

Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación al uso del peróxido de hidrógeno como coadyuvante tecnológico en el procesado de hemoderivados y cefalópodos

Miembros del Comité Científico

Rosaura Farré Rovira, Francisco Martín Bermudo, Ana María Cameán Fernández, Alberto Cepeda Sáez, Mariano Domingo Álvarez, Antonio Herrera Marteache, Félix Lorente Toledano, María Rosario Martín de Santos, Emilio Martínez de Victoria Muñoz, M^a Rosa Martínez Larrañaga, Antonio Martínez López, Cristina Nerín de la Puerta, Teresa Ortega Hernández-Agero, Perfecto Paseiro Losada, Catalina Picó Segura, Rosa María Pintó Solé, Antonio Pla Martínez, Daniel Ramón Vidal, Jordi Salas Salvadó, M^a Carmen Vidal Carou

Secretario

Vicente Calderón Pascual

Número de referencia: AESAN-2011-006

Documento aprobado por el Comité Científico en su sesión plenaria de 21 de septiembre de 2011

Grupo de Trabajo

Alberto Cepeda Sáez (Coordinador)
Antonio Martínez López
Perfecto Paseiro Losada
Antonio Pla Martínez
Ricardo López Rodríguez (AESAN)

Resumen

El presente informe evalúa la posibilidad de extender el uso del peróxido de hidrógeno (agua oxigenada, H₂O₂) como coadyuvante tecnológico para su utilización en el procesado de cefalópodos y hemoderivados.

El peróxido de hidrógeno está considerado como GRAS (*Generally Recognized as Safe*) por la FDA (*Food and Drug Administration*) y como no carcinogénico por la *International Agency for Research on Cancer* (IARC). Asimismo, el *Scientific Committee on Consumer Products* (SCCP) de la Comisión Europea considera que su empleo en pasta dentífrica hasta el 6% es seguro.

En varios países, incluidos algunos de la Unión Europea, este agente ya está autorizado para diversos usos en alimentación, como, por ejemplo, para descontaminar agua para consumo humano, o como coadyuvante tecnológico en tripas. En lo que se refiere específicamente a este informe, se propone extender su uso para el blanqueo de la sangre y sus fracciones y para cefalópodos por su efecto bacteriostático.

Este Comité Científico en relación al empleo del peróxido de hidrógeno para el procesado de cefalópodos y hemoderivados en las condiciones propuestas por la Asociación de Fabricantes y Comercializadores de Aditivos y Complementos Alimentarios (AFCA), y en base a los datos aportados por los diferentes estudios recogidos en este informe, tales como la ausencia de residuos y la no modificación de la oxidación lipídica o de las proteínas, concluye que no presenta riesgo para el consumidor y podría ser utilizado siempre atendiendo a las condiciones aquí reflejadas.

Palabras clave

Peróxido de hidrógeno, cefalópodos, hemoderivados, coadyuvante tecnológico.

Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) on the use of hydrogen peroxide as a processing aid in the processing of hemoderivatives and cephalopods.

Abstract

The current study evaluates the possibility of widening the use of hydrogen peroxide (oxygenated water-H₂O₂) as a processing aid in the processing of hemoderivatives and cephalopods.

Hydrogen peroxide is considered to be GRAS (Generally Recognized as Safe) by the FDA (Food and Drug Administration) and non-carcinogenic by the International Agency for Research on Cancer (IARC). In addition, the Scientific Committee on Consumer Products (SCCP) of the European Commission considers its use of up to 6% in toothpaste to be safe.

In various countries, including some within the European Union, the use of this agent in foods has already been authorised such as in the decontamination of water for human consumption and as a processing aid in cleaning casings. Regarding the matter to which this report specifically relates, it has been proposed to widen its use in the bleaching of blood and its fractions and also on cephalopods due to bacteriostatic effect.

Regarding the use of hydrogen peroxide for the processing of cephalopods and hemoderivatives under the conditions proposed by the AFCA (Spanish Association of Food Additive and Supplement Manufacturers and Distributors) and based on the data from the different studies that are brought together in this report, such as the absence of residues and the non-modification of lipid oxidation or proteins, the Scientific Committee concludes that it poses no risk to the consumer and can be used, providing the conditions referred to in this report are adhered to.

Key words

Hydrogen peroxide, cephalopods, hemoderivatives, processing aid.

Antecedentes

La Asociación de Fabricantes y Comercializadores de Aditivos y Complementos Alimentarios (AFCA) y la Federación de Industrias de Alimentación y Bebida (FIAB) han solicitado, acompañando su solicitud del correspondiente expediente, la autorización del uso del peróxido de hidrógeno (agua oxigenada, H₂O₂) como coadyuvante tecnológico en el procesado de los siguientes grupos de alimentos:

- Cefalópodos.
- Hemoderivados (sangre entera, hematíes y plasma).

A tal efecto, el Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) ha procedido a evaluar la seguridad del uso del peróxido de hidrógeno como coadyuvante tecnológico. En este sentido, el Comité ha establecido unas "Líneas directrices de la documentación precisa para la evaluación de coadyuvantes tecnológicos que se pretenden emplear en la alimentación humana" (AESAN, 2010). De acuerdo con los criterios establecidos en las citadas líneas directrices, el peróxido de hidrógeno se clasifica dentro de una situación 4: sustancia autorizada en alimentación humana cuya ingesta diaria admisible no ha sido establecida y cuyo empleo conduce a la presencia de residuos técnicamente inevitables.

Teniendo en cuenta dicha situación, se evalúan los aspectos relacionados con las características fisicoquímicas, función tecnológica, estudios de residuos y métodos analíticos, estudios y datos relativos a la inocuidad (Nivel A) y estudios de consumo y evaluación del nivel de exposición del consumidor.

Consideraciones relativas al peróxido de hidrógeno

1. Características fisicoquímicas

Composición del producto propuesto: peróxido de hidrógeno (número CAS: 7722-84-1) diluido en agua a unas concentraciones comprendidas entre el 0,05 y el 0,75% según los alimentos o grupos de alimentos donde se utilice (referido a la concentración de la solución de peróxido de hidrógeno que estará en contacto directo con el alimento).

Reactividad

- Reacciones catalíticas: sobre plata, platino, osmio y manganeso.
- Reacciones de adición: puede formar compuestos con amoníaco o urea.
- Reacciones reductoras: reduce óxidos de oro y plata; convierte el ferricianuro en ferrocianuro; descompone el hipobromito en bromuro.
- Reacciones oxidantes: las más frecuentes (arsénico, hierro, plomo...). Decolora materias sensibles como seda, marfil, plumas y otras que no soportan la oxidación con cloro, se ha utilizado para eliminar residuos de cloro gracias a su acción reductora.

2. Función tecnológica

Alimento o grupo de alimentos de destino

Los alimentos o grupos de alimentos de destino, así como las dosis máximas solicitadas son (Tabla 1):

Tabla 1. Alimentos de destino y dosis máximas solicitadas

Alimentos o grupos de alimentos	Uso tecnológico alegado	Dosis máxima
Cefalópodos	Bacteriostático	0,05%/24 horas
Hemoderivados: sangre entera, hematíes y plasma	Decolorante	0,75% (sangre entera y hematíes) y 0,1% en plasma/30 minutos

Uso tecnológico alegado

Los usos alegados son como decolorante o bacteriostático según el sector donde se utilice (Tabla 1).

Cefalópodos

Los cefalópodos son alimentos muy perecederos. En las empresas transformadoras se realiza su acondicionamiento, durante el que puede producirse una contaminación bacteriana, indicándose además que algunos aditivos autorizados (fosfatos, citratos) no evitan el crecimiento bacteriano y los sustitutos que si serán conservantes presentan desventajas tecnológicas (color y sabor indeseables). Su función principal es la de controlar el crecimiento bacteriano durante el procesado, además de evitar posibles degradaciones enzimáticas. Actúa como bacteriostático y no como bactericida.

El peróxido de hidrógeno se añade tras las etapas de pelado y eviscerado, puesto que durante este último proceso, se produce una liberación de microorganismos que haría ineficaz la utilización del peróxido a la concentración propuesta. La dosificación se realiza directamente en la planta procesadora mediante dilución.

No se han encontrado referencias al uso del agua oxigenada combinada con otros tipos de aditivos permitidos para conseguir efectos de ablandamiento y blanqueamiento (polifosfatos, sal, ácido cítrico, etc.). En el caso de los cefalópodos, estas mezclas se usan para evitar cambios de coloración. El uso combinado con agua oxigenada limita la subida de pH que provoca el uso de aquéllos.

Hemoderivados

Según indica el solicitante, la fracción globular supone 2/3 partes de la proteína total de la sangre porcina por lo que se producen diariamente grandes cantidades que, si no se ofrecen posibilidades de utilización, pueden convertirse en un residuo con grandes problemas medioambientales y sanitarios, si no se recoge de la forma adecuada.

El peróxido de hidrógeno, a las concentraciones propuestas, oxida el cromóforo que da color a la hemoglobina (grupo tetrapirrólico) y se pierde la tonalidad roja que impide su utilización tanto en alimentación humana como en animal. Así, se consigue obtener una proteína de color amarillento que mantiene gran parte del valor nutricional de la proteína nativa (hemoglobina) y que de esta forma no confiere color al producto al que se añade, por lo que podrá ser mejor aprovechado por la industria de elaborados cárnicos.

