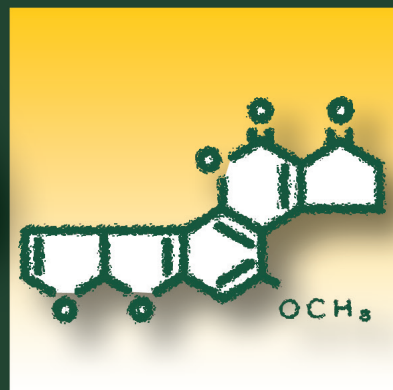
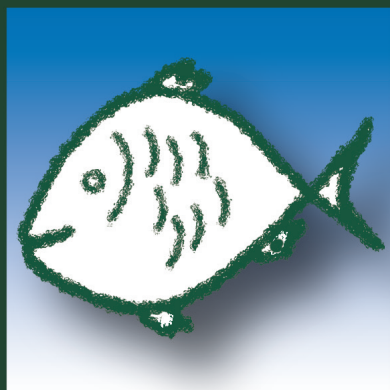


Ana M^a Cameán
Manuel Repetto
(Directores)

TOXICOLOGÍA ALIMENTARIA



TOXICOLOGÍA ALIMENTARIA

TOXICOLOGÍA ALIMENTARIA

Ana M.^a Cameán,
Catedrática de Toxicología
Universidad de Sevilla

Manuel Repetto
Ex-Director del Instituto Territorial de Toxicología
Profesor Titular de Toxicología. Universidad de Sevilla
(Editores)



Madrid - Buenos Aires

© Ana M.^a Cameán y Manuel Repetto, 2006

Reservados todos los derechos.

«No está permitida la reproducción total o parcial de este libro, ni su tratamiento informático, ni la transmisión de ninguna forma o por cualquier medio, ya sea electrónico, mecánico por fotocopia, por registro u otros métodos, sin el permiso previo y por escrito de los titulares del Copyright».

Ediciones Díaz de Santos

Madrid: www.diazdesantos.es/ediciones

Buenos Aires: www.diazdesantos.com.ar

México D. F.: www.diazdesantos.com.mx

ISBN: 84-7978-727-9

Depósito legal: M. 26.270-2006

Diseño de cubierta: Ángel Calvete

Fotocomposición: Fer

Impresión: Edigrafos

Encuadernación: Rústica-Hilo

IMPRESO EN ESPAÑA

Directores

Cameán, Ana M.^a

Catedrática de Toxicología.
Universidad de Sevilla

Repetto, Manuel

Profesor Titular y Profesor Colaborador
Honorario de Toxicología.
Universidad de Sevilla.
Ex-Director del Instituto Territorial
de Toxicología. Sevilla

Autores

Alegría, Amparo

Profesora Titular de Nutrición y Bromatología.
Universidad de Valencia.

Falco, Gemma

Profesora Asociada de Toxicología.
Universidad de Barcelona.

Anadón, Arturo

Catedrático de Toxicología. Universidad
Complutense.

Farré, Rosaura

Catedrática de Nutrición y Bromatología.
Universidad de Valencia.

Balaña, Rafael

Catedrático de Toxicología. Universidad de León.

Fernández, Mónica

Profesora Ayudante de Toxicología.
Universidad de Valencia.

Barberá, Reyes

Profesora Titular de Nutrición y Bromatología.
Universidad de Valencia.

Fernández-Pachón, María Soledad

Becaria Área de Nutrición y Bromatología.
Universidad de Sevilla.

Bello, José

Catedrático de Nutrición y Bromatología.
Universidad de Navarra.

Font, Guillermina

Catedrática de Toxicología. Universidad de
Valencia.

Bettini, Marli

Especialista en Toxicología. Centro
Toxicológico de la Universidad Pontificia
Católica de Chile.

G. Asuero, Agustín

Catedrático de Química Analítica. Universidad
de Sevilla.

Cameán, Ana M.^a

Catedrática de Toxicología. Universidad de
Sevilla.

Gago-Martínez, Ana I.

Profesora Titular de Química Analítica.
Universidad de Vigo.

Cubría, Carlos

Profesor Titular de Toxicología. Universidad de
León.

García-Fernández, Antonio Juan

Profesor Titular de Toxicología. Universidad
de Murcia.

Domingo, José Luis

Catedrático de Toxicología. Universidad
«Rovira i Virgili». Tarragona.

García-Parrilla, M.^a Carmen

Profesora Titular de Nutrición y Bromatología.
Universidad de Sevilla.

Gil, Ana Gloria

Profesora Asociada de Toxicología.
Universidad de Navarra.

Gil, Fernando

Profesor Titular de Toxicología. Universidad de Granada.

González-Weller, Dailos Manuel

Becario de la Dirección General de Universidades del Gobierno Autónomo de Canarias. Tenerife.

Hardisson, Arturo

Catedrático de Toxicología. Universidad de La Laguna. Tenerife.

Hernández, Antonio

Profesor Titular de Toxicología. Universidad de Granada.

Hungerford, James

Seafood Products Research Center, U.S. Food and Drug Administration. EE UU.

Jos, Ángeles

Profesora Ayudante de Toxicología.
Universidad de Sevilla.

Lagarda, M.^a Jesús

Profesora Titular de Nutrición y Bromatología.
Universidad de Valencia.

López, M.^a Carmen

Catedrática de Nutrición y Bromatología.
Universidad de Granada.

López de Cerain, Adela

Profesora Contratada de Toxicología.
Universidad de Navarra.

López García de la Serrana, Herminia

Catedrática de Nutrición y Bromatología.
Universidad de Granada.

Llobet, Juan M.

Catedrático de Toxicología. Universidad de Barcelona.

Maraver, Judith

Becaria del Área de Toxicología. Universidad de Sevilla.

Martínez-Larrañaga, M.^a Rosa

Catedrática de Toxicología. Universidad Complutense. Madrid.

Mañes, Jordi

Catedrático de Nutrición y Bromatología.
Universidad de Valencia.

Mate, Alfonso

Profesor Contratado de Fisiología.
Universidad de Sevilla.

Mellado, Encarnación

Profesora Titular de Microbiología.
Universidad de Sevilla.

Molina, Ana M.^a

Becaria del Área de Toxicología. Universidad de Córdoba.

Morales, M.^a Lourdes

Profesora Titular de Nutrición y Bromatología.
Universidad de Sevilla.

Morales, M.^a Teresa

Profesora Titular de Química Analítica.
Universidad de Sevilla.

Moreno, Isabel M.^a

Profesora Asociada de Toxicología.
Universidad de Sevilla.

Moyano, M.^a Rosario

Profesora Titular de Toxicología. Universidad de Córdoba.

Nadal, Martí

Licenciado en Ciencias Ambientales.
Universidad «Rovira i Virgili». Tarragona.

Navarro, Miguel

Profesor Titular de Nutrición y Bromatología.
Universidad de Granada.

Olea-Serrano, M.^a Fátima

Catedrática de Nutrición y Bromatología.
Universidad de Granada.

Olea-Serrano, Nicolás

Catedrático de Radiología. Universidad de Granada.

Ordóñez, César

Profesor Titular de Toxicología. Universidad de León.

Ordóñez, David

Catedrático de Toxicología. Universidad de León.

París, Enrique

Profesor Adjunto. Universidad Pontificia Católica de Chile.

Pérez-Pretejo, Yolanda

Profesora Ayudante de Toxicología. Universidad de León.

Peso, Ana del

Facultativo. Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. Sevilla.

Pichardo, Silvia

Profesora Ayudante de Toxicología. Universidad de Sevilla.

Picó, Yolanda

Profesora Titular de Nutrición y Bromatología. Universidad de Valencia.

Pla, Antonio

Catedrático de Toxicología. Universidad de Granada.

Reguera, Rosa M.^a

Profesora Titular de Toxicología. Universidad de León.

Repetto, Guillermo

Facultativo. Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. Sevilla. Profesor Asociado de Toxicología. Universidad de Sevilla.

Repetto, Manuel

Profesor Titular y Profesor Colaborador Honorario de Toxicología. Universidad de Sevilla. Ex-Director Instituto Territorial de Toxicología. Sevilla.

Revert, Consuelo

Especialista en Microbiología y Parasitología. Universidad de La Laguna. Tenerife.

Ríos, Juan Carlos

Profesor Auxiliar de Toxicología. Universidad Pontificia Católica de Chile.

Ruiz, M.^a José

Profesora Contratada de Toxicología. Universidad de Valencia.

Ruppén, Isabel

Becaria del Área de Química Analítica. Universidad de Vigo.

Sayago, Ana

Profesora Colaboradora de Química Analítica. Universidad de Sevilla.

Soler, Francisco

Profesor Titular de Toxicología. Universidad de Extremadura.

Soriano, José Miguel

Profesor Contratado de Nutrición y Bromatología. Universidad de Valencia.

Troncoso, Ana M.^a

Catedrática de Nutrición y Bromatología. Universidad de Sevilla.

Vázquez, Carmen M.^a

Profesora Titular de Fisiología. Universidad de Sevilla.

Vilanova, Eugenio

Catedrático de Toxicología. Universidad Miguel Hernández de Elche.

Villaño, Débora

Becaria FPI. Área Nutrición y Bromatología. Universidad de Sevilla.

Zurita, Jorge Luis

Becario de Proyecto. Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. Sevilla.

Prefacio

La *Toxicología Alimentaria* es una disciplina que reclama, cada vez más, la atención de investigadores y autoridades académicas, legislativas y gubernativas. El hombre ha debido aprender por experiencia propia, a veces dolorosa, a distinguir entre alimentos saludables y nocivos y, a lo largo de los siglos, a producir, conservar y preparar sus alimentos de la forma más beneficiosa. Pero el crecimiento de la población, la industrialización, en ocasiones poco previsoras de los efectos indeseables, la comercialización a gran escala, el mercantilismo a veces desconsiderado con el consumidor, la no observancia de las legislaciones por la población y quizás por las autoridades, etc., ha permitido la aparición de brotes e incluso de epidemias tóxicas de origen alimentario con cientos y hasta miles de intoxicados agudos, además de los incontables de carácter crónico, que son los que los alimentos pueden producir en mayor cantidad y de forma más solapada.

Ciertamente, después de cada uno de tales episodios se ha provocado, como reacción, un avance en la concienciación, un incremento en el interés y un endurecimiento en los controles, aunque, generalmente, con escasa repercusión en el tratamiento académico; ha sido lastimoso ver en los medios de difusión a profesores y especialistas de otras materias, pero legos en Toxicología, dar explicaciones evasivas sobre el origen y sobre la responsabilidad de ciertos episodios.

Entendiendo que el mejor medio de superación es el aprendizaje, hemos pretendido contribuir a ello y poner a disposición del estudioso la situación actual de los conocimientos sobre la *toxicología de los alimentos*, para lo que hemos tenido la suerte de contar con la participación de verdaderos expertos en Toxicología, Nutrición y Bromatología, que han aportado a esta obra lo mejor de su saber, y a quienes, desde aquí y una vez más, expresamos nuestro sincero reconocimiento.

También es merecedora de nuestro agradecimiento la Editorial Díaz de Santos, firma que desde hace muchos años acoge con afecto, dedicación y esmero nuestros manuscritos.

Manuel Repetto
Ana M.^a Cameán

Índice de capítulos

1. Introducción y conceptos. <i>Ana M.^a Cameán, Manuel Repetto</i>	1
2. Principales mecanismos de absorción de tóxicos presentes en alimentos. <i>Alfonso Mate, Carmen M.^a Vázquez</i>	19
3. Importancia de la microbiótica del tracto gastrointestinal en toxicología alimentaria. <i>Encarnación Mellado, Ángeles Jos, Isabel M.^a Moreno, Ana M.^a Cameán</i> ..	39
4. Biodisponibilidad de sustancias tóxicas en los alimentos. <i>Amparo Alegría, Reyes Barberá, M.^a Jesús Lagarda, Rosaura Farré</i>	61
5. Evaluación de la toxicidad de aditivos y contaminantes presentes en alimentos. <i>Antonio Pla, Antonio Hernández, Fernando Gil</i>	77
6. La aplicación de procedimientos <i>in vitro</i> en la evaluación toxicológica alimentaria. <i>Guillermo Repetto, Ana del Peso, Jorge Luis Zurita</i>	95
7. Evaluación de riesgos. <i>Eugenio Vilanova</i>	123
8. Biotoxinas marinas. <i>Ana I. Gago-Martínez, Isabel Ruppén, James Hungerford</i>	141
9. Toxinas de cianofíceas. <i>Isabel M.^a Moreno, Ángeles Jos, Silvia Pichardo, Guillermo Repetto, Ana M.^a Cameán</i>	169
10. Alimentos con sustancias tóxicas de origen natural: plantas superiores alimenticias. <i>Adela López de Cerain, Ana Gloria Gil, José Bello</i>	191
11. Intoxicaciones por plantas medicinales. <i>Juan Carlos Ríos, Enrique París, Guillermo Repetto</i>	211
12. Intoxicaciones por setas. <i>M.^a Rosario Moyano, Ana M.^a Molina</i>	221
13. Sustancias antinutritivas presentes en alimentos. <i>M.^a Lourdes Morales, Ana M.^a Troncoso</i>	237
14. Contaminantes biológicos. <i>Ana M.^a Cameán, Encarnación Mellado, Manuel Repetto</i>	251
15. La calidad como prevención de las intoxicaciones alimentarias. <i>Jordi Mañes, José Miguel Soriano</i>	273
16. Micotoxinas. <i>M.^a Rosa Martínez-Larrañaga, Arturo Anadón</i>	289

XIV Toxicología alimentaria

17. Riesgo tóxico por metales presentes en alimentos. <i>Gemma Falcó, Martí Nadal, Juan M. Llobet, José L. Domingo</i>	309
18. Importancia de la especiación de elementos en toxicología alimentaria. <i>Ana Sayago, Ana M.^a Cameán, Manuel Repetto, Agustín G. Asuero</i>	327
19. Residuos de plaguicidas en alimentos. <i>Guillermina Font, Mónica Fernández, M.^a José Ruiz, Yolanda Picó</i>	349
20. Contaminantes orgánicos persistentes en alimentos: dioxinas policloradas (PCDD), furanos policlorados (PCDF) y bifenilos policlorados (PCB). <i>Carlos Cubría, César Ordóñez, Rosa M.^a Reguera, Yolanda Pérez, Rafael Balaña, David Ordóñez</i>	373
21. Residuos de medicamentos de uso veterinario. <i>Arturo Anadón, M.^a Rosa Martínez-Larrañaga</i>	393
22. Riesgos tóxicos por consumo de animales de caza. <i>Antonio Juan García-Fernández, Francisco Soler</i>	413
23. Residuos de componentes de plásticos en alimentos. <i>Silvia Pichardo, Isabel M.^a Moreno, Ángeles Jos, Ana M.^a Cameán</i>	437
24. Toxicología de los aditivos alimentarios. <i>M.^a Soledad Fernández, M.^a del Carmen García, M.^a Lourdes Morales, Ana M.^a Troncoso,</i>	453
25. Aspectos bromatológicos y toxicológicos de colorantes y conservantes. <i>M.^a Fátima Olea-Serrano, M.^a Carmen López, Herminia López</i>	463
26. Aspectos bromatológicos y toxicológicos de los edulcorantes. <i>Miguel Navarro</i>	475
27. Tóxicos formados durante el procesado, preparación y almacenamiento de los alimentos. <i>Ana M.^a Cameán, Ángeles Jos, Isabel M.^a Moreno, Silvia Pichardo, Manuel Repetto</i>	493
28. Grasas y aceites alimentarios. <i>M.^a Teresa Morales</i>	517
29. Las vitaminas. <i>M.^a Carmen López, Herminia López, M.^a Fátima Olea-Serrano</i>	539
30. Disrupción hormonal. Exposición humana. <i>M.^a Fátima Olea-Serrano, Nicolás Olea-Serrano</i>	553
31. Evaluación de los nuevos alimentos. <i>M.^a Carmen García-Parrilla, M.^a Soledad Fernández-Pachón, Ana M.^a Troncoso</i>	567
32. Alergia alimentaria. <i>Débora Villaño, M.^a Carmen García, M.^a Lourdes Morales, Ana M.^a Troncoso</i>	581

33. Dieta y Cáncer. <i>Arturo Hardisson, Dailos Manuel González-Weller, Consuelo Revert</i>	593
34. Riesgo tóxico por radionúclidos. <i>Judith Maraver, Isabel M.^a Moreno, Ángeles Jos, Ana M.^a Cameán</i>	609
35. Irradiación de alimentos. <i>Judith Maraver, Isabel M.^a Moreno, Ángeles Jos, Ana M.^a Cameán</i>	623
36. Las fuentes de información en toxicología alimentaria: bases de datos accesibles en Internet. <i>Guillermo Repetto, Ana del Peso, Ángeles Jos, Isabel M.^a Moreno, Silvia Pichardo, Ana M.^a Cameán</i>	643
37. Manejo clínico de las intoxicaciones alimentarias. <i>Juan Carlos Ríos, Enrique París, Marli Bettini, Guillermo Repetto</i>	661

1

INTRODUCCIÓN Y CONCEPTOS

Ana M.^a Cameán, Manuel Repetto

Introducción. Toxicología alimentaria: concepto e incidencia en la bibliografía. Clasificación de los tóxicos según su fuente. Seguridad alimentaria: principios y dimensión internacional. Bibliografía.

