revista del

Comité Científico

de la aesa

Nº 3

MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO
agencia española de seguridad alimentaria

Revista del Comité Científico de la AESA

Madrid, 2006

Revista del Comité Científico de la aesa

Nº 3

Nota del Comité Editorial

Los Dictámenes que se incluyen a continuación son el resultado de las consultas que la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y otras instituciones hacen al Comité Científico. Esta Revista y sus dictámenes se presentan respondiendo a las 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 Bibliográficas" que se incluye al final de los Dictámenes. Lo contrario, además de dificultar su comprensión integral, pudiera llevar a extraer conclusiones parciales o equivocadas, divergentes del informe en su conjunto.

Revista del Comité Científico de AESA

Consejo Editorial

Presidenta de Honor
Elena Salgado

Editores Jefe
Félix Lobo Aleu
José Ignacio Arranz Recio

Secretarios
Maria Luz Carretero Baeza
Jesús Campos Amado
Belén Crespo Sánchez-Eznarriaga

Consejo Editorial Científico
Presidente del Comité Científico
Andreu Palou Oliver
Vicepresidente del Comité Científico
Juan José Badiola
Arturo Anadón Navarro
Margarita Arboix Arzo
Juan José Badiola
Albert Bosch Navarro
Juan Francisco Cacho Palomar
Francesc Centrich Escarpenter
Mª Luisa García López
Manuela Juárez Iglesias
Manuel Martín Esteban
Susana Monereo Megías
Juan Antonio Ordóñez Pereda
Andrés Otero Carballeira
Fernando Rodríguez Artalejo
Elías Rodríguez Ferri
Jose Manuel Sánchez Vizcaíno Rodríguez
Vicente Sanchís Almenar
Gregorio Varela Moreiras
Pablo Vera Vera
Gonzalo Zurera Cosano

Responsable de Comunicación AESA
Héctor Alonso
AESA: Alcalá, 56. 28071. Madrid
e-mail: comunicacionAesa@msc.es
Diseño y maquetación
Montserrat Gómez
Imprime
Artegraf
NIPO: 355-05-002-9
ISSN: 1885-6586
D.L.: M-27353-2005

Índice

Editorial 7

Opinión del Comité Científico de la AESA sobre una cuestión planteada por la Presidencia de la AESA, en relación con el riesgo de la presencia de Semicarbazida (SEM) en algunos productos alimenticios envasados en tarros de vidrio con tapas de metal con juntas de PVC 9

Opinión del Comité científico de la AESA sobre una cuestión en relación con la utilización del sistema CATALLIX® (basado en la activación del sistema lactoperoxidasa) como tratamiento higienizante de frutas y hortalizas para su comercialización como productos de IV gama 17

Opinión del Comité científico de la AESA sobre los riesgos asociados a la supresión de la refrigeración durante periodos limitados de tiempo, en las mesas de preparación de los servicios rápidos de restauración 32

Opinión del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria (AESA) relativa a la propuesta de alegaciones nutricionales de ácidos grasos Omega-3 en alimentos efectuada por la Comisión Europea y a las consideraciones sobre la misma aportadas por la Autoridad Europea en Seguridad Alimentaria (EFSA) 44

Este número supone un hito importante en la evolución de la revista. Es el número tres y, precisamente, inicia también el segundo año de andadura de una publicación que pretende juntamente con Nodo@esa servir como foro de difusión de asuntos de seguridad alimentaria y nutrición.

Hoy abrimos la puerta de la Revista del CC. Lo hacemos desde el convencimiento de que en nuestro país ya se ha conseguido una importante masa crítica de investigadores en Seguridad Alimentaria y Nutrición que están presentes en los ámbitos de publicación internacionales, pero desde el convencimiento también de que es bueno y necesario que se amplíe el campo de las revistas españolas ante la demanda creciente de lugares de publicación.

El reto editorial que supone el nuevo enfoque de la **Revista del Comité Científico de la AESA** nace con una doble vocación. Por una parte, reunir los más elevados requisitos de calidad científica e investigadora, que la equiparen a las más rigurosas publicaciones científicas de España. Por la otra, ampliar el ámbito científico de investigación en áreas que no se encuentran en las prioridades editoriales de otras publicaciones. El objetivo es ensanchar las áreas de investigación dentro de la Seguridad Alimentaria; queremos atender a cuestiones tradicionales de la Seguridad Alimentaria, pero también aquellas otras que, aún habiendo obtenido reconocimiento científico internacional, no han sido lo suficientemente bien acogidas en las publicaciones al uso, por ser especificas de líneas orientadas a los aspectos relativos a nuestra realidad nacional.

Además queremos fomentar el debate en Seguridad Alimentaria y Nutrición, y lo hacemos con una decidida vocación en esta dirección.

Nuestro objetivo será la excelencia, y para ello aceptaremos todas aquellas contribuciones científicas relevantes que cumplan esta característica. Y queremos priorizar especialmente aquellos enfoques que estén más en contacto con las demandas que se susciten por la Comunidad Científica, y con los debates relevantes de Seguridad Alimentaria y las Estrategias sobre Nutrición.

Todos los textos recibidos en la Revista habrán de superar una rigurosa selección por evaluadores anónimos, un informe por uno de los miembros del Comité Científico y la decisión final del Comité Editorial.

Los lectores de la revista podrán encontrar así estudios y exposiciones serias que les permitan clarificar los planteamientos en materia de Seguridad Alimentaria y Nutrición.

Por todo ello, en los siguientes números, con independencia de los dictámenes del Comité Científico que se puedan programar, habrá una sección de **Colaboraciones** en la que se compilarán en un principio las publicaciones relacionadas con la actividad del Centro Nacional de Alimentación (CNA), del Laboratorio Comunitario de Referencia de Biotoxinas Marinas (LCRBM) y de las Unidades de la

AESA y que en futuros números recogerá los artículos que se vayan recibiendo. Con este objetivo efectuamos un llamamiento para el envío de artículos sobre temas de Seguridad Alimentaria y Nutrición.

Los artículos deberán ser enviados a la dirección de correo electrónico comunicacionAesa@msc.es ateniéndose a las *Normas para la Publicación de Artículos* que aparecen en la página WEB de la AESA.

Una revista es siempre el fruto de encuentros y de un trabajo colectivo. No dudamos que con el esfuerzo de todos podremos conseguir que nuestra revista sea cada día mejor. Por ello, quiero expresar mi sincero agradecimiento a todos aquéllos que la han hecho y la harán posible. Muchas gracias a todos.

José Ignacio Arranz Recio
Director Ejecutivo de la AESA

Opinión del Comité Científico de la AESA sobre una cuestión planteada por la Presidencia de la AESA, en relación con el riesgo de la presencia de Semicarbazida (SEM) en algunos productos alimenticios envasados en tarros de vidrio con tapas de metal con juntas de PVC

Núm. Referencia: AESA-2003-006

Documento aprobado por el Comité Científico en sesión plenaria el 12 de mayo de 2004

Miembros del Comité Científico

Arturo Anadon Navarro, Albert Bosch Navarro, Andrés Otero Carballeira, María Luisa García López, Elías Rodríguez Ferri, José Manuel Sánchez-Vizcaíno Rodríguez, Juan José Badiola Díez, Fernando Rodríguez Artalejo, José Luis García López, Manuel Martín Esteban, Andreu Palou Oliver, Margarita Arboix Arzo, Manuela Juárez Iglesias, Juan Antonio Ordóñez Pereda, Vicente Sanchís Almenar, Gonzalo Zurera Cosano, Juan Francisco Cacho Palomar, Francesc Centrich Escarpener, Gregorio Varela Moreiras.

Grupo de Trabajo

Arturo Anadón Navarro (coordinador)
Margarita Arboix Arzo
Juan Francisco Cacho Palomar
Francesc Centrich Escarpenter

Resumen

La semicarbazida (SEM), compuesto hidracina, es un contaminante que se ha encontrado en una gran variedad de alimentos y su presencia podría tener diferentes orígenes tales como la biotransformación metabólica de la nitrofurazona (fármaco antibacteriano prohibido en animales productores de alimentos), la degradación del compuesto azodicarbonamida (aditivo blanqueante, aditivo de materiales plásticos, sustancia utilizada en las juntas de cierre de tapas de metal en envases de vidrio), y en los procesos tecnológicos que utilizan resinas con carragenanos. Se ha señalado la posible presencia de SEM, principalmente, en algunos productos alimenticios envasados en tarros de vidrio con tapas de metal con juntas de plástico y se ha evaluado el grado de riesgo en relación a una potencial carcinogénesis y genotoxicidad a partir de los datos de concentración/exposición de la SMZ encontrados en los alimentos infantiles.

Los datos toxicológicos existentes de la SMZ son limitados, pero indicativos de que la SMZ posee potencial de genotoxicidad y de carcinogenicidad. No obstante, los datos disponibles no permiten claramente afirmar que la actividad genotóxica observada *in vitro* se expresa también *in vivo*. En el ratón, la semicarbazida posee propiedades carcinógenas potenciales a dosis de 100 mg/kg p.c. /día.

Los análisis de los envases de alimentos infantiles mostraron resultados positivos a SMZ en un rango entre 20 y 40 µg/kg en la UE y entre 1 y 30 µg/kg en muestras españolas. Usando el valor de ingesta Percentil 95 (g/niño/día) de alimentos infantiles relevantes y asumiendo el nivel de contaminación de 40 µg/kg en todos los productos, la exposición estimada es 2,1 µg/kg p.c./día en niños de 9 meses de edad de un peso corporal medio de 8,8 kg, y un valor de ingesta Percentil 95 de 463,7 g/niño/día. En adultos de 60 kg expuestos en dieta a una contaminación de SMZ de 2 µg/kg de alimento y suponiendo que consumen 1 kg de alimento/día, se estima un nivel de exposición de 0,03 µg/kg p.c./día. Por lo tanto el riesgo que ello supone para el consumidor, niños y adultos es bajo.

Se concluye, que no existen datos científicos suficientes como para recomendar la modificación los hábitos dietéticos actuales de los consumidores, incluyendo los niños de corta edad. No obstante, se recomienda continuar los estudios sobre las causas posibles de la presencia de SMZ en los alimentos, así como realizar estudios complementarios de genotoxicidad *in vivo*, de toxicocinética y muestreos analíticos de SMZ en diferentes tipos de alimentos, para identificar las variables y los procesos implicados en la aparición de SMZ.

Palabras Clave

Semicarbazida, contaminante, alimentos infantiles, análisis de alimentos, riesgos para el hombre, seguridad consumidor.

Antecedentes

En julio de 2003 la EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) fue informada por la industria alimentaria de la posible presencia de Semicarbazida (SEM) en algunos productos alimenticios envasados en tarros de vidrio con tapas de metal con juntas de plástico (PVC). El 14 de octubre de 2003, la EFSA emitió un informe de evaluación de riesgos respecto de la presencia de SEM en alimentos basándose en los estudios más recientes aportados por el Panel de Expertos en Aditivos, Aromas, Coadyuvantes Tecnológicos y Materiales en Contacto con Alimentos (AFC) el 14 de octubre de 2003.

La Presidencia de la AESA propuso la creación de un Grupo de Expertos en el seno de su Comité Científico para que elaborara un proyecto de Opinión de dicho Comité, en la que se deberían incluir los siguientes aspectos: Grado de evidencia en relación a la carcinogénesis y genotoxicidad; Evaluación de la exposición a partir de los datos de concentración de SEM encontrada en los alimentos infantiles y una aproximación a la evaluación del riesgo.

Evaluación del riesgo

1. Origen de la semicarbazida: la semicarbazida es una hidracina que se ha encontrado en una gran variedad de alimentos y su presencia en los mismos podría tener diferentes orígenes:

a) Biotransformación metabólica de la nitrofurazona

La semicarbazida es un metabolito de la nitrofurazona, fármaco perteneciente al grupo de los antibacterianos nitrofuranos. Su presencia en alimentos de origen animal se debe a un uso fraudulento, dado que la nitrofurazona se encuentra incluida en el Anexo IV del Reglamento del Consejo (CEE) 2377/90 (sustancias para las que no pueden fijarse un límite máximo de residuos), por lo que no puede utilizarse en animales productores de alimentos. En 1993, los nitrofuranos se incluyeron en el Anexo IV debido a la limitada información acerca de sus propiedades toxicológicas no pudiéndose establecer sus valores de límite máximo de residuos (LMR) para los tejidos comestibles de diferentes especies animales.

En los tejidos procedentes de animales tratados con nitrofuranos, la semicarbazida puede detectarse como uno de los productos de degradación de los nitrofuranos; la semicarbazida es un metabolito reactivo, capaz de unirse covalentemente con macromoléculas orgánicas, por lo que pueden presentarse aductos con el ADN de significancia toxicológica (EFSA/AFC/FCM/17-final).

b) Degradación del compuesto azodicarbonamida

Se conoce que la semicarbazida se puede formar a partir de la degradación de la azodicarbonamida, sustancia usada en el tratamiento de la harina como blanqueante en algunos países, pero no en la Unión Europea, y como aditivo de materiales plásticos (como sustancia espumante usada en las juntas de cierre en tapas de metal para frascos de vidrio). Los agentes espumantes se añaden a los polímeros durante el procesado para, a través del plástico, formar células de gas diminutas, fenómeno necesario para que el plástico actúe eficazmente como un sello; con las altas temperaturas del procesado, la azodicarbonamida se descompone en gases, principalmente nitrógeno, junto con monóxido de carbono, dióxido de carbono y amoniaco, así como residuos no volátiles en cantidades muy

pequeñas (biourea alrededor del 2%) y otros productos indeseables (SCF, 1995). Para la azodicarbonamida no se ha establecido por la Unión Europea una ingesta diaria admisible (ADI) o una ingesta diaria teórica.

c) Procesos tecnológicos que utilizan carragenanos

La semicarbazida se ha encontrado en algunos ovoproductos obtenidos por un proceso tecnológico que utiliza resinas con carragenanos.

d) Alimentos envasados

La semicarbazida está estructuralmente relacionada con la azodicarbonamida, y se ha encontrado en materiales, tales como juntas de cierre para tapas de metal en frascos de vidrio utilizados como envases de alimentos.

La semicarbazida se ha encontrado en alimentos infantiles, conservas y mermeladas, zumos de frutas, miel, vegetales esterilizados, mayonesa, mostaza, salsas y *ketchups* entre otros, que han sido envasados en los recipientes anteriormente mencionados.

2. Toxicología de la semicarbazida:

Aunque los datos toxicológicos existentes son limitados, son indicativos de que la semicarbazida posee potencial de genotoxicidad y de carcinogenicidad.

a) Genotoxicidad

Se ha demostrado que la semicarbazida posee una débil actividad mutagénica en ausencia de actividad metabólica. Estudios *in vitro* de mutación génica en la bacteria *Salmonella Typhimurium* (cepas TA1535 y TA100) en ausencia de actividad metabólica demuestran resultados positivos. También se han encontrado resultados positivos en el ensayo *in vitro* de aberraciones cromosómicas con linfocitos de ratón (TNO, 2003). Por el contrario, estudios de clastogénesis en cultivos de células de mamíferos no fueron concluyentes, por lo que se están realizando de nuevo estos estudios (TNO, 2003).

b) Carcinogenicidad

No existen datos en el hombre. La Agencia Internacional sobre Investigación del Cáncer (IARC) clasifica a la semicarbazida como compuesto no carcinógeno para el hombre (Grupo 3). Sin embargo, existen datos, aunque cuestionados, de carcinogenicidad en animales. La semicarbazida no es carcinógeno en la rata CD hembra tratada con dosis en la dieta de 1000 mg/kg durante 32 semanas, o 500 mg/kg durante 78 semanas (Weisburger et al., 1981). Por el contrario, ratones *Swiss* hembras tratados con semicarbazida, dosis orales de 0,062% en el agua de bebida, durante toda la vida mostraron angiomas y angiosarcomas así como también tumores en pulmón. La dosis de semicarbazida que puede originar estos tumores localizados es equivalente a 100 mg/kg p.c./día administrada durante todo el periodo de vida. Diversos autores han señalado que la semicarbazida es uno de los carcinógenos más débiles entre las diferentes hidracinas ensayadas en el ratón (IARC, 1974; Parodi et al., 1981; Cheeseman, 1999).

c) Conclusiones sobre genotoxicidad y carcinogenicidad

• Los datos disponibles no permiten evaluar si la actividad genotóxica observada *in vitro* se expresa también *in vivo*, lo que se podría descartar probablemente por un ensayo complementario de genotoxicidad *in vivo*, usando dos células somáticas (por ejemplo, células de médula osea y de hígado de mamíferos).