3. Relación de usos autorizados del peróxido de hidrógeno

Algunos de los usos autorizados del peróxido de hidrógeno en el ámbito alimentario se incluyen en la Tabla 2.

Tabla 2. Relación de usos autorizados del peróxido de hidrógeno en alimentación

	Uso autorizado	Referencia
Europa	El Reglamento (CE) N° 853/2004 establece para las gelatinas acabadas (obtenidas a partir de huesos, cueros y pieles de rumiantes de cría, pieles de animales de cerdo y pieles de aves de corral) un residuo de peróxido de hidrógeno de 10 mg/kg (ppm).	(UE, 2004)
	El Reglamento (CE) N° 123/2008 permite la utilización del peróxido de hidrógeno en la producción de gelatina a partir de productos de origen animal.	(UE, 2008)
España	Autorizado el uso del agua oxigenada, a una dosis máxima de 5.000 ppm, en el blanqueado de tripas naturales.	Orden de 29 de octubre de 1986
	Autorizado su uso para descontaminar agua destinada a consumo humano.	Real Decreto 140/2003
Francia	Autorizado su uso como coadyuvante tecnológico en tripas.	(Arrêté del Ministère de l'Économie, des Finances et de l'Industrie, 2006)
	Evaluación toxicológica favorable como coadyuvante tecnológico en la fabricación de lactosuero de leches infantiles.	(AFSSA, 2005, 2007)
	Evaluación toxicológica favorable, en solución junto con ácido peracético y ácido acético, para la descontaminación microbiana de harinas.	(AFSSA, 2006, 2010)
Estados Unidos	Reconocido como GRAS (<i>Generally Recognized As Safe</i>) (21 CFR 184.1366) por la FDA (<i>Food and Drug Administration</i>), autorizando su uso en leche (0,05%), lactosuero (0,04%), queso de lactosuero coloreado con annato (0,05%), almidón (0,15%), jarabe de maíz (0,15%) y en emulsionantes (1,25%).	21 CFR 184.1366
	Autorizado su uso (27 CFR 240.1051) en vino (3 ppm) para facilitar fermentaciones secundarias, con la condición de que el producto final no contenga residuos, y para eliminar el color del jugo de uva roja o negra (500 ppm).	(FDA, 2011)
	Autorizado para el tratamiento de órganos y canales de pollo (21 CFR 173.370).	21 CFR 173.370
	Incluido en la base de datos de aditivos alimentarios (EAFUS) y en la lista de aditivos "indirectos" utilizados en sustancias en contacto con alimentos (CFSAN), ambas de la FDA.	–
Australia y Nueva Zelanda	Autorizado su uso como coadyuvante tecnológico (agente blanqueante) en alimentos, estableciéndose un residuo máximo de 5 mg/kg (ppm).	(ANZFSC, 2002)
Japón	Autorizado como agente blanqueante para todo tipo de productos alimenticios, estableciéndose como limitación de uso que no queden residuos en el producto final.	(FFCR, 2010)
Taiwán	Autorizado como agente higienizante en todos los productos alimenticios, excepto en harinas, siempre que no queden residuos de este agente en el alimento destinado al consumo humano.	(TFDA, 2009)

Además, en un informe emitido por el *Scientific Committee on Consumer Products* (SCCP) de la Dirección General de la Salud y Consumidores de la Comisión Europea (DG SANCO) se declara que el uso de dentífricos, enjuagues bucales y blanqueadores dentales que contengan hasta un 0,1% de peróxido de hidrógeno no supone un riesgo para la salud de los consumidores, y los tratamientos para blanqueo dental supervisados por un dentista pueden llevar hasta un 6% (SCCP, 2007).

Consideraciones sobre los estudios y datos relativos a la inocuidad del uso de peróxido de hidrógeno

1. Toxicocinética

Tanto la cinética como el metabolismo del peróxido de hidrógeno han sido objeto de estudio por parte del *European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals* (ECETOC, 1992). El peróxido de hidrógeno es un producto normal del metabolismo celular aeróbico como resultado de un número de reacciones enzimáticas. En condiciones fisiológicas normales la producción de peróxido de hidrógeno en el hígado es de unos 90 nmol/min/g de hígado.

Hay dos enzimas principales que metabolizan el peróxido de hidrógeno, la catalasa y la glutatión-peroxidasa que controlan la concentración de peróxidos. En lo que respecta a la catalasa, se destaca que se encuentra localizada principalmente en los peroxisomas y su actividad más alta se encuentra en el duodeno, hígado, riñones, membranas mucosas y tejidos altamente vascularizados. En su presencia, el peróxido de hidrógeno se descompone en agua y oxígeno, siendo la tasa de descomposición en el plasma humano de, aproximadamente, 0,01-0,06 mmol/l/min. La catalasa descompone altas concentraciones de peróxido de hidrógeno mientras que la glutatión-oxidasa es más eficaz sobre bajas concentraciones. La glutatión-peroxidasa se encuentra localizada en las mitocondrias y reduce el agua oxigenada a agua oxidándose a glutatión disulfuro.

En presencia de metales de transición, el peróxido de hidrógeno puede ser reducido, vía reacción de *Haber-Weiss* a radicales hidroxilo altamente reactivos y que pueden provocar una peroxidación lipídica. La reactividad oxidativa del peróxido de hidrógeno sobre moléculas biológicas como carbohidratos, proteínas, ácidos grasos o ácidos nucleicos no es significativa en ausencia de dichos metales de transición.

Una sensibilidad acrecentada de los eritrocitos frente al agua oxigenada se observa en casos de deficiencia de estas enzimas (acatalasemia y G6P-deshidrogenasa).

Aunque en algunos estudios se observó que el agua oxigenada incrementaba la actividad enzimática en tejidos de roedores, tal actividad no fue corroborada por otros estudios (ECETOC, 1992).

2. Efectos sobre los alimentos

En lo que se refiere a este aspecto, el Comité Científico estima que uno de los principales aspectos a considerar es el potencial tóxico de los productos formados como consecuencia de la utilización del peróxido de hidrógeno, especialmente metabolitos procedentes de oxidación (potencial formación de óxidos de colesterol o peróxidos).

Cefalópodos

Como posibles efectos indeseables, el solicitante indica que durante el tratamiento con agua oxigenada podrían modificarse los componentes del cefalópodo. Según la Tabla de composición remitida, los contenidos de grasa y colesterol que figuran para calamar, pulpo y sepia, oscilan entre 0,8-1,4 g/100 g y 112-233 mg/100 g, respectivamente. Los valores medios indicados de grasa y colesterol en cefalópodos, son 1,3 g y 215 mg/100 g, respectivamente. Debido al uso de agua oxigenada, existe un mayor riesgo de oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados lo que daría lugar a sabor a rancio y cierta pérdida de valor nutritivo. Sin embargo, los cefalópodos tienen una cantidad total de grasa muy baja, localizada casi toda en las vísceras que se eliminan durante el acondicionamiento y antes del tratamiento con este agente. El uso de peróxido de hidrógeno, por otra parte, podría aumentar el contenido de óxidos de colesterol en estos productos.

Respecto a las proteínas, se indica que sólo serían susceptibles de modificarse los aminoácidos azufrados, metionina y cisteína (su grupo -SH se oxidaría y formaría cistina, reacción que tiene lugar del mismo modo en el metabolismo humano).

Los efectos sobre los carbohidratos son nulos. En lo que respecta a las vitaminas, se indica que se destruye vitamina C aunque ninguno de los alimentos considerados son fuentes relevantes de esta vitamina.

Hemoderivados

Los datos aportados por el solicitante indican que, en el caso de la sangre, los contenidos de grasa y de colesterol son 0,1 g y 190 mg/100 g, respectivamente. Los resultados analíticos concluyen que el producto decolorado contiene algo más de cenizas a consecuencia del ajuste de pH, es más soluble y menos rojo, no se observan cambios sustanciales en los aminoácidos, el proceso de decoloración contribuye a reducir el número de bacterias totales presentes en el producto final, siendo además negativos los resultados para el índice de peróxidos.

3. Estudio del efecto del peróxido de hidrógeno sobre el contenido de óxidos de colesterol

Teniendo en cuenta los datos aportados por el solicitante, el Comité Científico considera que, aunque los contenidos de grasa en estos alimentos son bajos, los de colesterol no son despreciables por lo que se debe analizar el efecto del peróxido de hidrógeno sobre este componente.

La determinación de óxidos de colesterol es compleja debido a los bajos contenidos, la dificultad de su purificación y separación, su inestabilidad y la poca disponibilidad de patrones. El Comité Científico considera que, siguiendo las directrices europeas, sería conveniente proceder a la correcta identificación de los mismos por espectrometría de masas.

Gil et al. (2004) hacen una recopilación de los trabajos llevados a cabo por distintos autores en donde se especifican los contenidos de varios óxidos de colesterol encontrados en carne y productos cárnicos así como la enorme variabilidad existente según la especie que se considere. Por todo ello, concluyen que la diferente sensibilidad de las técnicas analíticas empleadas para la determinación de los óxidos de colesterol es una de las principales causas de tal variación y, por lo tanto, hay que seguir avanzando en la búsqueda de una mayor efectividad de las mismas.

