

Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) en relación a una solicitud de evaluación inicial para la comercialización de hidroxitirosol obtenido por síntesis química en el marco del Reglamento (CE) N° 258/97 sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios

Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición

José Manuel Barat Baviera, María Antonia Ferrús Pérez, Guillermina Font Pérez, Arturo Hardisson de la Torre, Antonio Herrera Marteache, Félix Lorente Toledano, Ascensión Marcos Sánchez, Amelia Martí del Moral, María Rosario Martín de Santos, M^o Rosa Martínez Larrañaga, Antonio Martínez López, Emilio Martínez de Victoria Muñoz, Cristina Nerín de la Puerta, Gaspar Pérez Martínez, Catalina Picó Segura, Rosa María Pintó Solé, Antonio Pla Martínez, José Luis Ríos Cañavate, Jordi Salas Salvadó, Jesús Simal Gándara

Secretario técnico

Vicente Calderón Pascual

Número de referencia: AECOSAN-2015-001

Documento aprobado por la Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición del Comité Científico en su sesión plenaria de 12 de febrero de 2015

Grupo de trabajo

Emilio Martínez de Victoria Muñoz (Coordinador)

Antonio Pla Martínez

Félix Lorente Toledano

María Rosario Martín de Santos

Félix Sancenón Galarza (Colaborador externo)

Resumen

La empresa Sprox Biotech S.L. ha solicitado la autorización para la comercialización en la Unión Europea de hidroxitirosol obtenido por síntesis química, para su adición, como ingrediente, en aceites, grasas y zumos de frutas y vegetales. Este ingrediente no cuenta con un historial de uso en la Unión Europea con anterioridad a 1997, por lo que entra dentro del ámbito de aplicación del Reglamento (CE) N° 258/97 sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios.

El Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) considera que de la información aportada no se deduce que el consumo del hidroxitirosol obtenido por síntesis química, en las condiciones propuestas por el solicitante, para su adición como ingrediente a grasas y aceites para consumo en crudo y a zumos de frutas y vegetales, pueda producir efectos negativos para la salud y, por ello, concluye que el nuevo alimento presentado a evaluación por Sprox Biotech S.L. cumple los criterios de aceptación establecidos por el Reglamento (CE) N° 258/97 sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios.

Palabras clave

Hidroxitirosol, nuevos alimentos, nuevos ingredientes.

Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Consumer Affairs, Food Safety and Nutrition (AECOSAN) on the initial assessment for an application for the marketing authorization of synthetic hydroxytyrosol under Regulation (CE) No 258/97 concerning novel foods and novel food ingredients

Abstract

The company Seprox Biotech S.L. requested authorisation for the marketing authorization of synthetic hydroxytyrosol in the European Union. This ingredient has no history of use in any significant quantities in the European Union prior to 1997 and therefore comes within the scope of Regulation (EC) No 258/97 on novel foods and novel food ingredients.

The Scientific Committee of the Spanish Agency for Consumer Affairs, Food Safety and Nutrition (AECOSAN) takes the view that, according to the information provided, there is no indication that consumption of synthetic hydroxytyrosol, under the conditions proposed by the applicant, to be added as ingredient in oils and fats to be consumed uncooked and in fruit and vegetable juices, can produce adverse effects on health. The Committee concludes that the novel foodstuff presented by Seprox Biotech S.L. for assessment meets the criteria for acceptance laid down by Regulation (EC) No 258/97 on novel foods and novel food ingredients.

Key words

Hydroxytyrosol, novel food, novel food ingredients.

1. Evaluación del nuevo alimento

Introducción

La empresa Seprox Biotech S.L. ha solicitado la autorización para la comercialización en la Unión Europea de hidroxitirosol producido por síntesis química para su adición como ingrediente a grasas y aceites para consumo en crudo y a zumos de frutas y vegetales.

De acuerdo con el solicitante, el hidroxitirosol producido por síntesis química no cuenta con historial de uso en la Unión Europea con anterioridad a 1997, por lo que entra dentro del ámbito de aplicación del Reglamento (CE) N° 258/97 de nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios (UE, 1997a).

Conforme a la Recomendación de la Comisión 97/618/CE, de 29 de julio de 1997, el solicitante declara que el nuevo alimento corresponde a la Clase 1 “Sustancias químicas puras o mezclas simples obtenidas a partir de fuentes no modificadas genéticamente”, subclase 1 “la fuente del nuevo alimento tiene un historial de uso alimentario en la Comunidad”. En consecuencia, el informe presentado por el solicitante sigue las directrices especificadas para la categoría 1.1 respondiendo a las secciones I, II, III, IX, X, XI, XII y XIII recogidas en la tabla II de dicha Recomendación (UE, 1997b).

El nuevo ingrediente propuesto tiene una alta pureza, superior al 99 %, y se produce mediante un proceso de síntesis química y procesos físicos de los que se obtiene hidroxitirosol en forma de un líquido viscoso de color amarillento.