• Se desconoce la toxicocinética de la semicarbazida. Sería importante evaluar la distribución tisular.

• En el ratón, la semicarbazida posee propiedades carcinógenas potenciales (dosis mínima observada de 100 mg/kg p.c. /día).

3. Evaluación de la exposición realizada a partir de los datos de concentración de semicarbazida encontrados en los alimentos infantiles

Aunque existen pocos datos sobre las concentraciones presentes de semicarbazida en alimentos, estas varían entre 20 µg/kg en alimentos infantiles y 2,6 µg/kg en otros productos. Se debe destacar que puede haber considerable variación en la concentración de semicarbazida entre los diferentes lotes pertenecientes al mismo producto y también que puede originarse una perdida de semicarbazida con el almacenamiento del producto.

Los análisis correspondientes a los envases de alimentos infantiles han dado como resultado cifras positivas de contaminación por semicarbazida que están entre 20 y 40 µg/kg (Alert/002/03E) y entre 1 y 30 µg/kg en muestras recogidas y analizadas en España, lo que supondría, usando el valor máximo de 40 µg/kg, que la exposición estaría entre 2,6 y 8,3 µg/día para niños de 5,8 y 9,8 kg de peso corporal (considerando que la ingesta media es 67 g/niño/día, y 208 g/niño/día, respectivamente) (CEC, 1993), cantidades muy por debajo de las observadas como tóxicas en los ensayos de carcinogénesis. (Anexo: Tabla de resultados obtenidos en muestras tomadas en España).

Las concentraciones más altas de semicarbazida aparecen en los alimentos infantiles envasados en frascos de cristal, por lo que la contribución de los alimentos envasados en frascos de cristal usados en la dieta total en adultos es probablemente mas baja que en la dieta de los niños.

Usando el valor de ingesta Percentil 95 (g/niño/día) de alimentos infantiles relevantes y asumiendo el nivel de contaminación de 40 µg/kg en todos los productos, la exposición estimada es 2,1 µg/kg p.c./día en niños de 9 meses de edad (un niño de 9 meses, de peso corporal medio de 8,8 kg, tiene un valor de ingesta Percentil 95 de 463,7 g/niño/día) (CEC, 1993); es decir en 464 g de alimento puede existir un nivel de contaminación de 18,6 µg lo que significa 18,6 µg/ 8,8 kg, es decir 2,1 µg/kg p.c./día).

En adultos con peso corporal medio 60 kg expuestos en dieta a una contaminación de semicarbazida de 2 µg/kg de alimento y suponiendo que consumen 1 kg de alimento/día, se estima un nivel de exposición de 0,03 µg/kg p.c./día.

Conclusiones y recomendaciones

Se ha detectado la presencia de semicarbazida en ciertos alimentos, aunque en cantidades muy pequeñas. El riesgo que ello supone para el consumidor, tanto para los adultos como para los niños, evaluado en función de la peligrosidad de la semicarbazida y de la dosis interna de exposición es bajo.

Se recomienda continuar los estudios sobre las causas posibles de la presencia de semicarbazida en los alimentos, así como realizar estudios complementarios de genotoxicidad *in vivo* y estudios de toxicocinética para aportar un mayor conocimiento de la toxicología de la semicarbazida.

Se deben continuar los estudios analíticos de semicarbazida en diferentes tipos de alimentos, intentando buscar las variables y los procesos implicados en la aparición de semicarbazida como contaminante.

Teniendo en cuenta que la semicarbazida tiene efectos potenciales de mutagénesis y/o carcinogénesis debe acelerarse el desarrollo y la evaluación de riesgos de tapas y juntas alternativas para el sellado de los envases de vidrio utilizados para los alimentos.

Por el momento, no existen datos científicos suficientes como para recomendar la modificación los hábitos dietéticos actuales de los consumidores, incluyendo los niños de corta edad.

Bibliografía

Alert/002/03E (2003). Annex 5.

CEE (1993). *Nutrient and energy intakes for the European Community, reports of the Scientific Committee on Food, thirty first series*, Office for Official Publications of the E.C., Luxembourg.

Cheeseman, M. A., Machuga, E. J. and Bailey, A. B. (1999). *A tiered approach to threshold of Regulation.* Food and Chemical Toxicology 37, 387-412.

EFSA/AFC/FCM/17 final (2003). *Statement of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food updating the advice available on semicarbazide in packaged foods.* Adopted on 1 October 2003.

IARC (1974). IARC *Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man: Some aromatic amines, hydrazine and related substances, Nnitroso compounds and miscellaneous alkylating agents.* Volume 4. International Agency for Research on Cancer, Lyon (France).

Parodi, S., Flora, S. D., Cavanna, M., Pino, A., Robbiano, L., Bennicelli, C. and Brambilla, G. (1981). *DNA-damaging activity in vivo and bacterial mutagenicity of sixteen hydrazine derivatives as related quantitatively to their carcinogenicity.* Cancer Research 41, 1469-1481.

Reglamento del Consejo 90/2377/CEE, por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal.

SCF (1995). *Opinion of the Scientific Committee on Food on the 23rd additional list of monomers and additives for food contact material.* SCF/CS/PM/GEN/M95 Final.

TNO (2003). *Oral presentation of results of genotoxicity studies commissioned by EFSA and conducted at TNO, Zeist*, The Netherlands, presented at the Scientific Panel meeting on 30 September 2003.

Weisburger, E. K., Ulland, B. M., Nam, J., Gart, J. J. and Weisburger, J. H. (1981). *Carcinogenicity tests of certain environmental and industrial chemicals.* Journal of the National Cancer Institute 67, 75-88.

Carcinogenicity tests of certain environmental and industrial chemicals. Journal of the National Cancer Institute 67, 75-88.

ANEXO I

SEM en productos alimenticios Datos procedentes de CNA-AESA, Galicia, Cataluña y Valencia
Unidades: µg/Kg

	CNA-AESA[1]				Galicia			
	N	**Media**	**Mediana**	**Rango**	**N**	**Media**	**Mediana**	**Rango**
Alimentos infantiles con carne	7	16,4	15	10 a 30				
Alimentos infantiles con pescado	4	15	15	10 a 20				
Alimentos infantiles con verdura								
Alimentos infantiles con fruta	3	3,7	5	1 a 5				
Alimentos infantiles con cereales								
Alimentos infantiles mixtos vegetales	3	4,7	2	2 a 10	6			
Alimentos infantiles mixtos vegetales y lácteos	4	11,8	12,5	2 a 20	1			
Alimentos infantiles lácteos								
Alimentos infantiles salsa								
Zumos infantiles	3	5	5	5	8	2,6	2,8	0,5 a 6
Productos Pesqueros	1	6	6	6				
Productos vegetales	15	1,4	1	0,5 a 3,8				
Néctares y zumos	4	0,5	0,5	0,5	16	0,7	0,5	0,5 a 3,3
Mermeladas	7	0,7	0,5	0,5 a 1,5				
Salsas	5	1,3	0,5	0,5 a 4,3				
Bebidas (agua, cerveza)	7	0,5	0,5	0,5				
Productos cárnicos (salchichas, patés)	6	0,5	0,5	0,5				

	Cataluña				Valencia			
	N	Media	Mediana	Rango	N	Media	Mediana	Rango
Alimentos infantiles con carne	8	37	35,2	12,3 a 61,6	1	13	13	
Alimentos infantiles con pescado	8	33,2	28,7	7,5 a 86,6	1	27	27	
Alimentos infantiles con verdura	7	24,7	14,1	8,6 a 64,9				
Alimentos infantiles con fruta	3	3,7	5	1 a 5				
Alimentos infantiles con cereales								
Alimentos infantiles mixtos vegetales	9	7,7	7,4	1,7 a 14,8	2	7,3	7,3	0,5 a 14
Alimentos infantiles mixtos vegetales y lácteos								
Alimentos infantiles lácteos								
Alimentos infantiles salsa								
Zumos infantiles	7	5,3	4,3	1,2 a 11,9	1	0,5	0,5	
Productos Pesqueros								
Productos vegetales								
Néctares y zumos	25	1,6	0,6	0,5 a 6,3	3	0,5	0,5	
Mermeladas								
Salsas								
Bebidas (agua, cerveza)								
Productos cárnicos (salchichas, patés)								

1. Una de las muestras se analizó sin homogeneizar el contenido del envase y se obtuvo el resultado de 65,5 ug/kg, no se ha incluido los rangos ni en el cálculo de la media y la mediana.

Fechas de los datos

CNA/AESA: 4 de diciembre de 2003

Cataluña: 2 de enero de 2004

Valencia: 2 de enero de 2004

CNA-AESA. LQ: 1 ug/Kg Galicia. LQ: 1 ug/Kg Valencia. LQ: 1 ug/Kg Cataluña. LQ: 1 ug/Kg FIAB. LQ: 1 ug/Kg. Los valores por debajo del límite de cuantificación se han considerado LQ/2.

Opinión del Comité científico de la AESA sobre una cuestión en relación con la utilización del sistema CATALLIX® (basado en la activación del sistema lactoperoxidasa) como tratamiento higienizante de frutas y hortalizas para su comercialización como productos de IV gama

Núm. Referencia: AESA-2005-012

Documento aprobado por el Comité Científico en sesión plenaria el 16 de noviembre de 2005

Miembros del Comité Científico

Arturo Anadon Navarro, Juan Antonio Ordóñez Pereda, Margarita Arboix Arzo, Juan José Badiola Díez, Andrés Otero Carballeira, Albert Bosch Navarro, Andreu Palou Oliver, Juan Francisco Cacho Palomar, Fernando Rodríguez Artalejo, Francesc Centrich Escarpener, Elías Rodríguez Ferri, José Manuel Sánchez-Vizcaíno Rodríguez, José Luis García López, María Luisa García López, Manuela Juárez Iglesias, Vicente Sanchís Almenar, Gregorio Varela Moreiras, Manuel Martín Esteban, Gonzalo Zurera Cosano

Grupo de Trabajo

Juan A. Ordóñez Pereda (coordinador)
Andrés Otero Carballeira
Manuel Núñez Gutiérrez (experto externo)
Jesús Campos Amado (secretario)

Resumen

El sistema lactoperoxidasa tiocianato (LP) comprende una serie de reacciones que se producen de forma natural en diversos fluidos orgánicos (saliva, leche, lágrimas, etc). Se cree que su función es proteger al organismo frente a diversos microorganismos patógenos. Para que funcione el sistema se requiere la presencia de peroxidasas, tiocianato (SCN^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La enzima, en presencia de H_2O_2, cataliza la oxidación de SCN^- originando diversos productos con actividad antimicrobiana, entre los cuales el hipotiocianito ($OSCN^-$) es el que se forma en mayores cantidades. Se considera que la actividad antimicrobiana de los compuestos formados radica en la oxidación de grupos sulfhidrilos de diversas enzimas y otras proteínas microbianas, aunque también pueden oxidar el NADH y NADPH perturbando los sistemas de transporte de energía y aminoácidos o la actividad de las enzimas glicolíticas. La eficacia del sistema LP puede variar dependiendo de diversos agentes y factores pero, en general, puede decirse que tiene una acción bacteriostática y/o bactericida sobre bacterias Gram negativas catalasa positivas. Las bacterias Gram positivas son más resistentes, considerándose que sólo inhibe su crecimiento.

El sistema CATALLIX® es un reactor diseñado para imitar las reacciones que tienen lugar de forma natural con el sistema LP. Consta de dos recipientes donde se deposita H_2O_2 y SCN^- disueltos en agua que se hace pasar a través de un soporte donde está inmovilizada la lactoperoxidasa. De esta forma se activa el sistema y se generan las sustancias antimicrobianas. Los experimentos realizados utilizando lechuga como modelo parecen indicar que el sistema CATALLIX® supera algo en eficacia a la cloración (100 mg/l) en la destrucción/inhibición de las bacterias que habitualmente se encuentran en las hortalizas frescas.

De entre las bacterias de interés sanitario que puede contaminar las hortalizas, *Listeria monocytogenes* es la que adquiere mayor relevancia por ser Gram positiva y por su psicrotrofilia. Es, pues, esta bacteria el microorganismos "diana" en relación con el tratamiento de hortalizas de IV gama con el sistema LP (CATALLIX®).

Se ha considerado que las hortalizas de IV gama se almacenan hasta su venta (no más de una semana) a temperatura de refrigeración (4ºC), que la contaminación por *L. monocytogenes* durante el troceado de las hortalizas y otras manipulaciones supera las 10 células/g, que el valor g de esta bacteria en hortalizas refrigeradas es, en el peor de los casos, de 19 horas y que el objetivo de seguridad alimentaria (FSO) es de 100 u.f.c./g. En estas condiciones, se necesitaría un tratamiento de descontaminación que lograra una disminución de dos unidades logarítmicas para conseguir el FSO.

Ante la previsible prohibición por la UE del uso de hipoclorito sódico en los alimentos, se necesitan métodos alternativos para descontaminar las frutas y hortalizas de IV gama. El sistema CATALLIX® posee un poder antibacteriano al menos igual a la cloración, por lo que se considera que puede utilizarse para el fin anteriormente mencionado. Por otra parte, las cantidades residuales de SCN^- en las hortalizas tratadas no presentan riesgo potencial para el consumidor, ya que la concentración detectada en estos productos está por debajo de los niveles endógenos descritos en saliva humana y en leche de vaca, oveja y cabra.

Palabras Clave

Lactoperoxidasa, hortalizas, frutas, *Listeria monocytogenes*, seguridad alimentaria.

Antecedentes

1. El sistema lactoperoxidasa (LP)

1.1. Características de los componentes del sistema

El sistema lactoperoxidasa-tiocianato o, simplemente, sistema lactoperoxidasa (LP), comprende una serie de reacciones que se producen de forma natural en diversos fluidos de los mamíferos, como la saliva y la leche. Se cree que su función es proteger al organismo frente a la acción del diversos microorganismos patógenos y/o un modo de seleccionar determinados microorganismos en el tracto intestinal de los recién nacidos (Davidson, 2001). Este sistema es uno de los agentes antimicrobianos presentes naturalmente en el organismo. En la leche de vaca es donde se ha estudiado más extensamente, estando en la actualidad bastante bien documentado.

Para que el sistema funcione se requiere la presencia de tres componentes: la enzima lactoperoxidasa (LP), tiocianato (SCN^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

La lactoperoxidasa (EC 1.11.1.7) es una enzima de la familia química de las peroxidasas que están ampliamente distribuidas en la naturaleza tanto en los animales, incluidos los humanos, como en los vegetales. Su función principal es la de catalizar la oxidación de diversos componentes en presencia de peróxido de hidrógeno (Reiter y Härnulv, 1984). Las peroxidasas se encuentran en las glándulas mamarias, salivares y lacrimales de los mamíferos y en sus respectivas secreciones, es decir, en leche, saliva y lágrimas. En estos fluidos se hallan en forma soluble pero en los tejidos glandulares pueden estar ligadas a partículas subcelulares (Hogg y Jago, 1970), lo que puede afectar a su afinidad por diferentes sustratos donadores de electrones (Kussendrager y Hooijdonk, 2000). Todas ellas son química e inmunológicamente similares. Son glicoproteínas con un grupo hemo en el centro catalítico covalentemente ligado a una cadena polipeptídica mediante un puente disulfuro (Thanabal y La Mar, 1989). La LP se encuentra naturalmente presente en las leches de vaca, oveja, cabra y búfala, con contenidos respectivos de 1,2 –19,4 (Björck y col., 1975; Reiter y col., 1976; Reiter y Härnulv, 1984), 0,14 – 2,38 (Medina y col., 1989), 0,95 – 2,15 (Zapico y col., 1991) y 0,9 (Härnulv y Kandasamy, 1982) unidades/ml. Existe también en leche humana pero su concentración es unas 20 veces más baja que la de la leche de vaca (Gothefors y Marklund, 1975).