Para el control de la presencia de óxidos de colesterol se recomienda, en general, realizar una separación de esa fracción, previa al análisis cromatográfico final. Se considera que la GC-MS y GC-MS/MS, previa derivatización o directamente, son los métodos de elección para la determinación de óxidos de colesterol, previa separación de triglicéridos por fase sólida (Calvo et al., 2003).

A la luz de la bibliografía consultada (Valenzuela et al., 2002), es posible concluir que los óxidos de colesterol deben considerarse productos indeseables en nuestra alimentación, tal como se considera en la actualidad a los ácidos grasos saturados, a los productos de oxidación de los ácidos grasos, y a los isómeros geométricos y posicionales *trans* (Valenzuela et al., 1995). Entre los efectos biológicos que se atribuyen a los óxidos de colesterol cabe citar: inhibición de la síntesis celular del colesterol; cambios en la fluidez de las membranas; inducción de apoptosis; inhibición de la síntesis de ADN; alteración de la homeostasis del calcio; induce agregación de trombina; posible mutagenicidad y una aterogenicidad mayor que la del colesterol.

La formación de óxidos de colesterol no depende exclusivamente de la acción del agua oxigenada, sino que la mayor parte de técnicas de procesado, especialmente el cocinado y los tratamientos de irradiación, incrementan drásticamente la velocidad de formación (especialmente la combinación temperatura/presencia de oxígeno). Por otra parte, la síntesis de óxidos de colesterol puede verse reducida, tanto por técnicas de envasado en atmósferas protectoras y/o almacenamiento en congelación, como mediante la utilización de antioxidantes.

No se ha especificado una ingesta máxima de óxidos de colesterol, aunque en general, independientemente de lo indicado por Valenzuela et al. (2002), las cantidades encontradas en los alimentos están por debajo de las que se podrían suponer que son perjudiciales para la salud (Astiasarán et al., 2006). En este sentido los mismos autores, Astiasarán et al. (2006), proporcionan datos de contenidos totales de óxidos de colesterol en muestras cárnicas cocinadas que oscilan entre 0,522 y 1,027 mg/100 g. Asimismo, proporcionan datos en langostinos sometidos a distintos tratamientos: frescos (33,15 ppm), congelados (2,38 ppm), frescos plancha (55,43 ppm) y congelados plancha (13,06 ppm). Además, se indica que existen estudios donde se establece como límite seguro <0,1 mg/día, aunque esta referencia no está avalada por evidencias científicas y, a su vez, indican que otros autores señalan como peligrosos porcentajes de oxidación referidos al colesterol superiores al 0,5%, siendo esta cifra solo superada por el salmón cocinado al microondas, con un valor de 0,80% (Astiasarán et al., 2007). Otros datos aportados en este trabajo son: pescados (salmón y langostinos) y carnes (hamburguesas, pechugas de pollo, lomo y salchichas tipo *frankfurt*) que en crudo mostraron contenidos bajos de óxidos de colesterol (0,003-0,552 mg/100 g alimento), incrementándose significativamente tras el cocinado (hasta 0,7 mg/100 g alimento). El cocinado con microondas supuso el mayor incremento de óxidos de colesterol en comparación con la fritura, plancha y asado. El almacenamiento a vacío disminuyó drásticamente la formación de óxidos de colesterol. Asimismo, se concluye que "los demostrados efectos negativos de los óxidos de colesterol, junto con la evidencia científica de su formación en los alimentos y de su absorción a partir de los mismos, hace que sea necesario conocer y controlar la ingesta de este tipo de compuestos en la dieta habitual".

En este sentido, como indicador de la pérdida de colesterol y consiguiente formación de óxidos, el solicitante aporta información sobre el porcentaje de recuperación de un patrón de colesterol después

del tratamiento con peróxido de hidrógeno en distintas condiciones. A concentraciones superiores (3,3%) a la máxima propuesta por el solicitante, las pérdidas de colesterol y, por tanto, la formación de óxidos de colesterol, son mínimas (1%), que se supone serán mucho menores en el caso del tratamiento de matrices complejas. Únicamente cuando se utilizan concentraciones muy superiores se aprecian pérdidas de colesterol, que pueden llegar a un 11% cuando se aplica peróxido de hidrógeno (33%) directamente sobre un residuo seco de colesterol.

A la vista de estas informaciones, el Comité Científico considera que, puesto que el contenido de óxidos de colesterol en los alimentos depende de varios factores como son la complejidad de las materias primas, tratamientos culinarios, proceso de conservación, etc., no es posible establecer un límite para su presencia aplicable a todos los alimentos objeto de evaluación en este informe. No obstante, y aún teniendo en cuenta que en ningún caso se establecen por parte de las normativas consideradas en los antecedentes un límite para estas sustancias, sería conveniente que se minimizase su formación y deberían ser objeto de un estudio para contemplar de forma general la presencia de óxidos de colesterol en los alimentos.

Estudio del perfil de óxidos de colesterol en cefalópodos y hemoderivados tratados con peróxido de hidrógeno

Con este objeto, el solicitante presenta un estudio que se llevó a cabo con el fin de determinar si los perfiles de óxidos de colesterol cambiaban significativamente cuando muestras de cefalópodos y hemoderivados se sometían a tratamiento con peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

En este estudio se utilizó como método de análisis el validado por Menéndez et al. (2008). Siguiendo las recomendaciones analíticas mencionadas anteriormente (apartado 3), se realizó una separación de la fracción de interés de los triglicéridos mediante fase sólida, el extracto se derivatizó y se sometió a una cromatografía de gases. La identificación y confirmación de los analitos se llevó a cabo por espectrometría de masas (GC-MS), cumpliendo las directrices de la Decisión 2002/657/CE (UE, 2002). También es importante destacar que para paliar cualquier posible sesgo, se tomo la precaución de analizar las muestras sometidas a tratamiento en iguales condiciones que las control, para poder descartar posibles artefactos generados durante el análisis.

El estudio se llevó a cabo sobre un total de 134 muestras que incluyeron hemoderivados ($n=9$) y tres tipos de cefalópodos: pota ($n=66$), potón ($n=37$) y sepia ($n=22$). Se compararon muestras que no habían sufrido ningún tipo de tratamiento con muestras enviadas al laboratorio por los industriales y que habían sido tratadas con disoluciones acuosas de peróxido de hidrógeno al 0,05% y se compararon también con muestras tratadas en el laboratorio siguiendo las instrucciones de los comerciales al 0,05% (durante 12 y 24 horas) y al 35% (12 horas) para simular unas condiciones muy desfavorables. Respecto a los hemoderivados, las muestras enviadas al laboratorio por los industriales habían sufrido un tratamiento con peróxido de hidrógeno al 0,75% durante 15-30 minutos.

De dicho estudio se concluye que las muestras de cefalópodos frescas, las muestras tratadas enviadas por los industriales y las muestras tratadas en el laboratorio a las concentraciones propuestas, no presentan diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) en sus perfiles de óxidos de colesterol.

Hay diferencias significativas en la composición de algunos óxidos de colesterol entre los distintos tipos de matrices, pero estas diferencias ya se observan en los productos sin tratar.

Los óxidos de colesterol mayoritarios resultaron ser los epóxidos de colesterol, β -epoxi y α -epoxi y el 7-cetocolesterol, lo que coincide plenamente con lo hallado en otros alimentos. El 25-hidroxicolesterol, que está reputado como uno de los más tóxicos, no se ha detectado en las muestras sin tratar ni en las tratadas con peróxido de hidrógeno del 0,05%. El Colestanotriol se encontró en las muestras frescas siempre a concentraciones muy bajas, inferiores a las encontradas en otros alimentos según la bibliografía consultada, además estos contenidos no aumentaron significativamente en las muestras tratadas.

Respecto a los hemoderivados, hay que señalar que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre las muestras sin tratar y las tratadas con peróxido de hidrógeno.

Los niveles de óxidos de colesterol en las muestras de hemoderivados sin tratar resultan algo más altos que los que se encuentran habitualmente en los alimentos listos para su consumo o cocinado, pero esto se debe, por una parte, a que se trata de un producto que se deseca por atomización a altas temperaturas (220-250 °C) lo que quizás explique esos valores, pero por otra parte hay que destacar que este producto no se consume como tal sino que se trata de un preparado alimenticio "concentrado". Hay que tener en cuenta que estos hemoderivados son productos que se utilizan como ingredientes en muy pequeñas cantidades en la elaboración de productos cárnicos, del orden de 0,5-0,8 g/kg en la masa cárnica, esto es menos de un 1% de la masa cárnica que posteriormente se procesa. Así que los contenidos de óxidos de colesterol en el producto final son muchísimo menores. Además, se podría añadir que en un estudio realizado por el solicitante sobre el efecto del tratamiento con peróxido de hidrógeno al 3%, se demuestra que no se afecta ni al valor nutritivo ni a la digestibilidad del mismo (APC Europe, 2005).