Introducción

La seguridad alimentaria es un tema de creciente interés social, ya que todos los ciudadanos, como consumidores, estamos expuestos a los tóxicos o sustancias potencialmente tóxicas presentes en los alimentos, y afectados por las prácticas empleadas en la producción, procesado, preparación, conservación y manejo de los alimentos.

A lo largo de los últimos años, una serie de sucesos provocados por dioxinas, hidrocarburos aromáticos policíclicos, biotoxinas, etc., han puesto claramente de manifiesto los riesgos relacionados con la contaminación de los alimentos y han motivado el interés por los estudios sobre la toxicidad de los alimentos. La presencia creciente de contaminantes en estos, el uso de aditivos alimentarios y la consecuente fijación de sus máximas ingestas admisibles en la dieta, los problemas relacionados con las alergias alimentarias, la introducción de alimentos en cuya producción se han utilizado técnicas comprendidas en la

expresión «modificación genética», etc., hacen que en la actualidad tenga una relevancia profunda un estudio sistemático de las sustancias tóxicas o potencialmente tóxicas que pueden encontrarse en los alimentos, dependiendo de las condiciones de preparación, conservación y uso, un desarrollo, en definitiva, de la toxicología alimentaria.

De hecho, una de las principales prioridades estratégicas de la Comisión de las Comunidades Europeas es velar por los más elevados niveles de seguridad alimentaria en la Unión Europea (UE) (Libro Blanco sobre Seguridad Alimentaria, 1999) y numerosos países y entidades regionales están desarrollando agencias de seguridad alimentaria.

Toxicología alimentaria: concepto e incidencia en la bibliografía

La toxicología alimentaria se puede definir brevemente como el estudio de los efectos

tóxicos potenciales de los xenobióticos presentes en los alimentos destinados para el consumo humano y de los animales (Winter, 2002). De forma más detallada, incluye el estudio del potencial tóxico de los alimentos, las condiciones y factores que afectan la presencia de estos tóxicos en alimentos, sus interacciones con nutrientes esenciales, la respuesta del ser humano a estos tóxicos, y los medios de prevención o minimización de los efectos tóxicos (Deshpande, 2002).

En esa misma dirección, la toxicología alimentaria es la rama aplicada de la Toxicología dedicada al estudio de la naturaleza, las fuentes y la formación de sustancias tóxicas en los alimentos, así como sus efectos nocivos, los mecanismos y manifestaciones de estos efectos y la prevención de intoxicaciones mediante el establecimiento de los límites de seguridad de las sustancias (Concon, 1988).

Pretende, consecuentemente, conocer los factores y condiciones que definen la toxicidad, riesgo y seguridad de las sustancias que se encuentran en los alimentos, y la naturaleza de la respuesta del consumidor a las mismas. Los conceptos de toxicidad (capacidad de producir un efecto tóxico), peligro (posibilidad de daño a humanos y/o animales) y seguridad (bajo las condiciones de uso) de las sustancias son relativas, dependiendo de una serie de factores exógenos y endógenos (Cameán y Repetto, 1995; Repetto, 1997).

Los términos «riesgo» y «peligro» se usan a menudo indistintamente. Sin embargo, el «riesgo» es función de la probabilidad de un efecto adverso como consecuencia de un peligro. En el contexto de la alimentación, «peligro» se refiere a una propiedad intrínseca (ejemplo, una toxina alimentaria) que ocasione un efecto adverso; el riesgo tiene en cuenta la probable exposición y la susceptibilidad del consumidor. Es importante aclarar que ningún alimento, incluidos los convencionales, puede garantizarse como absolutamente seguro, donde absoluto se interpreta como 100% seguro bajo cualquier condición de siembra, cosecha, almacenamiento y consumo para todos los sectores de la

población. Los alimentos aprobados poseen un riesgo normal, es decir, sabemos cómo controlar los riesgos residuales y los aceptamos (Robinson, 2003).

Los factores endógenos surgen de la variabilidad bioquímica y fisiológica de los individuos (idiosincrasia) y de su interacción con el ambiente. En los factores exógenos incluimos la naturaleza de las sustancias químicas, concentraciones, fuentes de exposición, presencia de otros compuestos (contaminantes), frecuencia y cantidades absorbidas y factores ambientales (crono y cosmotoxicología).

Esta disciplina difiere en muchos aspectos de otras ramas aplicadas de la toxicología, por la naturaleza y complejidad química de los alimentos (Kotsonis *et al.* 2001). El alimento no es solo esencial a lo largo de toda la vida sino que también contribuye en gran manera a la calidad de vida. Los alimentos en general son más complejos y tienen una composición más variable que el resto de sustancias a las que los humanos podemos estar expuestos. Los alimentos contienen cientos y miles de sustancias, la mayoría de las cuales no se han caracterizado o ensayado totalmente; se ha llegado a afirmar que el número de sustancias no identificadas presentes en los alimentos supera en gran medida al número de las que han sido identificadas. Sin embargo, a pesar de estas incertidumbres sobre su identidad química y pureza, la exposición a ellos es muy elevada.

Así, los alimentos son una mezcla compleja de nutrientes y sustancias no nutritivas, que pueden además interaccionar entre sí. En definitiva, los xenobióticos presentes en los alimentos tienen una dimensión toxicológica más compleja que los productos aislados, por las posibles interacciones con los propios nutrientes u otros constituyentes.

Por todo ello, en los últimos diez años se constata el interés creciente por investigaciones en materia de toxicología alimentaria, anteriormente mencionado. Una búsqueda bibliográfica sobre referencias que cubran publicaciones en temas de toxicología alimentaria en estos últimos 10 años, a través del pro-

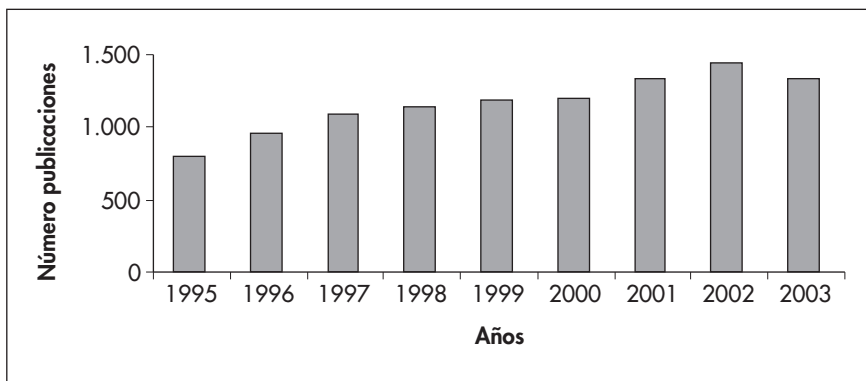


Figura 1.1. Evolución de las publicaciones en toxicología alimentaria.

grama SciFinder Scholar™ así lo demuestra (Figura 1.1). Dicho programa utiliza como fuentes de información diferentes bases de datos científicas como: CAPLUS, MEDLINE, CHEMLIST, CHEMCATS, REGISTRY, CAS-REACT, etc.

Desde las 795 citas referenciadas en 1995, se ha producido en términos generales un aumento del 76% de las publicaciones, ya que el número de citas en los años 2002 y 2003 ha sido del orden de 1.400 citas anuales.

Claramente, la seguridad microbiológica de los alimentos representa un área crítica de seguridad alimentaria, pues mantiene una fuerte presencia actual en el campo de las investigaciones científicas, como lo demuestran el gran número de artículos referentes al tema, y enorme la presencia en Internet de información sobre esta materia.

Según la opinión pública, los contaminantes ambientales y aditivos alimentarios se encuentran entre los principales peligros presentes en los alimentos, mientras, que por el contrario, los artículos científicos evidencian que los niveles de diferentes contaminantes ambientales, tales como los metales o residuos de plaguicidas han disminuido mucho en las últimas tres décadas y suelen encontrarse por debajo de los límites tolerables (Diehl, 2002).

Clasificación de los tóxicos según su fuente

De acuerdo con sus orígenes, los tóxicos alimentarios se pueden clasificar en cinco grandes grupos:

- 1) Constituyentes tóxicos naturales.
- 2) Contaminantes biológicos.
- 3) Contaminantes químicos.
- 4) Aditivos alimentarios.
- 5) Tóxicos derivados.

La Figura 1.2 muestra una visión global de las fuentes de los tóxicos potenciales presentes en los alimentos (Koeman, 1996).

Una clasificación más detallada, que tiene en cuenta el origen de los tóxicos, aparece en la Tabla 1.1, y a continuación se realiza una somera descripción de sus apartados.

1. Alimentos con sustancias tóxicas de origen natural

Son productos originados en el metabolismo de animales, plantas o microorganismos que utilizamos como alimentos, o están presentes en

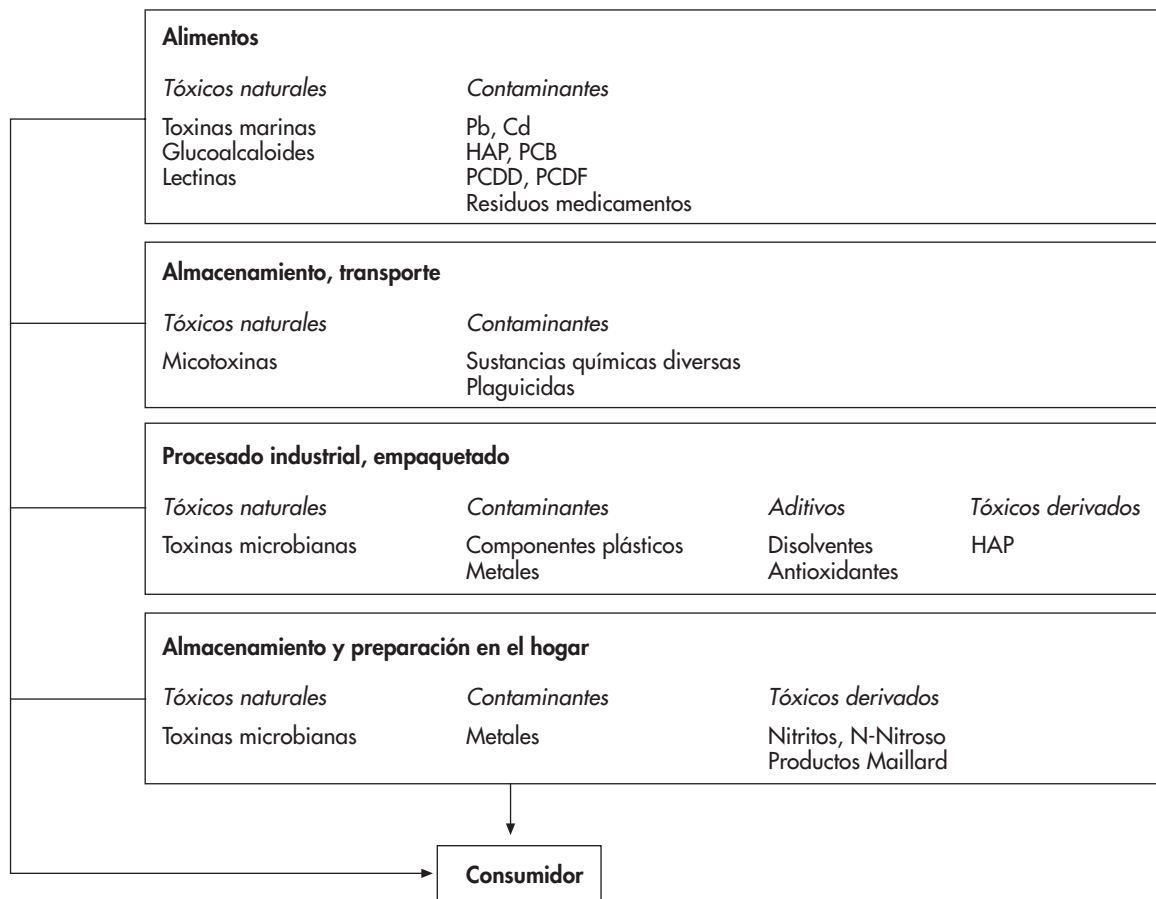


Figura 1.2. Fuentes de tóxicos potenciales presentes en alimentos.

ellos. Muchas de estas sustancias naturales son potentes tóxicos, con efectos adversos inmediatos, y que dan lugar a intoxicaciones severas, incluso fatales. Algunos poseen toxicidad retardada y el conocimiento de su presencia en el alimento y establecimiento del mismo como agente causal de la intoxicación resulta complicado (Cameán y Repetto, 1995).

Popularmente se cree que los compuestos de origen natural son intrínsecamente más seguros que los sintéticos, lo cual no se encuentra avalado por la evidencia científica. Por el contrario, toxinas bacterianas y alcaloides presentes en diversas especies vegetales poseen mayor toxicidad que los compuestos fabricados por el hombre (Repetto, 1997). Muchas de estas sustancias naturales pueden proporcionar un mayor

riesgo de cáncer que los riesgos tóxicos derivados de la exposición a sustancias sintéticas (Ames *et al.* 1990). En esa misma dirección, un informe del Consejo Nacional de Investigaciones de la Academia Nacional de Ciencias americana concluyó que los componentes naturales de la dieta pueden ser de mayor interés que los componentes sintéticos con respecto al riesgo cancerígeno (NRC, 1996).

1.1. Alimentos marinos

Los tóxicos naturales pueden estar presentes principalmente en pescados, moluscos, vegetales y hongos superiores, principalmente.

Las toxinas presentes en alimentos marinos muchas veces no están confinadas a una única

Tabla 1.1. Alimentos y sus constituyentes, según su interés toxicológico.

1. ALIMENTOS CON SUSTANCIAS TÓXICAS DE ORIGEN NATURAL
1.1. Alimentos marinos.
1.2. Plantas superiores.
1.3. Hongos superiores.
1.4. Sustancias antinutritivas.
2. CONTAMINANTES BIOLÓGICOS
2.1. Infecciones bacterianas.
2.2. Toxiinfecciones bacterianas.
2.3. Micotoxinas.
3. CONTAMINANTES QUÍMICOS. RESIDUOS
3.1. Sustancias inorgánicas.
3.2. Sustancias orgánicas.
3.2.1. Plaguicidas.
3.2.2. Dioxinas, dibenzofuranos y bifenilos clorados.
3.2.3. Medicamentos veterinarios.
3.2.4. Plásticos.
4. ADITIVOS ALIMENTARIOS
5. TÓXICOS DERIVADOS: FORMADOS DURANTE EL PROCESADO, PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LOS ALIMENTOS Y EN EL PROPIO CONSUMIDOR
6. CANCERÍGENOS DE ORIGEN ALIMENTARIO
7. DISRUPTORES HORMONALES
8. ALIMENTOS TRANSGÉNICOS
9. ALIMENTOS ALERGÉNICOS

especie; por ejemplo, aproximadamente unas 400 especies de pescados están implicadas en la intoxicación por ciguatera. Sin embargo, algunas toxinas son específicas de especies o géneros únicos. Un factor que complica el estudio de las toxinas marinas es la frecuencia esporádica con la que estos fenómenos ocurren, por lo que no se pueden predecir las intoxicaciones.