En cuanto a su estabilidad en relación con su actividad en el sistema LP cabe mencionar que, a concentraciones de 25 mg/l, es bastante estable a valores del pH superiores a 4 (Kussendrager y Hooijdonk, 2000) y pierde actividad a medida que el pH desciende de este valor (Paul y Ohlsson, 1985; Witt y van Hooydonk, 1996). La lactoperoxidasa es muy fotolábil en presencia de riboflavina, habiéndose estimado que tras una exposición a 6000 lux durante 4 horas a 10ºC se desactiva el 55% en leche y el 75% en suero y, por el contrario, no pierde actividad en tampón a pH 6,7 si no se añade riboflavina (Hernández y col., 1990). La lactoperoxidasa tiene una gran tendencia a adherirse a las superficies, lo que puede ocasionar que las disoluciones diluidas de la enzima disminuyan su actividad marcadamente (Kussendrager y Hooijdonk, 2000). Aunque se desconoce la razón de este comportamiento se ha sugerido que puede derivar del hecho de que la molécula puede interaccionar tanto iónica como hidrofóbicamente (Paul y Ohlsson, 1985).

El tiocianato es una sustancia ubicua en órganos (riñón, estómago, etc.), fluidos (sinovial, espinal, linfa, plasma, etc.) y secreciones (leche, saliva, etc.) de mamíferos (Wolfson y Sumner, 1993;

Kussendrager y Hooijdonk, 2000). Sus concentraciones dependen parcialmente de la alimentación y, en el caso particular del hombre, del hábito de fumar (Kussendrager y Hooijdonk, 2000). Se han descrito, por ejemplo, concentraciones de 37 – 198 mg/l en la saliva de hombres adultos y de 15 – 22 mg/l en la de jóvenes (Reiter y Härnulv, 1984; Reiter y Perraudin, 1991). En el caso particular de la leche, las concentraciones halladas son muy variables, estando comprendidas en los intervalos de 1,2 – 15,1 mg/l para la leche de vaca (Klebanoff y col., 1966), 0,4 – 20,6 mg/l para la de oveja con un valor medio de 10,3 mg/l (Medina y col., 1989) y en la leche de cabra se han registrado valores medios de 5,76 y 3,20 mg/l para las razas verata y murciano granadina, respectivamente (Zapico y col., 1991). La fuente de los tiocianatos son los glucosinolatos y los glucósidos cianógenos. Los primeros se encuentran en las hortalizas del género Brassica, como repollo, coles de Bruselas, coliflores, etc.; durante su hidrólisis se forma tiocianato entre otros productos, como isotiocianato y nitrilos (Reiter y Härnulv, 1984). Los glucósidos cianógenos se han descrito en repollo, patata, maíz, guisantes, etc.; cuando se hidrolizan se originan cianuros cuya acción tóxica se neutraliza al reaccionar con sustancias resultantes del metabolismo de los aminoácidos azufrados, los tiosulfatos, generándose tiocianato como producto final (Reiter y Härnulv, 1984).

El peróxido de hidrógeno es el tercer componente del sistema LP. El H_2O_2 puede formarse endógenamente en numerosas reacciones, como aquellas en las que están implicadas xantina oxidasa, glucosa oxidasa o sulfhidril oxidasa, pero normalmente el peróxido se neutraliza rápidamente merced a diversas enzimas (superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasas) presentes en el medio, por lo que no llega a alcanzar cantidades mensurables en la leche (Wilkins y Board, 1989). Bajo condiciones aeróbicas muchos lactobacilos, lactococos y estreptococos pueden producir cantidades suficientes de H_2O_2 como para activar el sistema LP (Kussendrager y Hooijdonk, 2000), necesitándose para ello cantidades de 8 a 10 mg/l (Davidson, 2001). El peróxido de hidrogeno, no obstante, puede tener una procedencia exógena, pudiéndose añadir como tal, en forma ligada (p.ej. percarbonato sódico, peróxido de magnesio) o mediante el uso de sistemas que generen H_2O_2 en continuo, como p.ej. xantina oxidasa o glucosa oxidasa inmovilizadas (Kussendrager y Hooijdonk, 2000). Incluso se ha observado que una práctica de este tipo es más eficaz para el funcionamiento del sistema LP que la adición directa de peróxido de hidrógeno (Klebanoff y col., 1966).

1.2. Mecanismo de acción del sistema LP

La LP cataliza la oxidación del tiocianato y algunos haluros. En estas reacciones se generan a partir del SCN^- compuestos intermediarios transitorios resultantes de la oxidación del mismo que pueden después sufrir oxidaciones adicionales para formar productos finales, como sulfato, dióxido de carbono y amoniaco o también pueden reciclarse para generar de nuevo SCN^- (Reiter y Härnulv, 1984). Estos productos intermediarios son los que poseen actividad antimicrobiana. El metabolito principal es el hipotiocianato ($OSCN^-$) y es éste el que se forma en mayores cantidades (Aune y Thomas, 1977; Klebanoff y col., 1966; Reiter y Härnulv, 1984; Wolfson y Sumner, 1993). El $OSCN^-$ puede producirse por dos diferentes rutas (Wolfson y Sumner, 1993; Wilkins y Board, 1989; Kussendrager y Hooijdonk, 2000):

- La oxidación de SCN^-, catalizada por la LP, puede dar lugar a tiocianógeno [(SCN)2] que rápidamente se hidroliza generando ácido hipotiocianoso (HOSCN) en equilibrio ácido-base con el $OSCN^-$

(pK = 5,3). A este valor del pH existen cantidades equimolares de los dos compuestos. Ambos tienen actividad antimicrobiana pero las evidencias muestran que la del no cargado (HOSCN) es mayor que la del disociado (Kussendrager y Hooijdonk, 2000).

- $2\ SCN^- + H_2O_2 + 2H^- \longrightarrow (SCN)_2 + 2H_2O$
  $(SCN)_2 + H_2O \longrightarrow HOSCN + SCN^- + H_2O$
  $HOSCN \longleftrightarrow H^- + OSCN^-$ (pK = 5,3)
- En la otra vía, el SCN^- puede oxidarse directamente a $OSCN^-$
  $SCN^- + H_2O_2 \longrightarrow OSCN^- + H_2O$

Se considera que la actividad antimicrobiana clave del sistema LP radica en la oxidación de los grupos sulfhidrilos de diversas enzimas y otras proteínas microbianas, formándose puentes disulfuro, sulfeniltiocianatos o ácidos sulfénicos (Thomas, 1985; Reiter y Härnulv, 1984), lo que se traduce en la inhibición del crecimiento, de la entrada de oxígeno en las células y de la producción de ácido láctico. El $OSCN^-$ puede también oxidar el NADH y NADPH a NAD+ y NADP+ (Hoogendoorn, 1977), perturbando los sistemas de transporte de energía y aminoácidos o la actividad de las enzimas glicolíticas (Reiter y Härnulv, 1984), lo que puede explicar también su actividad bacteriostática o bactericida.

Se considera que la activación del sistema LP requiere de 10 a 12 mg/litro de tiocianato y de 8 a 10 mg/litro de peróxido de hidrógeno (Wilkins y Board, 1989).

1.3. Actividad antimicrobiana

De acuerdo con las múltiples moléculas que pueden verse afectadas por la acción oxidante del sistema LP, la actividad antimicrobiana global del mismo puede ocasionar lesiones o modificaciones en diversas estructuras (pared celular, membrana citoplasmática, sistema de transporte, enzimas glicolíticas, ácidos nucleicos) de la célula microbiana y, en consecuencia, ocasionar la muerte o la inhibición del crecimiento o del metabolismo de los microorganismos afectados.

La eficacia del sistema LP puede variar dependiendo de numerosos factores. Entre ellos, la presencia de componentes de bajo peso molecular en el medio (Hoogendoorn y col., 1977), la cantidad de H_2O_2 disponible y la forma de suministrarla (Reiter y Härnulv, 1984), la fase de crecimiento del microorganismo (Purdy y col., 1983), el crecimiento en aerobiosis o anaerobiosis (Carlsson y col., 1984), etc.

Por otra parte, cabe la posibilidad de que algunos microorganismos puedan neutralizar los productos de oxidación del sistema LP mediante la reducción de los derivados sulfenil para transformarlos de nuevo en restos sulfhidril o, alternativamente, metabolizando los restos sulfenil generando nuevos componentes (Aune y Thomas, 1977; Reiter y Härnulv, 1984).

A pesar de esta variabilidad en la eficacia antimicrobiana del sistema LP, pueden hacerse una serie de consideraciones generales. Tiene una acción no sólo inhibidora sino también bactericida (dependiendo de las condiciones del medio) sobre las bacterias Gram negativas catalasa positivas como coliformes, pseudomonas, salmonelas, shigelas, etc. que incluso, eventualmente, pueden ser lisadas (Björck, 1978; Wilkins y Board, 1989; Kussendrager y Hooijdonk, 2000). Las bacterias Gram positivas, incluidos *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*, son más resistentes; se considera que sólo

inhibe el crecimiento de las mismas (Björck, 1978; Wilkins y Board, 1989; Kussendrager y Hooijdonk, 2000) aunque las investigaciones con *L. monocytogenes* han dado lugar a resultados contradictorios (véase apartado *Estimación del riesgo por tiocianato*). Las diferencias en la sensibilidad de unas y otras puede explicarse teniendo en cuenta la diferencia en la estructura de la pared celular de las bacterias Gram positivas y negativas y en sus distintas propiedades barrera (Reiter y Härnulv, 1984; Witt y van Hooydonk, 1996). Se han observado también diferencias entre especies próximas de bacterias Gram positivas catalasa negativas. Por ejemplo, la actividad puede ser bactericida y bacteriostática sobre los patógenos *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae*, respectivamente, mientras que las bacterias lácticas *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *cremoris* (antes adscritas al género *Streptococcus*) son resistentes. Dicha resistencia se debe a que los lactococos sintetizan una enzima (NADH : $OSCN^-$ oxidoreductasa) que cataliza la oxidación del $NADH_2$ en presencia del metabolito intermediario $OSCN^-$ (con actividad antimicrobiana) que se convierte en SCN^- (Carlsson y col., 1983).

Recientemente se ha propuesto el empleo del sistema LP para prevenir el desarrollo de diversos microorganismos responsables de enfermedades post-recolección en mangos: una bacteria Gram negativa *Xanthomonas campestris* y dos hongos, *Botryodiplodia theobromae* y *Colletotrichum gloeosporioides* (Le Nguyen y col., 2005). El sistema LP inhibió completamente el desarrollo de los tres microorganismos y, en el caso de *Xanthomonas*, el efecto fue más eficaz a un pH de 5,5.

2. Fundamento del sistema CATALLIX®

El sistema CATALLIX® es un reactor diseñado para imitar las reacciones que naturalmente ocurren en la leche cuando opera el sistema L. P. Consta, en esencia, de dos recipientes donde se depositan los sustratos 1 (H_2O_2) y 2 (SCN^-) disueltos en agua a la que se ha añadido el coagulante Wac HB® (ampliamente utilizado para el tratamiento de agua potable). El agua se hace pasar a través de un soporte de bentonita en el que se ha inmovilizado mediante enlace iónico la enzima LP (extraída de leche cruda). De esta forma se producen las reacciones anteriormente descritas, generándose los productos intermediarios transitorios, principalmente $OSCN^-$, responsables de la actividad antimicrobiana.

El sistema puede acoplarse fácilmente en una cadena de producción de diversos alimentos, como las frutas y hortalizas de la IV gama, a los que trata por aspersión con el "agua activada" con propiedades bacteriostáticas y biocidas.

3. Comparación de la eficacia del sistema CATALLIX® frente a la cloración

A petición de industrias del Reino Unido implicadas en la venta y transformación de alimentos frescos, la *Campden and Chorleywood Research Association* hizo un estudio comparativo de la actividad antimicrobiana del cloro frente a la del sistema CATALLIX® (Cleanroom Technology, 2005) utilizando lechuga iceberg (n = 3) inoculada con diversas bacterias. De forma resumida puede decirse (Cleanroom Technology, 2005) que el sistema CATALLIX® fue algo más eficaz en la destrucción/inhibición de las bacterias que habitualmente se encuentran en las hortalizas frescas.

A modo de ejemplo, el número de *Salmonella sp.* (población inicial log u.f.c/g ~ 2,4) disminuyó tras el lavado 1,5 unidades logarítmicas/g con el tratamiento con CATALLIX® y 1,3 unidades logarít-

micas con cloro (100 mg/l). A los tres días la reducción fue similar, próxima al 97%, alcanzándose una población en ambos casos de ~ 0,8 log u.f.c/g.

En el caso de *E. coli*, el lavado con cloro (100 mg/l) ocasionó una reducción del 96% (población inicial log u.f.c/g = 3,64) y con CATALLIX® del 92% (población inicial log u.f.c/g = 5,34). Después las bacterias dañadas/viables tratadas con cloro comenzaron a multiplicarse de tal forma que a los tres días la población llegó a un valor de log u.f.c./g = 6,12, es decir, una carga microbiana equivalente a 300 veces la inicial. Sin embargo, el número de bacterias tratadas con CATALLIX® alcanzó a los tres días un valor de log u.f.c./g = 5,64, es decir, que su número sólo se duplicó respecto a la población inicial.

Finalmente, *Listeria monocytogenes*, bacteria Gram positiva, fue más resistente que las otras dos bacterias (Gram negativas), alcanzándose reducciones del 90% tras el lavado con cloro (población inicial log u.f.c/g = 2,73) y del 65% tras el lavado con CATALLIX® (población inicial log u.f.c/g = 2,83). Después del lavado, las listerias tratadas con cloro empezaron a multiplicarse, al igual que ocurría en el caso de *Salmonella sp.* y *E. coli*, alcanzándose a los tres días de almacenamiento una población similar a la inicial (población final log u.f.c/g = 2,78). Sin embargo, las bacterias tratadas con CATALLIX® continuaron disminuyendo durante los tres días de almacenamiento, produciéndose una reducción adicional de 0,68 unidades logarítmicas/g, pudiéndose calcular una disminución global del orden del 93%. La respuesta de *L. monocytogenes* frente al sistema LP (CATALLIX®) se ha atribuido a que el $OSCN^-$ ocasiona un daño en las células de que difícilmente pueden reparar, lo que no ocurre en el caso del tratamiento con cloro (Cleanroom Technology, 2005).

Cuestión y términos en que se plantea

La cuestión que se plantea es analizar, a la luz de los conocimientos actuales, si la aplicación del sistema LP es apropiado para sustituir el tratamiento con cloro de frutas y hortalizas de la IV gama y si de este modo se podría lograr, al menos, un nivel similar de protección al consumidor.

Evaluación del riesgo

1. Identificación del peligro

En primer lugar, conviene apuntar que la preparación de frutas y hortalizas de la IV gama conlleva una serie de operaciones que, por una parte, podrían originar la contaminación con microorganismos del entorno procedentes de los manipuladores o de contaminaciones cruzadas y, por otra, una de las operaciones implica en muchas ocasiones un troceado del producto fresco, lo que provoca una rotura de las paredes celulares del alimento y la exudación de fluidos que sirven de nutrientes a los microorganismos presentes, con una mayor accesibilidad que si el producto está íntegro. La contaminación permite a una gran diversidad de microorganismos alcanzar el producto y, dependiendo de las propiedades intrínsecas del alimento (puede citarse al pH como característica clave) y de las condiciones del almacenamiento (en particular de la temperatura) se seleccionará una determinada microbiota. Por regla general, admitiendo que el alimento ya preparado se almacena a temperaturas de refrigeración, lo más frecuente es que en las hortalizas con pH superior a 4,0 sean especies del género *Pseudomonas* las responsables de la alteración, por tener un tiempo de generación (valor g) más bajo

a temperaturas de refrigeración. En este supuesto, que es el más probable, la alteración no afectaría a la salud del consumidor pero sí a la vida útil del producto de IV gama. El tratamiento con el sistema LP (CATALLIX®) sería recomendable ya que las pseudomonas son Gram negativas y, por tanto, se encuentran entre las bacterias de elevada sensibilidad al $OSCN^-$ (Davidson, 2001). Una investigación con *P. fluorescens* indica que el sistema LP provoca una reducción de 1,69 unidades logarítmicas/ml en leche a 4º C durante 24 horas y de 1,85 unidades a 8º C (Zapico y col., 1995).