Comentarios

El Comité Científico no está de acuerdo con la categorización del producto realizada por el solicitante ya que, al ser un nuevo producto de síntesis, considera que debería encuadrarse en la Clase 1, subclase 2 (la fuente del nuevo alimento no tiene un historial de uso alimentario en la Comunidad) aunque este hecho no varía significativamente la documentación que debe aportarse, ya que únicamente supone que no deban presentarse datos de la anterior exposición humana al nuevo alimento o a su fuente por lo que no afecta a la evaluación de la documentación presentada.

I. Especificaciones del nuevo alimento

El hidroxitirosol (3,4-dihidroxitirosol o 3,4-dihidroxifeniletanol) (N° CAS: 10597-60-1) obtenido por síntesis química por Seprox Biotech es un líquido viscoso de color amarillento (4 % de humedad). El solicitante afirma que los disolventes utilizados en la síntesis del hidroxitirosol están autorizados para uso alimentario en la Unión Europea o en Estados Unidos o presentan niveles residuales bajos y seguros.

Las especificaciones establecidas por el solicitante figuran en la tabla 1.

Tabla 1. Especificaciones del hidroxitirosol obtenido por síntesis química		
Parámetro	Criterio	Método de ensayo
Descripción	Líquido viscoso amarillento	Visual
Olor	Característico	Organoléptico
Sabor	Ligeramente amargo	Organoléptico
Solubilidad en agua	Miscible en agua	Saturación
Humedad	<4 %	Termogravimetría
pH	3,5-4,5	Solución 1 M en agua
Contenido de hidroxitirosol	>95,0 %	Cálculo 100 %-otros componentes
Pureza cromatográfica	>99,0 %	HPLC 280 nm
Acetato de hidroxitirosol	<0,3 %	HPLC
Otros	<0,1 %	HPLC
Metales pesados		
Plomo	<0,03 ppm	ICP-MS
Cadmio	<0,01 ppm	ICP-MS
Mercurio	<0,01 ppm	ICP-MS
Residuos de disolventes		
Acetato de etilo	<25,0 ppm	GC/MS espacio de cabeza
Isopropanol	<2,50 ppm	GC/MS espacio de cabeza
Metanol	<0,01 ppm	GC/MS espacio de cabeza
Tetrahidrofurano	<0,01 ppm	GC/MS espacio de cabeza

Con el fin de demostrar el cumplimiento de las especificaciones, en el dossier se aportan resultados del análisis de seis lotes fabricados no consecutivamente a lo largo del año 2012.

Además de los parámetros estipulados en las especificaciones, los boletines analíticos recogen datos del contenido en boro (cinco lotes), sodio, potasio, calcio, cromo, níquel, hierro, nitratos, nitritos, cloruros, sulfatos y acetona.

Los análisis han sido realizados por Seprox Biotech en el caso del contenido en hidroxitirosol, acetato de hidroxitirosol y humedad. El resto de análisis han sido realizados por un laboratorio externo (Laboratorio Químico-Microbiológico S.A.).

La validación del método para la determinación de hidroxitirosol por HPLC/UV en el formulado ha sido llevada a cabo por Harlan Laboratories S.A. Este laboratorio está acreditado por la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC) conforme a la norma UNE-EN ISO/IEC 17025 para la realización de análisis clínicos veterinarios (80/LE179) y conforme a Buenas Prácticas de Laboratorio para la realización de estudios de productos fitosanitarios en el área de ensayo de toxicidad en laboratorio (26/BPL030) y para la realización de estudios de sustancias químicas en las áreas de ensayo de toxicidad y toxicocinética en laboratorio (26/BPL037). A partir de la validación realizada por Harlan Laboratorios S.A., el solicitante ha realizado un estudio de distintos parámetros en relación a la

determinación de hidroxitirosol (intervalo de linealidad, límites de detección y cuantificación, reproducibilidad y estabilidad).

Por su parte el Laboratorio Químico-Microbiológico S.A. está acreditado por ENAC para la realización de distintos ensayos físicoquímicos de productos agroalimentarios conforme a la norma UNE-EN ISO/IEC 17025. Las determinaciones realizadas por este laboratorio no se encuentran dentro de su alcance de acreditación por lo que se ha aportado información sobre la precisión e incertidumbre de los métodos utilizados.

Análisis de compuestos inorgánicos

Los resultados del análisis de distintos compuestos inorgánicos en seis lotes de hidroxitirosol figuran en la tabla 2.

Tabla 2. Resultados del análisis de distintos compuestos inorgánicos en seis lotes de hidroxitirosol obtenido por síntesis química

Compuestos inorgánicos (mg/kg)	Media (mg/kg) ± desviación estándar	Compuestos inorgánicos (mg/kg)	Media (mg/kg) ± desviación estándar
Mercurio	<0,01	Sodio	433,13 ± 57,59
Plomo	0,03 ± 0,01	Potasio	431,72 ± 295,92
Niquel	0,04 ± 0,03	Calcio	119,45 ± 61,04
Cadmio	<0,01	Cloruros	508,13 ± 310,64
Cromo	0,08 ± 0,06	Sulfatos	219,35 ± 117,99
Hierro	2,05 ± 1,38	Nitritos	2,05 ± 3,70
Boro (5 lotes)	7,44 ± 3,39	Nitratos	10,7 ± 10,8

Análisis de compuestos orgánicos

El solicitante aporta datos de cuatro lotes analizados por HPLC-MS/MS de cuatro impurezas orgánicas: 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol, alcohol homovanílico, alcohol iso-homovanílico y acetato de hidroxitirosol. Afirma que la suma de todas ellas es menor del 0,1 %.