En una reciente revisión (Otaegui et al., 2010), se hace una recopilación de los contenidos de óxidos de colesterol en diferentes alimentos en fresco o sometidos a algún tratamiento industrial. Así, citando algunos ejemplos, entre los productos lácteos se encuentran contenidos de 13,7-27,3 $\mu\text{g/g}$ en mantequilla (Pie et al., 1990) o 1,1 $\mu\text{g/g}$ en leche entera en polvo (Angulo et al., 1997); entre los relacionados con huevo, se indican cantidades de 3,3-3,8 $\mu\text{g/g}$ en huevo líquido pasteurizado (Guardiola, 1995) o 43,8-52,0 $\mu\text{g/g}$ grasa en pasta de huevo desecada (Verardo et al., 2010). Entre los productos cárnicos los intervalos van desde 0,1 $\mu\text{g/g}$ en carne de ternera (Boselli et al., 2009), 0,2 $\mu\text{g/g}$ en carne de pollo (Zubillaga y Marker, 1991), entre 0,5-10,5 $\mu\text{g/g}$ en jamón fresco y 0,8 $\mu\text{g/g}$ en jamón curado (Sánchez et al., 2010) o entre 0,6-18,7 $\mu\text{g/g}$ en mortadela (Novelli et al., 1998). En pescados y productos relacionados se indican cantidades de 0,7 $\mu\text{g/g}$ grasa en salmón (Echarte et al., 2001), 33,6 $\mu\text{g/g}$ en anchoas (Shozen et al., 1997), 19,4 $\mu\text{g/g}$ en sardinas brasileñas (Saldanha et al., 2008), 119,9 $\mu\text{g/g}$ grasa en atún enlatado (Zunin et al., 2001) y 18,1 mg/100 g en gambas secadas al sol (Soto et al., 2008).

En el estudio que aquí se presenta los contenidos totales de óxidos de colesterol en las muestras en fresco resultaron ser para la pota de 0,6223 $\mu\text{g/g}$, para el potón 2,2384 $\mu\text{g/g}$ y para la sepia 0,2714 $\mu\text{g/g}$, es decir, no muy diferentes de los encontrados en otros productos en fresco, incluso se les podría situar entre los alimentos con valores más bajos y, por supuesto, entre los menores encontrados entre los productos de la pesca referenciados. En el caso del potón los valores son un poco más altos porque además del manto, se analizaron los rejos incluyendo su piel y la grasa que hubiera debajo.

Por otra parte, los estudios realizados en alimentos ponen de manifiesto una relación directa entre la intensidad del calor y la mayor formación de óxidos de colesterol (Osada et al., 1993) (Otaegui et

al., 2010) y que, además, los alimentos cocinados y después almacenados en congelación presentan mayores contenidos que las mismas muestras crudas almacenadas en congelación, lo que significa que el cocinado incluso puede ser un promotor de la oxidación durante el almacenado (Conchillo et al., 2005). En el trabajo de Osada et al. (1993), en el que no se encontraron óxidos de colesterol en calamares frescos, se obtuvieron valores de 0,146 $\mu\text{g/g}$ en calamar seco y de 0,11 $\mu\text{g/g}$ en calamar enlatado cocido ($n=3$). Respecto a los tratamientos sufridos por otros pescados y productos relacionados, Ohshima et al. (1993) indican valores totales de óxidos de colesterol para anchoas saladas y desecadas de 127 $\mu\text{g/g}$ peso seco frente a anchoas cocidas y desecadas de 188 $\mu\text{g/g}$ peso seco (incremento de 61 $\mu\text{g/g}$ peso seco). Echarte et al. (2001) compararon salmón fresco, salmón frito en aceite de oliva, salmón frito en aceite de soja y salmón asado encontrando un incremento de 2,24 $\mu\text{g/g}$ grasa en el frito en aceite de oliva, un incremento de 2,61 $\mu\text{g/g}$ grasa en el frito en aceite de soja y un incremento de 6,64 $\mu\text{g/g}$ grasa en el asado. Echarte et al. (2005) reportaron que los valores de óxidos de colesterol totales de los langostinos comercializados frescos se incrementaban en 22,28 μg por g grasa después de someterlos a la plancha y que los langostinos comercializados congelados sólo incrementaban su contenido de óxidos de colesterol 10,68 $\mu\text{g/g}$ grasa después de cocinarlos a la plancha. Saldanha y Bragagnolo (2007) observaron que los contenidos totales de óxidos de colesterol aumentaban significativamente en filetes de merluza de la Patagonia crudos desde 8,00 $\mu\text{g/g}$ peso seco el primer día de almacenamiento hasta 78,10 $\mu\text{g/g}$ peso seco al cabo de 120 días de almacenamiento en congelación a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ (incremento 70,1 $\mu\text{g/g}$ peso seco) y en el caso de las muestras asadas a la parrilla desde 18,50 hasta 122,30 $\mu\text{g/g}$ peso seco al cabo de 120 días de almacenamiento a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ (incremento 103,8 $\mu\text{g/g}$ peso seco). El anterior estudio se repitió con sardinas brasileñas (Saldanha et al., 2008) corroborando que los contenidos totales de óxidos de colesterol aumentan significativamente en sardina brasileña cruda desde 19,4 $\mu\text{g/g}$ peso seco el primer día de almacenamiento hasta 115,2 $\mu\text{g/g}$ peso seco tras 120 días de almacenamiento a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ (incremento 95,8 $\mu\text{g/g}$ peso seco) y en el caso de sardina a la parrilla desde 41,6 hasta 177,9 $\mu\text{g/g}$ peso seco al cabo de 120 días de almacenamiento a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ (incremento 136,3 $\mu\text{g/g}$ peso seco).

El ahumado también parece afectar a los contenidos de óxidos de colesterol y, así, Pickova y Dutta (2003) indican valores de 6,23 $\mu\text{g/g}$ de grasa en huevas de salmón fresco frente a 93,06 $\mu\text{g/g}$ de grasa en huevas de bacalao ahumado. Ohshima et al. (1993) señalan contenidos totales de óxidos de colesterol para salmón ahumado de 26,8 $\mu\text{g/g}$ peso seco.

En el estudio que el solicitante presenta, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los contenidos totales de óxidos de colesterol de muestras de cefalópodos y hemoderivados sin tratar y tratadas, por tanto se concluye que el peróxido de hidrógeno no parece ejercer una gran influencia en su formación en estos alimentos. De hecho, según los resultados obtenidos, en algunos casos no se produce prácticamente ningún incremento de los óxidos de colesterol respecto a las muestras en crudo y en los que sí se produce (por ejemplo en los tratados en el laboratorio largo tiempo, 24 horas) éste es muy pequeño. Muy posiblemente se deba a que el tratamiento con peróxido de hidrógeno recomendado por los fabricantes, implica bajas cantidades de peróxido de hidrógeno, y además parece que éste se descompone rápidamente. Sin embargo, sí parece importante establecer un nivel de tratamiento con peróxido de hidrógeno ya que, aunque los valores de óxidos de colesterol

encontrados en las condiciones más desfavorables (el tratamiento directo en cefalópodos con peróxido de hidrógeno al 35%) no son altas, sí que deberían controlarse.

4. Efecto del peróxido de hidrógeno sobre las proteínas

Aunque desde el punto de vista biomédico los estudios sobre el metabolismo de oxidación de proteínas han avanzado bastante, hay muy pocos estudios que aclaren y caractericen cómo es la oxidación de las proteínas presentes en los alimentos y cuál es su consecuencia.

La oxidación de las proteínas se conoce desde principios del siglo XX (Dakin, 1906) siendo objeto de abundantes investigaciones durante esos primeros años. Sin embargo, pronto se abandonaron estos temas debido a la gran complejidad puesta en evidencia durante su estudio (falta de identificación fiable de los numerosos centros de acción, complejidad en la explicación de los mecanismos de acción, falta de estabilidad de los derivados y sobre todo la falta de métodos de análisis fiables, etc.) (Davies, 2005).

El ataque de los agentes oxidantes a las proteínas musculares, entre otros, pasa principalmente por pérdidas del grupo -SH y la generación de compuestos carbonilos (aldehídos o cetonas) (Xiong, 2000). Aunque el peróxido de hidrógeno es un conocido agente oxidante, pocos estudios hay que determinen su efecto sobre las proteínas presentes en alimentos. Levine y Ciolino (1997) indican que el tratamiento con peróxido de hidrógeno de cultivos biológicos celulares induce modificaciones del ADN, pero destacan que es un pobre inductor de la generación de compuestos carbonilos por parte de las proteínas a menos que se aumenten los contenidos celulares de hierro mediante adiciones de forma extracelular. A este respecto, hay que indicar que en la mayor parte de los cefalópodos el hierro no es abundante habida cuenta de la estructura de su sistema circulatorio.

