamina D₃ circulante se sintetiza en la piel. Una exposición solar suficiente para causar un mínimo eritema cutáneo (o dosis eritematosa mínima) es capaz de producir 250-500 μg de vitamina D₃ circulante en 24 horas. La duración de la exposición necesaria para producir vitamina D dependerá de la pigmentación cutánea de cada raza humana, de tal forma que a mayor pigmentación, menor formación de vitamina D por tiempo de exposición y mayor tiempo necesario para sintetizar la misma cantidad de vitamina (Hollis, 2005). La latitud geográfica, la estación del año, el uso de filtros solares y la vestimenta condicionarán la síntesis de vitamina D en la piel, pues modificarán la intensidad de la exposición solar. A diferencia de lo que sucede en España, algunos países muestran una dieta escasa incidencia lumínica durante largas

épocas del año, pero también en nuestro país se registra diferente insolación según las regiones. Además, debe considerarse que la capacidad de síntesis dérmica de vitamina D se reduce con la edad (MacLaughlin y Holick, 1985). También se ha detectado una elevada prevalencia de déficit de vitamina D entre la población obesa infantil de etiología multifactorial, cuyos niveles deficitarios de vitamina D podrían influir en el desarrollo de insulinorresistencia y diabetes mellitus tipo 2 en esta población obesa (Gutiérrez-Medina et al., 2014). Por tanto, en estos casos complementar la dieta con vitamina D podría recomendarse.

La vitamina D, independientemente de su origen, requiere transformación metabólica para ser activa, para lo cual se transformará a nivel hepático hasta 25-hidroxivitamina D y a nivel renal hasta el metabolito activo 1,25-dihidroxivitamina D o calcitriol por acción de la parathormona (PTH) estimulada por niveles bajos de calcemia (Bendik et al., 2014). Ambas formas de vitamina D pueden variar tan sólo en la existencia de distintas cadenas alifáticas en su molécula, sin que esto suponga diferencias sustanciales en lo que se refiere a sus efectos fisiológicos. Cuando hay suficiente 1,25-dihidroxivitamina D, los niveles de calcemia están elevados o hay una disminución de los niveles de PTH, en el riñón el metabolito 1,25-dihidroxivitamina D se metaboliza a 1,24,25-trihidroxivitamina D y ácido calcitroico y la 25-hidroxivitamina D se metaboliza a 24,25-dihidroxivitamina D (IOM, 2011). Los metabolitos de la vitamina D se excretan a través de la bilis y las heces y, en menor grado, a través de la orina (Jones, 2008).

La vitamina D está implicada en el metabolismo fosfocálcico, es necesaria para la buena salud ósea y muscular, así como en otros mecanismos fisiológicos, como la diferenciación celular de numerosos órganos. Su déficit se ha relacionado con raquitismo en los niños y osteomalacia en los adultos, mayor riesgo de infecciones, enfermedades autoinmunitarias, insulinorresistencia, diabetes, síndrome metabólico, enfermedades cardiovasculares y neoplásicas, obesidad, asma y ciertas enfermedades neurológicas (Hypponen et al., 2001) (Holick, 2004) (Bouillon et al., 2006) (Lappe et al., 2007) (Thorne y Campbell, 2008) (Blanco et al., 2009) (Sharief et al., 2011) (Maalmi et al., 2012) (Masvidal Aliberch et al., 2012) (Morales et al., 2012) (Xiao-Mei et al., 2012) (Brouwer-Brolsma et al., 2013) (Autier et al., 2014) (Shanmugalingam et al., 2014). La vitamina D, además, es mucho más que una vitamina, pues contribuye a la modulación del sistema inmunitario (Jones et al., 2012) (Muehleisen y Gallo, 2013), forma parte de un sistema con acción hormonal a través de receptores específicos existentes en diferentes células del organismo en cuya expresión estarían implicados determinados genes (Bosse et al., 2009). Por todo lo indicado se recomienda una ingesta diaria de 400 UI/día (10 µg/día) que proporcione unos niveles séricos de 25-hidroxicolecalciferol de 20 ng/ml (50 nmol/l). Esta ingesta podrá incrementarse en función de la edad o del estado funcional y/o patológico de la persona.

Durante los primeros años de vida es especialmente necesario un aporte nutricional adecuado que cubra las necesidades fisiológicas de esta etapa debido a que el desarrollo es muy rápido.

Tanto la lactancia materna o artificial durante los primeros meses de vida, como posteriormente una dieta variada y equilibrada, pueden no ser suficientes para cubrir los requerimientos de vitaminas, imprescindibles para el correcto funcionamiento del organismo; de hecho, la leche materna aporta tan sólo 10-80 UI/día o 0,25-2 µg/día de vitamina D y podrá presentar variaciones importantes, dependiendo de los depósitos maternos durante el embarazo, la alimentación de la madre

lactante y su exposición solar (EFSA, 2014). Los depósitos de vitamina D de los prematuros son más bajos que aquellos nacidos a término, no sólo debido a la menor edad gestacional, sino también a la menor cantidad de grasa y músculo, principales lugares de almacenamiento de la vitamina D (AECOSAN, 2005) (Agostoni et al., 2010). Los hijos de madres vegetarianas estrictas que estén siendo amamantados mostrarán déficit de vitamina D debido a la ingesta materna deficiente en alimentos de origen animal, principales proveedores de esta vitamina, especialmente si la madre no se expone a la luz solar, pues el miedo a problemas neoplásicos cutáneos ha disminuido la exposición solar, aún en países donde ésta permitiría sintetizar fácilmente esta vitamina (Munns et al., 2006) (Pallás Alonso, R. y Grupo PrevInfad/PAPPS, 2006) (Craig, 2009) (Baig et al., 2013).

Si tras evaluar la ingesta diaria habitual en niños de 0 a 3 años (leche materna, fórmula infantil, cereales o papillas, tarritos...), así como los niveles circulantes de 25-hidroxi-vitamina D y compararlos con las recomendaciones actuales, se dedujese que la ingesta de vitamina D es insuficiente en la dieta del lactante y del preescolar, podría valorarse la utilización de alimentos fortificados o complementos alimenticios, para evitar deficiencias nutricionales y sus consecuencias posteriores.

Sin embargo, la extrapolación en lactantes y niños de los resultados basados en estudios en adultos requerirá una cuidadosa consideración, especialmente en relación a asegurar una ingesta nutricional adecuada de vitamina D pero convenientemente alejada del nivel máximo tolerado o *tolerate upper intake level* (TUL) (FSA, 2003).

Por ello, el Consejo de Dirección de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN), ha solicitado a la Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición del Comité Científico que realice una revisión y análisis sobre la complementación con vitamina D de la dieta de niños de 0 a 3 años.

2. Recomendaciones para complementar la dieta con vitamina D en otros países

En general, la mayor parte de los estudios relativos a la ingesta de vitamina D en niños europeos muestran que dicha ingesta es inferior a 10 µg/día y que ésta se reduce durante el segundo año de vida, con valores situados en torno a 5 µg/día (rango 4,5-10,4 µg/día) y, a partir de edades superiores, se sitúa alrededor de 2 µg/día (EFSA, 2013) (Dalmou et al., 2014). El estudio ENALIA (Encuesta Nacional de Alimentación en la Población Infantil y Adolescente) aporta que la ingesta habitual de vitamina D en la población infantil española fue de 3,3 µg/día en varones y 3,0 µg/día en mujeres de 6 a 12 meses y de 2,6 µg/día en varones y 2,3 µg/día en mujeres de 1 a 3 años (AECOSAN, 2015). Estas ingestas fueron insuficientes para cubrir los requerimientos en prácticamente la totalidad de la población. Hasta los 3 años de edad, la principal fuente de vitamina D fue los preparados infantiles.

El uso de complementos de vitamina D es declarado por 47-86 % de niños finlandeses entre 1 y 3 años, contribuyendo a 6-7 µg/día de la ingesta de vitamina D diaria, mientras que los complementos representan alrededor de la mitad de la ingesta diaria en niños alemanes de edad similar; el 97 % de los niños daneses complementan su dieta con 10 µg/día, el 88 % de los niños polacos de 6 meses y el 70 % de 12 meses reciben más de 10 µg/día y los niños británicos de edades comprendidas entre 1,5 y 4,5 años ingieren 1,2 µg/día (incluyendo complementos). Los niños griegos, en cambio, no complementan su dieta con vitamina D y muestran unos niveles séricos de 25(OH)D inferiores a

50 nmol/l durante los primeros 6 meses de vida, alcanzando 48 ± 7 nmol/l en verano y 33 ± 4 nmol/l en invierno. Por tanto, el 10-30 % de los niños europeos muestran, en conjunto, déficits evidentes de vitamina D (EFSA, 2013), mostrando que la aportación diaria de vitamina D en niños, tanto si proviene de la dieta como si lo hace de síntesis dérmica, es claramente insuficiente.

Las recomendaciones de complementar la dieta con vitamina D en los países del entorno socioeconómico y geográfico de nuestro país, según la edad y las necesidades de los sujetos se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Recomendaciones para complementar la dieta con vitamina D en diversos países		
País	Edad	Complementación recomendada
Alemania ¹	2ª semana-2º verano	400-500 UI/día (10-12,5 µg/día)
	0-12 meses	400 UI/día (10 µg/día)
	1-15 años	200 UI/día (5 µg/día)
Austria ²	0-3 años (1º año y 2º invierno)	400-800 UI/día (10-20 µg/día)
Bélgica ²	Lactantes	400 UI/día (10 µg/día) sólo en niños alimentados con leche materna. Las fórmulas para lactantes ya contienen obligatoriamente suplemento de vitamina D
Bulgaria ²	0-3 años	800 UI/día (20 µg/día)
Chipre ²	-	Sin recomendaciones
Croacia ²	-	Sin recomendaciones
Dinamarca ³	Nacidos a término (37 semana): 2 semanas-2 años Prematuros: desde alta a 2 años	400 UI/día (10 µg/día) Los niños con piel oscura y/o que visten con el cuerpo cubierto en verano continuarán con 400 UI/día (10 µg/día) toda la infancia y probablemente toda la vida, según la exposición al sol. No hay razón para elegir un producto con mayor cantidad de vitaminas y minerales. El consumo de vitamina D debe ser controlado durante toda la edad escolar y formar parte de los informes de salud infantil.
Eslovaquia ⁴	0-12 meses	400 UI/día (10 µg/día)
	1-6 años	480 UI/día (12 µg/día)
Eslovenia ²	1 semana-18 años	400 UI/día (10 µg/día)
Estonia ²	0-2 años	400 UI/día (10 µg/día)
Finlandia ⁵	2 semanas-2 años	400 UI/día (10 µg/día)