Análisis de residuos de disolventes

El solicitante aporta datos del contenido de residuos de los cinco disolventes potencialmente presentes en seis lotes de hidroxitirosol (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados del análisis de distintos residuos de disolventes en seis lotes de hidroxitirosol obtenido por síntesis química

Disolventes (mg/kg)	Media (mg/kg) ± desviación estándar
Acetato de etilo	9,63 ± 8,84
Acetona	1,85 ¹
Alcohol isopropílico	1,17 ± 0,74
Metanol	1,93 ¹
Tetrahidrofurano	<0,01

¹Un solo dato positivo.

Comentarios

El Comité Científico estima que el nuevo alimento a comercializar está bien identificado mediante los estudios de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), cromatográficos y de composición presentados y que la información sobre la presencia de otros compuestos orgánicos o inorgánicos es suficiente.

II. Efectos del proceso de producción aplicado al nuevo alimento

Descripción del proceso de producción

El solicitante produce hidroxitirosol mediante síntesis química y enzimática. Los detalles que se aportan en el dossier son considerados confidenciales por el solicitante.

Control de la producción

El solicitante declara que ha establecido controles de calidad para optimizar el proceso de producción y para verificar que los disolventes y reactivos utilizados cumplen la legislación alimentaria correspondiente.

Los disolventes utilizados se eliminan por evaporación en agua, que es el disolvente con mayor temperatura de ebullición de los utilizados.

En el caso de las sales orgánicas o inorgánicas, tras las reacciones en las que intervienen se producen extracciones con solventes para eliminar sus residuos.

Estabilidad del producto terminado

Seprox Biotech recomienda almacenar el nuevo ingrediente a 4 °C, en oscuridad y protegido de atmósferas oxidantes.

Se aporta un estudio de estabilidad de cinco lotes de hidroxitirosol sintético mantenido en las condiciones mencionadas durante 20 o 23 meses y de un lote mantenido durante 8 meses a temperatura ambiente en tres condiciones: oscuridad y atmósfera protectora, con luz y atmósfera protectora, y con luz y en un vial abierto.

Únicamente en el vial abierto se observa un gradiente de color a los 4 meses como resultado de la oxidación. También se incrementa la humedad dadas las características higroscópicas del producto y se reduce ligeramente la pureza.

En todos los casos el porcentaje de hidroxitorosol supera un 99 % de pureza. El solicitante no ha establecido una fecha de caducidad para el producto sintético.

Estabilidad del producto añadido a alimentos

Se aporta un estudio de estabilidad en zumos de uva y piña, manzana, naranja, tomate y de una mezcla de vegetales y en un zumo de uva y piña conteniendo 400 mg/kg de vitamina C y adicionado de hierro (40 mg/kg de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$). También se aporta un estudio en aceite de girasol, soja, oliva refinado y oliva virgen.

En el caso de los zumos, los estudios se realizaron a 40 y 90 °C, a excepción del zumo con hierro añadido en el que se emplearon 40 y 60 °C, y se han utilizando tres concentraciones de hidroxitirosol (15, 30 y 50 mg/kg). Debido a su naturaleza hidrofílica, el hidroxitirosol puede ser disuelto fácilmente en todas las matrices acuosas (zumos) estudiadas. La duración de los estudios varía desde las 3-4 horas hasta las 11 semanas en función del tipo de zumo, la temperatura aplicada y la concentración de hidroxitirosol adicionada. Los estudios a 60 y 90 °C se han realizado en viales abiertos.

Todas las muestras de zumos y aceites han sido analizadas por HPLC frente a una curva estándar en solución acuosa preparada para cada matriz específica. Para garantizar la validez de la extrapolación, se ha realizado un análisis de control utilizando una matriz a la que se han adicionado tres concentraciones de hidroxitirosol: baja (50 % de la concentración elegida), media (misma concentración que la elegida) y alta (150 % de la concentración elegida).

En el caso de los aceites, los estudios se realizaron a 40, 90 y 180 °C y se han utilizado tres concentraciones de hidroxitirosol (100, 300 y 500 mg/kg). El solicitante indica que la solubilidad de hidroxitirosol en estas matrices está limitada a 2,5 g/kg. La duración de los estudios varía desde 1 hora hasta los 12 meses en función del tipo de aceite, la temperatura aplicada y la concentración de hidroxitirosol adicionada.

Para la cuantificación del hidroxitirosol en aceites se han utilizado dos métodos de HPLC publicados previamente. Durante el primer mes se ha utilizado un método de análisis (Carrasco-Pancorbo et al., 2007) y a partir del quinto mes se ha utilizado otro con objeto de lograr una mejor extracción del hidroxitirosol (Romero y Brenes, 2012).

En el dossier presentado se indica que los resultados obtenidos en todos los zumos no muestran pérdidas significativas de hidroxitirosol en las condiciones estudiadas: 40 °C (8 semanas) y 90 °C (3-4 horas).