Las toxinas presentes en pescados se clasifican generalmente de acuerdo con su localización en el mismo. Entre las intoxicaciones por consumo de pescado citaremos las debidas al consumo de peces globo (fugu) en Japón, cuya toxina (tetrodotoxina) se concentra preferentemente en hígado y gónadas; otra intoxicación es debida a la ciguatera y diferentes toxinas relacionadas, que son neurotoxinas ictiosarcotóxi-

cas extendidas en especies muy variadas; también hay que tener presente diferentes intoxicaciones que cursan con síntomas suaves, producidas por consumo de pescados muy habituales en nuestra dieta (salmonetes, sardinas, etc.).

El fitoplancton marino se ve frecuentemente afectado por la presencia de algas microscópicas, las cuales sirven de alimentación a especies tales como moluscos bivalvos (mejillones, almejas, vieiras, ostras, etc.) así como larvas de crustáceos y otras especies marinas. La proliferación masiva de algas puede causar importantes daños socioeconómicos y sanitarios. Entre las contaminaciones más frecuentes de alimentos de origen marino por proliferaciones de algas tóxicas y consecuentemente de humanos consumidores de los mismos se encuentran: la intoxicación parali-

zante *Paralythic Shellfish Poisoning* (PSP), la intoxicación diarreica, *Diarrhetic Shellfish Poisoning* (DSP) y la amnésica, *Amnesic Shellfish Poisoning* (ASP) (Gago-Martinez, 2004).

1.2. Plantas superiores

Existe un amplio grupo de sustancias endógenas en alimentos derivados de plantas superiores que podemos clasificar por sus grupos funcionales o su acción fisiopatológica. Algunas intoxicaciones se producen con poca ingesta (setas), pero para otras se precisa un consumo elevado de alimentos; por ejemplo, los que contienen glucósidos cianogénicos o inhibidores de la colinesterasa. Otros principios activos, aunque se encuentran en concentraciones que no poseen una inmediata toxicidad aguda, su consumo continuado puede dar lugar a intoxicaciones crónicas, lo que hace esencial evaluar su significado para la salud humana y tomar medidas preventivas para minimizar riesgos, como es el caso de las metilxantinas. Otro aspecto a tener en cuenta es la idiosincrasia, por ejemplo, individuos con déficit genético de glucosa-6-fosfatos deshidrogenasa cuando consumen habas frescas o inhalan su polen padecen favismo, frecuente en el área mediterránea, caracterizado por anemia hemolítica (Cameán y Repetto, 1995).

1.3. Hongos superiores

Aunque los hongos superiores no se encuentran en alta proporción en la dieta diaria humana, presentan un gran riesgo tóxico, si tenemos en cuenta la frecuencia de intoxicaciones (incluso fatales) en relación con el número de personas expuestas. Existiendo aproximadamente unas 30-50 especies tóxicas, estas son responsables de aproximadamente el 70% de las intoxicaciones naturales, con efectos muy graves y letales (Food Research Institute, 1996).

1.4. Sustancias antinutritivas

Las sustancias antinutritivas son compuestos capaces de producir un déficit nutricional, por

interferir en la utilización y función de los nutrientes, pudiéndose clasificar en función del nutriente (proteínas, aminoácidos, elementos minerales, vitaminas) o en función de su origen, natural o adquirido a través de diversas fuentes (Derache *et al.*, 1990; Concon, 1988; Deshpande, 2002).

2. Contaminantes biológicos

Los alimentos por bacterias y microhongos han provocado a lo largo de la historia múltiples intoxicaciones y toxiinfecciones alimentarias (véase Capítulo 14). Por su parte, diferentes microorganismos del propio tracto gastrointestinal del huésped pueden actuar sobre los componentes de los alimentos, dando lugar a metabolitos tóxicos (descarboxilación de aminoácidos, producción de nitrosaminas, etc.).

En comparación con la presencia de tóxicos naturales, la contaminación biológica presenta gran interés en temas de seguridad alimentaria. Por ejemplo, en EE UU se estima que ocurren anualmente aproximadamente 76 millones de casos de intoxicaciones alimentarias de origen microbiano, unido a 325.000 hospitalizaciones y 5.000 fallecimientos causados por bacterias, virus y priones (Mead *et al.*, 1999). Es, por tanto, importante enfatizar que la mayoría de las intoxicaciones alimentarias en los países desarrollados son atribuibles a la contaminación biológica de los alimentos (Kotsonis *et al.*, 2001).

2.1. Infecciones bacterianas

Las intoxicaciones alimentarias por bacterias y virus tienen varios grados de severidad, variando desde una indisposición mediana a enfermedades de largo tratamiento. Su importancia como problema de salud pública vital no ha sido a veces valorado totalmente, debido a la dificultad de evaluar la incidencia real de las mismas y a la variabilidad en su severidad (Deshpande, 2002).

Efectivamente, según diferentes autores, solo una pequeña proporción de casos llegan real-

mente a los servicios de salud y se investigan de forma adecuada, sugiriéndose que hasta el 10% de la población mundial puede anualmente padecer una intoxicación alimentaria de origen microbiano (Kaferstein *et al.*, 1999).

La incidencia de las intoxicaciones alimentarias ha aumentado en la última década en los países desarrollados, y son variados los factores que parecen contribuir a dicho aumento: 1) mejores métodos de detección e identificación de los microorganismos y toxinas; 2) desarrollo de los estudios epidemiológicos, que han hecho aumentar el número de casos declarados; 3) factores dependientes del estilo de vida, tales como aumento del consumo de alimentos exóticos, o de alimentos procedentes de otros países con estándares sanitarios diferentes o cepas de organismos distintas, y aumento del consumo de alimentos preparados o en restaurantes lo que implica un mayor número de personas implicadas en su manejo, y el que dichos alimentos sean tratados en diferentes etapas y mantenidos a veces en condiciones no muy adecuadas, antes de su consumo.

Las principales especies bacterianas capaces de causar intoxicaciones alimentarias de origen bacteriano son *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*. El tiempo de presentación de los síntomas después del consumo de alimentos que contienen las toxinas bacterianas generalmente es inferior al requerido para la mayoría de toxiinfecciones alimentarias.

2.2. Toxiinfecciones alimentarias

Están producidas por numerosos microorganismos (Cameán *et al.*, 1995) en su mayoría de la familia *Enterobacteriaceae*, destacando los géneros *Salmonella* y *Shigella*. Dado que la fuente de estos agentes causales suele ser el tracto gastrointestinal de individuos reservorios o las heces de animales y humanos infectadas, o aguas contaminadas que, por deficiencias sanitarias, infectan a los alimentos, los alimentos susceptibles de contaminación pueden ser muy diversos, como carne fresca procedente de animal entero, pescados, moluscos, pasteles de crema, leche no pasteurizada, etc.

Las medidas preventivas, como las recomendadas por la OMS, son fundamentales en la prevención de los incidentes de intoxicaciones y toxiinfecciones alimentarias.

2.3. Micotoxinas

Además existe el riesgo tóxico por consumo de alimentos contaminados por micotoxinas. Estas conforman un amplio grupo de sustancias químicas que son metabolitos secundarios producidos por diversas especies de hongos; son capaces de inducir una gran variedad de efectos tóxicos en humanos y animales cuando ingieren alimentos contaminados. Pueden estar presentes en una gran diversidad de plantas alimenticias, frutas, piensos, y también pueden detectarse en productos animales derivados de animales que han consumido piensos contaminados, constituyendo un ejemplo típico de toxicología de los productos intermedios. Esta disciplina, según Truhaut, estudia el siguiente proceso: una sustancia es absorbida por animales o plantas, y biotransformada por estos a otras sustancias (intermedios), cuyos residuos pueden resultar tóxicos para quien utilice como alimento productos de aquellos vegetales o animales (ej.: aflatoxina M₁).

La presencia de hongos no implica necesariamente la existencia de micotoxinas, las cuales son elaboradas bajo ciertas condiciones. Sobre un centenar de especies de hongos, la mayoría de ellas pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, producen micotoxinas asociadas a intoxicaciones en humanos y animales. Más de una especie de hongo puede producir la misma micotoxina, y más de una micotoxina puede estar implicada en una intoxicación. Dada esta simultaneidad de toxinas en alimentos y piensos, existe la necesidad de evaluar las interacciones entre diferentes micotoxinas. Entre las muy diversas micotoxinas, las aflatoxinas han sido objeto de intensas investigaciones por su gran potencia hepatocarcinógena en ciertas especies animales (Kotsonis *et al.*, 2001).

Entre las diferentes líneas y recomendaciones futuras en el campo de las micotoxinas caben destacar las siguientes (Deshpande, 2002):

- Seguimiento de la presencia y cuantificación de micotoxinas en alimentos y piensos.
- Consumo potencial humano de micotoxinas específicas.
- Desarrollos genéticos de plantas resistentes a la acción de microhongos toxigénicos.
- Evaluación toxicológica de nuevas toxinas de forma individual y en combinación con otras micotoxinas más usuales.
- Desarrollo de programas de prevención de la contaminación de alimentos y piensos que consideren diferentes aspectos como: almacenamiento, tratamientos antifúngicos, destoxicación, irradiación, inactivación microbiana, control integrado de micotoxinas.
- Desarrollo de estudios de mecanismos de acción moleculares, órganos diana, mecanismos de destoxicación, estudios de absorción y transporte.

3. Contaminantes químicos. Residuos

3.1. Sustancias inorgánicas

Los constituyentes inorgánicos del agua y suelo, como por ejemplo, Se, Cd, Hg, nitratos, de forma natural pueden absorberse y acumularse en los alimentos o contaminarlos artificialmente, como consecuencia de las diversas actividades industriales, agrícolas o tecnológicas. Ello unido a las variaciones geológicas, ecológicas (la acidificación del suelo puede incrementar la absorción de metales como Cd), procesos agrícolas (uso de fertilizantes), migración de metales constituyentes de los materiales de envasado, cocinado o almacenamiento de alimentos, y diferentes hábitos dietéticos, hace que existan grandes diferencias en la ingesta de metales pesados entre la población.

Esta variabilidad en la absorción de metales, y el hecho de que en muchos casos (salvo exposición ocupacional) los alimentos constituyan la principal fuente de exposición, unido a la capacidad de acumulación de los metales en los organismos vivos, ha llevado a que diferentes

organizaciones supranacionales (OMS, FAO, UE, etc.) reconozcan la necesidad de establecer programas integrados con carácter internacional sobre concentraciones permisibles o límites de metales y demás contaminantes en alimentos, con métodos normalizados de toma de muestra y análisis. De hecho, la prevención de la exposición requiere además de una reducción de la emisión, la monitorización de alimentos y bebidas, y disponer de información de hábitos de consumo de los mismos (Cameán y Repetto, 1995).

Las investigaciones relativas a los elementos traza tienden a dirigirse hacia la detección, control y evaluación toxicológica de los mismos.

Respecto a la detección, se han de seguir desarrollando nuevas metodologías que permitan la determinación de los elementos con adecuada calidad, sensibilidad, rapidez, automatización y especificidad para cada tipo de alimento. En el control hay una necesidad de vigilar, a nivel internacional, las concentraciones de los elementos traza presentes en los alimentos. En cuanto a la evaluación toxicológica, tienen una alta prioridad las investigaciones sobre la biodisponibilidad de los elementos traza y los estudios de las especies químicas presentes en alimentos. Si en un principio se consideraba la toxicidad de los elementos químicos, después se vio que la forma elemental tiene poca importancia toxicológica, que depende realmente de la valencia, grado de oxidación o forma en que un metal se integra en un compuesto (especie química) (véase Capítulo 18).

La necesidad de determinar las diferentes especies de elementos traza en el medio ambiente, en materiales biológicos y alimentos, se ha convertido en estas últimas décadas en un reto, jugando un papel fundamental en diversas áreas, entre las que se pueden destacar, la química medioambiental, toxicología (determinación de la toxicidad y ecotoxicidad de elementos), control de calidad de productos alimentarios, control de procesos tecnológicos, control de calidad de productos farmacéuticos y medicamentos, química clínica, evaluación del impacto de instalaciones tecnológicas, exa-

men de exposición ocupacional, etc. (Kot y Namiesnik, 2000). El conocimiento de la especiación de los elementos ambiental y biomédicamente relevantes, así como su distribución en diferentes formas, reviste importancia, ya que la actividad biológica y toxicidad dependen críticamente de la forma química. Tanto los diferentes estados de oxidación de un elemento, como los diferentes compuestos inorgánicos u orgánicos de los que forman parte, implican diferencias en las propiedades estructurales y fisicoquímicas, y consecuentemente, diferencias respecto de la absorción, transporte, distribución, acumulación y efecto final (Soria *et al.*, 1995). Las medidas de concentración total de elementos traza proporcionan escasa información sobre su actividad biológica, puesto que las distintas formas se asimilan y actúan de forma diferente.

Por tanto, hay un inmenso trabajo aún por desarrollar, siendo necesario alcanzar un profundo conocimiento de las características toxicológicas de los alimentos en relación con los elementos traza. Ello es muy útil para informar a los productores con la finalidad de que adapten su actividad de forma que cumplan los requerimientos de la legislación internacional y las demandas de calidad e inocuidad requeridas en el mercado y los consumidores; y por último, para desarrollar estándares regulatorios sobre el máximo contenido de estos elementos traza, y sus especies (Ibáñez y Montoro, 1996).

3.2. Sustancias orgánicas

El incremento de la productividad agrícola y el desarrollo industrial han ocasionado una mayor presencia artificial de *contaminantes orgánicos* (plaguicidas, dibenzodioxinas (PCDD) y dibenzofuranos policlorados (PCDF), bifenilos policlorados (PCB), plastificantes en los alimentos de consumo humano (moluscos, vegetales, carnes, huevos) o bien animal (piensos) que pueden pasar a su vez a la cadena alimentaria humana.

Los principales contaminantes orgánicos presentes en los alimentos provienen de:

- a) Residuos de plaguicidas.
- b) Residuos de dibenzo-p-dioxinas policloradas (PCDD), dibenzofuranos policlorados (PCDF) y bifenilos policlorados (PCB).
- c) Medicamentos de uso veterinario.
- d) Migración de constituyentes de los plásticos.

3.2.1. Plaguicidas

En contraste con los millones de casos de intoxicaciones de origen microbiano, la incidencia de intoxicaciones humanas a partir de residuos de *plaguicidas* en alimentos normalmente es baja (Ferrer y Cabral, 1995; Grunow, 1999). Sin embargo, el interés del consumidor permanece siendo elevado, y por ejemplo, el 72-82% de los americanos considera que dichos residuos en los alimentos representan un peligro para la salud (Bruhn *et al.*, 1998). Además, recientemente, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) ha advertido del riesgo de accidentes contaminantes a partir de los miles de toneladas de plaguicidas almacenados en numerosos países, así como de plaguicidas caducados que deberían ser eliminados apropiadamente y que podrían dar lugar a intoxicaciones masivas tanto agudas como crónicas. La retención de residuos de plaguicidas por los alimentos se concreta a los compuestos más persistentes o estables ante la humedad, luz, oxidantes, procesos metabólicos, etc., y por tanto, fundamentalmente a los productos organoclorados, a algunos organometálicos y a ciertos carbamatos. Los compuestos organofosforados desaparecen más fácilmente, pero pueden persistir en distintos grupos de alimentos (Repetto *et al.*, 1995).

La toxicidad aguda de estos compuestos es solo marginalmente relevante en el campo de la toxicología alimentaria, ya que ordinariamente se está expuesto a bajos niveles de plaguicidas. Sin embargo, en la exposición crónica a través del consumo de alimentos que contengan residuos de plaguicidas, los riesgos toxicológicos se centran en su potencial carcinógeno, mutágeno

y teratógeno, así como en su posible actividad como disruptores endocrinos. Respecto a la actividad carcinogénica, la mayoría de los plaguicidas sospechosos de serlo pertenecen al grupo de los organoclorados, mientras que los estudios sobre organofosforados y carbamatos son menos concluyentes.

Para conocer el grado de exposición de la población a los residuos de plaguicidas en los alimentos se pueden realizar estudios de monitorización de los niveles de un amplio grupo de plaguicidas en estudios de dietas totales, y comparar las ingestas diarias estimadas con las ingesta diaria admisible (IDA) establecidas por la FAO/OMS (Deshpande, 2002). En España se han efectuado estudios teniendo en cuenta la composición de la cesta de la compra y los *límites máximos de residuos* (LMR) establecidos en la normativa vigente. De estos, la ingesta diaria estimada (IDE) teórica y su comparación con las ingestas diarias admisibles (IDA) permite determinar que el riesgo para la población es mínimo cuando no se superan los LMR (Fernández *et al.*, 2001; Valenzuela *et al.*, 2001; Blasco *et al.*, 2002).