Tabla 1. Recomendaciones para complementar la dieta con vitamina D en diversos países		
	2-17 años	300 UI/día (7,5 µg/día)
Francia ⁶	Lactantes	1 000-1 200 UI/día (25-30 µg/día)
	Niños <18 meses	600-800 UI/día (15-20 µg/día) si toman leche enriquecida con vitamina D
	Niños <18 meses	1 000-1 200 UI/día (25-30 µg/día) si no toman leche enriquecida con vitamina D
	Niños 18 meses-5 años	2 dosis trimestrales de 80 000-100 000 UI/día (2 000-2 500 µg/día) cada invierno (noviembre-febrero)
Grecia ²	-	Sin recomendaciones
Holanda ^{2,7}	2-24 semanas	400-600 UI/día (10-15 µg/día) con lactancia materna exclusiva
	6 meses-4 años	400-600 UI/día (10-15 µg/día)
Hungria ⁸	2 semanas-1 año	400 UI/día (10 µg/día)
	1-1,5 años	400 UI/día (10 µg/día) en otoño
Irlanda ^{2,9}	0-12 meses	200 UI/día (5 µg/día)
Islandia ²	1-36 meses	400 UI/día (10 µg/día) mediante producto vitamina A+D
Italia ²	-	Sin recomendaciones
Luxemburgo ²	-	Sin recomendaciones
Noruega ²	<6 meses	200-400 UI/día (5-10 µg/día) por suplemento o aceite de hígado de bacalao
Polonia ¹⁰	0-6 meses	400 UI/día (10 µg/día)
	6-12 meses	400-600 UI/día (10-15 µg/día) según dieta
	12-36 meses	De septiembre a abril: 600-1 000 UI/día (15-25 µg/día) según peso corporal
	12-36 meses	Todo el año o si no se ha conseguido síntesis dérmica durante el verano: 600-1 000 UI/día (15-25 µg/día) según peso corporal
	Grupos de riesgo:	
	Prematuros (≤40 semanas)	400-800 UI/día (10-20 µg/día)
	Niños obesos	De septiembre a abril: 1 200-2 000 UI/día (30-50 µg/día) según severidad obesidad
	Niños obesos	Todo el año o si no se ha conseguido síntesis dérmica durante el verano: 1 200-2 000 UI/día (30-50 µg/día) según severidad obesidad
	Dosis terapéuticas (1-3 meses): Déficit 25(OH)D <20 ng/ml (<50 nmol/l)	
	Neonatos	100 UI/día (2,5 µg/día)
	1-12 meses	1 000-3 000 UI/día (25-75 µg/día)
>12 meses	3 000-5 000 UI/día (75-125 µg/día)	

Tabla 1. Recomendaciones para complementar la dieta con vitamina D en diversos países		
Reino Unido ²	6 meses-4 años	300 UI/día (7,5 µg/día)
Rep. Checa ¹¹	15 días-1 año+invierno 2º año	500 UI/día (12,5 µg/día)
Rumanía ²	0-3 años	400 UI/día (10 µg/día)
Suecia ¹²	1 semana-<2 años	400 UI/día (10 µg/día)
	>2 años	400 UI/día (10 µg/día) si tienen piel oscura, no salen al exterior o salen cubiertos, no toman alimentos enriquecidos con vitamina D, no toman pescado
Suiza ¹³	1º año	400 UI/día (10 µg/día)
	2º-3º año	600 UI/día (15 µg/día)
Canadá ¹⁴	Todo el año	En niños mayores de 1 año o cuando se recibe vitamina D de otra fuente (equivalente a 400 UI/día, 10 µg/día) se interrumpirá la suplementación
	Invierno (en lactantes y niños de riesgo)	800 UI/día (20 µg/día)
Estados Unidos ¹⁵	0-2 meses	200 UI/día (5 µg/día)
	>2 meses	400 UI/día (10 µg/día)

Fuente: ¹(OGKJ, 2008) (Wabitsch et al., 2011). ²Respuesta de los puntos focales de EFSA en Austria, Bélgica, Bulgaria, Chipre, Croacia, Eslovenia, Estonia, Grecia, Holanda, Irlanda, Islandia, Italia, Luxemburgo, Noruega, Reino Unido y Rumania. ³(DHMA, 2012) (Nordisk Ministerråd, 2014). ⁴(Batelino, 2010) (UVZRS, 2010). ⁵(VRN, 2014a,b). ⁶(SFP, 2012). ⁷(Gezondheidsraad, 2008). ⁸(SKP, 2010) ⁹(FSAI, 2007, 2011). ¹⁰(Pludowski et al., 2013) (Lifschitz, 2014) (Weker y Baranska, 2014). ¹¹(Bělohávková et al., 2014). ¹²(NFAS, 2011). ¹³(FCN, 2012) (OFSP, 2012). ¹⁴(CPSI/IHC, 2002) (Ward, 2005) (Health Canada, 2012). ¹⁵(Gartner y Greer, 2003) (Wagner y Creer, 2008) (IOM, 2011).

3. Recomendaciones para complementar la dieta con vitamina D por parte de organismos internacionales y sociedades científicas

La tabla 2 describe las recomendaciones de complementar la dieta con vitamina D realizadas por distintos organismos internacionales y sociedades científicas, según la edad y necesidades de los sujetos.

Tabla 2. Recomendaciones de organismos internacionales y sociedades científicas para complementar la dieta con vitamina D

Organismo/Sociedad	Edad	Complementación recomendada
<i>European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition (ESPGHAN)</i> ¹	0-12 meses	400 UI/día (10 µg/día) bajo estricto control médico o pediátrico
FAO/OMS ²	0-18 años	200 UI/día (5 µg/día)
Prevención en la Infancia y la Adolescencia de la Asociación Española de Pediatría de Atención Primaria (Previnfad, AEPap) ³	En niños a riesgo (prematuros, con piel oscura, inadecuada exposición a la luz solar por hábitos culturales o por usar filtro solar en todos los paseos del niño, hijos lactantes de madres vegetarianas estrictas)	200-400 UI/día (5-10 µg/día)
Comisión de Lactancia Materna y Comisión de Nutrición de AEPap ⁴	0-12 meses	400 UI/día (10 µg/día) ingesta total recomendada
	1-3 años	600 UI/día (15 µg/día) ingesta total recomendada
	4-8 años	600 UI/día (15 µg/día) ingesta total recomendada
	9-18 años	600 UI/día (15 µg/día) ingesta total recomendada
<i>American Academy of Pediatrics (AAP)</i> ⁵	<1 año	400 UI/día (10 µg/día) excepto si toman leche enriquecida con vitamina D
	>1 año	400 UI/día (10 µg/día)
EFSA ⁶	0-6 meses (con lactancia materna exclusiva)	400 UI/día (10 µg/día)
	6-12 meses (con exposición solar mínima)	400 UI/día (10 µg/día)
	12-<36 meses (con exposición solar mínima)	400 UI/día (10 µg/día)

Fuente: ¹(Braegger et al., 2013). ²(FAO/WHO, 2012). ³(Pallás Alonso, R. y Grupo Previnfad/PAPPS, 2006). ⁴(AEP, 2004) (Martínez Suárez et al., 2012). ⁵(Wagner y Creer, 2008). ⁶(EFSA, 2013).

4. Niveles máximos tolerados para vitamina D

Los límites máximos tolerados (*tolerate upper intake levels* o TUL) definidos por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2012) para la vitamina D se presentan en la tabla 3, según la edad de los sujetos.

El TUL para la vitamina D en adultos se calculó a partir del NOAEL (*Non Observable Adverse Effect Level*) para la misma, considerado en 275 µg/día (rango 234-275 µg/día) que no provoca hiper-

calcemia ni hipercalcemia en adultos. Este valor se basa en dos estudios de corta duración (hasta 5 meses) en cohortes de hombres jóvenes sanos con una mínima exposición al sol (Barger-Lux et al., 1998) (Heaney et al., 2003). Para tener en cuenta las incertidumbres asociadas a este valor, se eligió un factor de incertidumbre de 2,5 y el UL se estableció en 100 µg/día. Se consideró que este TUL era de aplicación a mujeres embarazadas y madres lactantes a partir de datos obtenidos en dos estudios realizados en mujeres embarazadas y lactantes, utilizando dosis de hasta 100 µg/día de vitamina D₂ o D₃ durante semanas o meses que no aportaron eventos adversos, tanto para las madres, como para sus descendientes (Hollis y Wagner, 2004) (Hollis et al., 2011).

Para niños y adolescentes de 10 a 17 años, el Panel de EFSA sobre TUL de vitamina D analizó dos estudios que muestran que la ingesta de vitamina D en dosis de hasta 50 µg/día no provocan hipercalcemia (El-Hajj Fuleihan et al., 2006) (Maalouf et al., 2008). Aunque no hay estudios de mayor consumo, se consideró que no había motivo para creer que los adolescentes en fase de formación de hueso y crecimiento tenían menor tolerancia para la vitamina D que los adultos. Por tanto, se propuso para los adolescentes el mismo TUL que para los adultos.

Para niños de 1 a 10 años, no existen nuevos datos desde la elaboración del informe del *Scientific Committee on Food* (SCF, 2003), por lo que se consideró que no había motivo para creer que los niños de 1-10 años en la fase de formación de hueso y crecimiento tuvieran menor tolerancia para la vitamina D que los adultos. Por tanto, teniendo en cuenta su menor tamaño corporal, se propuso para ellos un TUL de 50 µg/día.

Para niños menores de 1 año, hay escasos datos sobre los que basar un NOAEL o un LOAEL (*Lowest Observed Adverse Effect Level* o menor nivel con efecto adverso observado) que se añadan a la información ya facilitada en el informe del SCF (2003) y su relación con la aparición de hipercalcemia en niños sanos. Teniendo en cuenta esta limitada evidencia, EFSA consideró que el TUL de 25 µg/día definido anteriormente debía mantenerse.

Tabla 3. Niveles máximos tolerados (<i>Tolerable Upper Intake Levels</i>) para vitamina D	
Edad (años)	Niveles Máximos Tolerados (TUL) de vitamina D (µg/día)
0-1	25 (1 000 UI/día)
1-10	50 (2 000 UI/día)
11-17	100 (4 000 UI/día)
≥18 (incluye gestantes y madres lactantes)	100 (4 000 UI/día)

Fuente: (EFSA, 2012).

Diversos países y asociaciones científicas han descrito TUL para sus poblaciones, las cuales se describen en la tabla 4.

Tabla 4. Niveles máximos tolerados (*Tolerable Upper Intake Levels*) para vitamina D descritos por diversos países y asociaciones científicas

País/Organismo	Edad (años)	Niveles Máximos Tolerados (TUL) de vitamina D (µg/día)
Alemania ¹	2-10 años	25 (1 000 UI/día)
Bélgica ²	1-10 años	25 (1 000 UI/día)
Finlandia ³	0-5 años	50 (2 000 UI/día)
Países Escandinavos ⁴	0-1 años	25 (1 000 UI/día)
	1-10 años	50 (2 000 UI/día)
Polonia ⁵	0-1 años	25 (1 000 UI/día)
	1-10 años	50 (2 000 UI/día)
	11-18 años	100 (4 000 UI/día)
Reino Unido ⁶	<1 año	25 (1 000 UI/día)
	1-10 años	50 (2 000 UI/día)
	>10 años	100 (4 000 UI/día)
<i>Institute of Medicine</i> (IOM, Estados Unidos) ⁷	0-6 meses	25 (1 000 UI/día)
	6-12 meses	38 (1 520 UI/día)
	1-3 años	63 (2 520 UI/día)
	4-9 años	75 (3 000 UI/día)
	9-8 años	100 (4 000 UI/día)
Comisión de Lactancia Materna y Comisión de Nutrición de AEPap (España) ⁸	0-6 meses	25 (1 000 UI/día)
	6-12 meses	37.5 (1 500 UI/día)
	1-3 años	62.5 (2 500 UI/día)
	4-8 años	75 (3 000 UI/día)
	9-18 años	100 (4 000 UI/día)

Fuente: ¹(Domke et al., 2005) (German Nutrition Society, 2012). ²(CSS, 2015). ³(VRN, 2014a,b). ⁴(Nordisk Ministerråd, 2014). ⁵(Pludowski et al., 2013) (Lifschitz, 2014) (Weker y Baranska, 2014). ⁶(UK-COT, 2015). ⁷(IOM, 2011). ⁸(Martínez Suárez et al., 2012).