Una gran variedad de bacterias patógenas pueden alcanzar el alimento mientras se prepara para su envasado y venta pero, quizás, las que pueden alcanzar mayor relevancia son las que pueden multiplicarse a temperaturas de refrigeración. Atendiendo a este atributo serían *Yersinia enterocolítica*, *Aeromonas hydrophila* y *L. monocytogenes* las bacterias patógenas a tener en cuenta. Las dos primeras son Gram negativas y caen, por tanto, dentro de las menos resistentes al sistema LP. Resta *L. monocytogenes*, que alcanza la mayor relevancia en relación con el tratamiento de frutas (excluidos los cítricos de pH muy bajo) y hortalizas de IV gama con el sistema LP (CATALLIX®).

2. Caracterización del peligro

Listeria monocytogenes es el agente causal de una enfermedad que se adquiere por su ingestión con los alimentos aunque también puede transmitirse de la madre al feto. La enfermedad puede ser leve o grave. En su versión leve se manifiesta con fiebre, dolores musculares y a veces náuseas. La modalidad grave (invasiva) se caracteriza por fiebre repentina, dolor de cabeza intenso, rigidez del cuello y mareos, pudiendo invadir el sistema nervioso con la aparición de pérdidas del equilibrio, convulsiones, meningitis, encefalitis y, finalmente, septicemia. Aunque cualquier persona puede adquirir la enfermedad, es muy poco común en niños, jóvenes y adultos con el sistema inmunitario sano pero existe un sector de la población, que se ha estimado en alrededor del 15% (Buchanan y col., 1997), especialmente susceptible. Entre estos individuos pueden citarse a embarazadas (pueden abortar o presentar un parto prematuro), recién nacidos (pueden presentar retraso mental e hidrocefalia), inmunocomprometidos (afectados de cáncer, Sida, transplantes, diabetes u otras enfermedades). Son estos individuos los propensos a adquirir la modalidad grave de la enfermedad que en EE.UU. se estima que afecta anualmente a alrededor de 2.500 personas, de las cuales unas 500 fallecen (CDCP, 2003). En España, según datos recogidos en el *Boletín Epidemiológico Semanal*, en el año 2004, se declararon al Servicio de Información Microbiológica 100 aislamientos de *Listeria monocytogenes* procedentes de casos humanos (39 laboratorios declarantes).

L. monocytogenes está ampliamente distribuida en todos los ambientes (alimentos, vegetación en descomposición, ensilados, agua, suelos, residuos fecales, heces de humanos y animales sanos, etc.). Los brotes de listeriosis que se han presentado y las investigaciones epidemiológicas han permitido deducir que los alimentos listos para su consumo *(ready to eat)*, entre los que pueden incluirse las frutas y hortalizas de IV gama, son de alto riesgo para los individuos susceptibles. *L. monocytogenes* se adhiere fuertemente a las superficies y se multiplica fácilmente en los productos refrigerados (Farber y Peterkin, 1999; Glass y Doyle, 1989). La eliminación de las listerias, e incluso la reducción de su incidencia, son muy difíciles en los establecimientos que elaboran este tipo de productos, debido a que estas bacterias se alojan en zonas muy recónditas de los equipos, como juntas, válvulas, etc. donde

pueden persistir durante años y en cualquier momento pueden contaminar el alimento, incluso si el producto ha estado libre de listerias durante meses (ICMSF, 2002).

No se sabe cual es la dosis infectiva. Sin embargo, los datos publicados indican que la población de *L. monocytogenes* en alimentos causantes de brotes y casos esporádicos de listeriosis se sitúa entre 102 y 106 u.f.c./g (ICMSF, 2002). Aunque *L. monocytogenes* está ampliamente distribuida en todos los entornos y puede aislarse de numerosos alimentos, la listeriosis en humanos es relativamente rara, de 2 a 3 (según Mead y col., 1999) ó de 5 a 6 (según los CDCP, 2000) casos anuales por millón de individuos. Estas circunstancias apoyan la opinión de que las infecciones se producen por dosis elevadas de *L. monocytogenes* (Notermans y col., 1998; SCVPH, 1999).

Sin embargo, la contaminación por *L. monocytogenes* de los alimentos en general constituye un riesgo importante para los consumidores, y en la propuesta de Reglamento de la Comisión Europea relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, se establece un criterio coherente con la consecución (en los alimentos destinados a la población en general) de un objetivo de inocuidad alimentaria de 100 u.f.c/g. Sus características, especialmente el ser psicrotrofa y Gram positiva, hacen que esta bacteria sea el microorganismo modelo para deducir la aptitud del sistema LP (CATALLIX®) como sustituto del tratamiento con cloro (en el procesado de frutas y hortalizas de la IV gama) manteniendo, al menos, un nivel similar de protección del consumidor.

Se remite al lector a una opinión previa de este Comité (AESA, 2005), en cuyo apéndice II se hacen consideraciones adicionales acerca de *L. monocytogenes*.

3. Respuesta de *L. monocytogenes* frente al sistema LP

L. monocytogenes es una bacteria Gram positiva y, por tanto, hay que encuadrarla entre las resistentes al $OSCN^-$ generado en el sistema LP. La importancia de este microorganismo en relación con la seguridad alimentaria ha interesado a los investigadores y es bastante abundante la bibliografía acerca del tema. Los resultados de las investigaciones realizadas son, a veces, contradictorios. Unos autores han observado un efecto bactericida del sistema LP. Podrían citarse el trabajo de Denis y Ramet (1989) que observaron una completa eliminación de *L. monocytogenes* presente en la superficie de quesos blandos, el de Kamau y col. (1990) utilizando el sistema LP nativo de la leche, el de Zapico y col. (1993), quienes concluyeron que el sistema LP tiene un ligero efecto bactericida en leche de cabra, y el de Gaya y col. (1991) en el que se indica que el sistema LP exhibió actividad bactericida sobre cuatro cepas de *L. monocytogenes*, aunque la magnitud de la misma dependió, entre otros factores, de la cepa, hallándose un tiempo de reducción decimal a 4º C entre 4,1 y 11,2 días. Finalmente, El-Shenawy y col. (1990) observaron que la acción bactericida dependía de la densidad de la población y de la temperatura; la desactivación fue total en 12 – 24 horas a 4º C y en 2 – 4 horas a 35º C cuando las tasas eran bajas (30 - 50 u.f.c/ml) pero con concentraciones medias (104 u.f.c./ml) o elevadas (108 u.f.c./ml) el efecto bactericida fue limitado, con descenso de la población de 0,5 y 1 unidades logarítmicas/ml a 4º C y 35º C, respectivamente. Otros autores, sin embargo, han observado un efecto bacteriostático. Entre ellos, Earnshaw y Bank (1989) en leche UHT inoculada con la bacteria, Siragusa y Jonson (1989) que realizaron sus investigaciones con la cepa Scott A, y Bibi y Bachmann (1990) que utilizaron dos temperaturas en el estudio. Estos últimos autores observaron que el efecto

bacteriostático dependía de la temperatura, estimando una duración de más de 20 horas a 20ºC y de más de 100 horas a 8 ºC.

4. Estimación de la contaminación de las frutas y hortalizas con *Listeria monocytogenes*, de su evolución en los productos almacenados a refrigeración y del criterio de rendimiento del tratamiento de descontaminación de frutas y hortalizas

La vida útil de las frutas y hortalizas de IV gama tratadas con cloro (habitualmente 80 mg/l) no es muy larga, no más de una semana a temperaturas de refrigeración. Su alteración habitual corre a cargo de bacterias Gram negativas, sobre todo las del género *Pseudomonas.*

De forma general, las frutas que habitualmente se utilizan para su transformación en productos IV gama (manzana, naranja, pomelo, melocotón, etc.) tienen un pH inferior a 4,0 mientras que en las hortalizas (lechuga, espinaca, zanahoria, cebolla, etc.) el pH se sitúa en valores superiores a 5,0 a excepción del pepino (3,8) y el tomate (4,3) entre otros. Estas circunstancias implican que *L. monocytogenes* no puede, al igual que otras muchas bacterias patógenas, multiplicarse en las frutas frescas. No deben preocupar, pues, estos productos en relación con la seguridad alimentaria una vez tratados con un sistema higienizante, como la cloración. *L. monocytogenes* sí puede desarrollarse, en cambio, en las hortalizas.

Las hortalizas están generalmente libres de patógenos del hombre y animales a no ser que hayan sido expuestas por riego o fertilización a efluentes y otros residuos de origen humano o animal. En aquellos países/regiones en los que se utilizan estas prácticas cabe esperar la presencia de patógenos en el producto fresco. De hecho, se han descrito, por ejemplo, brotes de salmonelosis atribuidos al consumo de apio, lechuga, repollo, endibias, etc. contaminados (Geldreich y Bordner, 1971; Bryan, 1977). Asumiendo una producción hortofrutícola a gran escala donde se controlan tanto las prácticas agrícolas como la manipulación de los productos recolectados, la contaminación por patógenos es rara. No obstante, pueden contaminarse en etapas posteriores a la recolección durante su manipulación y procesado cuando, por ejemplo, se preparan productos de IV gama. Nunca puede asegurarse una ausencia total de patógenos. La contaminación en estas condiciones podría compararse a la que sufren otros alimentos procesados, como los cárnicos cocidos, cuando se reduce su tamaño (lonchas, rodajas, cubos, etc.) para elaborar porciones domésticas.

La propuesta de Reglamento de la Comisión Europea relativa a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios especifica, en relación con *L. monocytogenes*, que al final de la vida útil de dichos productos (si están destinados a la población general), el número ha de ser como máximo de 100 u.f.c./g. Así lo entiende también la ICMSF (2002).

Tomando una postura conservadora, la ICMSF (2002) estima que una contaminación por *L. monocytogenes* en operaciones posteriores a la cocción de productos cárnicos puede, en el peor de los casos, alcanzar la tasa de 10 u.f.c./g. Lo mismo podría ocurrir durante el troceado y manipulación de hortalizas para la preparación de productos de IV gama. En la evaluación realizada se ha considerado que:

1. Las hortalizas de IV gama se almacenan hasta su venta a temperaturas de refrigeración.

2. La vida útil de las hortalizas de IV gama es de una semana.
3. La contaminación por *L. monocytogenes* es, como máximo, de 10 u.f.c./g.
4. A partir de los datos recogidos en ComBase (2005) puede estimarse un valor *g* (tiempo de duplicación) medio de alrededor de 60 horas para el crecimiento de *L. monocytogenes* en hortalizas a temperaturas de refrigeración (5 – 7º C). No obstante, el valor g más bajo de los que figuran en dicha base de datos es de 19,3 horas a 7º C en brécol, que se va a elegir para simular "el peor caso" de los posibles.
5. El objetivo de seguridad alimentaria (FSO) a alcanzar es el de 100 u.f.c./g en el momento del consumo del producto

Para conseguir el FSO, se precisaría un tratamiento que ocasionara 1,6 reducciones decimales (1,6D) durante el proceso de fabricación, a fin de que la carga microbiana máxima tras el tratamiento fuera de 25 u.f.c. de *Listeria monocytogenes*/100 g. Este nivel permitiría que, incluso con las 8,7 duplicaciones estimadas para "el peor caso" antes indicado, la población de *L. monocytogenes* no superase el valor de 100 u.f.c./g de producto durante los siete días de vida útil del mismo.

En conclusión, en el caso de *L. monocytogenes*, el FSO para hortalizas de IV gama se conseguiría con tratamientos que ocasionaran una reducción de dos unidades logarítmicas (criterio de rendimiento del proceso de descontaminación = 2D).

5. Conclusión sobre la eficacia descontaminante del sistema lactoperoxidasa en frutas y hortalizas de la IV gama

Aunque se ha puesto en duda la eficacia del tratamiento con cloro (100¬300 mg/l) para higienizar las hortalizas (Nichols y col., 1971) es el que actualmente se utiliza, ya que dada la inestabilidad del cloro en presencia de materia orgánica, las bajas dosis de cloro puedan hacer algo más que impedir la entrada de bacterias con el agua (ICMSF, 1980) aunque, evidentemente, el efecto depende de la concentración utilizada, del tiempo de permanencia, del pH y del número de lavados. El control continuo de los niveles de cloro es imperativo (ICMSF, 1980). La cloración no es, sin embargo, una panacea; su aplicación ha de ir unida al seguimiento de estrictas medidas higiénicas en los equipos y en las operaciones. Además, se requiere un control de las condiciones ambientales (temperatura y humedad relativa), ya que la supervivencia y la persistencia de coliformes y bacterias patógenas en la mayor parte de las hortalizas frescas están relacionadas con estos factores.

Ante la previsible prohibición del uso de hipoclorito sódico y cloro en los alimentos por la UE, se necesitan métodos alternativos a la cloración. Se ha sugerido la aplicación del sistema LP. En apartados anteriores se ha descrito detalladamente el fundamento de este método y la actividad antimicrobiana del mismo. A la vista de tales datos parece poder concluirse que el proceso CATALLIX®, basado en la actividad del sistema LP, posee un poder antibacteriano, al menos, igual al de la cloración. Las publicaciones acerca de si su acción es bactericida o bacteriostática ofrecen unos datos confusos. Como han observado algunos autores (El-Shenawy y col. 1990), la acción es bactericida cuando el número de listerias es bajo, como es el caso de las hortalizas de IV gama. No obstante si, en el peor de los casos, se asume que es bacteriostática, el sistema sería también eficaz, ya que se ha supuesto una contaminación de 10 listerias por gramo de producto y, de acuerdo con Bibi y Bachmann (1990),

el efecto bacteriostático es superior a 100 horas (4 días) a 8º C. A 4º C, los siete días de vida útil del producto no serían suficientes para que la población de listerias alcanzara el valor del FSO.

Finalmente, otro dato que permite inclinarse a favor de la eficacia del tratamiento con el sistema CATALLIX® radica en las investigaciones comparativas entre diversas bacterias patógenas, incluida *L. monocytogenes*, realizadas por Campden and Chorleywood Research Association (Cleanroom Technology, 2005) en relación con la eficacia del tratamiento con cloro y la aplicación del sistema LP mediante el proceso CATALLIX®. Los resultados, como se ha comentado en el apartado E3, son siempre favorables al proceso CATALLIX®.

No se dispone información acerca del efecto del sistema LP sobre los virus desnudos, que pueden contaminar frutas y hortalizas. Por ello, no puede evaluarse el riesgo asociado a estos microorganismos en alimentos tratados con el sistema CATALLIX®.

Estimación del riesgo por tiocianato y su toxicidad

Los residuos de agua oxigenada tras el tratamiento con el sistema CATALLIX® son imperceptibles y los de tiocianato muestran valores regulares del orden de 0,5 mg/kg de ensalada después del lavado final (AFSSA, 2003). Suponiendo un consumo de ensalada de 62 g/día, la exposición de iones tiocianato es de alrededor de 0,03 mg/día, un valor muy por debajo de la exposición normal a través de la saliva que puede alcanzar 25 mg/día (AFSSA, 2003), y de las cantidades descritas de 1 y 15 mg/l (Reiter y Härnulv, 1984), 6,98 – 12,06 mg/l (Medina y col., 1989) y 0,76 – 15,85 mg/l (Zapico y col., 1991) en leche de vaca, oveja y cabra, respectivamente. Adicionalmente, la naturaleza inocua del sistema LP viene apoyada por investigaciones *in vitro* con cultivo de células animales cuyos resultados no han mostrado efecto tóxico alguno (Reiter y Härnulv, 1984).

Puede concluirse que el sistema LP aplicado con el proceso CATALLIX® no parece dejar residuos tóxicos que puedan afectar a la salud del consumidor.

Situación en otros países

El sistema CATALLIX® está autorizado en Finlandia (Ministerio de Comercio y de Industria) y ha sido evaluado por la Agencia Francesa para la Seguridad Sanitaria de los Alimentos, que ha emitido un dictamen positivo para su uso en el lavado de vegetales de IV gama (AFSSA, 2003). El sistema LP está aconsejado por la FAO para el tratamiento de la leche cruda en aquellos países en los que es difícil el uso de sistemas de refrigeración, de acuerdo con las directrices establecidas por la Comisión del *Codex Alimentarius* en CAC/GL 13-1991 (Comisión del *Codex Alimentarius*, 1991). Asimismo, ha sido evaluado favorablemente por la *Food Standards Australia New Zealand* (FSANZ, 2002) como coadyuvante tecnológico para su uso en tratamiento de las superficies de las carnes.