3.2.2. Dioxinas, dibenzofuranos y bifenilos clorados

Otros contaminantes ambientales incluyen los compuestos orgánicos persistentes de *origen antropogénico* tales como policlorodibenzo-p-dioxinas (PCDD), dibenzofuranos policlorados (PCDF) y bifenilos policlorados (PCB). Estos compuestos se han visto involucrados en diferentes incidentes de contaminación ambiental con amplia repercusión pública: intoxicaciones masivas por consumo de aceite de arroz contaminado en Yusho (1968) y de Yu-Cheng (1979), muy especialmente el accidente de Seveso (1976) y más recientemente en diversas crisis alimentarias, como la contaminación de carnes en Bélgica (1999), granulados de pulpa de cítrico importado de Brasil (1997-1998), arcillas contaminadas utilizadas como aditivos en piensos animales (1999), niveles elevados en huevos (1999), etc. (Fabrellas, 2001).

Aquellos compuestos presentan una serie de características comunes a todos los contaminantes calificados como *compuestos orgánicos persistentes* (COP): persistencia, bioacumulación, biomagnificación y semivolatilidad; las fuentes de estos contaminantes son múltiples y diversas, de forma que son ubicuas en el medio ambiente: suelo, sedimentos, aire, de manera que afectan a las cadenas tróficas, siendo la dieta la principal fuente de exposición humana a las mismas (excluyendo exposición ocupacional o accidentes ya mencionados), y consecuentemente, provocando su interés en toxicología alimentaria.

La OMS recomendó en 1998 que la ingestión de dioxinas en humanos adultos no debería sobrepasar los límites de 1-4 pg/kg peso/día, debiéndose realizar esfuerzos para conseguir un límite por debajo de 1 pg (WHO, 2000), estimándose que en muchos de los países industrializados una parte importante de la población está expuesta a niveles por encima de la ingesta diaria tolerable.

La exposición a 2, 3, 7, 8-tetraclorodibenzo-paradioxina (2, 3, 7, 8-TCDD) se ha asociado con la aparición de cáncer, y otros efectos varios, como alteraciones endocrinas, reproductivas en ambos géneros, y sobre el desarrollo.

Las dioxinas están clasificadas por la Agencia de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC, 1997) en la categoría 1, como cancerígeno humano. En diferentes estudios se ha observado una clara asociación positiva entre las incidencias de cáncer de pulmón, sarcomas y linfomas y el incremento de la exposición a dioxinas. Respecto a otros efectos tóxicos, las evidencias epidemiológicas en humanos son actualmente concluyentes en la producción de daños dermatológicos, alteraciones enzimáticas hepáticas, y aumentan cada vez más las evidencias de la asociación entre las TCDD y diversas patologías cardiovasculares (ateroesclerosis e infarto de miocardio) y del tiroides, tanto en adultos como en niños.

3.2.3. Medicamentos veterinarios

En las últimas décadas se ha producido un creciente interés en relación con diferentes aspectos

relacionados con el uso de los medicamentos veterinarios y la presencia de sus residuos en alimentos de origen animal; consisten en antibióticos, hormonas de crecimiento o producción de leche, factores de engorde, finalizadores, etc., Particular interés presentan los peces, moluscos, etc., producidos por acuicultura, que reciben diversidad de productos, como antibióticos, hormonas y factores de crecimiento, fungicidas, algicidas, etc. La seguridad del consumidor de estos productos de origen animal, tratados con medicamentos veterinarios, es de gran importancia. Mientras el empleo de medicamentos en humanos implica un tratamiento voluntario durante normalmente cortos periodos de tiempo, y bajo supervisión controlada, la exposición de los consumidores a trazas de medicamentos a través de la ingesta de alimentos es involuntaria e incontrolada (Deshpande, 2002).

Los residuos de medicamentos veterinarios se definen como «sustancias farmacológicamente activas, principios activos, excipientes o productos de degradación y sus metabolitos que permanezcan en los productos alimenticios obtenidos a partir de animales a los que se les hubiera administrado el medicamento veterinario» (Reglamento 2377/90/CEE).

La concentración de residuos esperada es función de diversos factores, como el grado de absorción del medicamento a partir del tracto gastrointestinal, la dosis administrada, la farmacocinética del producto y el tiempo de espera o retirada, de forma que una de las razones más obvias para que se produzcan residuos por encima de los límites legislados, o límites máximos de residuos (LMR) se debe a la no adecuada observación de los periodos de espera recomendados, bien de forma deliberada o accidental (Deshpande, 2002).

Los residuos de los diferentes medicamentos normalmente aparecen en la carne (incluso de peces), leche, huevos y miel a muy bajas concentraciones, pero hay una serie de efectos no relacionados con la dosis como son las reacciones alérgicas o los riesgos de carcinogénesis, mutagénesis o teratogénesis derivados de estos residuos. Además, el no cumplimiento de los

tiempos de espera puede conducir a niveles de residuos más elevados en los tejidos comestibles del animal, constituyendo un serio riesgo toxicológico.

Es importante señalar asimismo que los residuos pueden alterar la microflora intestinal humana y contribuir al aumento de la resistencia de bacterias a antibióticos, tema de gran actualidad. A ese respecto, el Comité de Expertos conjunto FAO/OMS sobre Aditivos Alimentarios ha desarrollado un árbol de decisión para evaluar el efecto potencial de residuos de medicamentos veterinarios sobre la microflora intestinal humana (WHO, 2002).

3.2.4. Plásticos

Los materiales empleados en el empaquetado de alimentos, principalmente plásticos y resinas, están generalmente en contacto íntimo con los mismos, a menudo durante periodos de tiempo prolongados, y a veces a altas temperaturas. Estas condiciones pueden ocasionar la migración de diversos constituyentes (monómeros, estabilizadores, diversos coadyuvantes) y consecuentemente, producir riesgos de salud para la población.

La extensión de migración de una sustancia depende de varios factores, como son: a) la concentración del residuo o contaminante en el material; b) el grado de unión o de movilidad en la matriz del material; c) el grosor del material de empaquetado; d) la naturaleza del alimento en contacto con el material (graso, ácido, alcohólico, etc.); e) la solubilidad de la sustancia en el alimento y f) la duración y temperatura de contacto (Barlow, 1999).

La evaluación del riesgo tóxico en el caso de estos materiales de empaquetado incluye dos cuestiones claves: la toxicidad inherente de la sustancia que migra y conocer el nivel de exposición humana.

El uso de simuladores de alimentos para determinar niveles de migración potencial desde el envase tiene una gran aplicación, particularmente en el contexto de la toxicología regulado-

ra. Suelen aplicarse factores de corrección a los resultados, sobre todo en el caso de simuladores de alimentos grasos, ya que estos tienen una mayor capacidad de extracción que el propio alimento. La información obtenida de los ensayos de migración debe ser utilizada para estimar la exposición dietética. La ingesta diaria admisible (IDA) se calcula multiplicando el valor de migración de los simuladores de alimentos por los factores de consumo dando lugar a la concentración total en la dieta.

Hoy en día, aún se tiene escasa información sobre las características toxicológicas de muchos de estos productos que pueden migrar al alimento a partir del material de empaquetado, sobre todo en relación con la carcinogenicidad, mutagenicidad, teratogenicidad y alergenicidad de los mismos. También se requieren estudios conducentes a elucidar las interacciones entre diversos migrantes, por ejemplo monómeros, y estudios de biotransformación.

4. Los aditivos alimentarios

Se agregan, a diferencia de los contaminantes (presencia generalmente accidental), intencionalmente a los alimentos y bebidas, con el objeto de modificar sus caracteres organolépticos, facilitar o mejorar su proceso de elaboración y/o conservación. Aunque muchos de estos aditivos han sido usados durante largo tiempo y se consideran sustancias GRAS (generalmente reconocidas como seguras) las intoxicaciones crónicas que se han producido por la presencia de los aditivos en múltiples alimentos, los fenómenos de hipersensibilidad y riesgo de cancerogénesis, justifican que continúen las investigaciones sobre estas sustancias, y sus mecanismos de toxicidad y se revisen las *ingestas diarias admisibles* (IDA) de las mismas.

Aproximadamente unos 2.800 compuestos están aprobados en EE UU, de los que aproximadamente unos 1.300 son agentes del flavor, empleados en pequeñas concentraciones. Los nuevos aditivos introducidos en el mercado americano requieren para su aprobación el seguir las

recomendaciones de la FDA para la evaluación de su seguridad, cuya versión más reciente conocida como «Libro Rojo» se publicó en Julio de 2000 y se puede obtener en la dirección (<http://www.cfsan.fda.gov/~redbook/red-toca.html>). En la Unión Europea, por contraste, la lista E de aditivos permitidos, definidos según la directiva 89/107/EEC (EEC, 1989) es más reducida (unos 400 compuestos) (Maga, 1995).

Internacionalmente, el Comité mixto FAO/WHO de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) es el que evalúa la seguridad de los aditivos alimentarios, así como los residuos de medicamentos veterinarios en alimentos, tóxicos naturales y contaminantes. Desde 1956 JECFA ha evaluado más de 1.300 aditivos alimentarios, y las evaluaciones se pueden consultar en <http://www.inchem.org/jecfa.html>.

Lógicamente, continúan las investigaciones sobre nuevos aditivos más seguros, que puedan reemplazar algunos de los existentes, así como sobre las técnicas de procesado que requieran menos aditivos. Respecto a su evaluación toxicológica, debe prestarse especial atención a la metodología de evaluación de los efectos neurotóxicos e inmunotóxicos de los aditivos, así como en la profundización de sus mecanismos de acción, mediante los progresos que se vayan alcanzando en bioquímica y biología celular y molecular. Así mismo se deben intensificar los esfuerzos en la monitorización de su exposición para la población en general y para grupos de riesgo.

5. Tóxicos derivados: formados durante el procesado, preparación y almacenamiento de los alimentos y en el propio consumirdor

Los componentes de los alimentos pueden reaccionar con el concurso de agentes físicos (calor, luz) durante el cocinado, procesado y almacenamiento, y dar lugar a derivados más o menos tóxicos que los compuestos de partida, o de diferente toxicidad. La presencia de sustancias específicas puede tener efectos catalíticos (p. ej. áci-

dos y metales sobre las reacciones de hidrólisis u oxidación).

Podemos definir los *tóxicos derivados* como «cualquier sustancia tóxica o potencialmente tóxica que pueda formarse química o enzimáticamente en los alimentos durante el procesado, preparación o almacenamiento» (Concon, 1988). Muchos de ellos han sido identificados pero aún queda un gran número que no han sido ensayados desde el punto de vista toxicológico.

Un alimento, tal como se consume finalmente, puede contener una mezcla de sus componentes originales y un gran número de derivados. No solo es esencial que tales compuestos se identifiquen sino también que se establezcan las propiedades toxicológicas de cada uno de ellos y de la mezcla de todos, pues pueden existir fenómenos de sinergia aditiva, potenciación y/o antagonismo.

El procesado térmico de los alimentos es probablemente el procedimiento más empleado en la industria alimentaria, en operaciones tales como el propio cocinado, fritura, tostado, evaporación, esterilización, etc. Los efectos más usualmente reconocidos son la pérdida de nutrientes lábiles a las altas temperaturas, como vitaminas y aminoácidos, y consecuentemente, la pérdida de la calidad nutricional del alimento. Pero es bien conocido que el cocinado normal de los alimentos puede inducir, por ejemplo, la formación de tóxicos pirolíticos derivados de aminoácidos y proteínas, como son los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y aminas heterocíclicas (AH), muchos de los cuales son potentes mutágenos y cancerígenos humanos.

Los lípidos son un grupo amplio de compuestos que, junto a las proteínas y los carbohidratos, son los componentes estructurales principales de todas las células vivas. La importancia nutricional de aceites y grasas y su elevado consumo requiere un buen conocimiento de la composición de los mismos y de los diversos cambios que pueden experimentar en su composición, tanto en condiciones naturales como durante el procesado de los alimentos, debido a que en algunos casos pueden producirse efectos tóxicos asociados a ellos,

como consecuencia de su rancidez (hidrolítica, cetónica y oxidativa) o por su descomposición térmica (oxidación y reacciones de polimerización).

También se producen sustancias tóxicas por la acción de microorganismos, de sus enzimas (descarboxilasas, desaminasas) sobre el propio alimento, incluso en el propio organismo humano (nitrato-reductasas bacterianas del tracto gastrointestinal). Por ello incluimos entre los tóxicos derivados el riesgo tóxico derivado de la presencia de nitratos, nitritos y compuestos N-nitroso en los alimentos.

6. Cancerígenos de origen alimentario

Respecto al *cáncer de origen alimentario*, son numerosas las investigaciones dirigidas hacia este campo, que están experimentando un cambio paradigmático: las investigaciones se están dirigiendo hacia el estudio de los constituyentes de los alimentos que pueden prevenir el cáncer y su mecanismo de acción (Wenzel *et al.*, 2000; Mulcahy y Benson 2001).

A través de la dieta podemos estar expuestos a diferentes sustancias que influyen en el proceso global de inducción de cáncer, proceso complejo que incluye numerosas etapas e interacciones entre factores ambientales, y factores endógenos (Deshpande, 2002). La presencia de estos carcinógenos puede tener orígenes diferentes (Hardisson y Castells, 1988; Cameán y Repetto, 1995): origen natural (cicasina), pero también pueden deberse a procesos de contaminación biológica (aflatoxinas) o química (arsénico inorgánico), o bien puede tratarse de tóxicos derivados, de tóxicos formados en los procesos de almacenamiento, procesado y preparación (HAP, AH, nitrosaminas).

Diferentes factores nutricionales pueden afectar las etapas de iniciación y promoción de tumores, bien inhibiéndolas o induciéndolas. Por ejemplo, diversas vitaminas y metales traza son componentes de varias coenzimas y cofactores, que son requeridos por las enzimas que activan o inactivan sustancias carcinógenas o

procarcinógenas. O bien, diversos nutrientes pueden ser precursores de carcinógenos que se forman *in vivo*. Las grasas pueden actuar como disolventes de carcinógenos, facilitando su absorción, transporte y acumulación en los tejidos. La naturaleza de la dieta puede, asimismo, influir en el tipo y cantidad de microflora intestinal que puede inducir la formación de carcinógenos. El estatus nutricional del individuo puede afectar las defensas del sistema inmunitario y el desarrollo tumoral. Existen numerosos estudios en los que se involucra a las reacciones de producción de radicales libres en el proceso de carcinogénesis, por lo que se detecta un interés creciente en los efectos protectores de diversos componentes de la dieta, como son los debidos a la presencia de antioxidantes (vitaminas E, C, carotenos) (Deshpande, 2002).

7. Disruptores hormonales

En los últimos años se ha extendido el término de *disruptores hormonales* para definir a un conjunto heterogéneo de compuestos químicos con actividad hormonal. Los disruptores endocrinos interfieren las funciones de este sistema complejo por tres posibles caminos: a) mimetizando la acción de la hormona natural y en consecuencia desencadenando una reacción química similar en el organismo vivo; b) por bloqueo de receptores en las células diana de las hormonas y en consecuencia impidiendo la acción normal de la hormona; y c) afectando la síntesis, transporte, metabolismo y excreción de las hormonas, de tal forma que alteran la concentración apropiada en el órgano diana (Olea y Olea, 2004).

Si bien en especies animales la asociación exposición-contaminación con xenobióticos hormonales y trastornos en el comportamiento, alteraciones en el desarrollo y riesgo de enfermedad es un hecho probado, en el hombre tal relación necesita aún ser demostrada. El incremento de ciertas patologías de nuestro tiempo, como el aumento del cáncer de dependencia hormonal —mama, próstata, testículo, ovario,

etc.—, el alza en la incidencia de los nuevos casos de esterilidad ligada a endometriosis en la mujer y a la azoospermia/oligospermia en el hombre, entre otras, podría estar relacionada con la exposición inadvertida a los xenobióticos hormonales en el medio ambiente, alimentos, etc. Se hace necesario, por tanto, identificar estos compuestos químicos con objeto de eliminar su presencia en el medioambiente y estudiar la extensión y profundidad de la impregnación de las poblaciones humanas y animales (Olea y Olea, 2004).