Estos TUL se basan en que un exceso de vitamina D puede resultar en hipercalcemia, por aumento en la absorción intestinal y resorción ósea de calcio, que puede suponer una deposición del calcio en tejidos blandos, desmineralización ósea y toxicidad renal y cardiovascular irreversible. Entre los síntomas y signos clínicos manifestados pueden incluirse anorexia, náuseas, vómitos, debilidad, letargo, estreñimiento, dolor inespecífico y otras manifestaciones como sed, poliuria, pérdida de peso y arritmias cardíacas. Además, debido a la lipofilia de la vitamina D y su retención en el tejido adiposo, los efectos de la toxicidad por vitamina D pueden persistir hasta 2 meses tras el cese de la exposición a elevados niveles de la misma. Estos efectos responden, principalmente, a administraciones repetidas, pues tomas aisladas, aunque sean elevadas, no parecen mostrar signos de efectos tóxicos, excepto cuando la dosis en niños alcanza los 15 000 µg (UK-COT, 2015).

Conclusiones del Comité Científico

El Comité Científico de la AECOSAN, a la vista de la información científica disponible, concluye que debe asegurarse que los niveles séricos de 25-hidroxicolecalciferol en niños de 0-3 años se mantengan en 20 ng/ml o 50 nmol/l y éstos deben obtenerse a partir de la dieta, la exposición solar y, si fuera necesario, también mediante complementos de la dieta de tal forma que se obtengan, en total, 400 UI/día (10 µg/día) de vitamina D durante el primer año de vida o 600 UI/día (15 µg/día) entre 1 y 3 años de edad.

Por ello, se considera que, de forma preferente, debe estimularse el consumo de alimentos ricos en vitamina D, como pescado, huevos, productos lácteos o fórmulas infantiles adecuadas; cada uno introducido en la pauta de diversificación dietética del niño conforme a su edad.

También debe estimularse la realización de actividad física al aire libre, sobre todo en los niños a partir de los 18 meses, pues para los de edad inferior serían paseos con la madre/padre/cuidador. De esta forma, se aseguraría una óptima exposición a la iluminación solar, utilizando para ello los filtros solares adecuados que permitan la recepción de dicha iluminación al tiempo que protejan de sus efectos perniciosos, especialmente en regiones y horas de máxima insolación, aunque en nuestro país, salvo en época invernal, una exposición del 20 % del cuerpo sin protección alguna entre las 10 y las 15 horas proporciona el máximo beneficio en vitamina D con el menor riesgo de eritema cutáneo.

En caso de aporte insuficiente de vitamina D en la dieta o en determinados grupos de riesgo (niños prematuros, con piel oscura, obesos, hijos lactantes de madres vegetarianas estrictas especialmente con baja exposición a la luz solar, niños con inadecuada exposición a la luz solar por hábitos culturales o por usar filtro solar en todos los paseos del niño) se recomienda complementar la dieta hasta con 400 UI/día (10 µg/día) de vitamina D en niños de 0-3 años, bien en forma de fármacos, complementos o alimentos enriquecidos en dicha vitamina. Este complemento será especialmente aconsejable durante la lactancia materna, debido al bajo contenido en vitamina D de la leche materna. No hay necesidad de complementar la dieta de los lactantes alimentados con fórmulas infantiles, pues su composición ya cubrirá todos los requerimientos de vitamina D.

En cualquier caso, dicha complementación deberá realizarse bajo estricto control médico o pediátrico, realizándose controles analíticos periódicos que aseguren los niveles séricos mencionados y adaptando la suplementación a dichos niveles, manteniéndose convenientemente alejados de los niveles máximos tolerados.

Referencias

- AECOSAN (2005). Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. Alimentos especiales para prematuros. *Revista del Comité Científico de la AESA*, 2, pp: 45-62.
- AECOSAN (2015). Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. Valoración nutricional de la encuesta nacional de consumo de alimentos en población infantil y adolescente (ENALIA).
- AEP (2004). Asociación Española de Pediatría. Comisión de Lactancia Materna *Guía para profesionales*. Monografías de la AEP nº 5. Ergón, Madrid.
- Agostoni, C., Buonocore, G., Carnielli, V.P., De Curtis, M., Darmaun, D., Decsi, T., Domellöf, M., Embleton, N.D., Fusch, C., Genzel-Boroviczeny, O., Goulet, O., Kalhan, S.C., Kolacek, S., Koletzko, B., Lapillonne, A., Mihatsch, W., Mo-

- reno, L., Neu, J., Poindexter, B., Puntis, J., Putet, G., Rigo, J., Riskin, A., Salle, B., Sauer, P., Shamir, R., Szajewska, H., Thureen, P., Turck, D., Van Goudoever, J.B. y Ziegler, E.E. (2010). Enteral nutrient supply for preterm infants: commentary from the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Committee on Nutrition-ESPGHAN Committee on Nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition*, 50, pp: 85-91.
- Autier, P., Boniol, M., Pizot, C. y Mullie, P. (2014). Vitamine D status and ill health: a systematic review. *Lancet Diabetes & Endocrinology*, 2, pp: 76-89.
- Baig, J.A., Sheikh, S.A., Islam, I. y Kumar, M. (2013). Vitamin D status among vegetarians and non-vegetarians. *Journal of Ayub Medical College Abbottabad*, 25, pp: 152-155.
- Barger-Lux, M.J., Heaney, R.P., Dowell, S., Chen, T.C. y Holick, M.F. (1998). Vitamin D and its major metabolites: serum levels after graded oral dosing in healthy men. *Osteoporosis International*, 8, pp: 222-230.
- Battelino, T. (2010). Zapisnik 56. redne seje RSK za pediatrijo. *Slovenska Pediatrie*, 17, pp: 241-243.
- Bělohávková, S., Bronský, J., Burianová, I., Frühaufer, P., Fuchs, M., Kotalová, R., Malý, J., Mydlilová, A., Nevala, J., Pozler, O. y Sýkora, J. (2014). Doporučení Pracovní skupiny dětské gastroenterologie a výživy ČPS pro výživu kojenců a batolat / Recommendations for infant nutrition of the Children's gastroenterology and nutrition working group of Czech and Slovak Pediatrics Society. *Československá pediatrie*, 69, Suppl 1.
- Bendik, I., Friedel, A., Roos, F.F., Weber, P. y Eggersdorfer, M. (2014). Vitamin D: a critical and essential micronutrient for human health. *Frontiers in Physiology*, 5, pp: 1-14.
- Bikle, D.D. (2011). Vitamin D: an ancient hormone. *Experimental dermatology*, 20, pp: 7-13.
- Blanco Quiros, A., Arranz Sanz, E. y Garrote Adrados, J.A. (2009). Luz Solar, Vitamina D y Tuberculosis. *Boletín de Pediatría*, 49, pp: 220-226.
- Bosse, Y., Lemire, M., Poon, A.H., Daley, D., He, J.Q., Sandford, A., White, J.H., James, A.L., Musk, A.W., Palmer, L.J., Raby, B.A., Weiss, S.T., Kozyrskyj, A.L., Becker, A., Hudson, T.J. y Laprise, C. (2009). Asthma and genes encoding components of the vitamin D pathway. *Respiratory Research*, 10, pp: 98-119.
- Bouillon, R., Eelen, G., Verlinden, L., Mathieu, C., Carmeliet, G. y Verstuyf, A. (2006). Vitamin D and cancer. *Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 102, 156-162.
- Braegger, C., Campoy, C., Colomb, V., Decsi, T., Domellof, M., Fewtrell, M., Hojsak, I., Mihatsch, W., Molgaard, C., Shamir, R., Turck, D. y Van Goudoever, J. (2013). On behalf of the ESPGHAN Committee on Nutrition. Vitamin D in the Healthy European Paediatric Population. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 56, pp: 692-701.
- Brouwer-Brolsma, E.M., Bischoff-Ferrari, H.A., Bouillon, R., Feskens, E. J.M., Gallagher, C.J., Hyponen, E., Llewellyn, D.J., Stoecklin, E., Dierkes, J., Kies, A.K., Kok, F.J., Lamberg-Allardt, C., Moser, U., Pilz, S., Saris, W.H., Van Schoor, N.M., Weber, P., Witkamp, R., Zittermann, A. y Groot, L. (2013). Vitamin D: do we get enough? A discussion between vitamin D experts in order to make a step towards the harmonization of dietary reference intakes for vitamin D across Europe. *Osteoporosis International*, 24, pp: 1567-1577.
- CPSI/IHC (2002). Canadian Paediatric Society, Indian and Inuit Health Committee. Vitamin D supplementation in northern Native communities [position statement]. *Paediatric and Child Health*, 7, pp: 459-463.
- Craig, W.J. (2009). Health effects of vegan diets. *American Journal of Clinical Nutrition*, 89, pp: 1627S-1633S.
- CSS (2015). Conseil Supérieur de la Santé. Recommandations nutritionnelles pour la Belgique-Partim I: Vitamines et Oligoéléments. CSS n° 9164 & 9174.
- Dalmau, J., Moráis, A., Martínez, V., Peña-Quintana, L., Varea, V., Martínez, M.J. y Soler, B. (2014). Evaluación de la alimentación y consumo de nutrientes en menores de 3 años. Estudio piloto ALSALMA. *Anales de Pediatría (Barcelona)*, 81, pp: 22-31.
- DHMA (2012). Sundhedsstyrelsen/Danish Health and Medicines Authority. Sundhedsstyrelsens vejledning til sundhedspersonale vedrørende vitamin- og jerntilskud til børn under 2 år.
- Domke, A., Großklaus, R., Niemann, B., Przyrembel, H., Richter, K., Schmidt, E., Weißenborn, A., Wörner, B. y Ziegenhagen, R. (2005). Use of Vitamins in Foods. Toxicological and nutritional-physiological aspects. Part I. BfR-Wissenschaft, Berlin.