Los estudios recientes realizados sobre modelos alimentarios indican que la oxidación de las proteínas podría dar lugar a alteraciones en la gelificación, emulsificación, viscosidad, solubilidad e hidratación (Armenteros, 2010) o bien a pérdida de aromas, color, deterioro de la estructura, y pérdida de ternura y jugosidad de los productos cárnicos (Lund et al., 2007). Así, Rowe et al. (2004) han sugerido que la oxidación de las proteínas post mórtem influye en el deterioro de la textura de carne de ternera refrigerada. Carballo et al. (1991), Perlo et al. (1995), Jo et al. (2000) y Fernández et al. (2003) indicaron en sus trabajos que el deterioro del color durante el almacenamiento en refrigeración de carnes cocinadas se podría explicar por la degradación de algunos nitrosopigmentos causados por el proceso oxidativo, aunque ninguno indica qué mecanismo relaciona la oxidación de las proteínas con este efecto. Por otra parte, la oxidación de las proteínas puede afectar a su valor nutricional, probablemente debido bien a la destrucción de aminoácidos bien porque al modificar las proteínas se puede variar su digestibilidad (Estévez, 2005). En su tesis doctoral, Estévez (2005) concluye que el deterioro oxidativo de las proteínas en los productos cocidos influye sobre determinados parámetros de calidad provocando la decoloración de salchichas cocidas durante su refrigeración debido a la degradación de los pigmentos hémicos y también el deterioro de la textura de patés y salchichas debido a la posible generación de enlaces cruzados entre proteínas y la pérdida de su funcionalidad.

Sin embargo, otros autores recuerdan que, precisamente, se puede utilizar una oxidación de proteínas controlada para mejorar las propiedades de textura de determinados alimentos o para crear proteínas modificadas que sirvan como ingredientes en la elaboración de alimentos (Andersen, 2001).

Las técnicas que se utilizan para detectar el daño oxidativo en proteínas de origen animal son en su mayoría adaptadas de aquellas desarrolladas en la investigación biomédica. Así pues, la cuantificación de los grupos carbonilo a través del método de la dinitrofenilhidrazina (DNPH) se ha convertido en el procedimiento de uso generalizado y rutinario en gran variedad de productos cárnicos como la carne fresca, las emulsiones cárnicas y los productos cárnicos curados (Estévez y Cava, 2004) (Ventanas et al., 2006) (Lund et al., 2007). Sin embargo, Estévez (2005) y Armenteros (2010) demuestran que estos métodos sobreestiman notablemente la oxidación proteica ya que no son específicos, siendo más fiables los métodos de análisis por espectrometría de masas que identifica de forma inequívoca los marcadores de la oxidación (Armenteros et al., 2009) (Estévez et al., 2009). Por tanto, este hecho hay que tenerlo muy en cuenta a la hora de valorar los datos que hasta ahora se encontraban en la bibliografía científica (posiblemente sobreestimados) sobre la oxidación proteica en los alimentos.

La Agencia Francesa de Seguridad Sanitaria de los Alimentos (AFSSA) dispone de estudios que indican que tratamientos del lactosuero con peróxido de hidrógeno destinado a alimentos infantiles, a concentraciones de 200 mg de peróxido de hidrógeno/l lactosuero, no implicaban modificaciones mayores ni de la oxidación proteica, ni de la oxidación del colesterol, ni de los residuos de cisteína, en comparación a los obtenidos por tratamientos térmicos tales como la pasterización (AFSSA, 2005).

Finalmente, hay que señalar que en la literatura científica sobre este tema, a menudo se indica que la oxidación proteica suele ir paralela a la oxidación lipídica, por lo que se sugiere que ambos mecanismos podrían estar interconectados de alguna manera (Estévez, 2005) (Armenteros, 2010). Armenteros (2010) encuentra una buena correlación entre ambas oxidaciones en productos cárnicos, por ejemplo. Se podría entonces colegir que cuando la oxidación lipídica no es muy importante como ocurre en los estudios aquí presentados sobre cefalópodos y hemoderivados, tampoco lo será la oxidación proteica. Quizás por eso la mayor parte de los autores se centran en el estudio de la presencia de óxidos de origen lipídico habida cuenta de las dificultades en determinar la oxidación proteica, tal y como se ha comentado anteriormente.

5. Estudios de inocuidad

En lo que respecta a la inocuidad del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), se destaca que ha sido objeto de estudio, entre otros, por parte del Comité para los Medicamentos Veterinarios (*Committee for Veterinary Medicinal Products*, CVMP) de la Agencia Europea de Medicamentos (EMA, 1996) y por parte del Comité Científico de Toxicidad, Ecotoxicidad y Medio Ambiente (CSTEE, 2001). En el caso del CSTEE (2001) se estima una ingesta a través de los productos alimenticios de entre 0,033 y 0,13 mg H_2O_2 /kg peso corporal/día, estableciéndose además un nivel sin efecto adverso observable (*No Observed Adverse Effect Level*, NOAEL) de 30 mg H_2O_2 /kg p.c., a partir de un ensayo en ratas. No se indica ningún umbral de consumo seguro.

Posteriormente, el Comité Científico Veterinario de Salud Pública (SCVPH, 2003) evaluó la eficacia, y posible toxicidad de una solución de peroxiacidos, entre los que se incluye el peróxido de hidrógeno, utilizada en el tratamiento de canales de pollo. La citada evaluación se basó en los residuos que quedaban tras el tratamiento, no teniéndose en cuenta la posible formación de compuestos de reacción.

El SCVPH (2003) considera un NOAEL para el peróxido de hidrógeno de 26 mg H_2O_2 /kg p.c./día, aunque no se asocia ninguna ingesta diaria tolerable (*Tolerable Daily Intake*, TDI). La estrategia que

usa para evaluar el riesgo asociado a la ingesta de este compuesto es la del margen de seguridad, considerando además como inapreciable el riesgo estimado para la ingesta de los residuos de peróxido de hidrógeno.

La opinión del SCVPH ha sido, posteriormente, objeto de revisión por parte de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2005) llegando a unas conclusiones similares.

En cuanto a la evaluación toxicológica, EFSA considera el mismo NOAEL que el SCVPH para el peróxido de hidrógeno estableciendo:

- 26 mg/kg p.c./día para machos y 37 mg/kg p.c./día para hembras, identificados en un estudio de 90 días, en ratones catalasa-deficientes.
- 30 mg/kg p.c./día, en un estudio de ratas alimentadas por sonda.

La potencial exposición a peroxiacidos y peróxido de hidrógeno considerada por EFSA, basada en datos de consumo de carne por parte de adultos europeos, es de 0,6 µg/kg p.c./día para el consumidor medio, y de 1,1 y 1,5 µg/kg p.c./día para los percentiles 95 y 99 de sobreconsumo (peso corporal medio de 60 kg). EFSA indica, además, en consonancia con el SCVPH, que los subproductos generados por el tratamiento de las soluciones de peroxiacidos (incluyendo el peróxido de hidrógeno) no entrañan riesgos inaceptables de seguridad.

Junto a los aspectos anteriormente citados se puede destacar también, en relación a la evaluación de su inocuidad, que el peróxido de hidrógeno esta considerado como no carcinogénico por la *International Agency for Research on Cancer* (IARC, 1999).

Consideraciones sobre los estudios y datos relativos a la presencia de residuos de peróxido de hidrógeno

El solicitante presentó un estudio inicial sobre la posible presencia de residuos de peróxido de hidrógeno en hemoderivados y cefalópodos.

Sin embargo el Comité Científico, habida cuenta del bajo número de muestras analizadas y de los métodos utilizados, etc., lo consideró insuficiente.

Para la determinación de la presencia de residuos de peróxido de hidrógeno el Comité considera más adecuado utilizar los métodos enzimático-espectrofotométricos, ya que son más fiables y fáciles de implantar para llevar a cabo los autocontroles en las industrias alimentarias.

A este respecto, el solicitante presentó posteriormente otro estudio más completo sobre la detección de residuos de peróxido de hidrógeno en el que se ensayaron varios métodos, pero siempre bajo la premisa de que fueran métodos cuyos protocolos de aplicación fuesen de utilidad en las industrias transformadoras.

En este estudio se concluyó que como métodos cualitativos se recomendarían tanto las tiras reactivas comerciales para la detección de H₂O₂ (*Quantofix*) (Límite de detección: 1,5 mg H₂O₂/kg cefalópodo) como el método colorimétrico del yoduro potásico (Límite de detección: 0,6 mg H₂O₂/kg cefalópodo) y como método cuantitativo un método basado en la detección espectrofotométrica del complejo coloreado xilenol-Fe³⁺, método disponible comercialmente (*PeroxiDetect® Kit*) (Límite de detección: 1 mg H₂O₂/kg cefalópodo). Estos métodos son rápidos y fáciles de aplicar en cualquier laboratorio de

empresa. Se presentó la validación del método cuantitativo. A continuación se procedió a aplicar estos métodos para la detección de residuos de peróxido de hidrógeno en cefalópodos. En concreto, sobre muestras de pota, sepia y potón (n=50) que habían sido tratadas experimentalmente tanto en la industria como en el laboratorio a concentraciones de 0,05% de peróxido de hidrógeno, correspondientes a las indicadas por el solicitante para este tipo de alimentos.