Los resultados obtenidos en el caso de los aceites sometidos a 40 °C muestran que la cantidad de hidroxitirosol añadido que permanece en los aceites tras 12 meses de estudio es de, aproximadamente, el 85 % en el aceite de girasol, el 70 % en el aceite de oliva y menos del 40 % en el de soja.

A 90 °C se observan pérdidas de, al menos, el 62 % del hidroxitirosol adicionado (500 mg/kg) al someter tres muestras de aceite de oliva virgen extra a esta temperatura durante 4 días.

En el caso de los aceites sometidos a 180 °C durante 60 minutos, se observan pérdidas superiores

al 93 % del hidroxitirosol respecto a la cantidad medida a 120 °C (5 minutos antes de alcanzar 180 °C) para el aceite de oliva refinado, el aceite de oliva virgen extra y el aceite de soja, superando la pérdida el 50 % a los 20 minutos.

En el caso del aceite de girasol sometido a las mismas condiciones la pérdida es del 54 % a los 60 minutos y del 26 % a los 20 minutos.

Por ello, el solicitante considera adecuado el uso de aceites enriquecidos con hidroxitirosol para su consumo en crudo y, por el contrario, no recomienda la utilización de aceites enriquecidos con hidroxitirosol a altas temperaturas (temperaturas normales de cocinado) debido a la pérdida que se produce de hidroxitirosol y al deterioro de las propiedades organolépticas de los aceites.

Comentarios

El Comité considera que se ha descrito suficientemente el proceso de producción. El enzima utilizado está autorizado en otro Estado miembro de la Unión Europea.

Dada la falta de estabilidad del nuevo ingrediente añadido a aceites al ser sometido a distintos tratamientos térmicos, debería advertirse al consumidor que los aceites y grasas que lo contengan sólo deben consumirse en crudo tal como ha indicado el solicitante.

El solicitante debe proporcionar a los usuarios información de la estabilidad en los alimentos a los que se pretenda añadir.

III. Historial del organismo utilizado como fuente del alimento

El solicitante indica que produce hidroxitirosol mediante un proceso bien establecido de síntesis química y que no hay historia de uso del nuevo alimento como hidroxitirosol sintético, a pesar de que el hidroxitirosol natural está presente, entre otras fuentes alimentarias, en el aceite de oliva virgen y en las aceitunas.

Comentarios

El Comité Científico considera que el nuevo ingrediente se produce por un proceso de síntesis química y no tiene constancia de historial de consumo como alimento en la Unión Europea antes de 1997.

IX. Ingesta/nivel de usos previstos del nuevo alimento

El solicitante pretende la autorización del uso de hidroxitirosol en concentraciones de 5 mg por ración (FSA, 2008) de los alimentos propuestos, esto es, 5 mg/10 ml (0,5 mg/ml) de grasa o aceite para consumo en crudo y de 5 mg/200 ml (0,025 mg/ml) de zumo de frutas o vegetales. Excluye expresamente su uso en los alimentos destinados a lactantes y niños de hasta 36 meses.

Se ha realizado una estimación de ingesta de niños, adolescentes, adultos y ancianos en distintos países (Bélgica, Dinamarca, Francia, Alemania, Italia, España, República Checa y Suecia) utilizando la base de datos de consumo de alimentos de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2011a). La mayor ingesta de hidroxitirosol para consumidores adultos en un escenario

extremo, suma de percentiles 95, se produciría en Alemania (64,8 mg/día) y, en el caso de los niños, se produciría en la República Checa (40,5 mg/día).

Comentarios

Los datos de las ingestas medias y máximas de hidroxitirosol se han obtenido con datos de consumo crónico de alimentos de EFSA solo para consumidores. Se han utilizado los datos de ingesta de grasas y aceites y la de zumos de verduras y frutas. El escenario más desfavorable, es decir el consumo máximo teórico se calcularía sumando la ingesta de aceites y grasas más la de zumos de frutas y verduras en el percentil 95. Se asumen raciones de 10 ml para grasas y aceites y de 200 ml para zumos de verduras y frutas. A partir de estos datos y de la concentración propuesta para incluir en cada ración, 5 mg, se calculan las ingestas medias y máximas.

El Comité Científico considera apropiadas las estimaciones de ingesta realizadas por el solicitante.

X. Datos de la anterior exposición humana al nuevo alimento o a su fuente

El hidroxitirosol de Seprox Biotech es obtenido mediante un proceso de síntesis química y, como tal, no ha estado disponible comercialmente hasta ahora.

Se alega que el hidroxitirosol natural se encuentra presente en muchos alimentos y plantas, es utilizado como complemento alimenticio y ha sido objeto de varios estudios en humanos. Los solicitantes indican en su dossier una ingesta estimada de hidroxitirosol y otros compuestos fenólicos presentes de forma natural en aceitunas de 20-40 mg/día. Esta estimación se hace a partir de un consumo medio de 20 frutos/día de un tamaño medio y contenidos entre 1 y 2 mg hidroxitirosol/fruto. Esta ingesta no sería solo de hidroxitirosol sino también de oleuropeina y otros polifenoles de la aceituna y se espera que este consumo sea superior en los países mediterráneos donde tanto el aceite de oliva como las aceitunas son comúnmente consumidos.