- EFSA (2012). European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the Tolerable Upper Intake Level of vitamin D. *The EFSA Journal*, 10, pp: 2813.
- EFSA (2013). European Food Safety Authority. Scientific Opinion on nutrient requirements and dietary intakes of infants and young children in the European Union. *The EFSA Journal*, 11, pp: 3408-3411.
- EFSA (2014). European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to vitamin D and contribution to normal bone and tooth development pursuant to Article 14 of Regulation (EC) No 1924/2006.
- El-Hajj Fuleihan, G., Nabulsi, M., Tamim, H., Maalouf, J., Salamoun, M., Khalife, H., Choucair, M., Arabi, A. y Vieth, R. (2006). Effect of vitamin D replacement on musculoskeletal parameters in school children: a randomized controlled trial. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91, pp: 405-412.
- FAO/WHO (2012). Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. Human vitamin and mineral requirements. Report of a joint FAO/WHO expert consultation Bangkok, Thailand. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/004/y2809e/y2809e00.pdf> [acceso: 4-11-15].
- FCN (2012). Federal Commission for Nutrition. Vitamin D deficiency: Evidence, safety, and recommendations for the Swiss population. Report written by a group of experts on behalf of the Federal Commission for Nutrition (FCN). Disponible en: http://www.blv.admin.ch/themen/04679/05108/05869/index.html?lang=de&download=NHZLpZe-g7t,Inp6l0NTU042lZ26ln1acy4Zn4Z2ZqZpn02Yuq2Z6gpJCFYB9f2ym162epYbg2c_JjKbNoKSn6A [acceso: 4-11-15].
- FSA (2003). Food Standards Agency. Expert Group on Vitamins and Minerals. Safe Upper Levels for Vitamins and Minerals. Disponible en: <http://cot.food.gov.uk/cotreports/cotjointreps/evmreport> [acceso: 4-11-15].
- FSAI (2007). Food Safety Authority of Ireland (2007). Scientific Recommendations for a National Infant feeding Policy. 2nd edition.
- FSAI (2011). Food Safety Authority of Ireland (2011). Recommendations for a National Policy on Vitamin D Supplementation for Infants in Ireland.
- Gartner, L.M. y Greer, F.R (2003). American Academy of Pediatrics, Section on Breastfeeding and Committee on Nutrition. Prevention of rickets and vitamin D deficiency: new guidelines for vitamin D intake. *Pediatrics*, 111 (4), pp: 908-110.
- German Nutrition Society (2012). New Reference Values for Vitamin D. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 60, pp: 241-246.
- Gezondheidsraad (2008). Naar een toereikende inname van vitamine D. Den Haag. Publicatie nr 2008/15.
- Gutiérrez-Medina, S., Gavela-Pérez, T., Dominguez-Garrido, M.N., Blanco-Rodríguez, M., Garcés, C., Rovira, A. y Soriano-Guillén, L. (2014). Elevada prevalencia de déficit de vitamina D entre los niños y adolescentes obesos españoles. *Anales de Pediatría (Barcelona)*, 80, pp: 229-235.
- Haddad, J.G., Matsuoka, L.Y., Hollis, B.W., Hu, Y.Z. y Wortsman, J. (1993). Human plasma transport of vitamin D after its endogenous synthesis. *Journal of Clinical Investigation*, 91, pp: 2552-2555.
- Health Canada (2012). Vitamin D and Calcium: Updated Dietary Reference Intakes. Disponible en: <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/nutrition/vitamin/vita-d-eng.php#a13> [acceso: 4-11-15].
- Heaney, R.P., Davies, K.M., Chen, T.C., Holick, M.F. y Barger-Lux, M.J. (2003). Human serum 25-hydroxycholecalciferol response to extended oral dosing with cholecalciferol. *American Journal of Clinical Nutrition*, 77, pp: 204-210.
- Holick, M.F. (2004). Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, pp: 362-371.
- Hollis, B.W. (2005). Circulating 25-hydroxyvitamin D levels indicative of vitamin D sufficiency: implications for establishing a new effective dietary intake recommendation for vitamin D. *Journal of Nutrition*, 135, pp: 317-322.
- Hollis, B.W., Johnson, D., Hulsey, T.C., Ebeling, M. y Wagner, C.L. (2011). Vitamin D supplementation during pregnancy: double-blind, randomized clinical trial of safety and effectiveness. *Journal of Bone and Mineral Research*, 26, pp: 2341-2357.
- Hollis, B.W. y Wagner, C.L. (2004). Vitamin D requirements during lactation: high-dose maternal supplementation

- as therapy to prevent hypovitaminosis D for both the mother and the nursing infant. *American Journal of Clinical Nutrition*, 80, pp: 1752S-1758S.
- Hyponen, E., Laara, E., Reunanen, A., Jarvelin, 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.
- IOM (2011). Institute of Medicine. Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin and Vitamin D, Food and Nutrition Board (2011). Dietary Reference values for calcium and vitamin D and Fluoride. Report of the Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. National Academy Press, Washington. Disponible en: <http://www.nap.edu/catalog/13050.html> [acceso: 4-11-15].
- Jäpelt, R.B. y Jakobsen, J. (2013). Vitamin D in plants: a review of occurrence, analysis, and biosynthesis. *Frontiers in Plant Science*, 13, pp: 136-156.
- Jones, G. (2008). Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. *American Journal of Clinical Nutrition*, 88, pp: 582S-586S.
- Jones, A.P., Tulic, M.K., Rueter, K. y Prescott, S.L. (2012). Vitamin D and Allergic Disease: Sunlight at the End of the Tunnel? *Nutrients*, 4, pp: 13-28.
- Lappe, J.M., Travers-Gustafson, D., Davies, K.M., Recker, R.R. y Heaney, R.P. (2007). Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: results of a randomized trial. *American Journal of Clinical Nutrition*, 85, pp: 1586-1591.
- Lips, P. (2006). Vitamin D physiology. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 92, pp: 4-8.
- Lifschitz, C. (2014). DHA, kwas foliowy, witamina D, jod i żelazo w profilaktyce zdrowotnej, Standardy Medyczne. *Pediatrics*, 11, pp: 373-383.
- Maalm,i H., Berraie,s A., Tangour, E., Ammar, J., Abid, H., Hamzaoui, K. y Hamzaoui, A. (2012). The impact of vitamin D deficiency on immune Tcells in asthmatic children: a case-control study. *Journal of Asthma and Allergy*, 5, pp: 11-19.
- Maalouf, J., Nabulsi, M., Vieth, R., Kimball, S., El-Rassi, R., Mahfoud, Z. y El-Hajj Fuleihan, G. (2008). Short- and long-term safety of weekly high-dose vitamin D3 supplementation in school children. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93, pp: 2693-2701.
- MacLaughlin, J. y Holick, M.F. (1985). Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D3. *Journal of Clinical Investigation*, 76, pp: 1536-1538.
- Martínez Suárez, V., Moreno Villares, J.M. y Dalmau Serra, J. (2012). Recomendaciones de ingesta de calcio y vitamina D: posicionamiento del Comité de Nutrición de la Asociación Española de Pediatría. *Anales de Pediatría (Barcelona)*, 77, pp: 57.e1-57-e8.
- Masvidal Aliberch, R.M., Ortigosa Gómez, A., Baraza Mendoza, M.C. y García-Algar, O. (2012). Vitamina D: Fisiopatología y aplicabilidad clínica en pediatría. *Anales de Pediatría (Barcelona)*, 77, pp: 279.e1-279.e10.
- Morales, E., Romieu, I., Guerra, S., Ballester, F., Rebagliato, M., Vioque, J., Tardón, A., Rodriguez Delhi, C., Arranz, L., Torrent, M., Espada, M., Basterrechea, M., Sunyer, J., INMA Project. (2012). Maternal vitamin D status in pregnancy and risk of lower respiratory tract infections, wheezing, and asthma in offspring. *Epidemiology*, 23, pp: 64-71.
- Muehleisen, B. y Gallo, R.L. (2013). Vitamin D in allergic disease: Shedding light on a complex problem. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131, pp: 324-329.
- Munns, C., Zacharin, M.R., Rodda, C.P., Batch, J.A., Morley, R., Cranswick, N.E., Craig, M.E., Cutfield, W.S., Hofman, P.L., Taylor, B.J., Grover, S.R., Pasco, J.A., Burgner, D. y Cowell, C.T. (2006) Paediatric Endocrine Group; Paediatric Bone Australasia. Prevention and treatment of infant and childhood vitamin D deficiency in Australia and New Zeland: a consensus statement. *Medical Journal of Australia*, 185, pp: 268-272.
- NFAS (2011). Livsmedelsverket / National Food Agency Sweden. Råd om mat för barn 0-5 år- hanteringsrapport som beskriver hur riskoch nyttovärderingar, tillsammans med andra faktorer, har lett fram till Livsmedelsverkets råd / Dietary guidelines for children 0-5 years -management report describing risk- and benefit assesments and other factors behind the guidelines from National Food Agency. Disponible en: <http://www>.

- livsmedelsverket.se/globalassets/rapporter/2011/2011_livsmedelsverket_22_rad_om_mat_barn_0_till_5_han-teringsrapport.pdf?_t_id=1B2M2Y8AsgTpgAmY7PhCfg%3d%3d&_t_q=sm%c3%a5barn&_t_tags=language%-3asv%2csiteid%3a67f9c486-281d-4765-ba72-ba3914739e3b&_t_ip=10.177.10.161&_t_hit.id=Livs_Common_Model_MediaTypes_DocumentFile/_603edf0a-f807-4436-a00d-ae978fdc6973&_t_hit.pos=2 [acceso: 4-11-15].
- Nordisk Ministerråd (2014). Nordic Nutrition Recommendations 2012. Integrating nutrition and physical activity. Copenhagen. Disponible en: <http://norden.diva-portal.org/smash/get/diva2:704251/FULLTEXT01.pdf> [acceso: 4-11-15].
- OFSP (2012). Office Fédéral de la Santé Publique. Recommandations de l'Office fédéral de la santé publique concernant l'apport en vitamine D. Disponible en: http://www.blv.admin.ch/themen/04679/05065/05104/index.html?lang=fr&download=NHZLpZeg7t,Inp6lONTU042l2Z6ln1ae2lZn422qZpnO2Yuq2Z6gpJCFfYB9gGym162epYbg2c_JjKbNoKSn6A [acceso: 4-11-15].
- OGKJ (2008). Österreichische Gesellschaft für Kinder und Jugendheilkunde. Vitamin D supplementation.
- Pallás Alonso, R. y Grupo PrevlInfad/PAPPS (2006). Vitaminas y oligoelementos. PrevlInfad (AEPap)/PAPPS infancia y adolescencia.
- Pludowski, P., Karczmarewicz, E., Bayer, M., Carter, G., Chlebna-Sokół, D., Czech-Kowalska, J., Dębski, R., Decsi, T., Dobrzańska, A., Franek, E., Głuszko, P., Grant, W.B., Holick, M.F., Yankovskaya, L., Konstantynowicz, J., Książyk, J.B., Książczowska-Orłowska, K., Lewiński, A., Litwin, M., Lohner, S., Lorenc, R.S., Lukaszewicz, J., Marciniowska-Suchowierska, E., Milewicz, A., Misiorowski, W., Nowicki, M., Povoroznyuk, V., Rozenytr, P., Rudenka, E., Shoenfeld, Y., Socha, P., Solnica, B., Szalecki, M., Tatafaj, M., Varbiro, S. y Żmijewski, M.A. (2013). Practical guidelines for the supplementation of vitamin D and the treatment of deficits in Central Europe-recommended vitamin D intakes in the general population and groups at risk of vitamin D deficiency, *Endokrynologia Polska*, 64, pp: 319-327.
- SCF (2003). Scientific Committee on Food. Opinion on the Tolerable Upper Intake Level of vitamin D. 35 pp.
- Shanmugalingam, T., Crawley, D., Bosco, C., Melvin, J., Rohrmann, S., Chowdhury, S., Holmberg, L. y Van Hemelrijck, M.B.M.C. (2014). Obesity and cancer: the role of vitamin D. *Cancer*, 14, pp: 712.
- Sharief, S., Jariwala, S., Kumar, J., Muntner, P. y Melamed, M.L. (2011). Vitamin D levels and food and environmental allergies in the United States: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2006. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127, pp: 1195-1202.
- SFP (2012). Société Française de Pédiatrie. La Vitamine D: une vitamine toujours d'actualité chez l'enfant et l'adolescent. Disponible en: <http://www.sfpediatric.com/recommandation/la-vitamine-d-une-vitamine-toujours-dactualit%C3%A9-chez-lenfant-et-ladolescent#sthash.2umY0BkT.dpuf> [acceso: 4-11-15].
- SKP (2010). Szakmai Kollégium Pediatrics és a Nemzeti Bizottság támogatása szoptatás. Szakmai protokoll az Egészségügyi Minisztérium: etetés a egészséges csecsemők.
- Thorne, J. y Campbell, M.J. (2008). The vitamin D receptor in cancer. *Proceedings of the Nutrition Society*, 67, pp: 115-127.
- UK-COT (2015). Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment. Statement adverse effects of high levels of vitamin D. Disponible en: <http://cot.food.gov.uk/cotstatements/cotstatement-syrs/cotstatements2014/cot-statement-on-vitamin-d> [acceso: 4-11-15].
- UVZSR (2010). Úrad verejného zdravotníctva Slovenskej Republiky. Odporúčané výživové dávky pre obyvateľstvo v Slovenskej republike (9. revízia). Disponible en: http://www.uvzsr.sk/index.php?option=com_content&view=article&id=1014:odporuane-vyivove-davky-pre-obyvatestvo-vnslovenskej-republike&catid=66:vyiva-a-bezpenos-potravin&Itemid=72 [acceso: 4-11-15].
- VRN (2014a). Valtion ravitsemus-neuvottelukunta. Recommendations of the National Nutrition Council for the Dietary Intake of Vitamin D and the Use of Vitamin D Supplements. Disponible en: <http://www.ravitsemusneuvottelukunta.fi/portal/en/announcements+and+comments/> [acceso: 4-11-15].
- VRN (2014b). Valtion ravitsemus-neuvottelukunta. Terveystä ruoasta. Suomalaiset ravitsemussuositukset

2014. Disponible en: http://www.ravitsemusneuvottelukunta.fi/files/attachments/fi/vrn/ravitsemussuosituks-et_2014_fi_web.3.pdf [acceso: 4-11-15].