Conclusiones

- El sistema lactoperoxidasa es un mecanismo de defensa natural presente en el hombre y en animales como medio de lucha contra microorganismos no deseables. Los componentes del sistema (peroxidasas, peróxido de hidrógeno y tiocianato) están ampliamente distribuidos en tejidos humanos y animales.

- La actividad antimicrobiana del sistema se debe principalmente a la generación de hipotiocianito y otros intermediarios transitorios de menor actividad.
- Puede decirse que prácticamente todas las bacterias estudiadas son sensibles a la actividad del sistema lactoperoxidasa. No obstante, las bacterias Gram negativas son mucho más vulnerables que las Gram positivas.
- *Listeria monocytogenes*, por su condición de psicrotrofa y Gram positiva, es quizás la bacteria patógena de mayor interés en frutas y hortalizas de IV gama en relación con su sensibilidad frente a la acción antimicrobiana del sistema LP.
- Los datos existentes en la bibliografía no permiten concluir categóricamente si la acción del sistema sobre *Listeria monocytogenes* es bactericida o bacteriostática.
- A la vista de los datos considerados en el presente documento, se estima que el tratamiento de frutas y hortalizas frescas mediante el sistema CATALLIX® presenta, frente a las bacterias patógenas estudiadas, una eficacia similar a la de la cloración
- Las cantidades residuales de tiocianato en las hortalizas tratadas no presentan riesgo potencial para el consumidor, ya que la concentración detectada en estos productos están por debajo de los niveles endógenos descritos en la saliva humana y en las leches de vaca, oveja y cabra.

Referencias

AESA (Agencia Española de Seguridad Alimentaria) (2005). La aplicación de altas presiones en la carne. Rev. Comité Científico de la AESA. 1, 36-71.

AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) (2003). Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'autorisation d'emploi d'un système lactoperoxydase comme auxiliaire technologique pour le traitement des salades IVème gamme. Saisine nº 2003-SA-0015.

Aune, T. M. y Thomas, E. L. (1977) Accumulation of hypothiocyanite ion during peroxidase-catalyzed oxidation of thiocyanate ion. *Eur. J. Biochem*., 80, 209 – 214.

Bibi, W., y Bachmann, R. G. (1990) Antibacterial effect of the lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide system on the growth of Listeria spp. in skim milk. *Milchwissenchaft*, 45, 26 – 28.

Björck, L. (1978). Antibacterial effect of the lactoperoxidase system on psychrotrophic bacteria in milk. *J. Dairy Res*., 45, 109 – 118.

Björck, L., Rosen, C. G., Marshall, V. y Reiter, B. (1975). Antibacterial activity of the lactoperoxidase system in milk against pseudomonads and other Gram-negative bacteria. *Appl. Microbiol*., 30, 199 – 204.

Bryan, F. L. (1977). Diseases transmitted by food contaminated by waste water. *J. Food Prot*., 40, 45 – 56.

Buchanan, R. L., Damert, W.G., Whiting, R. C. y van Schothorst, M. (1997) The use of epidemiologic and food survey data to estimate a conservative dose¬response relationship for *Listeria monocytogenes* levels and incidence of listeriosis. *J. Food Prot.* 60, 918 – 922.

Carlsson, J. Iwami, Y. y Yamada, T. (1983) Hydrogen peroxide excretion by the oral streptococci and effect of lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide *Infect. Immun*., 40, 70- 80.

Carlsson, J., Edlund, M. B. K. y Hanstron, L. (1984) Bactericidal and cytotoxic effects of hypothiocyanite-hydrogen peroxide mixtures. *Infect. Immun*., 44, 581 – 586.

CDCP (Centers for Diseases Control and Prevention) (2000). Preliminary FoodNet data on the incidence of foodborne illness-selected sites, United States, 1999. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 49, 2001 – 2005.

CDCP (Centers for Diseases Control and Prevention) (2003). Disease information. Listeriosis. Revised 01/12/03.

http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/listeriosis_g.htm Cleanroom Technology (2005) Catalyst for Catallix. http://www.cleanroom-technology.co.uk

Comisión del *Codex Alimentarius* (1991) Directrices para la conservación leche cruda mediante la aplicación del sistema lactoperoxidasa (CAC/GL 13-1991). http://www.codexalimentarius.net/download/standards/29/CXG_013s.pdf

Davidson, R.M. (2001) Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. En "Food Microbiology: fundamentals and frontiers" 2ª ed. págs. 593 – 617. Eds: Doyle, M. P., Beuchat, L. R. y Montville, T. J. *ASM Press*. Washington, D.C.

Denis, F. y Ramet, J. P. (1989). Antibacterial activity of the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* in tripticase soy broth, UHT milk and French soft cheese. *J. Food Prot.* 52, 706 – 711.

Earnshaw, R. G. y Bank, J. G. (1989). A note on the inhibition of *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 in milk by an activated lactoperoxidase system. *Lett. Appl. Microbiol.*, 8, 203 – 205.

El-Shenawy, M. A., García, H. S, y Marth, E. H. (1990). Inhibition and inactivation of *Listeria monocytogenes* by the lactoperoxidase system in raw milk, buffer or semi-synthetic medium. *Milchwissenchatf* 45, 638 – 641.

Farber, J. M. y Peterkin, P .I. (1999). Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in meat products. En: "Listeria, listeriosis and food safety". 2ª ed. Eds: E. T. Ryser y E. H. Marth. Marcel Dekker. New York.

FSANZ (Food Standards Australian and New Zealand) (2002) Final Assessment Report. Application A404. Lactoperoxidase System. 18 December. http://www.foodstandards.gov.au/_srcfiles/A404%20FAR%20lactoperoxida se.pdf

Gaya, P., Medina, M. y Núñez, M. (1991) Effect of lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* behavior in raw milk at refrigeration temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 3355 – 3360.

Geldreich, E. E. y Bordner, R. H. (1971) Fecal contamination of fruit and vegetables. A review. *J. Milk Food Technol.*, 34, 184 – 195.

Glass, K. A. y Doyle M. P. (1989). Fate of *Listeria monocytogenes* in processed meat products during refrigerated storage. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 1565 – 1569.

Gothefors, L. y Mrklund, S. (1975). Lactoperoxidase activity in human milk and saliva of newborn infants. *Infect. Immun.*, 11, 1210 – 1215.

Härnulv, B. G. y Kandasamy, C. (1982). Increasing the keeping quality of milk by activation of its lactoperoxidase system. Results from Sri Lanka. *Milchwissenchaft* 37, 454 – 457.

Hernández, M. C. M., van Markwijk, B. W. y Vreeman, H. J. (1990). Isolation and properties of lactoperoxidase from bovine milk. *Neth Milk Dairy J.*, 44, 213 – 231.

Hogg, D. M. y Jago, G. R. (1970). The antibacterial action of lactoperoxidase: the nature of the bacterial inhibitor. *Biochem. J.*, 117, 791 – 797.

Hoogendoorn, H. (1985) Activation of the salivary peroxidase antimicrobial system: clinical studies. En "Lactoperoxidase system, Chemistry and biological significance" págs., 217 – 227. Eds: Pruit, K.M. y Tenovuo, M.A.. Marcel Dekker. New York.

Hoogendoorn, H., Pressens, J. P., Scholtes, W. y Stoddard, L. A. (1977). Hypothiocyanite ion: the inhibitor formed by the system lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide. *Caries Res.*, 11, 77 – 84.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Foods) (1980). *Microbial Ecology of Foods*. Vol. 2: Food Commodities. Academic Press Inc. New York.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Foods) (2002). Microorganisms in foods 7. Microbiological testing in food safety management 313 – 332. Kluwe Academic Plenum Publishers & Hall. New York.

Kamau, D. N., Doores, S. y Pruitt, K. M. (1990). Enhanced thermal destruction of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by the lactoperoxidase system. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2711 – 2716.

Klebanoff, S. J., Clem, W. H. y Luebke, R. G. (1966). The peroxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide system antimicrobial system. *Biochim. Biophys.* Acta. 117, 63 – 72.

Kussendrager, K.D. y Hooijdonk, A.C.M. (2000). Lactoperoxidase: physico¬chemical properties, occurrence, mechanism of action and application. Br.

J. Nutr., 84, S19-S20.

Le Nguyen, D. D., Ducamp, M. N., Dornier, M., Montet, D., Loiseau, G. (2005) Effect of the lactoperoxidase system against three major causal agents of disease in mangoes. *J. Food Prot.* 68, 1497-1500.

Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M., Tauxe, R. V. (1999) Food related illness and death in the United States. *Emerg. Infect.* Dis., 5, 607 – 625.

Medina, M., Gaya, P. y Núñez, M. (1989). The lactoperoxidase system in ewes' milk: levels of lactoperoxidase and thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol,* 8, 147 – 149.

Nichols, A. A., Davis, P .A., King, K. P., Winter, E. J. y Blackwall, F. L. C. (1971) Contamination of lettuce irrigated with sewage effluent. *J. Hortc. Sci.*, 46, 425 – 433.

Notermans, S., Dufrenne, J., Teunis, P. y Chackraborty, T. (1998). Studies on the risk assessment of Listeria monocytogenes. *J. Food Prot.*, 61, 244 – 248.

Paul, K. G. y Ohlsson, P. I. (1985). The chemical structure of lactoperoxidase. En "Lactoperoxidase system, Chemistry and biological significance" págs., 15 – 29. Eds: Pruit, K. M. y Tenovuo, M. A. Marcel Dekker. New York.

Purdy, M. A., Tenovuo, J., Pruitt, K. M. y White, W. W. (1983) Effect of growth phase and cell envelope structure on susceptibility of *Salmonella typhimurium* to the lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide system. *Infect. Immun.,* 39, 1187 - 1195

Reiter, B. y Härnulv, G. (1984) Lactoperoxidase antibacterial system: natural occurrence, biological functions and practical applications. *J. Food Prot.,* 47, 724 – 732.

Reiter, B. y Perraudin, J. P. (1991). Lactoperoxidase biological functions. En "Peroxidases in Chemistry and Biology" págs. 143 – 180. CRC Press. Boca Raton.

Reiter, B., Marshall, V. M. E., Björck, L. y Rosen, C. G. (1976). Nonspecific bacterial activity of the lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide system of milk against Escherichia coli and some Gram-negative pathogens. *Infect. Immun.*, 13, 800 – 807.

SCVPH (Scientific committee of the European Union on veterinary measures relating to public health) (1999). Opinion on *Listeria monocytogenes*. Adopted on 23 September 1999. http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/out25_en.pdf

Siragusa, G. R. y Johnson, M. G. (1989) Inhibition of *Listeria monocytogenes* growth by the lactoperoxidse-thiocyanate-H_2O_2 antimicrobial system. *Appl. Environ. Microbial.,* 55, 2802 – 2805.

Thanabal, V. y La Mar, G. N. (1989). A nuclear Overhauser effect investigation of the molecular and electronic structure of the heme crevice in lactoperoxidase. *Biochemistry*, 28, 7038 – 7044.

Thomas, E. L. (1985). Products of lactoperoxidase-catalyzed oxidation of thiocyanate and halides. En "Lactoperoxidase system, Chemistry and biological significance" págs. 31 – 53. Eds: Pruit, K. M. y Tenovuo, M. A. Marcel Dekker. New York.

Wilkins, K. M. y Board, R. G. (1989). Natural antimicrobial systems. En "Mechanisms of action of food preservation procedures" págs. 285 – 362. Ed: Gould, G.W. Elsevier Applied Science. London.

Witt, J. N. y van Hooydonk, A. C. M. (1996). Structure, function and application of lactoperoxidase in natural antimicrobial systems. *Neth. Milk Dairy J.*, 50, 227 – 244.

Wolfson, L. M. y Sumner, S. S. (1993) Antimicrobial activity of the lactoperoxidase system. A review. *J. Mol. Biol.*, 226, 185 – 207.

Zapico, P., Gaya, P., De Paz, M., Núñez, M. y Medina, M. (1991). Influence of breed, animal and days of lactation on lactoperoxidase system components in goat milk. J. Dairy Sci., 74, 783 – 787.

Zapico, P., Gaya, P., Núñez, M. y Medina, M. (1995). Activity of goats' milk lactoperoxidase system on *Pseudomonas fluorescens* and *Escherichia coli* at refrigeration temperatures. *J. Food Prot.* 58, 1136-1138.

Zapico, P., Gaya, P., Núñez, M. y Medina, M. (1995). Goats' milk lactoperoxidase system against *Listeria monocy - togenes. J. Food Prot.* 56, 988- 990.

Opinión del Comité científico de la AESA sobre los riesgos asociados a la supresión de la refrigeración durante periodos limitados de tiempo, en las mesas de preparación de los servicios rápidos de restauración

Núm. Referencia: AESA-2005-013

Documento aprobado por el Comité Científico en sesión plenaria el 16 de noviembre de 2005

Miembros del Comité Científico

Arturo Anadon Navarro, Margarita Arboix Arzo, Juan José Badiola Díez, Albert Bosch Navarro, Juan Francisco Cacho Palomar, Francesc Centrich Escarpener, José Luis García López, María Luisa García López, Manuela Juárez Iglesias, Manuel Martín Esteban, Juan Antonio Ordóñez Pereda, Andrés Otero Carballeira, Andreu Palou Oliver, Fernando Rodríguez Artalejo, Elías Rodríguez Ferri, Manuel Sánchez-Vizcaíno Rodríguez, Vicente Sanchis Almenar, Gregorio Varela Moreiras, Gonzalo Zurera Cosano

Grupo de Trabajo

Gonzalo Zurera Cosano (coordinador)
Jesús Campos Amado (secretario)
Andrés Otero Carballeira
Mª Luisa García López
Juan A. Ordóñez Pereda

Resumen

Se analizan los riesgos asociados a la eliminación de la refrigeración en las mesas de preparación de los restaurantes de servicio rápido, durante periodos limitados de tiempo, por el impacto negativo producido en la calidad de las hamburguesas y la consiguiente repercusión negativa en los consumidores. Se valora el efecto de la supresión de refrigeración de los ingredientes durante la etapa de ensamblaje del producto final, teniendo en cuenta la posibilidad de que un determinado patógeno, presente en la materia prima o procedente del entorno de trabajo (personal, equipos y utensilios), pueda alcanzar su umbral de peligrosidad durante dicha etapa. Para ello se procede al análisis de la información extraída del documento de Evaluación de Riesgos presentado para su consideración y a la aplicación de modelos predictivos, sobre los microorganismos patógenos que el Real Decreto 3484/2000 establece para este tipo de alimentos y en especial sobre *Listeria monocytogenes*, obteniendo las estimaciones de crecimiento de bases de datos apropiadas. Del análisis de los datos obtenidos puede concluirse que la supresión de la refrigeración en las mesas de preparación en los términos planteados, no supone un aumento significativo del riesgo, siempre y cuando se lleve a cabo la monitorización del proceso, donde se verifique la realidad de observancia de la caducidad secundaria para los alimentos empleados como ingredientes del menú final (en términos de tiempo de permanencia en la mesa de preparación), así como de un control riguroso de materias primas, y de la eficacia del sistema de limpieza y desinfección de las mesas de preparación, de forma individual para cada establecimiento/grupo empresarial. Sólo en esa situación podría llegarse a la conclusión de que no es necesario el mantenimiento de la refrigeración en esta etapa de ensamblaje, y se estaría conforme a lo dispuesto en el apartado 2 del artículo 7 del Real Decreto 3484/2000.

Palabras Clave

Microbiología predictiva, *Listeria monocytogenes*, mesas de refrigeración, servicios de restauración

Antecedentes

En la Sesión Plenaria del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria (AESA) celebrada el día 11 de mayo de 2005, se presentó la solicitud de la Empresa McDonald's España, de *"evaluación de los riesgos asociados a la eliminación de la refrigeración en las mesas de preparación durante periodos limitados de tiempo en los restaurantes de servicio rápido"*. La solicitud parece estar basada en el impacto negativo producido en la calidad de las hamburguesas al adicionar ingredientes fríos (pepinillos, salsas, etc.) a la carne recién retirada de la plancha, lo que reduce significativamente la temperatura del producto final y repercute negativamente en su aceptación por los clientes. Autoridades locales en aplicación de los Reales Decretos 2207/1995[1] y 3484/2000[2] por los que se regula la actividad de este tipo de establecimientos, recomendaron refrigerar las mesas de preparación, forzando a modificar el procedimiento operacional de los mismos con el consiguiente efecto desfavorable ya reseñado.