En este trabajo se concluyó que no se detectó en caso alguno la presencia de peróxido de hidrógeno en ninguna de las muestras de cefalópodo por los métodos propuestos. Probablemente se deba a que el peróxido de hidrógeno reacciona muy bien con la materia orgánica y de forma bastante rápida en las condiciones del tratamiento: la cantidad de materia orgánica es muy alta respecto a la de peróxido de hidrógeno que se propone utilizar y el pH del extracto es bastante alcalino (pH 9,3) lo que constituye un factor que acelera la descomposición de este agente. Estos dos pueden ser factores que, entre otros, favorezcan la no aparición de residuos en estos alimentos una vez que dejan de estar sumergidos en la disolución de tratamiento. Por tanto, el peróxido de hidrógeno a las concentraciones de tratamiento propuestas para los cefalópodos no deja residuos y se considera que actúa como coadyuvante tecnológico.

Estos métodos no se aplicaron a muestras de hemoderivados, puesto que después del tratamiento con peróxido de hidrógeno, este producto sufre un proceso de desecado por atomización a altas temperaturas (220-250 °C) lo que supone la total ausencia de residuos de peróxido de hidrógeno en las mismas. Hecho demostrado ya por un estudio realizado en este producto por APC Europe (2005).

Estudio de consumo y evaluación del nivel de exposición del consumidor

1. Cálculo de la ingesta diaria estimada (IDE)

Con objeto de llevar a cabo una evaluación de la exposición es necesario realizar una estimación de la ingesta diaria de peróxido de hidrógeno como consecuencia de la posible presencia de residuos en los alimentos tratados.

Los datos disponibles indican que no se detectan residuos de peróxido de hidrógeno en los alimentos objeto del presente informe. Si se considera el peróxido de hidrógeno como coadyuvante tecnológico el residuo debería ser sólo el técnicamente inevitable y teniendo en cuenta el límite de detección de la técnica analítica más sensible utilizada (0,6 mg/kg) los residuos de peróxido de hidrógeno no deberían superar esa concentración. Para el cálculo de la ingesta diaria estimada se pueden considerar dos supuestos: 0,6 mg/kg de peróxido de hidrógeno en el producto dispuesto para su comercialización y 1,5 mg/kg, como situación más desfavorable.

Teniendo en cuenta el consumo medio en adultos de los alimentos o grupos de alimentos objeto del estudio (AESAN, 2006) y un contenido en los alimentos de 1,5 mg/kg de peróxido de hidrógeno como residuo se puede realizar una estimación de la exposición tal y como se establece a continuación (Tabla 3). Los consumos utilizados, corresponden a "solo consumidores" dado el bajo porcentaje de consumidores de los alimentos aquí considerados.

Tabla 3. Estimación de la exposición a peróxido de hidrógeno en adultos

Alimentos	Contenido de H ₂ O ₂ (mg/kg)	Consumo medio en adultos (g por persona y día)	Consumo en adultos percentil 97,5 (g por persona y día)	Evaluación consumo medio adultos (mg H ₂ O ₂ por persona y día)	Evaluación consumo en adultos percentil 97,5 (mg H ₂ O ₂ por persona y día)
Calamares, sepia y similares	1,5	26,34	71,11	0,0395	0,1067
Conservas calamares y similares	1,5	29,07	77,43	0,0436	0,1162
Pulpo	1,5	41,41	89,14	0,0621	0,1337
Sangre	1,5	38,5	117,5	0,0578	0,1763
Consumo total de H₂O₂ (mg por persona y día)				0,2030	0,5328

En las condiciones descritas anteriormente, asumiendo un contenido máximo de residuos de 1,5 mg/kg, el consumo total de peróxido de hidrógeno como residuo en los alimentos objeto de evaluación sería de, aproximadamente, 0,2030 mg por persona y día para el consumidor medio y en el caso de los consumidores extremos (percentil 97,5) de 0,5328 mg por persona y día. Si consideramos el peso medio del adulto de 68,48 kg (AESAN, 2006) la ingesta en mg/kg p.c./día sería de 0,0030 y 0,0078 para consumidor medio y extremo, respectivamente.

Si consideramos un nivel de residuos de 0,6 mg/kg la ingesta diaria estimada para adultos (consumidor medio) sería de 0,0012 mg/kg p.c./día y para el consumidor extremo de 0,0031 mg/kg p.c./día.

Asimismo, en el caso de los niños también se puede realizar una estimación de la exposición teniendo en cuenta el consumo medio (AESAN, 2006) tal y como se establece a continuación (Tabla 4):

Tabla 4. Estimación de la exposición a peróxido de hidrógeno en niños

Alimentos	Contenido de H ₂ O ₂ (mg/kg)	Consumo medio en niños (g por persona y día)	Consumo en niños percentil 97,5 (g por persona y día)	Evaluación consumo medio en niños (mg H ₂ O ₂ por persona y día)	Evaluación consumo en niños percentil 97,5 (mg H ₂ O ₂ por persona y día)
Calamares, sepia y similares	1,5	26,27	74,23	0,0394	0,1114
Conservas calamares y similares	1,5	17,62	46,05	0,0264	0,0691
Pulpo	1,5	49,58	74,1	0,0744	0,1112
Sangre	1,5	0	0	0	0
Consumo total de H₂O₂ (mg por persona y día)				0,1402	0,2916

Asumiendo, al igual que en el caso de los adultos, un nivel máximo de residuos de 1,5 mg/kg, el consumo total en niños de peróxido de hidrógeno como residuo en los alimentos objeto de evaluación sería de, aproximadamente, 0,1402 mg por persona y día y en el caso de los consumidores extremos (percentil 97,5), el consumo total estimado es de 0,2916 mg por persona y día. Considerando el peso medio para niños de 34,48 kg (AESAN, 2006) dicha ingesta correspondería a 0,0041 mg/kg p.c./día para el consumidor medio y 0,0085 mg/kg p.c./día para el consumidor extremo.

Si consideramos un nivel de residuos de 0,6 mg/kg la ingesta diaria estimada para niños (consumidor medio) sería de 0,0016 mg/kg p.c./día y para el consumidor extremo de 0,0034 mg/kg p.c./día.

2. Cálculo del margen de exposición o margen de seguridad

El peróxido de hidrógeno está considerado como no carcinogénico por la *International Agency for Research on Cancer* (IARC, 1999), por lo que a efectos de caracterización del riesgo sólo habría que considerar sus efectos no cancerígenos, comparando la ingesta diaria estimada con la ingesta diaria tolerable (TDI). En ese sentido, el Comité Científico Veterinario de Salud Pública (SCVPH, 2003) estableció un NOAEL para el peróxido de hidrógeno de 26 mg H₂O₂/kg p.c./día, aunque no se asocia ninguna TDI. Dicho NOAEL ha sido utilizado posteriormente por EFSA en otras evaluaciones (EFSA, 2005).

En el informe del SCVPH (2003) se reconoce que cuando no hay una TDI establecida la evaluación debe hacerse aplicando el "margen de seguridad" (*Margin of Safety*, MOS). En este procedimiento, el NOAEL determinado en animales y expresado en mg/kg p.c./día se compara con el nivel al cual el humano está expuesto. Dicho MOS es el cociente entre el NOAEL y la ingesta diaria estimada y en general un MOS de 100 es considerado como un nivel seguro de exposición. Pero, también destaca, el mismo informe (SCVPH, 2003), que en el caso de los peróxidos sería recomendable un MOS de 1.000 teniendo en cuenta la limitada información toxicológica disponible para estos compuestos. Por lo tanto, en este caso se debería considerar un MOS de 1.000 como nivel seguro.

Este procedimiento no toma en cuenta las diferencias de susceptibilidad entre humanos y animales ni entre los mismos animales o seres humanos, por ello, el MOS que indica niveles aceptables es relativamente alto.

En la Tabla 5 se muestra el cálculo del MOS para las condiciones de exposición estimadas en el apartado anterior.

Tabla 5. Estimación del margen de seguridad

Parámetro	Adultos		Niños	
	Consumidor medio	Consumidor extremo	Consumidor medio	Consumidor extremo
Concentración de peróxido de hidrógeno (mg/kg)	1,5 (0,6 mg/kg)	1,5 (0,6 mg/kg)	1,5 (0,6 mg/kg)	1,5 (0,6 mg/kg)
Exposición H ₂ O ₂ (mg/kg p.c./día)	0,0030 (0,0012)	0,0078 (0,0031)	0,0041 (0,0016)	0,0085 (0,0034)
NOAEL (mg/kg/día)	26	26	26	26
Margen de seguridad (MOS)	8.784 (21.849)	3.342 (8.360)	6.388 (15.951)	3.073 (7.692)
Mínimo requerido de MOS	1.000	1.000	1.000	1.000

Por todo ello, se puede deducir que con el nivel de residuo de peróxido de hidrógeno considerado en los alimentos, no existen riesgos ni efectos adversos significativos para la salud.

Conclusiones del Comité Científico

1. En relación a la presencia de residuos de peróxido de hidrógeno:

- El Comité Científico considera que en base a los datos aportados en los diferentes estudios recogidos en este informe en relación al empleo del peróxido de hidrógeno como coadyuvante tecnológico en el procesado de cefalópodos y hemoderivados, en las condiciones propuestas por el solicitante no presenta riesgo para el consumidor.
- Para el control en industrias alimentarias implicadas en el empleo del agua oxigenada como coadyuvante tecnológico, se recomienda que se adopten como métodos más fiables para la valoración de residuos de peróxido de hidrógeno los indicados en este informe: como métodos cualitativos se recomendarían tanto tiras reactivas comerciales para la detección de H₂O₂ como el método colorimétrico del yoduro potásico, y como método cuantitativo un método basado en la detección espectrofotométrica del complejo coloreado xilenol-Fe³⁺, método disponible comercialmente.