Se citan distintos estudios sobre la eficacia en humanos de los polifenoles presentes en el aceite de oliva y sobre el contenido de hidroxitirosol y otros polifenoles en aceitunas.

El estudio de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) aportado demuestra que el compuesto obtenido por síntesis tiene la misma estructura que el hidroxitirosol natural.

Comentarios

El Comité Científico considera que el nuevo ingrediente se produce por un proceso de síntesis química y no hay exposición humana previa como alimento aunque podemos afirmar por el estudio de RMN antes mencionado que los resultados obtenidos con el hidroxitirosol de síntesis se podrían extrapolar con los del natural en cuanto a la exposición humana. No obstante, debemos señalar que la exposición a hidroxitirosol natural nunca se produce de forma aislada y/o en la forma química obtenida por síntesis ya que este compuesto siempre se acompaña, tanto en el aceite de oliva virgen como en las aceitunas, de otros polifenoles (por ejemplo, tirosol) y está presente en diferentes especies químicas (por ejemplo, oleuropeina).

XI. Información nutricional sobre el nuevo alimento

Se indica que no se pretende la sustitución del aceite de oliva, de las aceitunas u otras fuentes de hidroxitirosol por el nuevo ingrediente y que la ingesta propuesta no sería nutricionalmente desventajosa para el consumidor.

Se citan distintos estudios respecto a la eficacia del hidroxitirosol y otros polifenoles del aceite de oliva, incluyendo la declaración de propiedad saludable evaluada favorablemente por EFSA para los polifenoles del aceite de oliva (EFSA, 2011b). También se citan estudios, tanto en animales como en humanos, relativos a la absorción, distribución, metabolismo y excreción de compuestos fenólicos, incluido el hidroxitirosol.

Seproch Biotech aporta un estudio sobre la farmacocinética del ácido 3,4-hidroxifenilacético (DOPAC), el hidroxitirosol y el acetato de hidroxitirosol. El estudio ha sido realizado por Vivotecnia Research S.L. conforme los principios de Buenas Prácticas de Laboratorio establecidos por la Directiva 2004/10/EC (UE, 2004) y la legislación española (Real Decreto 1369/2000) (BOE, 2000).

Para realizar este ensayo se suministraron dosis únicas orales por gavage de 1 y 5 mg hidroxitirosol/kg a ratas *Sprague Dawley* de ambos sexos. Se han observado diferencias relevantes en lo que respecta a la máxima concentración (C_{max}) de cada analito medido en plasma tras la administración de una dosis única a ambas concentraciones, siendo DOPAC el analito con la mayor C_{max} seguido del acetato de hidroxitirosol.

Los tres compuestos muestran una rápida absorción (T_{max} : 0,5-1 hora) a excepción del DOPAC para el que el T_{max} fue de 2 horas en el caso de machos tratados con 1 y 5 mg/kg y hembras tratadas con 5 mg/kg.

Respecto a la biodisponibilidad, el DOPAC es el analito que presenta el mayor $AUC_{(0-24)}$ tras cada test, habiéndose encontrado los valores más altos en el caso de hembras tratadas con 5 mg/kg de acetato de hidroxitirosol.

En lo que respecta al hidroxitirosol, los parámetros calculados (C_{max} , T_{max} y AUC) responden a un número limitado de muestras obtenidas con concentraciones cuantificables.

Los resultados obtenidos sugieren una rápida conversión tanto del hidroxitirosol como del acetato de hidroxitirosol a DOPAC tras la administración oral.

Comentarios

La declaración de propiedad saludable que se aprueba en el Reglamento (UE) N° 432/2012 (UE, 2012) respecto a los polifenoles del aceite de oliva no es aplicable al hidroxitirosol obtenido por síntesis química. La adición del nuevo ingrediente a grasas y aceites no las hace equivalentes al aceite de oliva en cuanto a sus propiedades nutricionales o saludables. Cualquier declaración de este tipo que se pretenda realizar deberá ser autorizada previamente conforme al procedimiento establecido en el Reglamento (UE) N° 1924/2006 (UE, 2006).

Teniendo en cuenta lo dicho anteriormente, el Comité Científico considera que la adición de este nuevo ingrediente a grasas, aceites y zumos de frutas o vegetales, en las condiciones propuestas por el solicitante, no supone una desventaja nutricional.

XII. Información microbiológica sobre el nuevo alimento

El solicitante considera que el riesgo de proliferación bacteriana es muy bajo teniendo en cuenta tanto la naturaleza y pureza del hidroxitirosol como su proceso de producción. Se destaca además que el hidroxitirosol tiene actividad antimicrobiana. El solicitante ha aportado información respecto al recuento de aerobios totales, *E. coli*, Enterobacterias y mohos y levaduras en tres lotes representativos del producto, siendo el resultado negativo en todos los casos.

Comentarios

El Comité Científico considera suficientes los datos aportados.

XIII. Información toxicológica sobre el nuevo alimento

1. Estudios de toxicidad y genotoxicidad del hidroxitirosol

Seproch Biotech presenta estudios de toxicidad subcrónica y mutagenicidad (test de Ames y ensayo *in vitro* de aberración cromosómica en linfocitos humanos) realizados con el hidroxitirosol sintético objeto de evaluación.