La solicitud planteada por McDonald's trata de acogerse a lo dispuesto en el apartado 2 del Art. 7 del Real Decreto 3484/2000, que establece que *"cuando sea necesario por razones prácticas, se permitirán periodos limitados no sometidos al control de temperatura durante la manipulación, elaboración, transporte y entrega al consumidor final de las comidas preparadas, siempre que sea compatible con la seguridad y salubridad de los alimentos y hayan sido verificadas por la autoridad competente"*.

La necesidad de adoptar periodos no sometidos al control de temperatura se adopta únicamente por razones prácticas, y aunque esta decisión compete a la empresa, debe ser compatible con la seguridad y salubridad de los alimentos y verificada por la autoridad competente. Por tanto, la valoración de esta compatibilidad, es la que parece sustentar que la presente solicitud se someta al criterio del Comité Científico de la AESA. Para llevar a cabo dicha verificación es necesario disponer de un estudio de Evaluación de Riesgos sobre el aspecto ya reseñado.

En la Sesión Plenaria del Comité Científico de la AESA del 11/05/2005, se acordó solicitar documentación adicional a la Empresa solicitante, que se recibió el 20 de junio de 2005. Dicha documentación incluye el sistema de autocontrol implementado en los restaurantes de la cadena (Guías de Prácticas Correctas de Higiene y el Manual APPCC) y un estudio sobre *Microbiological Risk Assessment* para los ingredientes que componen el producto final (quesos, rodajas de tomate, cebolla deshidratada, cebolla cortada, lechuga, pepinillos, salsas, mostaza y ketchup) y sobre el que se deberán sacar las conclusiones que permitan finalmente acceder, o no, a dicha solicitud.

1. Análisis de la documentación presentada

Del análisis de la documentación recibida y basándose en la estabilidad microbiológica, los diferentes tipos de ingredientes que integran el producto final pueden agruparse en tres categorías:

A. El grupo integrado por las salsas de gran estabilidad microbiológica que deriva de las características físico-químicas (pH<4.6 y aw<0.85), de las mismas.

1. Real Decreto 2207/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las normas de higiene relativas a los productos alimenticios.

2. Real Decreto 3484/2000, de 29 de diciembre, por el que se establecen las normas de higiene para la elaboración, distribución y comercio de comidas preparadas.

B. El grupo integrado por los quesos, cuyas características fisico¬químicas hacen que requieran un control de temperatura, ya que pueden multiplicarse algunos microorganismos patógenos.
C. El grupo de los vegetales (cebolla y lechuga), que al ser productos frescos mínimamente procesados, no han recibido un tratamiento higienizante que asegure la ausencia de determinados agentes patógenos como *Salmonella, Escherichia coli* o *Listeria monocytogenes* y, por lo tanto, requieren el control de temperatura para evitar su crecimiento.

Es coherente pensar en la necesidad de que estos dos últimos grupos de ingredientes deberían someterse al control de temperatura, ya que pueden soportar el crecimiento microbiano. Sin embargo, basándose en los criterios utilizados en el sistema de autocontrol aplicado y asumiendo el cumplimiento de los requisitos y directrices fijadas en el mismo (calidad de materias primas, caducidad secundaria, temperatura/tiempo de mantenimiento, etc.), podría cuestionarse la necesidad de refrigeración de los ingredientes en la etapa de ensamblaje de las hamburguesas y atenerse a los dispuesto en el apartado 2 del artículo 7 del Real Decreto 3484/2000.

Para fundamentar cualquier decisión en ese sentido, debe analizarse toda la información disponible que tenga en cuenta los factores que pueden incidir en el crecimiento microbiano y dar lugar a situaciones de riesgo. Esta información debe extraerse del documento de Evaluación de Riesgos presentado por McDonald's, elaborado para sus establecimientos ubicados en Europa. En él se concluye que existe un riesgo muy bajo, siempre y cuando se observen Buenas Prácticas de Elaboración y un correcto control de los denominados puntos críticos establecidos en su sistema APPCC.

El objeto del presente informe no es analizar en profundidad el mencionado documento. No obstante, acorde con él, deben tenerse en cuenta las diferentes situaciones particulares en las que se pueden introducir ó modificar factores de riesgo insuficientemente valorados, que pueden influir de manera decisiva en la inocuidad de los alimentos objeto de estudio y que puede impedir llegar a conclusiones extrapolables a otros establecimientos de similares características.

Puesto que de lo que se trata es de evaluar el efecto de la supresión de refrigeración de los ingredientes durante la etapa de elaboración del producto final, el aspecto crucial a tener en cuenta es evaluar la posibilidad de que un determinado patógeno, presente en la materia prima o procedente del entorno de trabajo (personal, equipos y utensilios), pueda alcanzar el umbral de peligrosidad durante dicha etapa.

Aunque el documento presentado por McDonald`s parece estar correctamente diseñado y elaborado con rigurosidad, aporta información algo confusa y en ocasiones se recurre al sistema de "corta-pega" con las consiguientes erratas, lo que conduce a crear más confusión. Los datos de prevalencia y de concentración, en unidades formadoras de colonias por gramo (ufc/g), utilizados en el estudio de Evaluación del Riesgo, son algo bajos y en todo caso discutibles, ya que pueden ser muy diferentes según la fuente de procedencia[3,4]. Por ejemplo, en el caso de *L. monocytogenes* se emplean los mismos datos de prevalencia y concentración en cada uno de los alimentos-base que integran el produc-

3. Opinion of the Scientific Comité on Veterinary Measures relating to Public Health on *Listeria monocytogenes*. 23 September 1999.
4. Vitas et al. (2004). Ocurrence of Listeria monocytogenes in fresh and processed foods in Navarrra (Spain). International Journal of Food Microbiology 90, 349-356.

to final. La concentración expresada no es clara (0-10 cells/g), si se tiene en cuenta que el límite de detección es de 10 ufc/g[5].

Aunque se podría hacer una valoración con cada uno de los microorganismos de interés en estos alimentos, sólo se va a tener en cuenta a *L. monocytogenes*, ya que en el caso de *E.coli* O157:H7 y *Salmonella* tiene menos sentido, puesto que su sola presencia en cualquiera de los ingredientes es inaceptable desde el punto de vista sanitario. Por lo tanto, tratar de valorar el efecto de la supresión de refrigeración de los ingredientes en el comportamiento de estos dos últimos microorganismos es, de momento, de menor interés. Sin embargo, el ejemplo de *L. monocytogenes* puede ser muy clarificador.

En el documento sobre Análisis de Riesgos presentado por McDonald`s se asume que *L. monocytogenes* no debe estar presente en el alimento si todas las etapas se ha implementado adecuadamente. Sin embargo (continúa el documento), cabe la posibilidad que 1 ufc/g pueda estar presente y no detectarse (límite de detección = 10 ufc/g). Si el objetivo de inocuidad alimentaria (FSO) es de 100 ufc/g, se puede estimar el tiempo que tardaría 1 ufc/g en alcanzar dicho nivel en la situación de temperatura del obrador o cocina más adversa, es decir, a la temperatura óptima (30º C) de crecimiento del microorganismo. En estas condiciones, el tiempo de duplicación de *L. monocytogenes* es de aproximadamente 40 minutos[6]. Por tanto, el tiempo necesario para superar el nivel de 100 ufc/g será de 280 minutos (7 duplicaciones x 40 minutos). Este periodo de tiempo es muy superior a la caducidad secundaria establecida por la empresa (tiempo de permanencia sin refrigeración) que es de tan sólo 120 minutos, es decir, se está aplicando un margen de seguridad superior al 50%.

Aunque en el documento se parte de la posible presencia de una célula de *L. monocytogenes* por gramo de alimento, podría hacerse el mismo razonamiento a partir de 3, 6 ó 9 ufc/gramo (recuérdese que el límite de detección en alimentos sólidos es de 10 ufc/g) o a partir de concentraciones iniciales más elevadas y al mismo tiempo permisibles (El Real Decreto 3484/2000, establece para *L. monocytogenes* el criterio de m=10, M=102, para n=5 y c=2), por lo que el efecto sobre la valoración del riesgo *(risk ranking)* puede ser muy diferente en función de la concentración inicial de que se parta, superándose, o no, el tiempo de caducidad secundaria fijado para cada ingrediente.

De acuerdo con el mencionado criterio microbiológico establecido por el Real Decreto 3484/2000, se puede dar el caso que dos de cada cinco muestras tengan una carga microbiana muy próxima o, incluso, alcancen las 100 ufc/g, permitiéndosele a las tres muestras restantes un contenido máximo de 10 ufc/g (debe recordarse que el documento de Evaluación de riesgo presentado por McDonald`s recoge niveles entre 0-10 ufc/g). Asumiendo, por una parte, la presencia de esa tasa (10 ufc/g) y aceptando, por otra, un tiempo de duplicación de 40 minutos, se tardarían sólo 2,6 horas en superar las 100 ufc/g (2,21 horas para alcanzarlo). Una situación intermedia y admisible por el R.D. 3484/2000, sería el de aquellas muestras con 50 ufc/g, que tardarían sólo 40 minutos en alcanzar las 100 ufc/g.

5. UNE-EN ISO 11290-2. Noviembre 2000. Microbiología de los alimentos para consumo humano y para animales. Método horizontal para la detección y recuento de Listeria monocytogenes. Parte 2: Método de recuento (ISO 11290-2:1998).

6. En el documento no se especifica de donde y como se obtiene dicho tiempo.

Por supuesto para muestras con 100 ufc/g, no es necesario ningún cálculo. No obstante, debe tenerse en cuenta que incluso un criterio microbiológico más restrictivo (como n=5, c=0, m= ausencia de *L. monocytogenes* en 10 g –o sea, menos de 10/g) que pudiera aplicarse a las materias primas, conlleva, en términos probabilísticos, que un lote que lo cumpla el criterio, tiene un 95% de probabilidades de contener un recuento medio de 5,88 ufc/g (supuestos una distribución logarítmico-normal de la población de L. monocytogenes y una desviación estándar -ds- de los recuentos de *L. monocytoge - nes* de 0,1 log ufc/g).

Con independencia de las conclusiones que puedan extraerse del documento de Evaluación de Riesgos presentada por McDonald`s y en favor de su argumentación, deben tenerse en cuenta una serie de factores que actúan incrementando la seguridad del producto final. Entre ellos:

- las características intrínsecas (pH, aw) de algunos de estos alimentos, no son muy favorables para el crecimiento microbiano.
- la fase de latencia de los microorganismos en matrices complejas como son los alimentos, donde las condiciones ambientales están sujetas a cambios de temperatura, puede ser superior al periodo de caducidad secundaria establecida. (Ver Tablas 1 a 7). En consecuencia, la repercusión sanitaria de una contaminación durante el proceso de ensamblaje (contaminación cruzada) no se diferenciaría de la producida en zonas de trabajo refrigeradas
- el tiempo requerido para que un alimento previamente refrigerado (4º C) y expuesto a temperatura ambiente, alcance una temperatura desfavorable de 30º C es de aproximadamente 60 minutos.

Metodología

Con el objeto de clarificar algunas de las dudas que pudieran derivarse del documento, se ha procedido a la aplicación de modelos predictivos en los microorganismos patógenos que el R.D. 3484/2000 establece para este tipo de alimentos (*E. coli, S. aureus, Salmonella* y *L. monocytogenes*), recurriendo a las estimaciones de crecimiento de los programas Growth Predictor (GP) http://www.ifr.bbsrc.ac.uk/safety/ GrowthPredictor/default.html y Pathogen Modelling Program (PMP) http://www.arserrc.gov/mfs/ PATHOGEN.HTM (Tablas 1-7). Igualmente, se ha utilizado la información disponible de challenge tests en alimentos, procedentes de ComBase http://www.combase.cc/ y de la bibliografía científica (Tabla 8), introduciendo intervalos de valores de las variables que afectan al crecimiento microbiano, entre los que se encuentran los productos objeto de estudio.

Resultados

Los resultados obtenidos de la aplicación de los programas GP y PMP, permiten deducir que incluso en la situación más adversa de temperatura (30º C) y partiendo de una contaminación inicial de *L. monocytogenes* de 1 ufc/g, los tiempos de duplicación[7] (24 a 38 minutos) (Tablas 3 y 6) multiplicados por el número de duplicaciones necesarias para alcanzar 100 ufc/g (6.64 duplicaciones), proporcionan tiempos superiores (160 y 253 minutos) a la caducidad secundaria fijada para los alimentos que integran el producto final (2 horas). Sin embargo, si el nivel de contaminación es mayor (10 ufc/g), el resultado es muy diferente, ya que se alcanzaría las 100 ufc/g en tan sólo 80 a 126 minutos. Con otros niveles de contaminación mas elevados (por ejemplo 50 ufc/g) pero aún permitidos por el Real

Decreto 3484/2000 (recuérdese el criterio de m=10, M=10^2, para n=5 y c=2), se alcanzarán las 100 ufc/g en tan sólo 24-38 minutos. Aunque estos resultados pueden crear cierta preocupación, hay que recordar que los tiempos de duplicación que se generan en los programas PMP y GP proceden de datos de crecimiento obtenidos en medios de cultivo y no en alimentos, por lo que estas estimaciones deben tomarse con cautela.

De los datos procedentes de pruebas de inoculación en productos con similares características, se obtienen tiempos de duplicación superiores, que difieren significativamente de los hallados por GP y PMP. Así, los datos de crecimiento de *L. monocytogenes* en lechuga[8] ofrecen un tiempo de duplicación de 60 minutos, con lo que partiendo de una concentración de 10 ufc/g, se alcanzarán las 100 ufc/g en 199 minutos (>3 horas) en el caso más adverso de temperatura (Tabla 8). Con 50 ufc/g se tardaría una hora en lograr esa población.

Si se considera sólo la fase exponencial de crecimiento, la concentración máxima admisible sería de hasta 25 ufc/g, ya que con dos duplicaciones (2 horas) se alcanzarían los 100 ufc/g. Sin embargo, para ciertos casos (contaminación cruzada), ha de tenerse en cuenta, además, la duración de la fase de latencia de este microorganismo, que en las condiciones más favorables para su crecimiento (temperaturas de 30º C y empleando medios de cultivo), es de 2.5 horas (Tablas 3 y 6). Con toda certeza este tiempo será superior si se trata de alimentos. Así, para *L. monocytogenes* en lechuga[9] en las condiciones mencionadas, se ha calculado una fase de latencia de 3.8 horas (Tabla 8).

Conclusiones

A la vista de estas consideraciones, puede concluirse que la supresión de la refrigeración en las mesas de preparación en los términos planteados, no supone un aumento significativo del riesgo, siempre y cuando se lleve a cabo la monitorización del proceso y la verificación del cumplimiento de los periodos de caducidad secundaria para los alimentos empleados como ingredientes del menú final, así como un control riguroso de materias primas y de la eficacia del sistema de limpieza y desinfección de las mesas de preparación, de forma individual para cada establecimiento/grupo empresarial. Sólo en esa situación podría concluirse que no es necesario mantener la refrigeración en esta etapa del proceso de elaboración de acuerdo con lo especificado en el apartado 2 del artículo 7 del Real Decreto 3484/2000. Igualmente, convendría revisar el criterio microbiológico para *L. monocytogenes* establecido en el Real Decreto 3484/2000 de acuerdo a la propuesta de la CE[10]. En el caso de aplicarse el criterio de m=M=100 ufc/g, el fabricante deberá ser capaz de demostrar a la entera satisfacción de la autoridad competente, que el producto no excederá el límite de 100 ufc de *L. monocytogenes*/g durante su periodo de vida comercial. Es decir, el fabricante puede fijar límites intermedios durante el

7. Téngase en cuenta que las predicciones dadas por GP y PMP proceden de datos obtenidos mediante experimentos realizados en caldo de cultivo.

8. Koseki and Isobe, 2005. Prediction of pathogen growth on iceberg lettuce under real temperature history during distribution from farm to table. Int. J. Food Microbiol. 104, 239-248.

9. Koseki and Isobe, 2005. Prediction of pathogen growth on iceberg lettuce under real temperature history during distribution from farm to table. Int. J. Food Microbiol. 104, 239-248.