2. En relación al aumento y/o formación de óxidos de colesterol en cefalópodos y hemoderivados tratados con peróxido de hidrógeno a las dosis propuestas, este Comité considera que:

- Estos productos ya tienen contenidos intrínsecos cuantificables de óxidos de colesterol y el incremento de los mismos después del tratamiento no es significativo ($p \leq 0,05$) tal y como se demuestra en los estudios aportados al comparar muestras tratadas con peróxido de hidrógeno y sin tratar.
- En relación a la formación de óxidos de colesterol nuevos, en base a los estudios aportados se concluye que los perfiles cromatográficos no aportan significativamente ($p \leq 0,05$) ningún compuesto nuevo antes y después del tratamiento con peróxido de hidrógeno a las dosis propuestas para estos productos.

3. En relación al efecto del peróxido de hidrógeno sobre la oxidación proteica en muestras tratadas, la bibliografía consultada permite concluir que no es importante, puesto que se produce de forma paralela a la oxidación lipídica y ambos mecanismos están interconectados.

4. El empleo del peróxido de hidrógeno por la industria para los usos reseñados y en las condiciones expuestas por el solicitante deberá estar sometido a unas Buenas Prácticas de Elaboración.

Referencias

- AESAN (2006). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Modelo de dieta española para la determinación de la exposición del consumidor a sustancias químicas. Disponible en: http://www.aesan.msc.es/AESAN/docs/docs/notas_prensa/modelo_dieta_espanola.pdf [acceso: 30-4-2010].
- AESAN (2010). Líneas directrices de la documentación precisa para la evaluación de coadyuvantes tecnológicos que se pretenden emplear en la alimentación humana. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 10, pp: 79-93.
- AFSSA (2004). Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'autorisation d'emploi d'une préparation à base de peroxyde d'hydrogène, d'acide acétique et d'acide peracétique dans l'eau de lavage des oeufs coquilles avant cassage. Afssa-Saisine n° 2003-SA-0017.
- AFSSA (2005). Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'autorisation d'emploi d'un traitement par le peroxyde d'hydrogène (dont la destruction est obtenue après son action par l'addition de catalase) en vue de préparer la qualité bactériologique du lactosérum en cours de déminéralisation dans la fabrication de laits infantiles. Afssa-Saisine n° 2004-SA-0294.
- AFSSA (2006). Avis de l'Agence de sécurité sanitaire des aliments relatif aux résultats des essais à l'échelle industrielle en vue d'autoriser l'emploi en tant qu'auxiliaire technologique en alimentation humaine d'une solution à base d'acide peracétique, de peroxyde d'hydrogène, d'acide acétique et deux substances servant comme stabilisateurs dans la solution, en meunerie. Afssa-Saisine n° 2005-SA-0288. Saisine liée n° 2004-SA-0250.
- AFSSA (2007). Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la demande d'autorisation en tant qu'auxiliaire technologique d'un traitement par le peroxyde d'hydrogène (dont la destruction est obtenue après son action par l'addition de catalase) en vue de préparer la qualité bactériologique du lactosérum en cours de déminéralisation dans la fabrication de laits infantiles (à la suite de l'avis Afssa du 21 avril 2005). Afssa-Saisine n° 2005-SA-0373. Saisine liée n° 2004-SA-0294.
- AFSSA (2010). Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'autorisation d'emploi d'une solution à base d'acide peracétique pour la décontamination microbiologique des farines dans le procédé de meunerie du blé, en tant qu'auxiliaire technologique, à la suite de l'avis Afssa du 1er mars 2006. AFSSA saisine n° 2010-SA-0013. Saisine liée n° 2005-SA-0288.
- Andersen, H.J. (2001). Oxidation in heterogenous foods and biological tissues: Impact on food quality and health. 2001 IFT Annual Meeting, June 23-June 27; New Orleans, LA.
- Angulo, A.J., Romera, J.M., Ramirez, M. y Gil, A. (1997). Determination of cholesterol oxides in dairy products. Effect of storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, pp: 4318-4323.
- ANZSC (2002). Australia New Zealand Food Standards Code. Standard 1.3.3 Processing aids, pp: 9. Disponible en: <http://www.foodstandards.gov.au/thecode/foodstandardscode/index.cfm> [acceso: 30-4-09].
- APC Europe (2005). Estudio sobre el uso de agua oxigenada como coadyuvante tecnológico en concentraciones limitadas para decolorar productos sanguíneos de origen porcino. Departamento de I+D.
- Armenteros, M., Heinonen, M., Ollilainen, V., Toldrá, F. y Estévez, M. (2009). Analysis of protein carbonyls in meat products by using the DNPH-method, fluorescence spectroscopy and liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry (LC-ESI-MS). *Meat Science*, 83 (1), pp: 104-112.
- Armenteros, M. (2010). Reducción de sodio en lomo y jamón curados. Efecto sobre la proteólisis y las características sensoriales. Tesis Doctoral, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, y Universidad Politécnica de Valencia, Departamento de Tecnología de Alimentos.
- Arrêté del Ministère de l'Économie, des Finances et de l'Industrie. (2006). Arrêté du 19 de octobre 2006 relatif à l'emploi d'auxiliaires technologiques dans la fabrication de certaines denrées alimentaires. Ministère de l'Économie, des Finances et de l'Industrie. Journal Officiel de la République Française de 2 de diciembre de 2006.

- Astiasarán, I., Ansorena, D., Ruiz, N., Menéndez, M. y Valencia, I. (2006). Formación de óxidos de colesterol en salchichas cocinadas a microondas [Cholesterol oxides formation in frankfurters cooked in microwaves]. Congreso iberoamericano CIBSA. Sevilla.
- Astiasarán, I., Ansorena, D., Maider, E., Conchillo, A. y Menéndez Carreño, M. (2007). Óxidos de colesterol en alimentos cocinados con presencia habitual en nuestra dieta. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 73 (4), pp: 1159-1174.
- Boselli, E., Rodríguez, M.T., Fedrizzi, G. y Caboni, M.F. (2009). Cholesterol photosensitised oxidation of beef meat under standard and modified atmosphere at retail conditions. *Meat Science*, 81, pp: 224-229.
- Calvo, M.V., Ramos, L. y Fontecha, J. (2003). Determination of cholesterol oxides content in milk products by solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 26, pp: 927-931.
- Conchillo, A., Ansorena, D. y Astiasaran, I. (2005). Intensity of lipid oxidation and formation of cholesterol oxidation products during frozen storage of raw and cooked chicken. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 85, pp: 141-146.
- Carballo, J., Cavestany, M. y Jimenez, F. (1991). Effect of lighth on color and reaction of nitrite in sliced pork bologna under different chilled storage temperatures. *Meat Science*, 30, pp: 235-244.
- CSTEE (2001). Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment. Opinion on the results of the Risk Assessment of Hydrogen Peroxide. Opinion expressed at the 26 th CSTEE plenary meeting. C2/JCD/csteep/81. HydrogenPeroxideHH.11092001/D(01).
- CVPH (2003). Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health. Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health on the evaluation of antimicrobial measures treatments for poultry carcasses.
- Dakin, H.D. (1906). The oxidation of amido-acids with the production of substances of biological importance. *Journal of the Biological and Chemistry*, 1, pp: 171-176.
- Davies, J. (2005). Review: The oxidative environment and protein damage. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1703, pp: 93-109.
- ECETOC (1992). European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals. Hydrogen peroxide. Joint Assessment of Commodity Chemicals nº 22. ISSN-0773-6339-22.
- Echarte, M., Zulet, M.A. y Astiasaran, I. (2001). Oxidation process affecting fatty acids and cholesterol in fried and roasted salmon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (11), pp: 5662-667.
- Echarte, M., Conchillo, A., Ansorena, D. y Astiasarán, I. (2005). Óxidos de colesterol en langostinos frescos y congelados, crudos y a la plancha. *Nutrición Hospitalaria*, 20 (4), pp: 293-296.
- EFSA (2005). European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on a request form the Commission related to treatment of poultry carcasses with chlorine dioxide, acidified sodium chlorite, trisodium phosphate and peroxyacids. Question N° EFSA Q-2005-002. *The EFSA Journal*, 297, pp: 1-27.
- EMEA (1996). The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Committee for Veterinary Medicinal Products. Hydrogen Peroxide. EMEA/MRL/061/96-FINAL.
- Estévez, M. y Cava, R. (2004). Lipid and protein oxidation, release of iron from heme molecule and colour deterioration during refrigerated storage of liver pâté. *Meat Science*, 68, pp: 551-558.
- Estévez, M. (2005). Desarrollo de nuevos transformados cárnicos cocidos a partir de carne, hígado y grasa de cerdo Ibérico con antioxidantes naturales. Tesis doctoral. Editada por el Servicio de Publicaciones de la Universidad de Extremadura.
- Estévez, M., Ollilainen, V. y Heinonen, M. (2009). Analysis of Protein Oxidation Markers α -Amino adipic and γ -Glutamic Semialdehydes in Food Proteins Using Liquid Chromatography (LC)-Electrospray Ionization (ESI)-Multistage Tandem Mass Spectrometry (MS). *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*, 57, pp: 3901-3910.
- FDA (2011). Food and Drug Administration. Direct Food Substances Affirmed as Generally Recognized as Safe.