8. Alimentos transgénicos

La aplicación empírica de la genética a la alimentación se remonta a los comienzos de la agricultura o la ganadería, cuando el hombre decidió obtener mejores razas de animales de granja o variedades vegetales comestibles. Tras milenios de selección de mutantes espontáneos y generación de nuevos organismos utilizando el cruce sexual, los últimos años han dado lugar a la aplicación de la ingeniería genética, de las técnicas comprendidas en el término «modificación genética» (MG) a la tecnología de alimentos (Robinson, 2003; García Parrilla y Troncoso González, 2004).

Con ello se han generado los denominados alimentos transgénicos. Existen decenas de ellos, tanto de origen animal como vegetal y fermentado. Muchos han sido producidos en compañías multinacionales del sector agroalimentario pero otros lo han sido en laboratorios públicos de investigación. Todos los que han obtenido el permiso de comercialización han debido ser sometidos a evaluaciones toxicológicas y ambientales. Aún así, su comercialización ha generado una gran polémica, sobre todo en los países miembros de la Unión Europea, donde son tema constante de debate, en la mayoría de los casos con grandes dosis de apasionamiento y pocas de racionalidad (García Parrilla y Troncoso González, 2004).

Los factores que tienen que considerarse al evaluar la seguridad de los alimentos derivados

de una MG son los mismos que para cualquier otro alimento que no se haya consumido previamente con seguridad, es decir: a) que el nuevo alimento posea la misma capacidad o valor alimenticio que el antiguo; y b) que no posea propiedades tóxicas. De hecho, el Reglamento Europeo de Nuevos Alimentos, introducido en 1997, es de aplicación a cualquier alimento nuevo, y no solo a los derivados de la aplicación de la tecnología de MG. Para establecer si un alimento derivado de un organismo genéticamente es o no seguro, es necesaria su comparación con el alimento más similar que tenga un historial de utilización segura, mediante el método de «equivalencia sustancial», concepto desarrollado mediante las contribuciones de varias organizaciones internacionales independientes y de grupos de expertos (Robinson, 2003), y realizar estudios de toxicidad y alergenicidad.

9. Alimentos alergénicos

El porcentaje de adultos afectados por *alergias alimentarias* suele ser inferior al 1%. Mientras este porcentaje es ligeramente superior en niños, algunas alergias alimentarias han crecido en los últimos años. El término *alergia* supone una reacción del sistema inmunitario que implica, entre otros hechos, una descarga de histamina a partir de los mastocitos, que es a su vez accionada por IgE. Los síntomas que aparecen como resultado de una reacción alérgica varían de un individuo a otro y oscilan desde irritaciones en la piel hasta shock anafiláctico e incluso la muerte. Los tratamientos son muy limitados, siendo la exclusión la única terapia efectiva por el momento (Troncoso y Morales, 2004).

A pesar de que todos los alimentos son potencialmente alergénicos, sólo unos pocos están implicados en la alergia alimentaria, estimándose que ocho tipos de alimentos, tales como: leche de vaca y productos lácteos (Tunik y Goldfrank, 2002), mariscos, huevos, pescados, cacahuetes, semillas de soja, nueces y trigo son los responsables de al menos el 90% de todas las alergias ali-

mentarias (Taylor *et al.*, 2000). Algunos alérgenos de los alimentos tienen una reactividad cruzada tanto con otros alérgenos alimentarios como con alérgenos del medio ambiente.

La sensibilidad resulta de la susceptibilidad genética de los individuos, junto con su historial de exposición a la sustancia. Las costumbres dietéticas determinan la prevalencia de determinadas alergias en el mundo. Por ejemplo, la alergia al cacahuete es bastante común en EE UU, mientras que la dermatitis atópica como respuesta al arroz de la dieta es relativamente frecuente en Japón. Sería de esperar que se produjeran cambios en los patrones actuales de las alergias con la llamada globalización de las dietas (Robinson, 2003).

La mayoría de los alérgenos alimentarios son proteínas, pero representan un número muy pequeño en comparación con los miles de proteínas presentes en los cultivos básicos (Robinson, 2003). Aún se conoce poco sobre las propiedades fisicoquímicas e inmunológicas de la mayoría de los alérgenos, siendo necesarias investigaciones al respecto.

Diversos alimentos (fresas, plátanos, tomate, etc.) y bebidas obtenidos por fermentación o envejecidos (quesos, vinos, cervezas, etc.) poseen histamina y sustancias relacionadas, tras cuya ingestión provocan reacciones similares a las alérgicas pero sin participación de inmunoglobulinas, por lo que reciben el nombre de pseudoalergias (Repetto, 1997).

Seguridad alimentaria: principios y dimensión internacional

La seguridad alimentaria se ha desarrollado considerablemente gracias al papel significativo de algunas organizaciones internacionales, como el Codex Alimentarius y la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) en el marco del Acuerdo sobre Medidas Sanitarias y Fitosanitarias de la OMC (ASPS), la Organización Mundial de la

Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

La UE es el mayor importador/exportador mundial de productos alimenticios e intercambia un conjunto cada vez más diversificado de productos de este tipo con países de todo el mundo. Los cambios producidos en los métodos de producción y de transformación de alimentos, así como diversas crisis alimentarias, han puesto claramente de manifiesto los riesgos relacionados con la contaminación de los alimentos, y la necesidad de llevar a cabo propuestas y normas de seguridad alimentaria que sirvan para proteger y fomentar la salud de los consumidores. Dichas acciones propuestas en el *Libro Blanco sobre Seguridad Alimentaria* (1999) y su aplicación posibilitarán una estructura más coordinada e integrada de la seguridad alimentaria, dirigida a lograr el máximo nivel posible de protección de la salud.

El principio rector de todo el *Libro Blanco* es que la política de seguridad alimentaria debe basarse en un *planteamiento global e integrado*, es decir, a lo largo de toda la cadena alimentaria, «de la granja al consumidor». Los pilares de la seguridad alimentaria incluidos en el *Libro Blanco*, como son: asesoramiento científico, recopilación y análisis de los datos, aspectos reglamentarios y de control, e información al consumidor, deben formar un conjunto uniforme para lograr este planteamiento integrado. Esta política integrada, de la granja al consumidor, abarca todos los segmentos de la cadena alimentaria, como la producción de alimentos para animales, la producción primaria, la transformación de los alimentos, el almacenamiento, el transporte, la venta minorista, y se tiene que poner en marcha de manera sistemática y coherente, eficaz, y a la vez tiene que ser dinámica y transparente.

La Comisión de las Comunidades Europeas consideró asimismo necesario el establecer un nuevo Organismo, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (<http://www.efsa.eu.int>), destinado a convertirse en el punto de referencia científico para toda la Comunidad.

EFSA se creó de acuerdo con el Reglamento (CE) n.º 178/2002 de 28 de enero de 2002, opera de forma independiente a las Instituciones de la Comunidad, y su cometido fundamental es prestar asesoramiento científico independiente sobre todos los asuntos que tengan un impacto directo o indirecto en la seguridad de los alimentos.

Posteriormente, se han creado las Agencias Nacionales de Seguridad alimentaria. En nuestro país, la Agencia Española de Seguridad Alimentaria (AESA) (<http://www.aesa.msc.es/aesa/web/aesa.jsp>) es un organismo autónomo adscrito al Ministerio de Sanidad y Consumo, que tiene como misión garantizar el más alto grado de seguridad y promover la salud de los ciudadanos:

- Reduciendo los riesgos de las enfermedades transmitidas o vehiculadas por los alimentos.
- Garantizando la eficacia de los sistemas de control de los alimentos.
- Promoviendo el consumo de los alimentos sanos, favoreciendo su accesibilidad y la información sobre los mismos.

Con carácter mundial, los consumidores tienen derecho a que los productos procedentes de la Comunidad (UE) respeten los mismos niveles elevados de seguridad alimentaria que se aplican en el interior de esta. Por lo tanto, el nivel exigido a los productos exportados desde la Comunidad deberá ser, al menos, idéntico al que se exige a los productos comercializados en la misma.

En la reciente ampliación de la UE, es esencial que los nuevos países hayan puesto en práctica la legislación en materia de seguridad alimentaria, así como sistemas de control equivalentes a los aplicados en la Comunidad. Ya no hay únicamente responsabilidades nacionales, cada Estado miembro está obligado respecto a todos los ciudadanos de la Unión Europea, y de terceros países por lo que respecta a los alimentos producidos en su territorio. De tal forma que en definitiva se aumente la confianza de los consumidores en la seguridad alimentaria.

Bibliografía

- Barlow SM (1999). Safety assessment of food-packaging materials. En: Van der Heijden K, Younes M, Fishbein L, Miller S (eds.). *International food safety handbook*. Marcel Dekker, New York. pp. 273-285.
- Blasco C, Picó Y, Font G (2002). Monitoring of five postharvest fungicides in fruit and vegetables by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography/mass spectrometry. *J AOAC Int* 85: 704-711.
- Bruhn CM, Winter CK, Beall GA, Brown S, Harwood JO, Lamp CL (1998). Consumer response to pesticide/food safety risk statements: Implications for consumer education. *Dairy Food Environ. Sanit.* 18: 278-287.
- Cameán AM, Repetto M (1995). Estado actual de la toxicología alimentaria. En: *Toxicología avanzada*, Díaz de Santos, Madrid, pp. 205-292.
- Concon JM (1988). *Food toxicology*. Part A, B. Marcel Dekker, New York.
- Derache R et al. (1990). *Toxicología y seguridad de los alimentos*. Omega, Barcelona.
- Deshpande SS (2002). *Handbook of food toxicology*. Marcel Dekker, New York.
- Diehl JF (2002). Some established facts and some new concepts in food toxicology. *Acta Alimentaria* 31: 355-369.
- EEC (1989) Commission Directive 89/107/EEC, 21 December 1988 on the approximation of the laws of the Member States concerning food additives authorized for use in foodstuffs intended for human consumption. *Official J. of the European Communities L40*, 11.2.89, 27-33.
- Ellenhorn MJ (1997). *Ellenhorn's Medical toxicology. Diagnosis and treatment of human poisoning*, 2.^a ed, Williams and Wilkins, Baltimore.
- Fabrellas B (2001). *Coordinación en la toma de decisiones medioambientales. Estado actual, deficiencias y actuaciones*. Reunión de Toxicología Ambiental, Madrid.
- Fernández M, Picó Y, Mañes J (2001). Pesticide residues in oranges from Valencia (Spain). *Food Addit Contam* 18: 615-624.
- Ferrer A, Cabral R (1995). Recent epidemics of poisoning by pesticides. *Toxicol Lett* 82-83: 55-63.
- Food Research Institute (1996). *Food safety*. Marcel Dekker, New York, 1996.
- Gago-Martínez A (2004). Biotoxinas Marinas. En: *Toxicología de postgrado-04. CD-ROM*, Área de Toxicología, Universidad de Sevilla, Sevilla.
- García Parrilla MC, Troncoso González AM (2004). Evaluación de los nuevos alimentos. En: *Toxicología de postgrado-04. CD-ROM*, Área de Toxicología, Universidad de Sevilla, Sevilla.
- Grunow W (1999) *Food Compound-Related Aspects*. En: Marquardt H, Schäfer SG, McClellan R., Welsch F. (eds.), *Toxicology*, Academic Press, San Diego.
- Hardisson A, Castells S (1988). Cancerígenos en alimentos. *Alimentaria* 190: 71-85.
- IARC (1997) Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, volume 69. *Polychlorinated dibenzo-para-dioxins and polychlorinated dibenzofurans*. International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- Ibáñez N, Montoro R (1996). Trace element food toxicology: An old and ever-growing discipline. *Critical Rev Food Sci Nutr* 36: 299-320.
- Kaferstein FK, Motarjemi Y, Moy GG, Quevado F (1999). Food safety: A worldwide public issue. En: Van der Heijden K, Younes M, Fishbein L, Miller S. (eds.) *International food safety handbook*, Marcel Dekker, New York. pp. 1-20.
- Koeman JH (1996). Introduction to nutritional toxicology. En: Niesink RJM, Vries J de, Hollinger MA (eds.). *Toxicology. Principles and applications*. CRC Press, Boca Raton.
- Kot A, Namiesnik J (2000). The role of speciation in analytical chemistry. *TrAC* 19: 69-79.
- Kotsonis FN, Burdock GA, Flamm WG (2001). Food toxicology. En: Klaasen CD (ed.). *Casarett and Doull's Toxicology The basic science of poisons*, 6th ed, McGraw-Hill, New York. pp. 1049-1088.
- Libro Blanco sobre Seguridad Alimentaria* (1999). Comisión de las Comunidades Europeas, COM (1999) 719 final.
- Maga JA (1995). Types of food additives. En: Maga JA, Tu AT (eds.). *Food additives toxicology*. Marcel Dekker, New York. pp. 1-9.
- Mead PS, Slutsker L, Dietz, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 5: 607-625.
- Mulcahy M, Benson A (2001). Chemoprevention of colon cancer. *Cancer Treatment and Research* 106: 155-182.

- NRC (1996). *Carcinogens and anticarcinogens in the human diet*. National Academy Press, Washington, DC.
- Olea MF, Olea N (2004). Disrupción endocrina. Exposición humana. En: *Toxicología de postgrado-04. CD-ROM*. Área de Toxicología, Universidad de Sevilla, Sevilla.
- Repetto M, Martínez D, Sanz P (1995). Actualización de la toxicología de los plaguicidas. En: Repetto M (ed.). *Toxicología avanzada*, Díaz de Santos, Madrid, pp. 557-601.
- Repetto M, (1997). *Toxicología fundamental*, 3.^a ed. Díaz de Santos, Madrid.
- Robinson C (2003). *Alimentos y tecnología de modificación genética. Salud y seguridad en el consumidor*. ILSI, Internacional Life Sciences Institute, Bruselas.
- Soria ML, Repetto G, Repetto M (1995). Revisión general de la toxicología de los metales. En: Repetto M (ed.). *Toxicología avanzada*, Díaz de Santos, Madrid, pp. 293-358.
- Taylor SL, Hefle SL, Gauger BJ (2000). Food allergies and sensitivities. En: Helferich W, Winter CK (eds.). *Food toxicology*. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 1-36.
- Troncoso AM, Morales ML (2004). Alergias Alimentarias. En: *Toxicología de postgrado-04. CD-ROM*, Área de Toxicología, Universidad de Sevilla, Sevilla.
- Tunik MG, Goldfrank LR (2002). Food Poisoning. En: Goldfrank LR, Flomenbaum NE, Lewin NA, Howland MA, Hoffman RS, Nelson LS (eds.). *Goldfrank's Toxicologic emergencies*, McGraw-Hill, New York, pp. 1085-1099.
- Valenzuela AI, Picó Y, Font G (2001). Determination of five pesticide residues in oranges by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography to estimate daily intake of consumers. *J AOAC Int* 84: 901-909.
- Wenzel U, Kuntz S, Brendel MD, Daniel H (2000). Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Research* 60: 3823-3831.
- WHO (2002). Evaluation of certain veterinary drug residues in food. Fifty-eighth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *WHO Technical Report Series No. 911*. OMS. Geneva.
- WHO-ECEH/IPCS (2000). Consultation on assessment of the health risk of dioxins; Reevaluation of the tolerable daily intake (TDI): Executive Summary. *Food Additives and Contaminants 17*: 223-240. OMS. Geneva.
- Winter CK (2002). Electronic information resources for food toxicology. *Toxicology* 173: 89-96.

PRINCIPALES MECANISMOS DE ABSORCIÓN DE TÓXICOS PRESENTES EN ALIMENTOS

Alfonso Mate, Carmen M.^a Vázquez

Introducción: aparato digestivo. Mecanismos de absorción de sustancias. Transporte de sustancias tóxicas en el tracto digestivo. Bibliografía.

Introducción: aparato digestivo

El aparato digestivo es uno de los lugares más importantes de absorción de tóxicos, muchos de los cuales se absorben junto con los alimentos ingeridos.