- Wabitsch, M., Koletzko, B. y Moß, A. (2011.) Ernährungskommission, Deutsche Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin. Vitamin-D-Versorgung im Säuglings-, Kindes- und Jugendalter. *Monatsschr Kinderheilkd.*
- Wagner, C.L. y Creer, F.R. The Section on Breastfeeding and Committee on Nutrition (2008). Prevention of risk of vitamin deficiency in infants, children and adolescents. *Pediatrics*, 122, pp: 1142-1152.
- Ward, L.M. (2005). Vitamin D deficiency in the 21st century: a persistent problem among Canadian infants and mothers. *Canadian Medical Association Journal*, 172, pp: 769-770.
- Webb, A.R. (2006). Who, what, where and when-influences on cutaneous vitamin D synthesis. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 92, pp: 17-25.
- Weker, H. y Baranska, M. (2014). Żywnie niemowląt i małych dzieci. Zasady postępowania w żywieniu zbiorowym. Instytut Matki i Dziecka. Disponible en: http://www.imid.med.pl/images/do-pobrania/Zywnie_niemowlat_www.pdf [acceso: 4-11-15].
- Xiao-Mei, M., Langhammer, A., Camargo, C.A. y Yue, C. (2012). Serum 25-Hydroxyvitamin D Levels and Incident Asthma in Adults. The HUNT Study. *American Journal of Epidemiology*, 176, pp: 1169-1176.

Estudios de prospección de bisfenol A y melamina en bebidas enlatadas

Juana Bustos, María Isabel Santillana, María Luisa Lomo y Elvira Ruiz.

Servicio de Contaminantes, Centro Nacional de Alimentación, Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.

Resumen

El bisfenol A (BPA) y la melamina son dos sustancias empleadas en la fabricación de recubrimientos internos de latas para bebidas. La posible cesión desde el envase al alimento de este tipo de materiales está regulada en España por el Real Decreto 847/2011, que incluye en su alcance los recubrimientos y autoriza el uso de sustancias incluidas en el reglamento de materiales plásticos (UE) N° 10/2011, con las mismas restricciones que apliquen en éste: 0,6 mg kg⁻¹ para el BPA (excepto en la fabricación de biberones de policarbonato para niños: Reglamento (UE) N° 321/2011) y 2,5 mg kg⁻¹ para la melamina.

En los últimos años se ha generado gran controversia en relación al uso del BPA en materiales para contacto con los alimentos, por posibles efectos tóxicos para la salud. Ello ha llevado a la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) a realizar una nueva evaluación de esta sustancia que ha sido publicada recientemente, en la que establece una ingesta diaria tolerable (IDT) temporal de 4 µg kg⁻¹ p.c. día⁻¹.

En el caso de la melamina, la IDT establecida por la EFSA en 2010 es de 0,2 mg kg⁻¹ p.c. día⁻¹.

Las bebidas enlatadas constituyen un grupo de alimentos de alto consumo en la población general. Aunque existen numerosos datos publicados de niveles de BPA en alimentos, en particular para el grupo de bebidas enlatadas en Europa, son escasos. En el caso de la melamina, de acuerdo con nuestro conocimiento no hay datos publicados en España sobre los niveles de melamina en bebidas enlatadas.

Este estudio se planteó con el objetivo de aportar datos sobre las concentraciones de estas dos sustancias, BPA y melamina, en muestras de bebidas enlatadas del mercado español. Para llevarlo a cabo, se adaptaron y verificaron las metodologías disponibles en el laboratorio, ya validadas, para reducir los límites de cuantificación, quedando éstos en 2 µg kg⁻¹ para el BPA, y 0,5 mg kg⁻¹ para la melamina en bebidas.

Los métodos verificados se aplicaron al análisis de 38 muestras de bebidas en lata, recogidas en el mercado minorista de la Comunidad de Madrid. En ninguna de las muestras se detectó melamina por encima del límite de cuantificación. En el caso del BPA, pudieron obtenerse resultados para 35 de las 38 muestras, detectándose BPA en 6 de ellas (17 %) en un rango de concentración de (2-6) $\mu\text{g kg}^{-1}$, siendo el valor medio $3,4 \mu\text{g kg}^{-1}$. Estos resultados de BPA indican que los niveles en bebidas enlatadas son muy bajos, lo que está en concordancia con los publicados por otros autores.

En todas las muestras analizadas los niveles de BPA y de melamina han sido muy inferiores a los límites aplicables de $0,6 \text{ mg kg}^{-1}$ y $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente, recogidos en el reglamento de materiales plásticos (Reglamento (UE) N° 10/2011), y aplicables a los recubrimientos de acuerdo con el Real Decreto 847/2011.

Palabras clave

Bisfenol A, melamina, bebidas enlatadas, HPLC-FL, LC/MS-MS.

Prospective studies of bisphenol A and melamine in canned drinks

Abstract

Bisphenol A (BPA) and melamine are substances used in the manufacture of internal coatings used in canned drink products. The potential release of these substances from this type of material into the food is regulated at national level by the Royal Decree 847/2011. This legislation includes coatings for food contact in its scope and allows the use of substances listed in the European regulation (EU) No 10/2011 for plastic articles and materials, with the same restrictions there mentioned: 0.6 mg kg^{-1} for BPA (banned for the manufacture of polycarbonate infant feeding bottles: Regulation (EU) No 321/2011) and 2.5 mg kg^{-1} for melamine.

In the last years, controversy has been raised on the use of BPA in food contact materials, because of possible toxic health effects. This has led the European Food Safety Authority (EFSA) to a new evaluation of this substance, which has been recently published and establishes a temporary tolerable daily intake (TDI) of $4 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ b.w. day}^{-1}$.

In the case of melamine, EFSA issued an opinion in 2010 setting a TDI of $0.2 \text{ mg kg}^{-1} \text{ b.w. day}^{-1}$. Canned drinks are commonly consumed by the general population. Even though many data have been published on BPA levels found in foods, these are scarce in the particular case of canned drinks in Europe. Concerning melamine, according to our knowledge, there are not published data on melamine levels in this type of products in Spain.

This study was designed with the aim at providing data on the levels of these two substances, BPA and melamine, in canned drinks/beverages in the Spanish market. In order to perform it, the analytical methods already available in the laboratory were adapted and verified to lower the limits of quantitation. These were finally set for drinks at $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ for BPA, and 0.5 mg kg^{-1} for melamine.

The adapted methods were used to analyse 38 samples of canned drinks, collected at the retail market, in the autonomous community of Madrid.

Melamine could not be detected in any sample, above the quantitation limit. Concerning BPA,

results could be obtained for 35 out of 38 samples, and it was detected in 6 samples (17 %) at levels ranging (2-6) $\mu\text{g kg}^{-1}$, being the average concentration 3.4 $\mu\text{g kg}^{-1}$. According to these results BPA levels in canned drinks are low, which is in agreement with the studies published by several authors.

BPA and melamine found concentrations in all the analysed samples were well below the restriction limits of 0.6 mg kg^{-1} and 2.5 mg kg^{-1} , respectively, established in the regulation for plastic materials (Regulation (EU) No 10/2011) and applicable according to the Spanish Royal Decree 847/2011.

Key words

Bisphenol A, melamine, canned drinks, HPLC-FL, LC/MS-MS.

1. Introducción

El bisfenol A, (2,2-bis (4-hidroxifenil) propano) (BPA), es una de las sustancias químicas con mayor volumen de producción en el mundo (>5 millones de toneladas al año, previstas para 2015) (Merchant Research & Consulting, 2014). Básicamente se usa como monómero o sustancia de partida en la producción de policarbonato, resinas epoxi, polisulfonas y como aditivo en algunos plásticos (antioxidante, estabilizante en la producción de PVC), por lo que puede encontrarse en muchos materiales destinados a estar en contacto con alimentos: botellas y envases de policarbonato, platos, tazas, resinas epoxi empleadas en recubrimiento internos de latas y contenedores de alimentos.

El uso del BPA está autorizado en materiales plásticos destinados a estar en contacto con los alimentos (Reglamento (UE) N° 10/2011) con un límite de migración específica de $0,6 \text{ mg kg}^{-1}$ (UE, 2011a), estando prohibida su utilización en la fabricación de biberones de plástico para lactantes desde junio de 2011 (Reglamento (UE) N° 321/2011) (UE, 2011b).

En los últimos años se ha generado una gran controversia acerca de su posible toxicidad. El BPA actúa como un disruptor endocrino (su exposición durante el periodo perinatal puede alterar el sistema reproductivo), pudiendo producir también alteraciones en el sistema nervioso, inmunológico y cardiovascular (Geens et al., 2012) (Vanderberg et al., 2012) (Rochester, 2013). La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (*European Food Safety Authority*, EFSA) ha evaluado en varias ocasiones el bisfenol A. La primera evaluación se llevó a cabo en 2006, estableciéndose una IDT (ingesta diaria tolerable) de $50 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ p.c. día}^{-1}$, basándose en que no existían efectos adversos en los estudios con animales a una dosis de $5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ p.c. día}^{-1}$ aplicando un factor de 100. Este valor de IDT se ha mantenido en las dos revisiones posteriores realizadas en 2008 y 2010. En su última revisión, publicada en 2015, a la vista de los últimos estudios y teniendo en cuenta las incertidumbres que rodean los efectos potenciales para la salud del BPA, EFSA ha establecido una IDT temporal de $4 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ p.c. día}^{-1}$ (EFSA, 2015).

Dado que la principal exposición al BPA es a través de la dieta, se han realizado gran cantidad de estudios de la posible cesión de BPA desde los envases a los alimentos (Goodson et al., 2002) (Munguía-López et al., 2005) (Sajiki et al., 2007) (Santillana et al., 2011) (Liao y Kannan, 2013).