- § 184.1366 Hydrogen peroxide. Disponible en: <http://ecfr.gpoaccess.gov/cgi/t/text/textidx?c=ecfr&sid=10ba70b259398e4c6d52212c9a323a6f&rgn=div8&view=text&node=21:3.0.1.1.14.2.1.102&idno=21> [acceso: 28-4-11].
- Fernández, J.M., Fernández, J. Sayas, E., Sendra, E. y Pérez, J.A. (2003). Effects of storage conditions on quality characteristics of bologna sausages made with citrus fiber. *Journal of Food Science*, 68, pp: 710-715.
- FFCR (2010). The Japan Food Chemical Research Foundation. Information on Food Safety in Japan, Ministry of Health, Labour and Welfare. Establishment of Specifications and Standards Based on the Food Sanitation Law 2006: Food Additives. Standards for Use of Food Additives: Standards Applying Specifically to Individual Additives. Disponible en: [http://www.ffcr.or.jp/zaidan/FFCRHOME.nsf/7bd44c20b0dc562649256502001b65e9/8a4352b95978b195492569990007fbaa/\\$FILE/Standards%20for%20Use%2010Nov10.pdf](http://www.ffcr.or.jp/zaidan/FFCRHOME.nsf/7bd44c20b0dc562649256502001b65e9/8a4352b95978b195492569990007fbaa/$FILE/Standards%20for%20Use%2010Nov10.pdf) [acceso: 30-4-11].
- Gil, M.D., Bañón, S., Laencina, J. y Garrido, M.D. (2004). Cholesterol oxides in meat and meat products: formation determining factors. *Anales de Veterinaria*, 20, pp: 21-34.
- Guardiola, F., Codony, F., Miskin, D., Rafecas, M. y Boatella, J. (1995). Oxysterol Formation in Egg Powder and Relationship with Other Quality Parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43 (7), pp: 1903-1907.
- IARC (1999). International Agency for Research on Cancer. Evaluation Hydrogen Peroxyde, vol. 71, pp: 671.
- Jo, C., Jin, S.K. y Ahn, D.U. (2000). Color changes in irradiated cooked pork sausage with different fat sources and packaging during storage. *Meat Science*, 55, pp: 107-113.
- Levine, R.L. y Ciolino, H.P. (1997). Modification of proteins in endothelial cell death during oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 22, pp: 1277-1282.
- Lund, M.N., Lametsch, R., Hviid, M.S., Jensen, O.N. y Skibsted, L.H. (2007). High oxygen packaging atmosphere influences protein oxidation and tenderness of porcine Longissimus dorsi during chill storage. *Meat Science*, 77, pp: 295-303.
- Menéndez, M., García, C., Astiasarán, I. y Ansorena, D. (2008). Validation of a gas chromatography-mass spectrometry method for the analysis of sterol oxidation products in serum. *Journal of Chromatography*, 864, pp: 61-68.
- Novelli, E., Zanardi, E., Ghiretti, G.P., Campanini, G., Dazzi, G., Madarena, G. y Chizzolini, R. (1998). Lipid and cholesterol oxidation in frozen stored pork, salame milano and mortadella. *Meat Science*, 48, pp: 29-40.
- Orden de 29 de octubre de 1986 por la que se aprueba la norma de calidad para tripas naturales con destino al mercado interior. BOE 267 de 7 de noviembre de 1986, pp: 37141-37142.
- Osada, K., Kodama, T., Cui, L., Yamada, K. y Sugano, M. (1993). Oxidation of cholesterol by heating. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, pp: 1893-1898.
- Oshima, T., Nan, L. y Koizumi, C. (1993). Oxidative decomposition of cholesterol in fish products, *Journal of the AOCS*, 760 (6), pp: 595-600.
- Otaegui, A., Menéndez, M., Ansorena, D. y Astiasarain, I. (2010). Oxysterols: a world to explore (Review). *Food and Chemical Toxicology*, 48, pp: 3289-3303.
- Perlo, F., Gago, A., Rosmini, M., Cervera, R., Perez, J., Pagan, M., Lopez, F. y Aranda, V. (1995). Modification of physicochemical and color parameters during marketing of "pate". *Meat Science*, 41, pp: 325-333.
- Pie, J.E., Spahis, K. y Seillan, C. (1990). Evaluation of oxidative degradation of cholesterol in food and food ingredients: identification and quantification of cholesterol oxides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, pp: 973-979.
- Pickova, J. y Dutta, P. (2003). Cholesterol oxidation in some processed fish products. *Journal of the AOCS*, 80 (10), pp: 993-996.
- Rowe, L.J., Maddock, K.R., Lonergan, S.M. y Huff, E. (2004). Influence of early post-mortem protein oxidation on beef quality. *Journal of Animal Science*, 82, pp: 785-793.
- Saldanha, T. y Bragagnolo, N. (2007). Cholesterol oxidation is increased and PUFA decreased by frozen storage and grilling of atlantic hake fillets (*Merluccius hubbsi*). *Lipids*, 42, pp: 671-678.
- Saldanha, T., Benassi, M.T. y Bragagnolo, N. (2008). Fatty acid contents evolution and cholesterol oxides formation in Brazilian sardines (*Sardinella brasiliensis*) as a result of frozen storage followed by grilling. *Food Science and Technology*, 41, pp: 1301-1309.

- Sánchez, F., García, J.A. y Arnau, J. (2010). Processing of dry-cured ham in a reduced-oxygen atmosphere: effects on physicochemical and microbiological parameters and mite growth. *Meat Science*, 84, pp: 400-408.
- SCCP (2007). Scientific Committee on consumer Products. Opinion on "Hydrogen peroxide, in its free form or when released, in oral hygiene products and tooth whitening products", SCCP/0844/04, Disponible en: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_122.pdf [acceso: 28-4-11].
- Shozen, K., Ohshima, T., Ushio, H., Takiguchi, A. y Koizumi, C. (1997). Effects of antioxidants and packing on cholesterol oxidation in processed anchovy during storage. *Lebensmittel-Wissenschaft Technologie-Food Science and Technology*, 30, pp: 2-8.
- Soto, I., Campillo, P.J., Ortega, J., Rodriguez, M.T., Lercker, G. y Garcia, H.S. (2008). Cholesterol oxidation in traditional Mexican dried and deep-fried food products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, pp: 489-495.
- TFDA (2009). Taiwan Food and Drug Administration, Department of Health, Executive Yuan. Scope and application standards of food additives: Sanitizing agents. Disponible en: http://www.fda.gov.tw/eng/people_laws_list.aspx?pages=4&keyword=&classifysn=16 [acceso: 2-5-11].
- UE (2002). Decisión de la Comisión (2002/657/CE), de 12 de agosto de 2002, por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. DO L 221 de 17 de agosto de 2002, pp: 8-36.
- UE (2004). Reglamento (CE) N° 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. DO L 139 de 30 de abril de 2004, pp: 55-205.
- UE (2008). Reglamento (CE) N° 123/2008 de la Comisión, de 12 de febrero de 2008, por el que se modifica y corrige el anexo VI del Reglamento (CEE) N° 2092/91 del Consejo sobre la producción agrícola ecológica y su indicación en los productos agrarios y alimenticios. DO L 38 de 13 de febrero de 2008, pp: 3-7.
- Valenzuela, A., Sanhueza, J.C. y Nieto, S.K. (1995). *Trans* fatty acid isomers from hydrogenated fats: The controversy about health implications. *Grasas y Aceites*, 46, pp: 369-375.
- Valenzuela, A., King, J. y Nieto, S. (2002). Oxidos de colesterol (Oxisteroles): factores que condicionan su formación, efectos biológicos y su presencia en los alimentos. *Revista Chilena de Nutrición*, 29 (2), pp: 1-11.
- Ventanas, S., Estévez, M., Tejeda, J.F. y Ruiz, J. (2006). Protein and lipid oxidation in Longissimus dorsi and dry-cured loin from Iberian pigs as affected by crossbreeding and diet. *Meat Science*, 72, pp: 647-655.
- Verardo, V., Pasini, F., Iafelice, G., Messia, M.C., Marconi, E. y Caboni, M.F. (2010). Influence of storage conditions on cholesterol oxidation in dried egg pasta. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, pp: 3586-3590.
- Xiong, Y. L. (2000). Protein oxidation and implications for muscle foods quality. En *Antioxidants in muscle foods*, pp: 85-111. E. A. Decker, C. Faustman, & C. J. Lopez-Bote (Eds.), New York: Wiley.
- Zubillaga, M.P. y Maerker, G. (1991). Quantification of three cholesterol oxidation products in raw meat and chicken. *Journal of Food Science*, 56, pp: 1194-1196.
- Zunin, P., Boggia, R. y Evangelisti, F. (2001). Identification and quantification of cholesterol oxidation products in canned tuna. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 78, pp: 1037-1040.