El estudio de toxicidad subcrónica (OECD N° 408) ha sido realizado por Harlan Laboratories S.A. bajo los principios de Buenas Prácticas de Laboratorio y de acuerdo con las requerimientos y recomendaciones establecidas en varias guías y directivas europeas. El estudio ha sido publicado (Auñón-Calles et al., 2013a).

Las condiciones del ensayo fueron las siguientes: dosis orales de 0 (control), 5, 50 y 500 mg hidroxitirosol/kg peso corporal/día fueron suministradas por gavage a ratas *Wistar Hannover* de ambos sexos durante un periodo de 13 semanas con un periodo de recuperación de 4 semanas.

Tras 91-92 días de tratamiento, fueron sacrificados cuatro grupos de diez animales por sexo para llevar a cabo los test de toxicidad. Asimismo, dos grupos adicionales de cinco animales por sexo fueron sometidos a un periodo de recuperación de 4 semanas con objeto de evaluar la progresión o reversibilidad de alguno de los cambios observados en los test.

En el estudio se analizaron muestras de cada grupo durante la primera y octava semana de tratamiento con objeto de determinar el contenido de hidroxitirosol y se registraron periódicamente los resultados de los exámenes oftalmoscópicos, signos clínicos, consumos de alimentos y pesos corporales durante los periodos de aclimatación, tratamiento y recuperación.

Asimismo, se llevaron a cabo baterías de observación funcional y mediciones de la actividad locomotora y fuerza de agarre durante la decimotercera semana de tratamiento y al final del periodo de recuperación, y se tomaron muestras de sangre para llevar a cabo análisis hematológicos, bioquímicos y urinarios.

El solicitante informa de que no se han observado signos de efectos adversos o mortalidad durante el estudio. La salivación observada en varios de los animales tratados se atribuye al sabor amargo del hidroxitirosol y/o a las características físicas de la formulación (ligeramente aceitosa y densa).

Se han observado pequeñas variaciones en el peso corporal de ratas macho y hembra tratadas a la dosis de 500 mg/kg peso corporal/día. Se indica que, en lo que respecta a la hematología y los

parámetros químicos, los cambios significativos son considerados como cambios casuales/varia-ciones biológicas y no como efectos adversos relacionados con el tratamiento dado que estos cambios no han sido observados en ambos sexos, carecen de cambios correlativos en otros parámetros clínicos, son de pequeña magnitud, no se han observado en alguna dosis o no han sido asociados con cambios microscópicos en los órganos relacionados.

Los cambios observados en el peso de algunos órganos tras el periodo de recuperación se consi-deran casuales debido a que no dependen de la dosis y a la ausencia de cambios histopatológicos y químicos correlacionados.

Basándose en los resultados obtenidos se ha establecido como NOAEL (*Non Observed Adverse Effects Level*) la dosis de 500 mg/kg peso corporal/día.

El test de Ames (OECD N° 471) ha sido realizado por Vivotecnia Research S.L. bajo los principios de Buenas Prácticas de Laboratorio. El citado estudio ha sido publicado (Auñon-Calles et al., 2013b).

El test se realizó en las cepas TA98, TA100, TA1535, y TA1537 de *Salmonella typhimurium* y en la cepa WP2 (pKM101) de *Escherichia coli*, con y sin activación metabólica, utilizando cinco concentraciones en el rango de 0,06 a 5 µl/placa. Para fijar las dosis de ensayo se llevó a cabo un estudio previo de citotoxicidad en una de las cepas con resultados negativos a una concen-tración de 50,0 µl/ml.

El resultado fue negativo en todas las cepas y a todas las concentraciones utilizadas, lo que indi-ca que el hidroxitirosol sintético objeto de estudio no induce mutaciones pudiendo ser considerado como no mutagénico de acuerdo con estos ensayos.

El ensayo *in vitro* de aberración cromosómica en linfocitos humanos (OECD N° 473) ha sido reali-zado por Harlan Laboratories S.A. bajo los principios de Buenas Prácticas de Laboratorio. El citado estudio ha sido publicado (Auñon-Calles et al., 2013b).

El ensayo se realizó con y sin activación metabólica, utilizando diez concentraciones en el rango de 10,0 a 1 542 µl/ml. Para fijar las dosis de ensayo se llevó a cabo un estudio previo de citotoxicidad.

Sólo se han observado efectos clastogénicos a concentraciones de 10 mM, la cual es muy poco probable que se alcance tras la ingestión oral.

Adicionalmente, se citan distintos estudios de toxicidad, genotoxicidad, toxicidad para la repro-ducción y teratogeneidad realizados fundamentalmente con extractos de pulpa de aceitunas.