Sin embargo, los datos existentes en la bibliografía sobre los niveles de bisfenol A en bebidas enlatadas en Europa son limitados. Gallart-Ayala et al. (2011) encontraron niveles entre 44 ng L^{-1} y 607 ng L^{-1} en 7 de 11 muestras de bebidas analizadas, recogidas del mercado en Barcelona en el año 2009. Geens et al. (2010) estimaron una concentración media de $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ en el estudio de 45 bebidas enlatadas procedentes del mercado belga. Los niveles de BPA detectados por Cuhna et al. (2011) en bebidas enlatadas, en Portugal, oscilaron entre $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ y $4,7 \mu\text{g L}^{-1}$. Más recientemente, Fasano et al. (2015), en muestras del mercado italiano obtienen que en bebidas carbonatadas el valor medio de BPA es de $1,24 \mu\text{g L}^{-1}$ y en bebidas no carbonatadas la media es de $0,80 \mu\text{g L}^{-1}$; no obstante, en este último estudio se incluyeron bebidas enlatadas y en otro tipo de envases. Un estudio con un número mayor de muestras analizadas (72) fue realizado en Canadá por Cao et al. (2009), en el que el 85 % de las muestras contenían $<1 \mu\text{g L}^{-1}$ de BPA y la concentración media fue de $0,57 \mu\text{g L}^{-1}$.

La melamina es un monómero utilizado en la obtención de resinas de melamina/formaldehído, para la fabricación de artículos termoestables de uso ampliamente difundido, comúnmente cono-

cidos como vajillas de “melamina”. Además, esta sustancia se utiliza también como aditivo, por ejemplo en resinas tipo epoxi para recubrimientos de latas, o en cierres metálicos utilizados para frascos de vidrio, actuando como impulsor de la formación de la red tridimensional en el curado de la resina. También se utiliza en adhesivos.

La EFSA, en su informe de evaluación de la melamina, publicado en 2010, estableció una IDT de $0,2 \text{ mg kg}^{-1} \text{ p.c. día}^{-1}$ (EFSA, 2010). En el mismo documento, y de acuerdo con los datos aportados por la industria para la subcategoría de alimentos: refrescos con un porcentaje de fruta inferior al del néctar, excluidos los zumos, el valor encontrado de melamina (límite superior) correspondería a $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$ ($n=1$), mientras que los datos aportados por los países europeos, para la misma categoría, arrojaban un valor medio ($n=13$) de $0,69 \text{ mg kg}^{-1}$ (mínimo $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$ y máximo $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$).

En España, según nuestro conocimiento, no existen datos publicados sobre niveles de melamina en bebidas enlatadas, siendo éstas un producto de alto consumo entre la población.

El 50,5 % de las latas comercializadas en España corresponden a cerveza (4 % sin alcohol). En cuanto a las bebidas no alcohólicas, la principal bebida refrescante consumida es la de cola con un porcentaje del 51,1 % del total; las bebidas con sabores cítricos (naranja, limón), suponen el 21,2 % del total destacando el sabor naranja con un 13,7 %. Respecto a las bebidas sabor tónica el porcentaje actual es de 6,3 % (MAGRAMA, 2015).

Los recubrimientos de las latas y contenedores de metal no se encuentran incluidos en el ámbito de aplicación del reglamento de plásticos; no obstante, a nivel nacional, el Real Decreto 847/2011 (BOE, 2011), por el que se establece la lista positiva de sustancias permitidas para la fabricación de materiales poliméricos destinados a entrar en contacto con los alimentos, sí contempla los recubrimientos en su alcance de aplicación. Aunque ni el bisfenol A ni la melamina están incluidos en la lista positiva de monómeros, aditivos y otras sustancias de partida del Real Decreto 847/2011, éste autoriza el uso de las sustancias enumeradas en el anexo 1 del reglamento de plásticos (UE) N° 10/2011, con las restricciones de uso que figuran allí. Por tanto, se entiende que el uso de BPA y de la melamina, están autorizados en la fabricación de recubrimientos, aplicando una restricción de $0,6 \text{ mg kg}^{-1}$ y $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente.

Por otra parte, en lo que se refiere a la melamina, el Reglamento (UE) N° 594/2012, (UE, 2012) por el que se modifica el Reglamento (CE) N° 1881/2006 sobre el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios, establece un contenido máximo de melamina de $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$ en productos alimenticios, y de 1 mg kg^{-1} en preparados para lactantes y de continuación.

El objeto del presente trabajo fue aportar datos sobre niveles de concentración de BPA y de melamina en bebidas enlatadas. La selección de estas dos sustancias y del tipo de muestra objeto de estudio se decidió en base a:

- El BPA estaba siendo sometido a reevaluación por EFSA, por lo que existía la posibilidad de que, en función de los resultados de la evaluación, se redujera el límite de migración ($0,6 \text{ mg kg}^{-1}$) o incluso se prohibiera su utilización para materiales en contacto con los alimentos. Era por tanto de interés obtener datos indicativos de la presencia y niveles de BPA que podrían encontrarse en alimentos enlatados. El grupo de refrescos se seleccionó por su alto consumo y la escasez de datos disponibles.

- El límite de migración de la melamina para materiales plásticos se bajó en el año 2011 a $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$ (UE, 2011b), siendo el límite anterior de 30 mg kg^{-1} . Se consideró de interés, llevar a cabo sobre las mismas muestras utilizadas en el estudio sobre el bisfenol A, los análisis dirigidos a obtener información sobre los niveles de concentración de melamina, y conocer si éstos eran acordes al nivel de restricción establecido en el reglamento para los materiales plásticos.

Tanto para la determinación de melamina como de BPA, fue necesario adaptar, previamente, los procedimientos de ensayos disponibles en el laboratorio y acreditados por la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC), con el objetivo de reducir los límites de cuantificación.

2. Materiales y métodos

2.1 Muestras analizadas

En el periodo de mayo a septiembre de 2014 se adquirieron, en el comercio minorista de la Comunidad de Madrid (grandes y medianas superficies), 38 muestras de bebidas enlatadas, distribuidas de la siguiente manera: 22 muestras de refrescos/bebidas sin alcohol (zumos, colas, biter, tónica, agua, cerveza sin alcohol, etc.), 10 muestras de bebidas energéticas y 6 muestras de bebidas con alcohol (cervezas), correspondientes a 23 marcas comerciales distintas y cuyo país de origen en todos los casos era la Unión Europea.

Las muestras se presentaban en latas de 330 mL (25 envases), 500 mL (7 envases), 375 mL (1 envase), 335 mL (1 envase) y 250 mL (4 envases).

En los envases con contenido $<500 \text{ mL}$ se realizó la estimación de la superficie de contacto, ya que en la expresión de los resultados (mg kg^{-1}) aplica una relación entre la superficie de contacto y el volumen de 6 dm^2 por kg de alimento.

Las muestras se almacenaron a temperatura ambiente hasta su apertura. Una vez abiertas, el contenido se dividió en dos porciones (para la determinación de BPA y de melamina) y se conservaron en matraces topacio en refrigeración hasta su análisis. En el caso de las bebidas carbonatadas, se desgasificaron en un baño de agua de ultrasonidos durante 20 minutos aproximadamente.

2.2 Reactivos y patrones

En los ensayos de bisfenol A se empleó acetonitrilo de calidades HPLC y LC-MS (Scharlab), ácido acético glacial, min. 99 % (Merck), agua ultrapura tipo I (Sistema Direct-Q, Millipore), filtros de nylon de $0,45 \mu\text{m}$ (Symta) y de PTFE de $0,2 \mu\text{m}$ (Waters).

El patrón de bisfenol A, pureza $\geq 95 \%$, se obtuvo de Aldrich. A partir de una solución concentrada de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ preparada en acetonitrilo, se obtuvo otra por dilución de concentración $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. A partir de esta última se preparó en el mismo disolvente una solución de $2 \mu\text{g mL}^{-1}$, que se empleó para la obtención de las soluciones de calibración en el rango de $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ a $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ de bisfenol en muestra.

Para el análisis de melamina se utilizó acetonitrilo de calidad LC-MS (Scharlab), formiato amónico (Fluka), dietiletilamina (Sigma-Aldrich), agua ultrapura tipo I (Sistema Direct-Q, Millipore), filtros de nylon de $0,45 \mu\text{m}$ y $0,2 \mu\text{m}$ (Acrodisc).

Los patrones empleados fueron melamina, pureza $\geq 99\%$ (Merck), y como patrón interno melamina ^{13}C , 99 % amino- ^{15}N , 98 % de $100\ \mu\text{g mL}^{-1}$ en agua (Cambridge Isotope CNLM-8150-1). La solución madre de melamina se preparó en agua, en concentración de $1\ \text{mg mL}^{-1}$. A partir de una dilución de melamina en agua de $0,5\ \mu\text{g mL}^{-1}$, y de una dilución de patrón interno también en agua, de $1\ \mu\text{g mL}^{-1}$, se obtuvieron las soluciones de calibración equivalentes en el rango de $0,5\ \text{mg kg}^{-1}$ a $5\ \text{mg kg}^{-1}$. Para ello, se evaporaron $100\ \mu\text{L}$ de la solución de patrón interno y diferentes alícuotas de la solución de melamina de $0,5\ \mu\text{g mL}^{-1}$, y posteriormente se redisolvió en el eluyente empleado en el análisis cromatográfico.

2.3 Equipo instrumental

2.3.1 Determinación de bisfenol A

Para el análisis cromatográfico se utilizó un equipo de Agilent Technologies de la serie 1100, acoplado a un detector de fluorescencia (Agilent G1321A), operando a λ de excitación de $227\ \text{nm}$ y λ de emisión de $313\ \text{nm}$. La columna empleada fue de fase C18, $150\ \text{mm} \times 3,0\ \text{mm}$, $3,5\ \mu\text{m}$ (Zorbax Eclipse Plus), y como fase móvil un gradiente de acetonitrilo/agua (25 % al 100 %) a un flujo de $0,55\ \text{mL min}^{-1}$ y un volumen de inyección de $50\ \mu\text{L}$.

Para la confirmación del bisfenol A, se utilizó un equipo LC-MS/MS de Agilent Technologies compuesto por un HPLC de la serie 1200 acoplado a un detector de masas de triple cuadrupolo (Triple Quad 6410) y una columna C18 de $150\ \text{mm} \times 3,0\ \text{mm}$, $3,5\ \mu\text{m}$ (X-Terra, Waters). La separación cromatográfica se realizó con una fase móvil de 0,1 % de ácido acético en agua/acetonitrilo en gradiente (30 % al 100 %) a un flujo de $0,4\ \text{mL min}^{-1}$ y un volumen de inyección de $50\ \mu\text{L}$. El modo de ionización utilizado fue electrospray negativo (ESI⁻), con una temperatura de la fuente de $325\ ^\circ\text{C}$, un flujo del gas de $6\ \text{mL min}^{-1}$, una presión en el nebulizador de 45 psi y un voltaje en el capilar de 3 500 V. Se trabajó en modo MRM, monitorizándose las transiciones $227 > 212$ (*target*) y $227 > 133$ (cualificadoras).

2.3.2 Determinación de melamina

La determinación instrumental de melamina se realizó en un equipo compuesto por un cromatógrafo Agilent serie 1200 acoplado a un detector de trampa de iones Agilent 6330. La separación cromatográfica fue en modo HILIC, empleando una columna de sílice de $100\ \text{mm} \times 3,0\ \text{mm}$ (Atlantis HILIC Silica, Waters) a una temperatura de $30\ ^\circ\text{C}$. Como fase móvil se empleó acetonitrilo/formiato amónico 10 mM pH 3 (95:5), en modo isocrático, a flujo de $0,5\ \text{mL min}^{-1}$. El volumen de inyección fue de $15\ \mu\text{L}$. La ionización fue en ESI⁺, temperatura de secado de $350\ ^\circ\text{C}$, nebulizador a presión de 35 psi, flujo del gas de secado a $12\ \text{L min}^{-1}$ y voltaje de capilar de 3 000 V. Se trabajó en modo MRM, monitorizando las transiciones $127 > 85$ y $133 > 89$ para la melamina y el patrón interno, respectivamente. La confirmación de la identidad de la melamina se basó en la comparación de los espectros MS(2) de la muestra y patrón.