Anatómica y funcionalmente, el aparato digestivo se divide en el tracto gastrointestinal (TGI) o tubo digestivo y en los órganos accesorios. Los órganos del tubo digestivo comprenden la cavidad bucal, faringe, esófago, estómago, intestino delgado con duodeno, yeyuno e íleon, intestino grueso con ciego, colon y recto, y ano. Los órganos digestivos accesorios comprenden los dientes, lengua, glándulas salivales, hígado, vesícula biliar y páncreas (Figura 2.1).

El tubo digestivo, desde el esófago hasta el conducto anal, está formado por cuatro capas, las cuales contienen un tipo dominante de tejido que realiza funciones determinadas en todo el proceso de digestión y absorción (Figura 2.2). Las cuatro capas, desde el exterior al interior son:

1. La serosa, que completa exteriormente la pared del tubo digestivo, formada por tejido conjuntivo revestido de una capa simple de epitelio escamoso.
2. La muscular, también llamada *muscularis externa*, responsable de las contracciones segmentarias y de los movimientos peristálticos a lo largo del tubo digestivo. Está formada por fibras musculares lisas que exteriormente están dispuestas de forma longitudinal e interiormente de forma circular. En medio de estas dos capas de músculo liso se encuentra el plexo mientérico o de Auerbach, que proporciona la principal inervación del tubo digestivo, que puede ser intrínseca, perteneciente al propio tubo digestivo, o extrínseca, formada por fibras y ganglios del sistema nervioso simpático y parasimpático. En el estómago se encuentra una tercera capa de fibras musculares lisas, en este caso dispuesta de forma oblicua.
3. La submucosa, capa de tejido conjuntivo muy vascularizada que contiene glándulas digestivas, tejido linfoide asociado al trac-

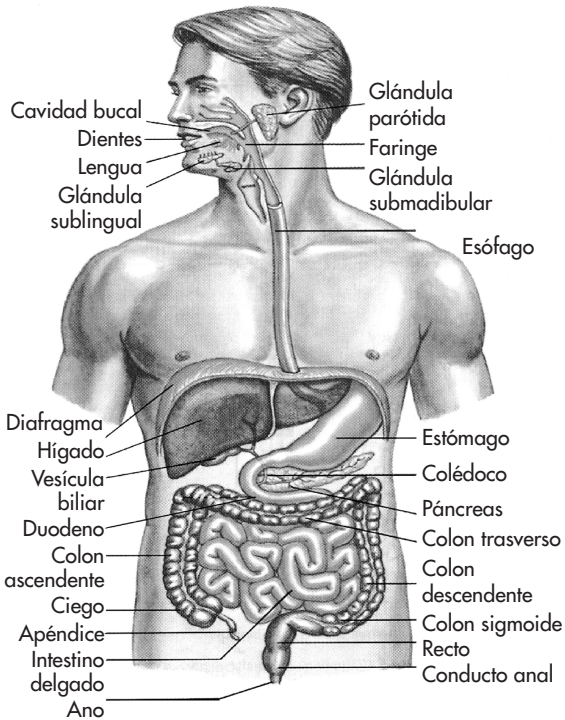


Figura 2.1. Estructura del aparato digestivo.

to digestivo y el plexo submucoso o de Meissner, que facilita la inervación nerviosa a la capa muscular de la mucosa y controla las secreciones digestivas.

4. La mucosa, que reviste la luz del tubo digestivo y es la principal capa de absorción y secreción del tubo digestivo. Consta a su vez de tres capas, la *muscularis mucosae* o capa muscular de la mucosa, la lámina propia y el epitelio.

Dependiendo del lugar del tubo digestivo donde nos encontremos, el epitelio se especializa para la conducción, digestión o absorción del alimento. En caso del estómago, el epitelio es principalmente secretor, con grandes cantidades de glándulas gástricas productoras del jugo gástrico. Por el contrario, en el intestino delgado el epitelio es predominantemente absorptivo, ya que es el lugar por excelencia de absorción de nutrientes. Dada la importancia del intestino delgado en el desarrollo de este capítulo, nos centraremos en describir la mucosa del intestino delgado.

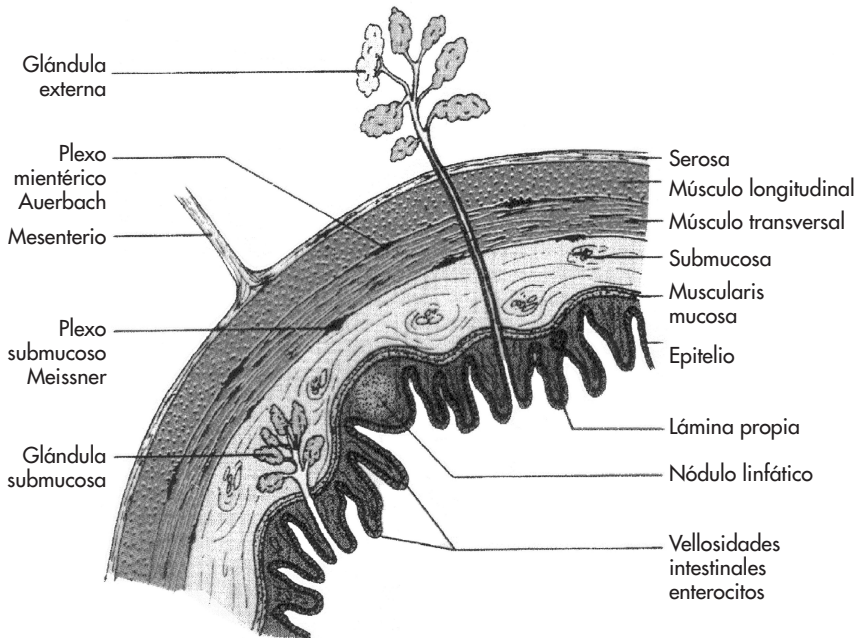


Figura 2.2. Capas del tubo digestivo.

1. Estructura de la mucosa del intestino delgado

La mucosa del intestino delgado contiene numerosos pliegues transversos, formando elevaciones semicirculares que reciben el nombre de válvulas conniventes o pliegues de Kerkring (Figura 2.3). Estos pliegues son muy numerosos en el duodeno distal y en el yeyuno proximal y menos en la mitad proximal del íleon. La superficie de estos pliegues está a su vez cubierta de vellosidades que protruyen hacia la luz intestinal. Cada vellosidad es un pliegue de la mucosa similar a un dedo que se proyecta hacia el interior de la luz intestinal (Figura 2.4). La forma y magnitud de las vellosidades dependen de la zona del intestino delgado que se considere y del estado fisiológico del individuo. El íleon presenta vellosidades más estrechas, cortas y escasas que el duodeno y yeyuno. Estas vellosidades intestinales, junto con las válvulas conniventes aumentan, la superficie de absorción de la mucosa en aproximadamente 30 veces.

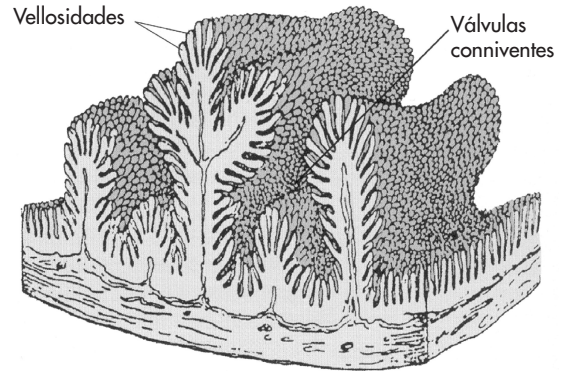


Figura 2.3. Válvulas conniventes.

La lámina propia es una capa de tejido conectivo que rellena el centro de la vellosidad. En ella se encuentra un conducto linfático, vasos sanguíneos, colágeno, elastina y multitud de células del sistema inmunitario, que nos proporciona la defensa inmunológica contra los antígenos ingeridos. En el íleon tenemos las placas de Peyer, que son agrupaciones de células linfoides.

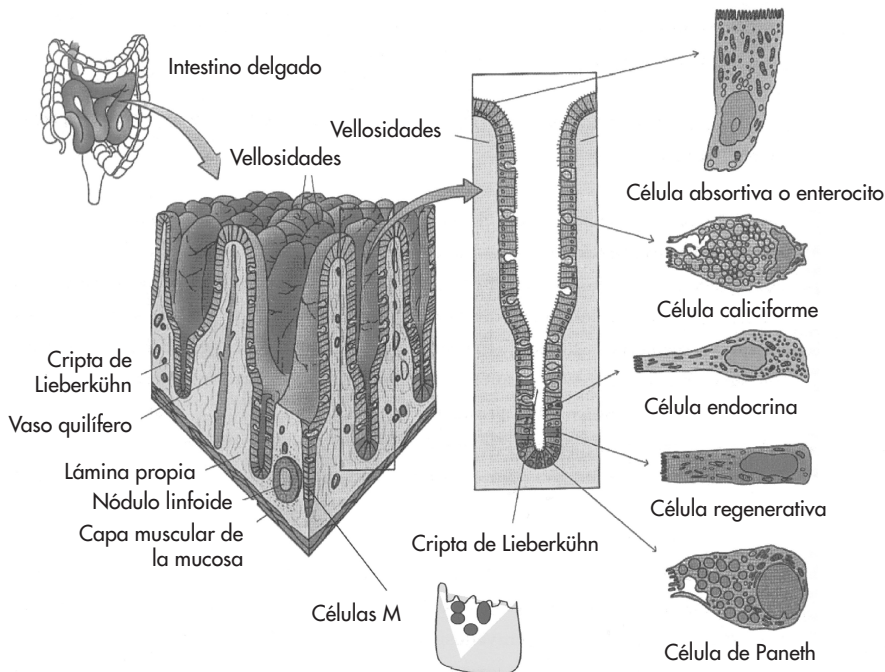


Figura 2.4. Válvulas intestinales.

des. Por ello, la función principal de la lámina propia es la inmunitaria, además de ser una estructura importante de soporte para las células epiteliales intestinales.

El epitelio intestinal se encuentra rodeando toda la vellosidad. Las células epiteliales de la punta de las vellosidades se desprenden de forma continua y son reemplazadas por células que provienen de la base de la vellosidad. El epitelio de la base de la vellosidad se invagina hacia el interior en determinados puntos para formar estrechas bolsas que se abren a la luz intestinal, formando las llamadas criptas intestinales o de Lieberkühn.

El epitelio intestinal presenta dos funciones importantes, que son la de transporte de sustancias y la de barrera defensiva. En el epitelio intestinal nos encontramos con diferentes tipos de células distribuidas desde la punta a la cripta de la vellosidad. De todas ellas, la que presenta un especial interés en la absorción de sustancias son las células absorptivas o enterocitos.

Los enterocitos son células columnares muy polarizadas que se parecen a otras células absorptivas como las del túbulo proximal del riñón (Figura 2.5). La membrana en contacto con el contenido intestinal es la llamada membrana luminal o apical, y la que rodea el resto del enterocito recibe el nombre de membrana basolateral. Ambas membranas presentan diferencias morfológicas y funcionales.

La membrana apical también recibe el nombre de membrana de borde en cepillo, por presentar multitud de proyecciones digitiformes estrechamente unidas llamadas microvellosidades, que hacen aumentar la superficie de absorción de 14 a 40 veces más. En el interior de las microvellosidades hay unos filamentos que recorren toda su longitud y se proyectan hacia el interior de la célula, formando el citoesqueleto de la microvellosidad (Figura 2.5).

Las microvellosidades están revestidas por glucoproteínas que forman el llamado glucocáliz, que no solo protege a las microvellosidades de su autodigestión, sino que además contiene multitud de enzimas que intervienen en la digestión terminal de los dipéptidos y disacáridos hasta sus monómeros. Además de estas proteínas enzimáticas, en la membrana apical existen multitud de otras proteínas no enzimáticas, cuya función puede ser la de actuar como receptores o como transportadores; tal es el caso del transportador de D-glucosa acoplado al sodio, SGLT1 (*sodium glucose cotransporter*) (Wright *et al.*, 1991); o el transportador de sales biliares dependiente de sodio, ASBT (*apical sodium-dependent bile acid transporter*) (Christie *et al.*, 1996), entre otros.

Junto con las proteínas, la membrana apical es rica en lípidos, existiendo una proporción lípido/proteína de aproximadamente 1:1,5. Los lípidos más abundantes son los fosfolípidos y el colesterol.

Tanto la composición de proteínas como la de lípidos de la membrana apical no es uniforme a lo largo del intestino, existiendo diferencias regionales, y dentro de la misma región, considerando la madurez de los enterocitos. En los enterocitos menos desarrollados localizados en

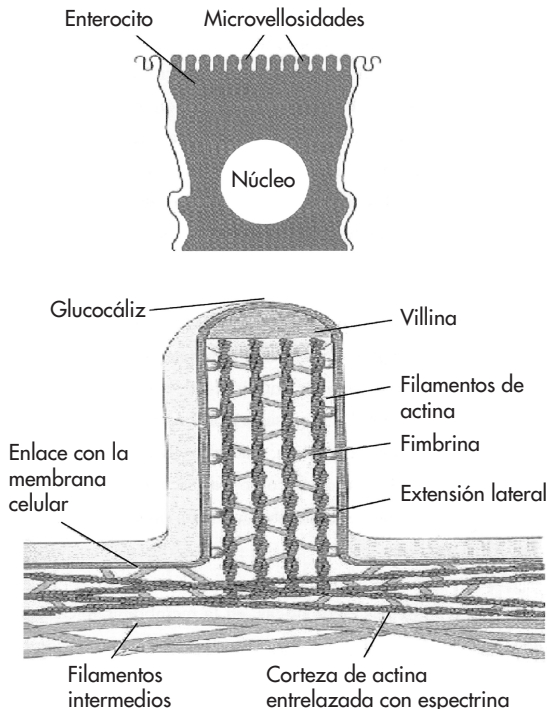


Figura 2.5. Enterocito: microvellosidad intestinal.

la cripta de la vellosidad, las microvellosidades son menos abundantes y más cortas, con un glucocáliz menos desarrollado que en los enterocitos más maduros localizados en la punta de la vellosidad.

2. Otros lugares de absorción

Aunque el sitio principal de absorción en nuestro organismo es el intestino delgado, existen otros órganos, como el estómago, colon o la cavidad oral, que pueden ser también lugares significativos de absorción. Así, la mucosa de la cavidad oral se comporta de manera idéntica a otras membranas. Sin embargo, el corto tiempo de residencia de las sustancias en la boca y la consiguiente escasa absorción hacen que la relevancia toxicológica sea prácticamente despreciable.

El estómago sí es un órgano importante desde el punto de vista toxicológico para aquellas sustancias que son rápidamente absorbidas, como el etanol y algunos ácidos débiles (barbituratos, salicilatos, fenolatos). Por otro lado, un aumento en el valor de pH intragástrico, tras la administración de bicarbonato, por ejemplo, podría causar un aumento considerable en la absorción de bases débiles, que se encontrarían en forma no ionizada.

Otro lugar de absorción es el colon, cuyo epitelio se comporta de manera muy similar al del intestino delgado. La importancia toxicológica de este órgano es enorme, puesto que aquí reside gran cantidad de microorganismos cuya actividad metabólica puede cambiar las propiedades toxicológicas y el patrón de absorción de muchos compuestos, afectando sobre todo sus propiedades ácido-base y liposolubilidad. Estos aspectos serán considerados en el tema siguiente.

3. Factores que determinan la absorción en el tracto digestivo

En general, la toxicidad de los compuestos por vía oral es mucho menor que por otras vías, debido a que la absorción en el tracto gastrointestinal (TGI) está condicionada, como veremos

a continuación, por una serie de mecanismos de control del paso de sustancias. Por otro lado, la mayoría de las sustancias absorbidas pasan por el hígado en primera instancia, donde pueden metabolizarse para dar lugar a otras sustancias de menor, o a veces, mayor toxicidad. Es lógico deducir, por tanto, que el hígado es un órgano expuesto a un daño tóxico muy elevado.