La información disponible sobre la toxicidad del hidroxitirosol sintético es limitada, ya que sólo hay dos trabajos publicados al respecto (Auñon et al., 2013a,b). No obstante, el estudio de RMN aportado por el solicitante apoya la identidad de las moléculas natural y sintética. Para el hidroxitirosol sintético se ha propuesto un NOAEL subcrónico de 500 mg/kg peso corporal/día (Auñon et al., 2013a), aunque se trata de la dosis más alta utilizada en los ensayos, por lo que podría ser aún mayor. Con dichas dosis no se han encontrado efectos tóxicos adversos de relevancia. El ensayo se ha hecho en ratas y como se ha indicado es el único existente. Sería deseable tener información de otras especies que pudieran ser más sensibles.

En ensayos *in vitro* (Auñon et al., 2013b) se ha visto que el hidroxitirosol no es genotóxico ni mu-tagénico a concentraciones muy superiores a las esperadas tras su ingestión. Se han visto efectos clastogénicos a concentraciones (10 mM) muy difíciles de alcanzar tras la ingestión oral. No se

descarta (Auñón et al., 2013b) que una exposición prolongada al hidroxitirosol y/o sus metabolitos pueda tener efectos desfavorables, aunque la información disponible (Auñón et al., 2013a) no apunta, aparentemente, a dicha posibilidad.

Sin embargo, sí existe mucha información sobre los posibles efectos adversos de extractos acuosos de pulpa de aceitunas. Dicha información aparece recogida en detalle en el reconocimiento como GRAS (*Generally Recognized as Safe*) por la *Food and Drug Administration* (FDA, 2013). Se ha establecido un NOAEL agudo de 2 000 mg/kg peso corporal/día en ratones y 1 000 mg/kg peso corporal/día en ratas, considerándose más apropiado el valor de 2 000 mg/kg peso corporal/día. En ratas se ha encontrado un NOAEL subcrónico de 2 000 mg/kg peso corporal/día (equivalentes a 72 mg hidroxitirosol/kg peso corporal/día) y con esas mismas dosis no se han encontrado efectos reproductivos adversos ni tampoco mutagénicos. Sólo se han encontrado ligeras alteraciones (posible toxicidad) a dosis de 5 000 mg/kg peso corporal/día (equivalentes a una dosis de 350 g en una persona de 70 kg de peso), que de cualquier forma no se consideran de interés. Además, como se recoge en dicho documento hay una evidente “historia de uso seguro” en lo que se refiere al aceite de oliva y las aceitunas (con alto contenido de hidroxitirosol).

Los datos anteriores han llevado a la FDA a conceder el estatus de GRAS a los extractos acuosos de pulpa de aceituna, estando algunos de ellos comercializados como los llamados nutracéuticos.

La ingesta estimada de hidroxitirosol por su presencia de forma natural en aceitunas de mesa es de 20-40 mg/día (similar a la que resultaría por el uso de hidroxitirosol como ingrediente de nuevos alimentos). De hecho, el uso previsto de hidroxitirosol por Seprox Biotech es de 5 mg/ración en los alimentos seleccionados (grasas y aceites; zumos vegetales/frutas). Ello supone una ingesta diaria de 0,30 mg/kg peso corporal/día y 0,68 mg/kg peso corporal/día para la media y el P95, respectivamente, lo que supone 18,1 mg/día y 40,6 mg/día para una persona de 60 kg de peso.

Si bien la información disponible sobre el hidroxitirosol sintético es escasa, dicha información confirma los mismos resultados obtenidos previamente con extractos de pulpa de aceituna, en los que se admite la ausencia de efectos adversos. Igualmente, la experiencia en el uso de aceite de oliva y aceitunas (que contienen hidroxitirosol como uno de sus componentes polifenólicos, en cantidades similares o mayores a las previstas para el hidroxitirosol en su uso como “nuevo alimento”) apoya la seguridad del hidroxitirosol sintético.

Comentarios

Vista toda la información disponible, se considera que, no hay datos que hagan suponer posibles efectos adversos por el uso de hidroxitirosol en las condiciones propuestas por el solicitante. Se considera que la información aportada por Seprox Biotech sobre la seguridad del hidroxitirosol es suficiente desde el punto de vista toxicológico.

2. Toxicidad de los residuos presentes en el hidroxitirosol

Se ha valorado la posible toxicidad de los residuos detectados en el hidroxitirosol sintético según los datos de las tablas 2 y 3. Para ello se ha tenido en cuenta la ingesta máxima diaria (datos del solicitante) de hidroxitirosol para consumidores adultos en un escenario extremo, suma de P95, que

sería de 64,8 mg/día y para niños de 40,5 mg/día. Para el aporte de cada residuo a la ingesta diaria se ha considerado el valor medio o el valor indicado como límite de detección (LOD) (Tablas 2 y 3). Para los cálculos se ha tomado un peso de 60 kg para un adulto y 18,3 kg para niños de 0-9 años según datos de peso de la Organización Mundial de la Salud, que considera la “mediana” del peso para niños de 5 años de 18,3 kg.

Para cada residuo considerado se ha calculado la ingesta diaria teniendo en cuenta la ingesta máxima diaria de hidroxitirosol (64,8 mg/día y 40,5 mg/día para adultos y niños, respectivamente).

Comentarios

Tanto en adultos como en niños, la ingesta diaria estimada, a partir de los datos de ingesta de hidroxitirosol, representa un mínimo porcentaje de la ingesta diaria admisible (o parámetro equivalente), por lo que desde el punto de vista toxicológico la presencia de residuos en las concentraciones consideradas, en principio, no tendría ningún significado.