2.4 Extracción de las muestras

Para la extracción de bisfenol A, a 10 g de la muestra (desgasificada cuando procedía) se añadieron 10 mL de acetonitrilo y se extrajeron en agitación durante 15 minutos. El extracto se centrifugó a 3 000

rpm, 10 min y posteriormente se filtró una alícuota en filtro de nylon de 0,45 μm para su determinación por fluorescencia. En el caso de ser necesaria la confirmación de la presencia de bisfenol A por LC-MS/MS, el extracto se filtró a través de filtros de PTFE, 0,2 μm .

En la extracción de melamina, a 0,5 g de la muestra (desgasificada cuando procedía), se añadieron 10 mL de una mezcla de dietilamina/agua/acetonitrilo (1+4+5) y se extrajo por agitación 1 minuto. Posteriormente el extracto se centrifugó a 10 000 rpm, 5 $^{\circ}\text{C}$, 10 min, y se transfirieron 500 μL del sobrenadante, filtrado (nylon, 0,45 μm), junto con 100 μL de solución de patrón interno de melamina de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a un tubo para su evaporación a sequedad. El residuo final se redisolvió (1 minuto en agitación seguido de 1 minuto en baño de agua de ultrasonidos) en 500 μL de la fase móvil utilizada en la separación cromatográfica.

2.5 Validación

El laboratorio disponía de procedimientos de ensayos para la determinación de BPA en niveles $\geq 0,05 \text{ mg kg}^{-1}$, basado en cromatografía de líquidos con detección por fluorescencia (HPLC-FL) y confirmación por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC/MS-MS) con triple cuadrupolo; y de melamina en niveles $\geq 2,5 \text{ mg kg}^{-1}$, por LC/MS-MS (trampa de iones). Los métodos se adaptaron y verificaron, con el objetivo de reducir los límites de cuantificación.

2.5.1 Bisfenol A (BPA)

Para la verificación del método a niveles bajos, $\leq 0,05 \text{ mg kg}^{-1}$, se utilizó una muestra de zumo de naranja envasada en PET (contenido en BPA $< 2 \mu\text{g/L}^{-1}$).

Para comprobar si había efecto matriz, se preparó una curva de calibración de rango 2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ a 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ en la muestra blanco, y se comparó con la curva, en igual rango de concentración, preparada en acetonitrilo.

Se evaluaron los siguientes parámetros en función de los criterios del sistema de calidad seguidos en el laboratorio, basados en la ISO 17025 (UNE-EN 2005):

- Selectividad/especificidad: se comprobó que en el blanco de la muestra no aparecieran picos interferentes en el tiempo de retención del bisfenol A con una respuesta superior a 1/3 de la obtenida al límite de cuantificación. La variación del tiempo de retención del bisfenol A en la muestras no podía superar el margen de $\pm 5 \%$, respecto al de los patrones. Además en el análisis por LC/MS-MS, la relación de iones de las transiciones monitorizadas no debía variar en más de un 30 % respecto a las obtenidas con los patrones.
- Función respuesta: se evaluó obteniendo curvas de calibrado (rango 2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ -20 $\mu\text{g kg}^{-1}$) en acetonitrilo, en diferentes días. La linealidad expresada como desviación estándar relativa de la pendiente debía ser $\leq 5 \%$ y el coeficiente de correlación de la regresión lineal (r) $\geq 0,996$.
- Precisión/exactitud: se estudió cargando la muestra blanco en niveles de 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ y 4 $\mu\text{g L}^{-1}$, y se analizó por triplicado en 2 días ($n=6$). Se estimaron los CV % obtenidos para la repetibilidad y reproducibilidad interna. La exactitud se expresó como % de recuperación. Como criterios de referencia para la precisión se tomaron los calculados con la ecuación de Hortwitz-Thompson. Las recuperaciones para los niveles estudiados debían estar comprendidas entre 40 % y 100 %.

de acuerdo con la guía *Guidelines for performance criteria and validation procedures of analytical methods used in controls of food contact materials* (Bratinova et al., 2009).

La incertidumbre (U %) se calculó de acuerdo con la siguiente expresión:

$$U (\%) = 2 \times [U_{\text{Reproducibilidad}} (\%)^2 + U_{\text{Recuperación}} (\%)^2]^{1/2}$$

2.5.2 Melamina

La verificación del método se llevó a cabo paralelamente al análisis de las muestras, y se basó en la comprobación de la linealidad en el rango de (0,5-5) mg kg⁻¹, de la precisión y exactitud (expresada como recuperación) al límite de cuantificación de 0,5 mg kg⁻¹, y de la eficacia en la confirmación a este nivel de concentración.

Para ello, con cada serie de muestras analizadas se preparó una curva de calibración y se realizaron 2-4 recuperaciones sobre una o varias muestras de bebidas, al nivel de 0,5 mg kg⁻¹. En total se realizaron 22 recuperaciones, distribuidas en 7 días no sucesivos. Los criterios exigidos para la verificación del método fueron: recuperación 80 %-110 %; precisión según la estimada con la ecuación de Horwitz-Thompson; la linealidad debía satisfacer que el coeficiente de correlación de la regresión lineal (r) fuera $\geq 0,99$, y que la desviación o residuos de los niveles de calibración fueran inferiores al 15 %, excepto para el límite de cuantificación que se admitía un 20 %. En cuanto a la confirmación de la melamina debía cumplirse que la relación relativa de las intensidades de los iones cualificadores: *m/z* 68 y *m/z* 110 respecto al ión utilizado en la cuantificación, *m/z* 85, no variara más de un 50 % con respecto a la relación obtenidas con el patrón más cercano en concentración. La incertidumbre se calculó utilizando la misma expresión que para el BPA.

3. Resultados y discusión

3.1 Bisfenol A (BPA)

La verificación a niveles bajos de concentración, del método interno para el BPA previamente validado en el rango de 0,05 a 2,0 mg kg⁻¹ (Santillana et al., 2011), fue satisfactoria.

En relación a la linealidad, los coeficientes de correlación de la regresión lineal obtenidos fueron (r) $\geq 0,999$, y la desviación estándar relativa de la pendiente fue inferior a 5 %. Por otra parte, se comprobó que no había efecto matriz, ya que se obtuvo un CV < 1 % entre las pendientes de las curvas de calibrado obtenidas en la matriz y en acetonitrilo. Por este motivo se decidió trabajar con curvas de calibrado preparadas en acetonitrilo.

La precisión obtenida, en términos de repetibilidad y reproducibilidad interna para el nivel de 2 µg kg⁻¹, fue de CV=3 % y CV=6 %, respectivamente. Para el nivel de 4 µg kg⁻¹, se obtuvo un CV=5 % para la repetibilidad y reproducibilidad interna. Los valores obtenidos fueron inferiores a los estimados con la ecuación de Horwitz-Thompson. En cuanto a la exactitud, las recuperaciones medias fueron satisfactorias: 90 % para 2 µg kg⁻¹ y 95 % para el nivel de 4 µg kg⁻¹.

En relación a la selectividad, se han cumplido los criterios que se han indicado anteriormente en cuanto a variaciones en tiempo de retención y en la relación de iones. No se detectaron interferencias relevantes en el análisis de la muestra de bebida "blanco" (bisfenol A < 2 µg kg⁻¹).

En resumen, los resultados obtenidos fueron satisfactorios según los criterios previamente establecidos, fijándose el nuevo límite de cuantificación para bebidas en $2 \mu\text{g kg}^{-1}$, con una incertidumbre expandida estimada del 14 %.

Tras la verificación del método, éste se aplicó a la determinación de BPA en las muestras descritas anteriormente. Todas ellas se analizaron por duplicado y se realizaron análisis de recuperación paralelos sobre muestra. De las 38 muestras ensayadas, se encontraron problemas analíticos de recuperación en el análisis de 3 de ellas (2 bebidas energéticas y un biter), para las que no se proporcionan resultados.

En el 17 % de las muestras se cuantificó BPA en el rango de concentraciones de $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ a $6 \mu\text{g kg}^{-1}$ ($0,26 \mu\text{g dm}^{-2}$ a $1,05 \mu\text{g dm}^{-2}$), siendo el valor medio de las muestras positivas de $3,4 \mu\text{g kg}^{-1}$, y correspondiendo en todos los casos al grupo de las bebidas refrescantes. En el caso de las bebidas alcohólicas y energéticas ninguna muestra presentó cantidades detectables de BPA. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Resultados de BPA en muestras de bebidas enlatadas					
Tipo de bebida	Número de muestras	Muestras positivas ($\geq 2 \mu\text{g kg}^{-1}$)	Niveles de BPA encontrados		
			$\mu\text{g kg}^{-1}$	$\mu\text{g dm}^{-2}$	Tipo de muestra
Refrescos/bebidas sin alcohol	21	6	4,6	0,77	Refresco naranja
			2,0	0,26	Refresco piña
			2,5	0,41	Refresco lima-limón
			6,3	1,05	Biter
			2,0	0,27	Refresco lima-limón
			3,0	0,50	Limón-mosto-tinto verano
Bebidas alcohólicas	6	0	-	-	Cervezas
Bebidas energéticas	8	0	-	-	-
Total	35	6	Rango concentraciones: (2-6) $\mu\text{g kg}^{-1}$ Valor medio: $3,4 \mu\text{g kg}^{-1}$		

Las muestras que dieron positivas por cromatografía de líquidos con detección por fluorescencia (HPLC-FL), se confirmaron por espectrometría de masas (LC/MS-MS) en las condiciones descritas anteriormente. Se debe hacer notar que, de las 35 muestras para las que se proporcionan resultados, en el análisis por HPLC-FL se obtuvieron tres falsos positivos, correspondiendo 2 de las mues-

tras al grupo de bebidas energéticas y una muestra al de bebidas refrescantes (té al limón). Estas muestras no se han incluido en el grupo de muestras positivas, ya que no se confirmó la identidad del BPA.

En la figura 1 se muestran los cromatogramas (ambas transiciones) de un patrón de bisfenol A y de una muestra de bebida refrescante, obtenidos en el análisis por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC/MS-MS).