10. SANCO/4198/2001 Rev. 18 de 22/6/2005. Draft Commission Regulation on microbiological criteria for foodstuffs.

proceso que deben ser suficientemente bajos para garantizar que el límite de 100 ufc de *L. monocy - togenes*/g no se excederá al final del periodo de vida comercial del producto. Las posibilidades de demostración descansan en la aplicación de modelos matemáticos y la realización de pruebas de inoculación de alimentos bajo condiciones de almacenamiento previsibles[11] y, todo ello, en el marco de la correspondiente Evaluación de Riesgos[12].

11. Carrasco et al., 2005. Quantitative models can help manufacturers achieve regulatory criteria for Listeria monocytogenes. COST Action 920 "Quantitative Risk Assessment". Dubrovnik.

12. La relevancia de la Evaluación de Riesgos ha quedado plasmada en el Reglamento (CE) Nº 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo 29 de abril de 2004, cuyo artículo 13 establece que las disposiciones de los anexos I y II (Producción primaria y Requisitos higiénicos generales aplicables a todos los operadores de la empresa alimentaria, respectivamente) podrán adaptarse o actualizarse teniendo en cuenta nuevas Evaluaciones de Riesgos. Por otra parte, como recoge el Real Decreto 1940/2004 en su artículo 4, la Evaluación del Riesgo Microbiológico en Alimentos, vendrá a ser una de las normas generales de vigilancia de las zoonosis y de los agentes zoonóticos.

ANEXO

Predicciones de parámetros cinéticos: Growth Predictor y Pathogen Modelling Program http://www.ifr. bbsrc.ac.uk/safety/GrowthPredictor/default.html http://www.arserrc.gov/mfs/ PATHOGEN.HTM http://www.combase.cc/

Tabla 1.- Predicciones de parámetros cinéticos de *Escherichia coli* obtenidos mediante Growth Predictor y Pathogen Modelling Program.

	Escherichia coli								
T	[a]Gr (Log_{10})		[b]Gt (h)		Lag (h)		Log N_o	pH	a_w
	[c]GP	GP	[d]PMP	GP	PMP	GP	PMP		
10[e]	0,0323	9,33	4,5		57,4				
15	0,099	304	2,5		18,4				
20	0,2401	1,26	1,2		7,4	1	3[e]	5,8	0,997[f]
25	0,4604	0,65	0,7		3,7				
30	0,6979	0,43	0,5		2,3				

[a]Maximum growth rate (log_{10} concentración/h). (Tasa máxima de crecimiento).
[b]Generation time. (Tiempo de generación o de duplicación).
[c]Growth Predictor.
[d]Pathogen Modelling Program.
[e]Mínimo valor admitido por el programa.
[f]Valor por defecto.
N_o: Concentración inicial empleada (log ufc/g).

Tabla 2.- Predicciones de parámetros cinéticos de *Staphylococcus aureus* obtenidos mediante Growth Predictor y Pathogen Modelling Program.

Staphylococcus aureus

T (ºC)	[a]Gr (Log_{10})	[b]Gt (h)		Lag (h)		Log N_o		pH	a_w
	[c]GP	GP	[d]PMP	GP	PMP	GP	PMP		
7,5[e]	0,0122	24,8	*		*				
10	0,0242	12,5	15		78,8				
15	0,0785	3,84	5,2		18,4	1	3[e]	5,8	0,997[f]
20	0,1947	1,55	2,2		6				
25	0,3692	0,82	1,1		2,7				
30	0,5357	0,56	0,7		1,7				

[a]Maximum growth rate (log_{10} concentración/h). (Tasa máxima de crecimiento).
[b]Generation time. (Tiempo de generación o de duplicación).
[c]Growth Predictor.
[d]Pathogen Modelling Program.
[e]Mínimo valor admitido por el programa.
[f]Valor por defecto.
N_o: Concentración inicial empleada (log ufc/g).
* Valor no disponible.

Tabla 3.- Predicciones de parámetros cinéticos de *Listeria monocytogenes* obtenidos mediante Growth Predictor y Pathogen Modelling Program.

Listeria monocytogenes

T (ºC)	[a]Gr (Log_{10})	[b]Gt (h)		Lag (h)		Log N_o		pH	a_w
	[c]GP	GP	[d]PMP	GP	PMP	GP	PMP		
7	0,0334	12,9	9,6		56,6				
10	0,0425	7,09	5,6		35				
15	0,0981	3,07	2,5		17	1	3[e]	5,8	0,997[f]
20	0,1862	1,62	1,3		9,1				
25	0,2907	1,04	0,8		5,3				
30	0,3732	0,81	0,5		3,4				

[a]Maximum growth rate (log_{10} concentración/h). (Tasa máxima de crecimiento).
[b]Generation time. (Tiempo de generación o de duplicación).
[c]Growth Predictor.
[d]Pathogen Modelling Program.
[e]Mínimo valor admitido por el programa.
[f]Valor por defecto.
N_o: Concentración inicial empleada (log ufc/g).

Tabla 4.- Predicciones de parámetros cinéticos de *Salmonella* obtenidos mediante Growth Predictor y Pathogen Modelling Program.

	Salmonella								
T (ºC)	[a]Gr (Log_{10})	[b]Gt (h)		Lag (h)		Log N_o		pH	a_w
	[c]GP	GP	[d]PMP	GP	PMP	GP	PMP		
7[e]	0,012	25,2	*		*				
10	0,0278	10,8	14,4		64,8				
15	0,0903	3,34	3,6		17,9	1	3[e]	5,8	0,997[f]
20	0,22	1,37	1,2		7,4				
25	0,4018	0,75	0,6		4,5				
30	0,5506	0,55	0,4		4,1				

[a]Maximum growth rate (log_{10} concentración/h). (Tasa máxima de crecimiento).
[b]Generation time. (Tiempo de generación o de duplicación).
[c]Growth Predictor.
[d]Pathogen Modelling Program.
[e]Mínimo valor admitido por el programa.
[f]Valor por defecto.
N_o: Concentración inicial empleada (log ufc/g).
* Valor no disponible.

Tabla 5.- Predicciones de parámetros cinéticos de *Escherichia coli* obtenidos mediante Growth Predictor y Pathogen Modelling Program.

	Escherichia coli								
T (ºC)	[a]Gr (Log_{10})	[b]Gt (h)		Lag (h)		Log N_o		pH	a_w
	[c]GP	GP	[d]PMP	GP	PMP	GP	PMP		
10	0,0349	8,62	5,4		54,0				
15	0,1045	2,89	2,2		17,0				
20	0,2469	1,22	1,1		6,7	1	3[e]	5,8	0,997[f]
25	0,46,13	0,65	0,6		3,3				
30	0,6816	0,44	0,4		2,0				

[a]Maximum growth rate (log_{10} concentración/h). (Tasa máxima de crecimiento).
[b]Generation time. (Tiempo de generación o de duplicación).
[c]Growth Predictor.
[d]Pathogen Modelling Program.
[e]Mínimo valor admitido por el programa.
[f]Valor por defecto.
N_o: Concentración inicial empleada (log ufc/g).

Tabla 6.- Predicciones de parámetros cinéticos de *Listeria monocytogenes* obtenidos mediante Growth Predictor y Pathogen Modelling Program.

Listeria monocytogenes

T (ºC)	[a]Gr (Log_{10})	[b]Gt (h)		Lag (h)		Log N_o		pH	a_w
	[c]GP	GP	[d]PMP	GP	PMP	GP	PMP		
7	0,0274	11	6,9		39,3				
10	0,0501	6,01	4,1		24,4				
15	0,1177	2,56	1,9		11,9	1	3[e]	5,8	0,997[f]
20	0,2273	1,33	1,0		6,4				
25	0,3611	0,83	0,6		3,8				
30	0,4718	0,64	0,4		2,5				

[a]Maximum growth rate (log_{10} concentración/h). (Tasa máxima de crecimiento).
[b]Generation time. (Tiempo de generación o de duplicación).
[c]Growth Predictor.
[d]Pathogen Modelling Program.
[e]Mínimo valor admitido por el programa.
[f]Valor por defecto.
N_o: Concentración inicial empleada (log ufc/g).

Tabla 7.- Predicciones de parámetros cinéticos de Salmonella obtenidos mediante Growth Predictor y Pathogen Modelling Program.

Salmonella

T (ºC)	[a]Gr (Log_{10})	[b]Gt (h)		Lag (h)		Log N_o		pH	a_w
	[c]GP	GP	[d]PMP	GP	PMP	GP	PMP		
7	0,0139	21,7	*		*				
10	0,0318	9,49	10,1		58,8				
15	0,0999	3,02	2,7		16,0	1	3[e]	5,8	0,997[f]
20	0,236	1,28	1,0		6,5				
25	0,4179	0,72	0,5		3,9				
30	0,5551	0,54	0,4		3,5				

[a]Maximum growth rate (log_{10} concentración/h). (Tasa máxima de crecimiento).
[b]Generation time. (Tiempo de generación o de duplicación).
[c]Growth Predictor.
[d]Pathogen Modelling Program.
[e]Mínimo valor admitido por el programa.
[f]Valor por defecto.
N_o: Concentración inicial empleada (log ufc/g).
*Valor no disponible.

Consideraciones

Predicciones resultantes de modelos secundarios cuyos datos crudos fueron obtenidos mediante experimentos realizados en caldo de cultivo en atmósfera aeróbica.

Tabla 8.- Predicciones de los parámetros cinéticos de crecimiento de L. monocytogenes y E.coli en lechuga iceberg a 30º C.

Koseki and Isobe, 2005. Int J. Food Microbiol. 104, 239-248

Modelos tipo Ratkowsky

*L. monocytogenes*_Lettuce: √μmax=0,016(T+4,26)

*L. monocytogenes*_PMP: √ μmax=0,027(T+0,44)

E. coli O157:H7_Lettuce: √μmax=0,033(T-4,54)

E. coli O157:H7_PMP: √μmax=0,032(T-2,67)

	μmax.	Doubling time (h)	Doubling time (min)	Time (min) to reach 100 cfu/g with No=10 cfu/g	lag (h)	Lag (min)
L. monocytogenes_Lettuce	0,30.	1,00	60,10	199,56	3,80	228,11
L. monocytogenes_Lettuce	0,67	0,44	26,73	88,77	1,95	117,11
E. coli 0175: H7_Lettuce	0,70	042	27,58	84,94	1,77	106,38
E. coli 0157: H7_PMP	0,76	0,39	23,61	78,40	1,93	116,19

μmax: Tasa máxima especificada de crecimiento (log ufc/gh).

Lag: Fase de latencia (horas).

Opinión del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria (AESA) relativa a la propuesta de alegaciones nutricionales de ácidos grasos Omega-3 en alimentos efectuada por la Comisión Europea y a las consideraciones sobre la misma aportadas por la Autoridad Europea en Seguridad Alimentaria (EFSA)

Núm. Referencia: AESA-2006-3

Documento aprobado por el Comité Científico en sesión plenaria el 8 de febrero de 2006

Miembros del Comité Científico

Andreu Palou Oliver, José Badiola Díez, Arturo Anadon Navarro, Margarita Arboix Arzo, Juan Francisco Cacho Palomar, Francesc Centrich Escarpener, María Luisa García López, Manuela Juárez Iglesias, Manuel Martín Esteban, Susana Moreno Megías, Juan Antonio Ordóñez Pereda, Andrés Otero Carballeira, Fernando Rodríguez Artalejo, Elías Rodríguez Ferri, José Manuel Sánchez-Vizcaíno Rodríguez, Vicente Sanchís Almenar, Gregorio Varela Moreiras, Pablo Vera Vera, Gonzalo Zurera Cosano

Grupo de Trabajo

Andreu Palou Oliver (coordinador)
Jesús Campos Amado (secretario)
Manuel Martín Esteban
Juan A. Ordóñez Pereda

Resumen

La Comisión Europea ha elaborado una propuesta de Reglamento relativo al uso de alegaciones nutricionales y de salud en el etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios. Por su parte, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) a través del Panel de Productos Dietéticos, Nutrición y Alergias (Panel Científico NDA) ha emitido una Opinión científica sobre posibles alegaciones nutricionales relativas a los ácidos grasos ω–3, grasa monoinsaturada, insaturada y poliinsaturada, que constituye una primera respuesta de la EFSA a una cuestión sobre alegaciones nutricionales.

En relación con las alegaciones nutricionales sobre los ácidos grasos ω-3 que propone la Comisión Europea, se han producido en España diversas reflexiones, mayoritariamente por parte de entidades del sector agroalimentario así como por asociaciones sectoriales, de las que ha sido informada la Agencia Española de Seguridad Alimentaria (AESA) y de las que se ha derivado la necesidad de una Opinión del Comité Científico de la citada Agencia sobre varios aspectos del contenido de las alegaciones. Estos aspectos se refieren a las cantidades mínimas de ácidos grasos ω-3, a la forma de expresión de este contenido y a la numerosa argumentación en favor de que las alegaciones se refieran de forma separada a los ácidos grasos ω-3 de cadena larga y no con carácter general a los ácidos grasos ω-3.

Después del análisis de la propuesta relativa a las alegaciones nutricionales de ácidos ω- 3, el Comité Científico de la AESA llega prácticamente a las mismas conclusiones que el Panel Científico de la EFSA, es decir, que no se justifica la preferencia por una sola alegación nutricional general para los ácidos grasos ω-3, y que por el contrario, existen evidencias científicas suficientes para asignar alegaciones separadas relativas a los principales tipos de ácidos grasos ω-3 reconocidos desde el punto de vista nutricional. Asimismo, el Comité de la AESA indica que la evidencia científica no es suficiente para delimitar las cifras concretas que propone la Comisión Europea en relación con las alega-

ciones referidas a "fuente de" y "rico en"; concluyendo, por último, que seria apropiado expresar el contenido de ácidos grasos ω-3 por porción o por ración estándar establecida o que se deba establecerse.

Palabras Clave

Ácidos grasos ω-3, alegaciones nutricionales, Reglamento, **fuente, rico**, ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), ácido α-linolénico (ALA), ácido araquidónico (AA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA), omega-3.

Antecedentes

Propuesta de la Comisión Europea (CE) y opinión de la EFSA sobre alegaciones nutricionales de ácidos grasos ω-3.

En Julio de 2003 la Comisión Europea (CE) elaboró una propuesta de Reglamento sobre el uso de alegaciones nutricionales y de salud (EC. 2003), en la actualidad pendiente de ser adoptada, que cubre las alegaciones nutricionales y de salud en el etiquetado, presentación y publicidad de alimentos. El anexo de la propuesta contiene una lista de las alegaciones nutricionales que se prevé estarán permitidas así como sus condiciones específicas de utilización; se trata de un anexo que podrá revisarse cuando sea necesario, estando previsto que las modificaciones al mismo se realicen a través del procedimiento del Comité correspondiente y, cuando sea apropiado, después de consultar a la Autoridad Europea en Seguridad Alimentaria (EFSA) (EFSA. 2005).

Por su parte, recientemente y a instancias de la CE, el Panel Científico de Productos Dietéticos, Nutrición y Alergias (Panel científico NDA) ha emitido una opinión sobre posibles alegaciones nutricionales relativas a los ácidos grasos ω-3, grasa mono-insaturada, insaturada y poli-insaturada (EFSA. 2005). Esta opinión constituyó una primera respuesta de la EFSA a una cuestión sobre alegaciones nutricionales, que se le planteó en los siguientes términos:

> *"La CE requiere a la EFSA que emita una opinión sobre la base científica de las alegaciones nutricionales relativas a ácidos grasos ω-3 y a grasas mono-insaturada, poli-insaturada e insaturada. En este contexto se plantea a la EFSA que revise la base científica de las siguientes alegaciones propuestas y que asesore sobre su adición al Anexo de la Propuesta de Reglamento.*
>
> ***Fuente ("source") de ácidos grasos** ω-3. El alimento debe contener más del 15% de la Ingesta Nutricional Recomendada (INR) (con una INR de 2 g/día para un varón adulto) de los referidos ácidos grasos ω-3 por 100 g, o por 100 ml, o por 100 kcal (425 kj).*
>
> ***Rico (High) en ácidos grasos** ω-3. El alimento debe contener más del 30% de la INR para un varón adulto de los referidos ácidos grasos ω-3 por 100 g, o por 100 ml, o por 100 kcal (425 kj)."*

La pregunta planteada a la EFSA por la CE y la referida opinión del Panel Científico NDA se refieren también a las alegaciones sobre grasa mono-insaturada, poli-insaturada, e insaturada. Sin embargo, estas alegaciones no son objeto de consideración en la presente opinión del Comité Científico de la AESA.