3. Estudios de alergenicidad

El solicitante indica que no se esperan reacciones alérgicas en base a la estructura y naturaleza del hidroxitirosol sintético. Se han aportado datos del análisis de proteínas de cuatro lotes del producto que muestran valores entre 0,35 y 0,45 mg/ml.

Comentarios

El Comité Científico considera que la única fuente potencial de proteína en el nuevo alimento es la enzima utilizada en el proceso y que, dado que esta enzima está autorizada para uso alimentario en Dinamarca y que no se han encontrado referencias a reacciones alérgicas de origen alimentario a lipasas (EFSA, 2014a, 2014b, 2014c), es improbable que el nuevo alimento plantee un riesgo de alergenicidad.

Conclusiones del Comité Científico

El Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AE-COSAN) considera que de la información aportada no se deduce que el consumo del hidroxitirosol obtenido por síntesis química, en las condiciones propuestas por el solicitante, para su adición como ingrediente a grasas y aceites para consumo en crudo y a zumos de frutas y vegetales, pueda producir efectos negativos para la salud. El Comité Científico concluye que el nuevo alimento presentado a evaluación por Sprox Biotech S.L. cumple los criterios de aceptación establecidos por el Reglamento (CE) N° 258/97 sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios.

Referencias

- Auñón-Calles, D., Canut, L. y Visioli, F. (2013a). Toxicological evaluation of pure hydroxytyrosol. *Food and Chemical Toxicology*, 55, pp: 498-504.
- Auñón-Calles, D., Giordano, E., Bohnenberger, S. y Visioli, F. (2013b). Hydroxytyrosol is not genotoxic *in vitro*. *Pharmacological Research*, 74, pp: 87-93.
- BOE (2000). Real Decreto 1369/2000, de 19 de julio, por el que se modifica el Real Decreto 822/1993, de 28 de mayo, por el que se establecen los principios de buenas prácticas de laboratorio y su aplicación en la realización de estudios no clínicos sobre sustancias y productos químicos. BOE 173 de 20 de julio de 2000, pp: 25832-25838.
- Carrasco-Pancorbo, A., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Lercker, G. y Fernandez-Gutierrez, A. (2007). Evaluation of the Influence of Thermal Oxidation on the Phenolic Composition and on the Antioxidant Activity of Extra-Virgin Olive Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, pp: 4771-4780.
- EFSA (2011a). European Food Safety Authority. Use of the EFSA Comprehensive European Food Consumption Database in Exposure Assessment. *The EFSA Journal*, 9 (3), pp: 2097-2131.
- EFSA (2011b). European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to Polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865). *The EFSA Journal*, 9 (4), pp: 2033-2058.
- EFSA (2014a). European Food Safety Authority. Scientific Opinion on lipase from a genetically modified strain of *Aspergillus oryzae* (strain NZYM-FL). *The EFSA Journal*, 12 (7): 3762, pp: 1-15.
- EFSA (2014b). European Food Safety Authority. Scientific Opinion on Lipase from a Genetically Modified Strain of *Aspergillus oryzae* (strain NZYM-LH). *The EFSA Journal*, 12 (7): 3 763, pp: 1-15.
- EFSA (2014c). European Food Safety Authority. Scientific Opinion on lipase from a genetically modified strain of *Aspergillus oryzae* (strain NZYM-AL). *The EFSA Journal*, 12 (12): 3778, pp: 1-17.
- FDA (2013). Food and Drug Administration. GRAS notice No.459. Disponible en: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdc/?set=GRASNotices&id=459> [acceso: 3-02-15].
- FSA (2008). Food Standards Agency. Trends in portions size in the UK- A preliminary review of published information.
- Romero, C. y Brenes, M. (2012). Analysis of Total Content of Hydroxytyrosol and Tyrosol in Olive Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, pp: 9017-9022.
- UE (1997a). Reglamento (CE) N° 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo de 27 de enero de 1997 sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios. DO L 43 de 14 de febrero de 1997, pp: 0001-0006.
- UE (1997b). Recomendación de la Comisión 97/618/CE, de 29 de julio de 1997, relativa a los aspectos científicos y a la presentación de la información necesaria para secundar las solicitudes de puesta en el mercado de nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios, la presentación de dicha información y la elaboración de los informes de evaluación inicial de conformidad con el Reglamento (CE) N° 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo. DO L 253 de 16 de septiembre de 1997, pp: 0001-0036.
- UE (2004). Directiva 2004/10/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 11 de febrero de 2004, sobre la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas relativas a la aplicación de los principios de buenas prácticas de laboratorio y al control de su aplicación para las pruebas sobre las sustancias químicas. DO L 50 de 20 de febrero de 2004, pp: 44-59.
- UE (2006). Reglamento (CE) N° 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de diciembre de 2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos. DO L 404 de 30 de diciembre de 2006, pp: 9-25.
- UE (2012). Reglamento (UE) N° 432/2012 de la Comisión de 16 de mayo de 2012 por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños. DO L 136 de 25 de mayo de 2012, pp: 1-40.