Entre los factores que pueden alterar la absorción por el TGI, y de esa forma modificar la toxicidad de las sustancias, podemos citar:

1. El flujo sanguíneo, de forma que un aumento del mismo hace que las sustancias absorbidas se retiren con mayor rapidez, manteniéndose un elevado gradiente de concentración que permite la absorción de nuevas sustancias. Considerando que después de las comidas el flujo sanguíneo aumenta hasta un 30%, cabe esperar que la absorción de un tóxico sea mayor si este se ingiere durante una comida, siempre que sus propiedades fisicoquímicas se lo permitan. Además, todas aquellas sustancias que influyan sobre el flujo sanguíneo afectarán la velocidad de absorción. Por ejemplo, sustancias vasoconstrictoras (serotonina, vasopresina, noradrenalina), disminuirán el flujo sanguíneo y como consecuencia la absorción de sustancias. Por el contrario, sustancias vasodilatadoras como el etanol aumentan la absorción de sustancias, como por ejemplo el fenobarbital.

2. El flujo linfático, de la misma forma que el flujo sanguíneo. Variaciones en el flujo linfático repercuten sobre la absorción de sustancias que son absorbidas por esta vía, generalmente sustancias liposolubles. Por ejemplo, la tripalmitina, un lípido que duplica el flujo linfático, aumenta la absorción de tetraciclina por medio de esta vía.

3. La motilidad intestinal, que determina el tiempo de permanencia o vaciado de las sustancias, condiciona la toxicidad de las mismas, ya que cuanto mayor sea el tiempo de residencia mayor será la tasa de absorción. Por tanto, cualquier elemento que aumente o disminuya la velocidad de tránsito del TGI tendrá un correspondiente efecto sobre la toxicidad de los com-

puestos. Sustancias que sean tóxicas como tal, verán aumentado su poder de toxicidad al aumentar el tiempo de permanencia. Lo contrario ocurre con aquellas sustancias que adquieren o incrementan su poder tóxico tras ser metabolizadas por la flora intestinal en el colon, lugar predominante de residencia de la microflora, ya que serán absorbidas en mayor grado antes de llegar al colon, disminuyendo su contenido a este nivel.

Dentro de este apartado hay que tener en cuenta factores como la diarrea y el estreñimiento, ya que ambos suponen una alteración de la motilidad intestinal, con sus consecuencias en la absorción de tóxicos.

4. Factores químicos, como por ejemplo la formación de complejos insolubles o quelatos que pueden facilitar o inhibir la absorción. Como ejemplos tenemos el ácido cítrico, que aumenta la absorción de plomo; el ácido ascórbico que aumenta la absorción de Fe, o el EDTA, que reduce su absorción.

Mecanismos de absorción de sustancias

La membrana celular es una bicapa lipídica que funciona como una barrera que controla el paso de moléculas a su través. La zona interior de esta bicapa es lipofílica, por lo que sólo permite el paso de las sustancias liposolubles o de moléculas de bajo peso molecular sin carga. Si se dejara tiempo suficiente, en principio cualquier molécula podría atravesar la membrana; sin embargo, la velocidad de difusión variaría dependiendo de su tamaño y de su solubilidad.

Por tanto, moléculas pequeñas no polares, tales como el O_2 y el CO_2 , se disuelven en la bicapa y la atraviesan rápidamente. Moléculas polares sin carga difunden rápidamente a través de la bicapa si son pequeñas, como el agua, el etanol o el glicerol. Pero difunden lentamente si son grandes, como la glucosa, los aminoácidos o los nucleótidos. Sin embargo, la bicapa es muy

impermeable a los iones y a las moléculas cargadas, independientemente de su tamaño. Por todo ello, se necesitan proteínas de transporte especializadas en la absorción de aquellas sustancias difíciles de atravesar la membrana.

1. Transporte de macromoléculas: endocitosis y exocitosis

El transporte de moléculas de gran tamaño se realiza mediante la formación de vesículas y la unión de estas con la membrana (Figura 2.6). Si la sustancia se transporta hacia dentro se habla de endocitosis, y si es hacia fuera, exocitosis.

La endocitosis es la invaginación de un trozo de membrana hacia el interior de la célula formándose la llamada vesícula endocítica. En la formación de la vesícula se atrapa líquido y sustancias del líquido extracelular que se transportan hacia el interior de la célula. La pinocitosis es un tipo de endocitosis donde se producen vesículas más pequeñas ($0,1-0,2 \mu m$), y ocurre en casi todas las células.

La exocitosis es la formación de vesículas en el interior de las células, llamadas secretoras, que al fundirse con el interior de la membrana

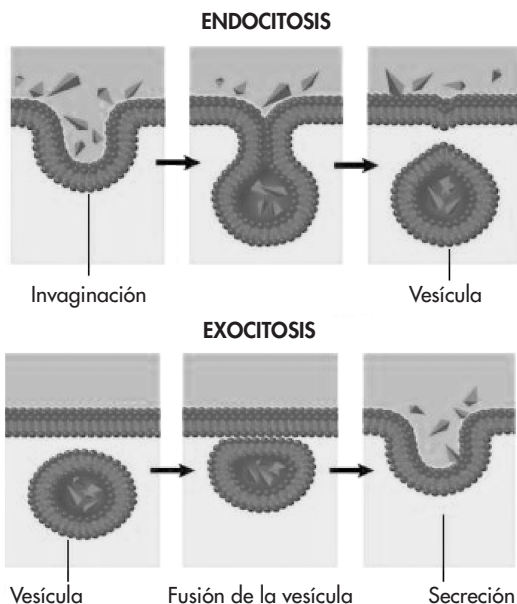


Figura 2.6. Endocitosis y exocitosis.

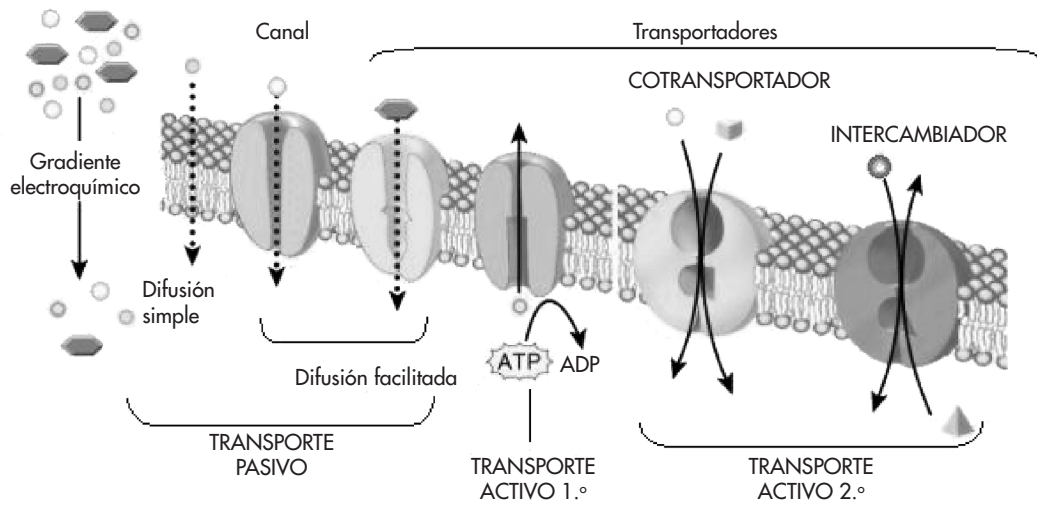


Figura 2.7. Mecanismos de transporte.

celular, eliminan hacia el líquido extracelular su contenido.

2. Transporte pasivo

Difusión simple

La difusión simple se define como el movimiento de partículas a través de la membrana a favor de su gradiente de concentración y, en su caso, eléctrico (gradiente electroquímico).

La difusión simple se rige por la llamada ecuación de Fick:

$$J = P A (C_1 - C_2), \text{ donde:}$$

J = velocidad de difusión o flujo

P = coeficiente de permeabilidad

A = área de la sección a recorrer

C_1 y C_2 = concentraciones a ambos lados de la membrana.

El coeficiente de permeabilidad depende del coeficiente de difusión del soluto en el medio (agua), que a su vez dependerá de varios factores como el tamaño e interacción de las moléculas de soluto con las de agua, y su solubilidad en el medio. Así, gases como el O_2 y CO_2 tienen altos coeficientes de permeabilidad, por tanto difundirán rápidamente por las membranas celulares.

La difusión simple a través de la membrana no tiene dirección predominante, y no es específica para una determinada sustancia. Ya que la velocidad de difusión, existiendo un gradiente de concentración, depende del coeficiente de permeabilidad, y conociendo que la membrana celular es liposoluble, esto nos indica que las sustancias que atraviesan mejor la membrana celular por difusión simple son las lipofílicas. Si son hidrofílicas difundirán lentamente, y utilizarán otros mecanismos de transporte.

Difusión facilitada

Es una difusión simple ayudada por una proteína integral de membrana, que recibe el nombre de transportador o canal dependiendo del tipo de sustancias (Figura 2.7). También se rige por los gradientes electroquímicos. Por tanto, la difusión facilitada se limita por el gradiente y el número de transportadores o canales.

Al existir en la membrana un número limitado de transportadores, la velocidad de transporte se satura, y se dice que el transporte muestra cinética de saturación tipo Michaelis-Menten, con constantes cinéticas para la proteína, velocidad máxima (V_{max}) y constante de transporte (K_m) (Figura 2.8).

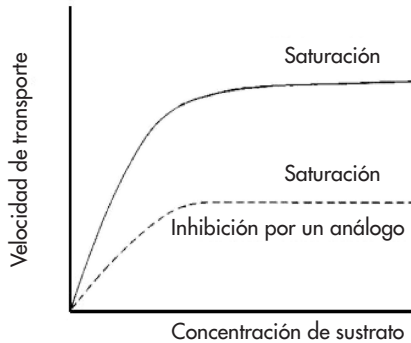


Figura 2.8. Cinética de saturación tipo Michaelis-Menten.

Las características que presenta este sistema de transporte son:

1. Permite el transporte de sustancias hidrofílicas a mayores velocidades de las que cabría esperar por su coeficiente de permeabilidad.
2. Alcanza la saturación a concentraciones altas de sustrato, con cinética de saturación tipo Michaelis-Menten.
3. La proteína transportadora presenta especificidad por el soluto
4. El transporte presenta inhibición competitiva por solutos de estructura conocida.

Difusión a través de canales iónicos

Es la difusión facilitada de iones. Iones como el Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- y HCO_3^- , al no ser liposolubles, atraviesan la membrana a través de unas proteínas integrales, distribuidas por toda la membrana, llamadas canales, que no son más que poros abiertos en las membranas celulares.

Los canales iónicos tienen dos propiedades importantes que los diferencian de simples poros acuosos:

1. Son selectivos: permiten el paso de determinados iones.
2. Casi todos están regulados: pueden cambiar su conformación pasando de un estado cerrado a un estado abierto.

Movimiento de agua a través de la membrana celular: canales de agua o acuoporinas

Existen canales de agua o acuoporinas en la membrana plasmática que explican la alta velocidad con la que se mueve el agua a través de un medio hidrofóbico. El agua se mueve a favor de su gradiente de concentración, o lo que es lo mismo, desde donde hay una menor concentración de soluto a donde hay más concentración de soluto. Habitualmente se habla de ósmosis y de gradiente osmótico. Se define la presión osmótica de una solución como la presión necesaria para evitar el flujo neto de agua a través de una membrana que separa dicha solución de otra que contiene agua pura. Cuando una membrana separa dos soluciones con distinta presión osmótica, el agua se moverá desde la que tiene menor presión osmótica a la que la tiene mayor.

3. Transporte activo

Transporte activo primario

Existen proteínas intrínsecas de membrana, llamadas generalmente bombas iónicas, que utilizan energía metabólica para transportar iones en contra de un gradiente de concentración o eléctrico. El uso de este gasto de energía acoplado a un sistema de transporte define a este transporte como activo primario. La fuente de energía utilizada es el ATP sintetizado por las mitocondrias, el cual es roto o hidrolizado por las bombas y lo llevan a ADP, usando la energía almacenada en el tercer enlace de fosfato. Por este motivo las bombas iónicas reciben además el nombre de ATPasas, por su capacidad para hidrolizar ATP (Figura 2.7).

La más conocida de todas las bombas es la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa o bomba de Na^+ . Es la más abundante en los organismos superiores. Se localiza en la membrana plasmática de casi todas las células eucarióticas, en la región basolateral, y su función es mantener baja la concentración de sodio dentro de la célula y alta la de potasio. Esto lo consigue porque continuamente está transportando sodio hacia fuera de la célula

en contra de su gradiente electroquímico e introduciendo potasio. En cada ciclo se intercambian 3 iones sodio por 2 iones potasio y se hidroliza una molécula de ATP. Si no fuera por la bomba de Na^+ , el sodio tendería a entrar en la célula y el potasio a salir, ambos de forma pasiva por sus gradientes de concentración.

Transporte activo secundario

Es el transporte de solutos en contra de su gradiente electroquímico utilizando la energía almacenada en el gradiente de concentración de otro soluto (un ión libera energía potencial cuando se mueve a favor de su gradiente electroquímico). Casi siempre se utiliza el sodio como el ión que se mueve a favor de gradiente, aprovechándose la energía liberada en este movimiento. Al mantenerse el gradiente del sodio gracias a la bomba Na^+/K^+ -ATPasa, esto indica que estos sistemas de transporte también dependerán del funcionamiento de la bomba. Por ello reciben el nombre de transporte activo secundario.

Estos sistemas se comportan como los sistemas de transporte pasivo mediados por el trans-

portador: son proteínas intrínsecas de membrana, presentan especificidad, muestran cinética saturante e inhibición competitiva. Difieren del transporte pasivo en que transportan en contra de gradiente eléctrico y/o químico, y necesitan de la disipación del gradiente iónico para obtener la energía.

Funcionalmente, se clasifican en (Figura 2.9):

1. Sistemas de cotransporte: el soluto transportado se mueve en la misma dirección que el ión sodio. Como ejemplos podemos citar los sistemas de transporte de azúcares y de aminoácidos existentes en el intestino delgado y túbulo proximal.
2. Sistemas de antitransporte o intercambio (*antiporters*): el soluto se mueve en dirección contraria al ión. Por ejemplo, el intercambiador Na^+/H^+ .

Todos estos mecanismos de transporte se distribuyen entre las regiones de la membrana celular, en la región apical y en la basolateral. La polarización de las células se mantiene por la presencia de uniones estrechas entre las células.

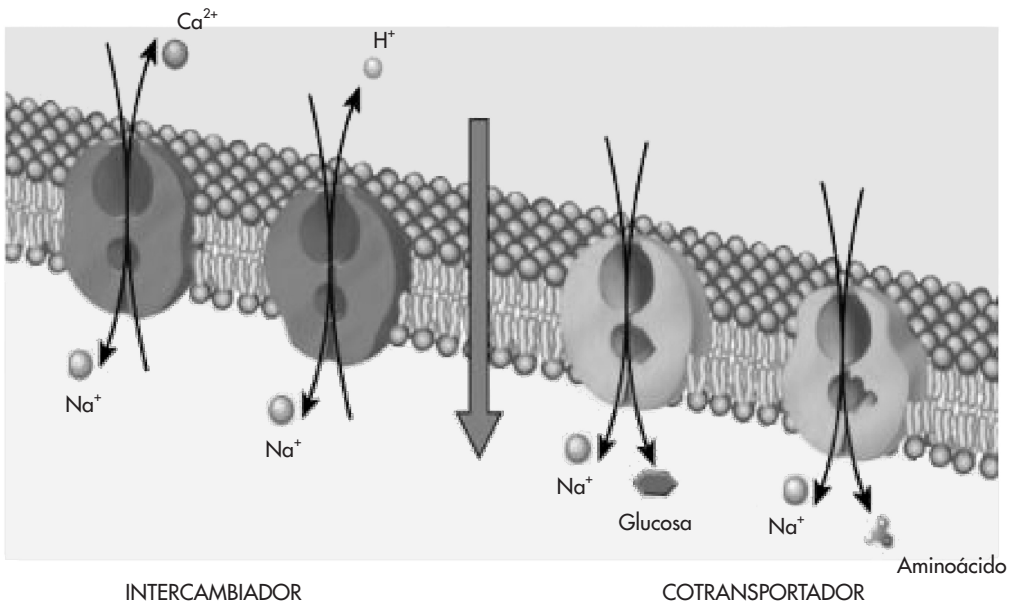


Figura 2.9. Transporte activo secundario.

Estas uniones estrechas hacen también posible que las proteínas transportadoras se sitúen en sus lugares respectivos sin que existan movimientos de ellas entre ambos sitios de la membrana. Esta disposición es clave para el transporte transcelular a través de las células epiteliales.