> Acidos grasos poliinsaturados (PUFAs), ácido α-linolénico (ALA), ácido araquidónico (AA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA)

Términos en que se plantea la cuestión

En España, se han producido diversas reflexiones, mayoritariamente por parte de entidades del sector agroalimentario (productores de ω-3 y fabricantes de productos enriquecidos) así como por asociaciones sectoriales que representan a dichas entidades, recogidas por la AESA en relación al proceso de adopción de las referidas alegaciones nutricionales. Se refieren a varios aspectos del contenido de las alegaciones propuestas:

a) cantidades mínimas de ácidos grasos ω-3 que se contemplan en la propuesta.

b) forma de expresión de este contenido ya que no se contempla la expresión por ración o por ingesta diaria habitual y ello puede afectar negativamente, por ejemplo, a ciertos productos líquidos.

c) numerosa argumentación en favor de que las alegaciones se refirieran a ácidos grasos ω-3 de cadena larga y no exclusivamente una alegación genérica de ácidos grasos ω-3.

Análisis

¿Se considera adecuado establecer alegaciones nutricionales únicamente para el contenido de los ácidos grasos ω-3 en general?

Los ácidos grasos esenciales (AGEs) son ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) que se necesitan para el mantenimiento de la salud pero que no pueden ser sintetizados en nuestro organismo (Heird and Lapillonne. 2005) (Singh. 2005). En principio, se consideran dos clases principales de PUFAs, los ω-6 (también denominados n-6) y los ω-3 (ó n-3). El ácido graso esencial paterno o generador de la serie de ácidos grasos ω-6 es el ácido linoleico (LA), el cual puede ser desaturado y elongado en el organismo humano generando ácido araquidónico (AA). Por su parte, el ácido graso esencial paterno de la serie ω-3 es el ácido α-linolénico (ALA), que puede ser desaturado y elongado en nuestro organismo para formar el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA). Sin embargo, dentro de los ácidos grasos ω-3 se distinguen, desde el punto de vista nutricional, los ω-3 de cadena larga (LC-PUFAs n-3), con más de tres dobles enlaces y el ALA, ya que sabemos que en el organismo, aunque el ALA se convierte en EPA y en DHA, la capacidad de tal conversión es limitada, viéndose afectada por diversos factores, incluida la propia acción limitante de la presencia de ácidos grasos ω-6 (ácidos linoleico y araquidónico) en la dieta. Surgen así dudas más que razonables en el momento actual sobre si, en relación con las alegaciones para ácidos grasos ω-3, es preferible considerar una postura respecto a la alegación más restringida a los ácidos grasos ω-3 de cadena larga o bien, en todo caso, dos tipos diferentes de alegaciones para las dos categorías generales de ácidos grasos ω-3, a saber: una alegación para el ALA y otra para los ácidos grasos ω-3 de cadena larga.

Durante los últimos años se ha incrementado la publicación de evidencias relacionando la suplementación con aceites de pescado PUFAs ω-3 y enfermedad cardiovascular y donde son reconocidos de modo específico los efectos cardioprotectores de los ω-3 de cadena larga (McCowen and Bistrian. 2005; Harris. 2004; Holub y Holub. 2004; von Schacky. 2004; Ismael. 2005; Nettleton y Katz. 2005 y las referencias en ellos incluidas).

Todo lo anterior está en total consonancia con la reciente opinión del Comité Científico NDA de la EFSA. De hecho, en sus conclusiones y en el resumen de las mismas, dicho comité refleja exactamente que existen y deben tomarse en consideración estas dos categorías de ácidos grasos ω-3, y que tienen funciones claramente diferenciadas: *"There are two categories of ω-3 fatty acids (n-3 polyunsaturated fatty acids [n-3 PUFA])- -α-linolenic acid (ALA) and long chain n-3 polyunsaturated fatty acids (LC n-3 PUFA, mainly eicosapentaenoic acid [EPA] and docosahexaenoic acid [DHA]) - which differ in function and requirements"* (EFSA. 2005). En esta opinión se advierte, de modo destacado, que las alegaciones *(claims)* propuestas por la CE no incluyen tal distinción, estableciendo de modo textual lo siguiente: *"The proposed claims do not distinguish between ALA and LC n-3 PUFA which have different nutritio - nal roles. ALA is a nutritionally essential fatty acid required for synthesis of important* fatty acids and

eicosanoids. Available evidence suggests that LC n-3 PUFA (EPA and DHA) may reduce the risk of car - diovascular disease, possibly mediated by prevention of cardiac arrhythmias" (EFSA. 2005).

En definitiva, el Comité Científico de la AESA concluye que hay evidencia científica suficiente como para distinguir entre los dos grupos de ácidos grasos ω-3 en el contexto de la futura regulación europea de alegaciones nutricionales. Se concluye, además, que la opinión del Panel Científico NDA de la EFSA comparte la apreciación de esta evidencia y no refrenda de modo favorable el texto de las alegaciones presentadas a su consideración por la CE, sino más bien al contrario.

Adaptación de las cantidades de ingesta diaria recomendadas de ácidos grasos ω-3 y de ácidos grasos ω-3 de cadena larga en el contexto de las alegaciones nutricionales.

La recomendación por parte del Panel Científico de la EFSA acerca de la necesidad de modificar los términos de la alegación propuesta por la CE se deduce también, más allá de cualquier duda razonable de interpretación, de la información adicional que acompaña de las cantidades de ácidos grasos ω-3 de cadena larga que diversas autoridades alimentarias recomiendan en relación a efectos cardioprotectores en adultos (EFSA. 2005). Así, el Panel dice, expresamente: *"The RNI –Reccomended nutrient intake– proposed in the claim (2 g/day) is in the same range as intakes of ALA recommen - ded by some national and international authorities to meet dietary requirements in adults (1-3 g/day). However, it is much greater than intakes recommended by some authorities for LC n-3 PUFA (EPA and DHA) in adults for cardio-protective effects (200-500 mg/day). In many EU populations intakes of both ALA and LC n-3 PUFA are typically lower than these recommendations"*. Es decir, las cantidades de LC-PUFAS n-3 (EPA y DHA) que son recomendables en relación con los efectos cardioprotectores reconocidos de los ω-3, son muy inferiores a las recomendables de ALA. Análogas consideraciones han emitido otros Comités Científicos de diversas Agencias de Seguridad Alimentaria (AFSSA) reflejando de modo más preciso el estado actual del conocimiento científico en este tema (Harris. 2004; Holub y Holub. 2004; von Schacky. 2004; Ismail. 2005; Nettleton y Katz. 2005).

De este modo, tomando como ejemplo el caso de los ácidos grasos ω-3 de cadena larga, si se adoptase el criterio de aplicar a las cantidades recomendadas de nutrientes el límite de un 15% de las mismas para la alegación "fuente de" y el límite de un 30% para la alegación "rico en", y tomando como base la cifra de 200 mg/día, mencionada en la opinión del Panel Científico de la EFSA (EC. 2003), los límites (en g/100 g) que resultarían serían los siguientes: 0,03 (para "fuente de") y 0,06 (para "rico en") para los ácidos grasos ω-3 de cadena larga. Para el caso de los ácidos grasos ˆ-3, los límites serían 0,3 g/100g ("fuente de") y 0,6 g/100g ("rico en").

Sobre una alegación genérica de ácidos grasos ω-3. Relación entre ácidos grasos ω-6 y ω-3.

El Panel Científico de la EFSA (EC 2003) indica que el LA y el ALA compiten por las mismas enzimas, desaturasas y elongasas, teniendo el ALA mayor afinidad, lo que puede explicar que una ingesta muy elevada de ALA reduce la proporción de ácidos grasos ω-6 en los tejidos y que una ingesta muy elevada de AA puede alterar el metabolismo y la distribución de PUFAs ω-3. Así, debido a la competi-

ción durante el metabolismo por las enzimas entre los ácidos grasos de las series ω-3 y ω-6, es importante mantener un equilibrio entre los PUFAs ω-6 y ω-3 en la dieta. Al respecto, se ha abundado ya en la importancia de aumentar la proporción de ácidos grasos ω-3 en la dieta (Harper y Jacobson. 2003), aunque no haya consenso sobre cual es la relación óptima ω-6/ω-3 (EFSA. 2005).

En estas condiciones, y ante, por una parte, la dificultad que supone el no poder fijar de modo suficientemente preciso el requerimiento de una determinada relación ω-6/ω-3 y, por otra, sabiendo que es preferible el mantenimiento de un cierto equilibrio, una alegación genérica de ácidos grasos ω-3 podría inducir a más errores en la nutrición del consumidor si se compara por ejemplo con una alegación limitada a LC-PUFAs n-3. De hecho, puede ser de más difícil y, en todo caso, de insuficiente comprensión por un consumidor europeo medio, en contra de lo establecido en el artículo 5 de la propuesta de Reglamento europeo sobre alegaciones nutricionales y de salud.

Expresión de las alegaciones nutricionales, en términos del contenido de ácidos grasos ω-3 por ración (serving size).

Las diferentes formas de expresión del contenido de los referidos ácidos grasos ω-3, no parecen suficientes y, para ciertos productos, podrían no ser apropiadas; por ejemplo el caso de los productos líquidos. En la propuesta de la CE se contemplan solamente las expresiones de cantidad (en gramos o miligramos) de ácidos grasos ω-3 por 100g de producto, o bien por100 ml de producto o por 100 kcal (425 kj) de producto; en cambio, no se contempla específicamente la expresión de la cantidad de ácidos grasos ω-3 por ración diaria.

Sin embargo, en muchos casos la información sobre el tamaño de las raciones y la cantidad de nutrientes por ración es la manera más directa para que el consumidor europeo medio se pueda aproximar al conocimiento de los nutrientes que ingiere diariamente en sus comidas. El tamaño de las raciones reflejaría la cantidad que la mayor parte de personas toma en las comidas, aunque no sea necesariamente la cantidad recomendada que debiera tomarse (CSPI. 1998). Tiene la ventaja de ser una medida fácilmente apreciable y comprensible para la mayor parte de la población, y que estas raciones son prácticamente las mismas para productos similares o, por ejemplo, para un mismo producto comercializado bajo diferentes marcas, con lo que entre ellos, la comparación resulta muy fácil.

La elección de una unidad de referencia (100g, 100 ml, o ración) parece más un asunto de preferencias, o derivado de comportamientos de acuerdo con una determinada tradición, en lugar de una cuestión fácilmente abordable bajo la perspectiva científica, pero la expresión por ración facilita más que las otras que el consumidor se haga una idea de lo que representa lo que ingiere o compra en relación a unos determinados objetivos nutricionales.

Por contra, quizás el principal problema deriva precisamente de la diversidad de estos hábitos en los distintos países y regiones europeas y, por lo tanto, la dificultad de lograr una armonización en el conjunto europeo.

Adicionalmente, cabe notar que la referencia de ácidos grasos ω-3 por 100 kcal, 100 g o 100 ml genera cierta inconsistencia. Dependiendo del tipo de producto y de lo elevado que se establezca la INR, los productos serán aptos o inadecuados desde un punto de vista nutricional, por lo que resultan claramente favorecidos aquellos alimentos con un contenido graso mayor y es aquí donde radica

una considerable incongruencia puesto que podrían recomendarse productos con un alto contenido graso total simplemente porque tuviesen un contenido apropiado de ácidos grasos ω-3 totales y/o de cadena larga.

Se llega así a la necesidad de establecer referencias por porción de consumo aún cuando esta solución tiene la desventaja de no reconocer las diferencias entre países y regiones dentro de la UE. Por ejemplo, la porción de consumo de mantequilla aceptable en nuestro país no tiene por qué ser la habitual en Alemania, Reino Unido o Finlandia; lo mismo cabría decir para productos derivados del pescado.

Conclusiones del Comité Científico de la AESA.

Se han analizado la propuesta relativa a las alegaciones nutricionales de ácidos grasos ω-3 elaboradas por la CE así como la opinión al respecto emitida por el Panel Científico NDA de la EFSA y como conclusiones, el Comité Científico de la AESA expresa lo siguiente:

1. No se justifica científicamente la preferencia por una sola alegación nutricional general para los ácidos grasos ω-3 y, por el contrario, existen méritos científicos claramente diferenciables para alegaciones separadas de los dos principales tipos de ácidos grasos ω-3 reconocidos desde el punto de vista nutricional, llegando prácticamente a las mismas conclusiones que el Panel de la EFSA, en el sentido de que, desde el punto de vista de los términos de referencia planteados por la CE, es decir, en el contexto de las alegaciones nutricionales previstas en la propuesta de Reglamento, el panel de la EFSA concluye igual que esté Comité, que "no hay una sola categoría de ácidos grasos ω-3 [ácidos grasos poliinsaturados n-3 (PUFAs n-3)] sino dos, a saber: 1) ácido α-linolénico (ALA); y 2) Ácidos grasos ω-3 de cadena larga (LC-PUFAs n-3), principalmente ácido eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA), los cuales difieren en función y requerimientos"
2. La evidencia científica no es suficiente para delimitar las cifras concretas que la CE propone en la propuesta de Reglamento con el fin de asignar las alegaciones referidas a "fuente de" y "rico en" (en inglés *source* y *high*, respectivamente) de ácidos grasos ω-3, debido a que tal propuesta da cabida a posibles formulaciones cuya relación de ácidos grasos ω-6/ω-3 puede no ajustarse a las necesidades nutricionales de alguno de estos dos tipos de compuestos.

En definitiva, este Comité no ve justificación científica para una única alegación genérica para el conjunto de ácidos grasos ω-3, sino que justifica en mayor medida, alternativamente o adicionalmente, dos alegaciones diferenciables: una para los ácidos grasos ω-3 de cadena larga y otra para el ácido α-linolénico.

Referencias

CSPI (1998) Center for Science in the Public Interest. Food Labeling for the 21st Century: A Global Agendaf or Action. http://www.cspinet.org/reports/labelrept.pdf.

EC (2003) Proposal for a regulation of the European Parliament and the council on the nutrition and health claims made on foods. COM (2003) 424 final.

EFSA. (2005) Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to nutrition claims concerning omega-3 fatty acids, monounsaturated fat, polyunsaturated fat and EFunsaturated fat.

(Panel-members: Becker, W., Branca, F., Brasseur, D., Bresson, J. L., Flynn, A., Jackson, A., Lagiou, P., Løvik, M., Mingrone, G., Moseley, B., Palou, A., Przyrembel, H., Salminen, S., Strobel, S., van den Berg, H., van Loveren, H.). The EFSA Journal 253 253:1-29.

Harper, C. R., Jacobson, T. A. (2003) Beyond the Mediterranean diet: the role of omega-3 Fatty acids in the prevention of coronary heart disease. Prev Cardiol 6:136-46.

Harris, W.S. (2004) Are omega-3 fatty acids the most important nutritional modulators of coronary heart disease risk? Curr Atheroscler Rep 6:447-52.

Heird, W. C., Lapillonne A (2005) The role of essential fatty acids in development. Annu Rev Nutr 25:549-71.

Holub, D. J., Holub, B. J. (2004) Omega-3 fatty acids from fish oils and cardiovascular disease. Mol Cell Biochem 263:217-25.

Ismail, H. M. (2005) The role of omega-3 fatty acids in cardiac protection: an overview. Front Biosci 10:1079-88.

McCowen, K.C., Bistrian BR (2005) Essential fatty acids and their derivatives. Curr Opin Gastroenterol 21:207-15.

Nettleton, J. A., Katz R (2005) n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in type 2 diabetes: a review. J. Am Diet Assoc 105:428-40.

Singh, M. (2005) Essential fatty acids, DHA and human brain. Indian J. Pediatr 72:239-42.

von Schacky, C. (2004) Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 7:131-6.

Rapport sur les acides gras de la famille oméga 3 et système cardiovasculaire : intérêt nutritionnel et allégations. http://www.afssa.fr/ftp/afssa/basedoc/rapportomega3.pdf

MINISTERIO
DE SANIDAD
Y CONSUMO
agencia
española de
seguridad
alimentaria