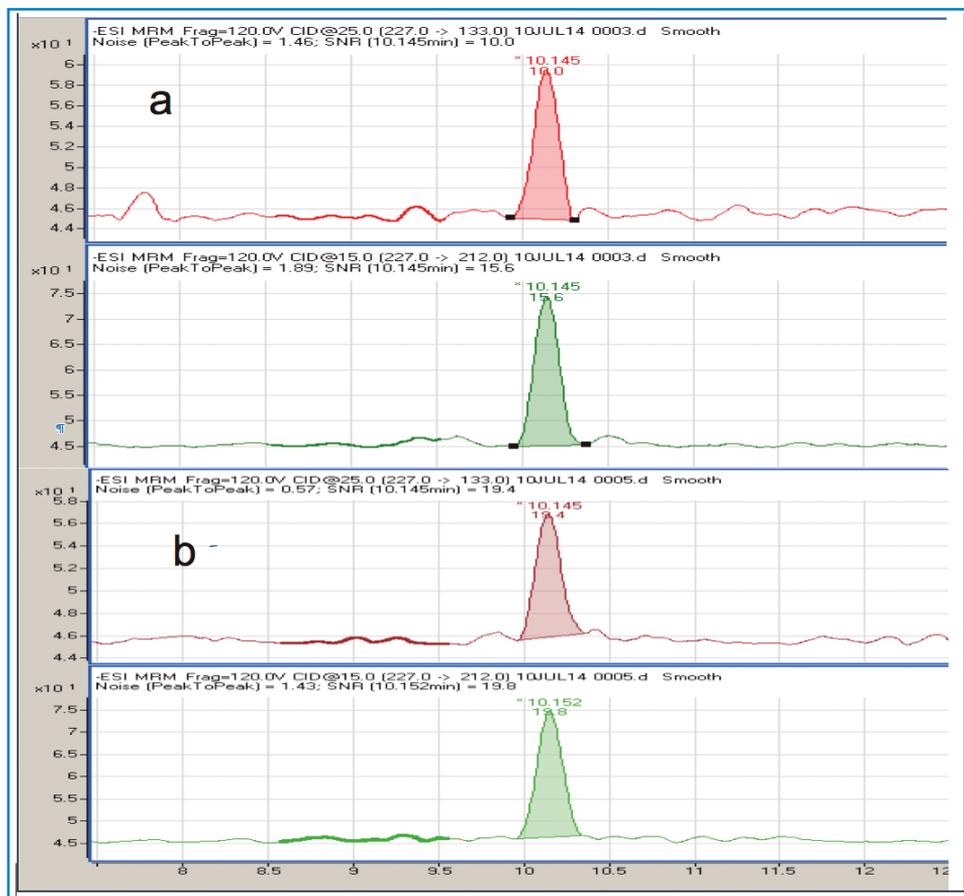


Figura 1. Cromatogramas (LC/MS-MS) de: a) patrón de BPA, $6 \mu\text{g L}^{-1}$, b) muestra bebida, concentración BPA $5 \mu\text{g L}^{-1}$.

Los resultados de BPA en bebidas enlatadas del presente trabajo, aunque limitados en número, indican que los niveles encontrados son muy bajos, lo que está en concordancia con los publicados por otros autores, mencionados en la introducción de este trabajo.

El nivel más alto de BPA detectado en este estudio ha sido de $6 \mu\text{g kg}^{-1}$. El único estudio realizado en España, según nuestro conocimiento, para ver la cesión de BPA de bebidas refrescantes enlatadas, fue publicado por Gallart-Ayala et al. en 2011, en el que detectaron un rango de concentraciones de $(0,044-0,607) \mu\text{g L}^{-1}$ en 7 de 11 muestras recogidas en el año 2009 en Barcelona.

Por otra parte, los resultados obtenidos en las muestras positivas en este estudio, serían compatibles con datos publicados sobre niveles de extracción (con acetonitrilo) de BPA de recubrimientos epoxi empleados en la fabricación de latas para bebidas: entre $1 \mu\text{g dm}^{-2}$ y $4 \mu\text{g dm}^{-2}$ (Oldring et al., 2014).

3.2 Melamina

Los resultados de comprobación del método para el nivel de $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ fueron satisfactorios, obteniéndose una recuperación media del 95 %. La precisión, expresada como coeficiente de variación fue del 9 % tanto para la repetibilidad como para la reproducibilidad interna. Las curvas de calibración cumplían los requisitos mencionados anteriormente; los coeficientes de correlación (r) fueron $>0,997$. Igualmente, en relación a la confirmación de la identidad de la melamina se cumplían los criterios preestablecidos de la relación de iones. La incertidumbre se estimó en un 18 % al nivel de $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$. En la figura 2 se muestra el cromatograma de una muestra de bebida y la misma muestra con melamina añadida en concentración de $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$.

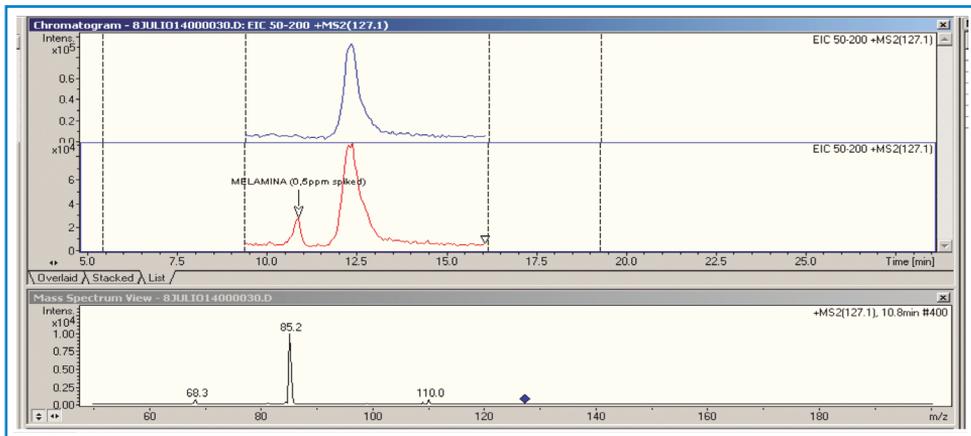


Figura 2. Cromatogramas (LC/MS-MS) de una muestra de bebida enlatada y la misma muestra con $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ de melamina añadida. Espectro de melamina en la muestra añadida (trazo inferior).

En cuanto a los resultados de las muestras de bebidas analizadas (38), los niveles de melamina estaban siempre por debajo del límite de cuantificación: $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$.

En todas las muestras analizadas los niveles de BPA y de melamina han sido muy inferiores a los límites aplicables de $0,6 \text{ mg kg}^{-1}$ y $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente, recogidos en el reglamento de materiales plásticos (Reglamento (UE) N° 10/2011), y aplicables a los recubrimientos de acuerdo con el Real Decreto 847/2011.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Juana Torres, Luisa Tello y Carmen Tejedor, del Servicio de Contaminantes del Centro Nacional de Alimentación, su colaboración en el desarrollo de este estudio.

Referencias

- BOE (2011). Real Decreto 847/2011, de 17 de junio, por el que se establece la lista positiva de sustancias permitidas para la fabricación de materiales poliméricos destinados a entrar en contacto con alimentos. BOE nº 164 de 11 de julio de 2011, pp: 76316-76330.
- Bratinova, S., Raffael, B. y Simoneau, C. (2009). Guidelines for performance criteria and validation procedures of analytical methods used in controls of food contact materials. 1st edition 2009. Publication Office of the European Union, Luxembourg, *Joint Research Centre, Scientific and Technical Report*, EUR 24105 EN.
- Cao, X.L., Corriveau, J. y Popovid, S. (2009). Levels of Bisphenol A in canned soft drink products in canadian markets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, pp: 1307-1311.
- Cunha, S.C., Almeida, C., Mendes, E. y Fernandes, J.O. (2011). Simultaneous determination of bisphenol A and bisphenol B in beverages and powdered infant formula by dispersive liquid-liquid micro-extraction and heart-cutting multidimensional gas chromatography-mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants. Part A*, 28, pp: 513-526.
- EFSA (2010). European Food Safety Authority. Scientific Opinion on Melamine in Food and Feed. *The EFSA Journal*, 8 (4):1573.
- EFSA (2015). European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs: Executive summary. *The EFSA Journal*, 13 (1): 3978.
- Fasano, E., Esposito, F., Scognamiglio, G., Di Francesco, F., Montuori, P., Cocchieri, R. A. y Cirillo, T. (2015). Bisphenol A contamination in soft drinks as a risk for children's health in Italy. *Food Additives and Contaminants. Part A*, 32 (7), pp: 1207-1214.
- Gallart-Ayala, H., Moyano, E. y Galceran, M.T. (2011). Analysis of bisphenols in soft drinks by on-line solid phase extraction fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 683, pp: 227-233.
- Geens, T., Apelbaum, T.Z., Goeyens, L., Neels, H. y Covaci, A. (2010). Intake of bisphenol A from canned beverages and foods on the Belgian market. *Food Additives and Contaminants. Part A*, 27, pp: 1627-1637.
- Geens, T., Aerts, D., Berthot, C., Bourguignon, J.P., Goeyens, L., Lecomte, P., Maghuin-Rogister, G., Pironnet, A.M., Pussemier, L., Scippo, M.L., Van Loco, J. y Covaci, A. (2012). A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A. *Food and Chemical Toxicology*, 50 (10), pp: 3725-3740.
- Goodson, A., Summerfield, W. y Cooper, I. (2002). Survey of bisphenol A and bisphenol F in canned foods. *Food Additives and Contaminants*, 19, pp: 796-802.
- Liao, C. y Kannan, K. (2013). Concentrations and profiles of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from the United States and their implications for human exposure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, pp: 4655-4662.
- MAGRAMA (2015). Ministerio Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Informe del consumo de Alimentación en España 2014.
- Merchant Research & Consulting (2014). Bisphenol A (BPA): 2014 World Market Outlook and Forecast up to 2018. Market Publishers Ltd., January 2014.
- Munguía-López, E.M., Gerardo-López, S., Peralta, E., Bolumen, S. y Soto-Valdez, H. (2005). Migration of bisphenol A from can coatings into fatty-food simulant and tuna fish. *Food Additives and Contaminants*, 22, pp: 892-898.
- Oldring, P.K.T., Castle, L., O'Mahony, C. y Dixon, J. (2014). Estimates of Dietary Exposure to Bisphenol A (BPA) from Light Metal Packaging using Food Consumption and Packaging usage Data: A Refined Deterministic Approach and a Fully Probabilistic (FACET) Approach. *Food Additives and Contaminants. Part A*, 31 (3), pp: 466-489.
- Rochester, J.R. (2013). Bisphenol A and human health: a review of the literatura. *Reproductive Toxicology*, 42, pp: 132-155.
- Sajiki, J., Miyamoto, F., Fukata, H., Mori, C., Yonekubo, J. y Hayakawa, K. (2007). Bisphenol A and its source in foods in Japanese markets. *Food Additives and Contaminants*, 24, pp: 103-112.

- Santillana, M.I., Ruiz, E., Nieto, M.T., Bustos, J., Maia, J., Sendón, R. y Sánchez, J.J. (2011). Migration of bisphenol A from polycarbonate baby bottles purchased in the Spanish market by liquid chromatography and fluorescence detection. *Food Additives and Contaminants*, 28 (11), pp: 1610-1618.
- UE (2011a). Reglamento (UE) N° 10/2011 de la Comisión de 14 de enero de 2011 sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos. DO L 12 de 15 de enero de 2011, pp: 1-89.
- UE (2011b). Reglamento (UE) N° 321/2011 de la Comisión de 1 de abril de 2011 que modifica el Reglamento UE N° 10/2011 por lo que respecta a la restricción del uso de bisfenol A en biberones de plástico para lactantes. DO L 87 de 2 de abril de 2011, pp: 1-2.
- UE (2012). Reglamento (UE) N° 594/2012 de la Comisión de 5 de julio de 2012 por el que se modifica el Reglamento (CE) N° 1881/2006 de la Comisión, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios, en lo concerniente a los contenidos máximos de los contaminantes ocratoxina A, PCBs no similares a las dioxinas y melamina en los productos alimenticios. DO L 176 de 6 de julio de 2012, pp: 43-45.
- Vanderberg, L.N., Colborn, T., Hayes, T.B., Heindel, J.J., Jacobs, D.R.Jr., Lee D.H., Shioda, T., Soto, A.M., Vom Saal, F.S., Welshons, W.V., Zoeller, R.T. y Myers, J.P. (2012). Hormones and endocrine-disrupting chemicals: Low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocrine Reviews*, 33 (3), pp: 378-455.

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

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

Abreviatura revista: Rev. Com. Cient. AECOSAN