Transporte de sustancias tóxicas en el tracto digestivo

Aunque la mayoría de tóxicos se absorben en el tracto digestivo mediante procesos de transporte pasivo (especialmente por difusión simple), existen muchos otros que, o bien son demasiado grandes para atravesar las membranas celulares a través de los poros acuosos o son tan lipófilos que no pueden disolverse en los dominios lipídicos de dichas membranas. Es en estos casos donde entran en juego otros procesos de transporte (transporte activo, difusión facilitada, endocitosis) de los descritos anteriormente.

En los últimos años se han realizado avances significativos en lo referente al transporte mediado de xenobióticos, gracias a la caracterización funcional y molecular de diferentes familias de proteínas transportadoras. La primera familia de transportadores identificados se obtuvo a partir de células tumorales que desarrollaban resistencias a diversos fármacos anticancerosos, ya que utilizaban estos transportadores para expulsarlos de su interior. Por ello se les dio el nombre global de *multidrug resistance proteins* (MDR) o glucoproteínas P (P-gp) (Rozman y Klaassen, 2001). Otras familias relacionadas con la anterior, aunque con diferencias en cuanto a la especificidad de sustrato, son las *multidrug resistance-associated proteins* (MRP) y las proteínas de resistencia del cáncer de mama (*breast cancer resistance proteins*, BCRP). También podemos citar las familias OATP (*organic anion transporting polypeptide*), especialmente importante en el transporte hepático de xenobióticos; los transportadores de

aniones, OAT (*organic anion transporter*) y de cationes, OCT (*organic cation transporter*); o las familias de transportadores de nucleótidos (*nucleotide transporter*, NT), metales divalentes (*divalent-metal ion transporter*, DMT) y péptidos de pequeño tamaño (*oligopeptide transporter*, PEPT).

De los transportadores mencionados anteriormente, las familias MDR, MRP y BCRP constituyen sistemas de transporte activo primario, ya que obtienen la energía necesaria a partir de la hidrólisis del ATP (Lautier *et al.*, 1996; Borst *et al.*, 1999; Hooiveld *et al.*, 2001). Por otra parte, OATP, OAT, OCT y PEPT son todos transportadores activos secundarios o terciarios, puesto que obtienen energía a expensas del intercambio o del cotransporte de iones intra o extracelulares (Burckhardt y Wolff, 2000; Dresser *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2001). Los transportadores localizados hasta la fecha en el tracto digestivo humano se recogen en la Tabla 2.1. Debido al continuo aumento en la identificación de los genes responsables de la síntesis de estos transportadores, y que a menudo se les da varios nombres diferentes según el grupo investigador responsable de dicha identificación, el Comité de Nomenclatura de Genes Humanos (*Human Gene Nomenclature Committee*) ha realizado una clasificación estándar, englobándose las proteínas transportadoras con nombres como *solute carrier superfamily* (SLC) y *ATP-binding cassette transporters* (ABC) (Mizuno *et al.*, 2003).

Hay que tener en cuenta que algunos transportadores primarios que extraen sustrato de la célula, como MDR1, MRP2 o BCRP, se encuentran en la membrana apical de los enterocitos, excretando los sustratos hacia el lumen intestinal. Por lo tanto, estas proteínas transportadoras constituirían un mecanismo limitador de la absorción neta de ciertos tóxicos (Gotoh *et al.*, 2000; Hirohashi *et al.*, 2000; Jonker *et al.*, 2000). De hecho, la secreción activa de drogas es un factor cuya importancia está empezando a ser reconocida a la hora de valorar la biodisponibilidad oral de muchos fármacos (Wacher *et al.*, 2001; Zhang y Benet, 2001).

Tabla 2.1. Transportadores de xenobióticos expresados en intestino e hígado humanos.

Intestino		Hígado	
Nombre (HGNC)	Localización	Nombre (HGNC)	Localización
MDR1/P-gp (ABCB1)	MA	MDR1/P-gp (ABCB1)	MC
MRP2 (ABCC2)	MA	MRP1 (ABCC1)	MS
MRP3 (ABCC3)	MB	MRP2 (ABCC2)	MC
		MRP3 (ABCC3)	MS
BCRP (ABCG2)	MA	BCRP (ABCG2)	MC
PEPT1 (SLC15A1)	MA		
OATP-B (SLC21A9)	SD	OATP-B (SLC21A9)	MS
OATP-D (SLC21A11)	SD	OATP-C (SLC21A6)	MS
OATP-E (SLC21A12)	SD		
		OATP8 (SLC21A8)	MS
		OAT2 (SLC22A7)	MS
		OCT1 (SLC22A1)	SD
		OCT3 (SLC22A3)	SD
DMT1	MA		

HGNC, *Human Gene Nomenclature Committee*; MA, membrana apical; MB, membrana basolateral; MC, membrana canalicular; MS, membrana sinusoidal; SD, sin determinar.

La variedad de sustancias potencialmente tóxicas que pueden incorporarse a nuestro organismo junto con los alimentos es enorme. Expondremos a continuación algunos ejemplos de cómo se lleva a cabo la absorción de sustancias tóxicas en el tracto digestivo. Mucho queda aún por investigar en este campo, por lo que algunos de los mecanismos de transporte propuestos son todavía hipótesis que requieren ser contrastadas.

1. Metales

La absorción de iones metálicos por vía oral, afortunadamente, es muy selectiva y está sometida a una elevada regulación, lo cual reduce notoriamente su potencial toxicidad (Powell *et al.*, 1999). Como regla general, los cationes metálicos monovalentes atraviesan la mucosa digestiva más fácilmente que los divalentes, y estos a su vez mejor que los trivalentes (Arnich

et al., 2004); de hecho, el Fe^{3+} se reduce a Fe^{2+} en la mucosa como paso previo a su absorción. Todos los metales divalentes se transportan desde el lumen hacia el interior celular a través de proteínas de membrana apical (luminal) como DMT1. En el caso del hierro, parece ser que existe una interacción entre DMT1 y proteínas intracelulares unidoras de metales en el citosol, como la mobilferrina, almacenándose posteriormente el hierro en forma del complejo ferritina; finalmente, una proteína plasmática, la transferrina, se encarga de contactar con la membrana basolateral, opuesta a la apical, para secuestrar el hierro e incorporarlo al torrente circulatorio.

El caso más preocupante desde el punto de vista toxicológico lo constituyen los metales pesados, debido a su elevada afinidad por el sulfuro de hidrógeno y a su capacidad para secuestrar los grupos tiol (SH^-) presentes en ciertas moléculas antioxidantes de nuestro organismo.

El clásico trío de metales pesados estudiados en toxicología lo constituyen el plomo, cadmio y mercurio, a los que normalmente se unen el arsénico, estaño y aluminio (Boudene, 1990).

La absorción intestinal de aluminio nunca supera el 0,1% de la dosis ingerida, y está sujeta a regulación por parte de muchos factores sistémicos y locales, como la formación de complejos y el pH gástrico; parece ser que la concentración luminal de fosfato disminuye la absorción de aluminio, mientras que la de citrato la aumenta (Drueke, 2002). Por otro lado, parece improbable que existan transportadores específicos para metales altamente tóxicos como el plomo o el cadmio. Se asume, pues, que estos metales deben compartir rutas diseñadas para otros metales esenciales como el hierro, calcio o zinc (Zalups y Ahmad, 2003), actuando como moléculas competidoras; de hecho, recientes estudios experimentales y epidemiológicos muestran que dietas pobres en hierro resultan en una mayor absorción de plomo y cadmio, sugiriéndose incluso una suplementación de la dieta con hierro para prevenir el envenenamiento con estos metales (Bressler *et al.*, 2004). También cabe destacar el hecho de que la vitamina D, además de su conocida importancia como sustancia facilitadora de la absorción intestinal de calcio y fósforo, podría también aumentar la absorción de metales pesados como el plomo, cadmio, aluminio o cobalto (Moon, 1994).

A modo de ejemplo, veamos con más detalle cómo se lleva a cabo la absorción de cadmio (Cd) en el tracto digestivo. La fuente principal de exposición a Cd en no fumadores la constituye la ingestión de comidas contaminadas. Así, los pescados, carnes —sobre todo hígado y riñones—, patatas o cereales pueden contener cantidades relativamente elevadas de Cd, pudiéndose absorber hasta un 8% de la dosis ingerida. Además de su efecto citotóxico directo, mediado fundamentalmente por su interacción con tioles intracelulares de bajo peso molecular (como el glutatión, cisteína y metalotioneína), el Cd es también un elemento potencialmente carcinógeno, ya que tiene capacidad de activar protooncogenes.

Una de las hipótesis propuestas para el transporte epitelial de Cd apunta, como señalamos anteriormente, a la utilización de proteínas de membrana implicadas en el transporte de elementos esenciales. Otra hipótesis más reciente afirma que, cuando el Cd forma conjugados con los tioles de bajo peso molecular, estos servirían como sustratos para los transportadores de aminoácidos, oligopéptidos, aniones orgánicos o cationes orgánicos que hemos descrito anteriormente en este capítulo. De hecho, este es un mecanismo propuesto también para la absorción de metilmercurio, que, uniéndose al grupo tiol del aminoácido cisteína, utilizaría el transportador de metionina para atravesar la membrana plasmática (Kerper *et al.*, 1992) (Figura 2.10). Finalmente, también se considera últimamente la posibilidad de que el Cd se una a proteínas como la albúmina o metalotioneína, que posteriormente serían incorporadas al interior celular mediante endocitosis.

La absorción intestinal de Cd ocurre principalmente en el duodeno y parte inicial del yeyuno (Andersen *et al.*, 1994). En la Figura 2.11 se representan esquemáticamente los mecanismos potenciales implicados en transporte apical y basolateral de Cd en los enterocitos del intestino delgado. Aunque, como hemos dicho, se desconocen en la actualidad el (los) mecanismo(s) específico(s) de absorción, hay cada vez una mayor evidencia que apunta al papel clave del

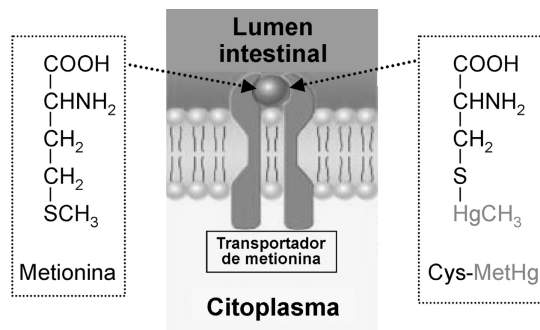


Figura 2.10. Transporte de metilmercurio (MetHg).

La unión con el grupo tiol del aminoácido cisteína (Cys) forma un compuesto de estructura análoga a la metionina, pudiendo utilizar el transportador de esta en la membrana apical.

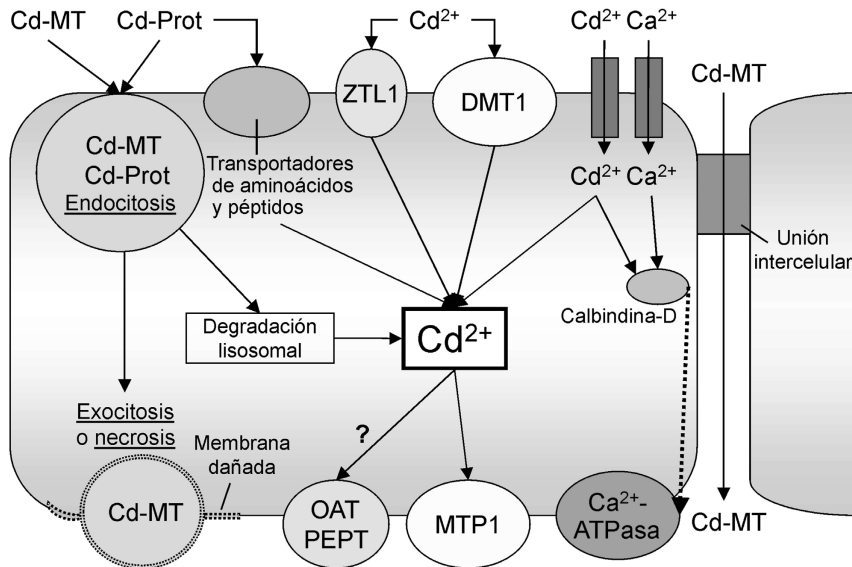


Figura 2.11. Transporte de cadmio (Cd) en enterocitos.

Cd-MT, cadmio a metalotioneína; Cd-Prot, cadmio unido a proteínas; DMT, *Divalentmetal ion transporter*, ZTL, *Zinc transporter luminal*; MTP, *Metal transport protein*.

transportador DMT1 en la entrada de Cd al enterocito. La molécula DMT1 constituye un sistema de transporte acoplado a protones cuya actividad está modulada por el potencial de membrana. Como su nombre indica, es capaz de transportar numerosos cationes divalentes, siendo el principal responsable de la absorción del hierro no unido a grupos hemo (Ferguson *et al.*, 2001).

Sin embargo, la absorción intestinal de Cd no está mediada exclusivamente por DMT1. Elisma y Jumarie (2001) han puesto de manifiesto una vía alternativa de entrada de Cd a través de uno de los transportadores apicales de Zinc, ZTL1, que ha sido recientemente localizado en la membrana apical de los enterocitos (Cragg *et al.*, 2002). Por otra parte, se sabe que cuando el Cd se encuentra unido a la metalotioneína (Cd-MT), este complejo puede atravesar el epitelio intestinal intacto e incorporarse a la circulación portal entrando en los capilares sanguíneos de la lámina propia (Sugawara y Sugawara, 1991). Para explicar este hecho, el complejo Cd-MT debe cruzar la membrana apical por vía paracelular (esto es, a través de las

relativamente permeables uniones intercelulares que delimitan los enterocitos adyacentes) y/o mediante un proceso de endocitosis, para posteriormente ser transportado a través de la membrana basolateral por exocitosis o ser liberado después de inducir la muerte del enterocito (véase Figura 2.11).

La incorporación del Cd unido a oligopéptidos hacia el interior del enterocito también podría ocurrir por endocitosis, aunque, debido a la enorme cantidad de transportadores de aminoácidos y péptidos de pequeño tamaño presentes en la membrana apical de los enterocitos, es probable que estos también participen en el transporte luminal del Cd unido al grupo tiol de la cisteína o de pequeños péptidos que contengan este aminoácido. Esta teoría se ve reforzada por el conocimiento de que ciertos transportadores de aminoácidos están implicados en la reabsorción renal de compuestos de mercurio conjugado con cisteína (Zalups, 2000; Cannon *et al.*, 2001), y muchos de estos transportadores se encuentran también en el epitelio intestinal.

Finalmente, otra vía propuesta de entrada de Cd al enterocito, aunque aún no muy aceptada, sería la utilización de canales iónicos, especialmente canales de calcio (Ca). Felley-Bosco y Diezi (1992) han puesto de manifiesto, en ratas sometidas a dietas pobres en Ca, un aumento en el transporte apical de Cd que podría estar mediado por canales o transportadores de Ca. También parece posible que la calbindina-D, proteína unidora de Ca que se sintetiza en el enterocito en respuesta a la 1,25-dihidroxi-vitamina D, pueda facilitar el transporte de Cd hacia la membrana basolateral.

Muy poco se conoce del transporte basolateral de Cd hacia los capilares sanguíneos de la lámina propia. Un mecanismo sugerido es la utilización de la proteína transportadora de hierro MTP1 (*metal transport protein*), perteneciente a la misma familia que DMT1 y que ha sido recientemente localizada en la membrana basolateral de los enterocitos en el ratón (Abboud y Haile, 2000). Sin embargo, mucho queda aún por investigar en esta área, pues existen numerosos ligandos intracelulares que se unen al Cd y que podrían desempeñar un importante papel en su salida del enterocito.

2. Sustancias naturales

Muchos alimentos habituales en nuestra dieta contienen, además de nutrientes, proporciones variables de sustancias sin valor nutritivo o incluso tóxicas para nuestro organismo. Entre los potenciales tóxicos naturales de los alimentos se encuentran sustancias tan variadas como alcaloides, xantinas, polifenoles, glucósidos, aminoácidos tóxicos o las lectinas. Por ello resulta imposible generalizar un proceso de transporte común para todas y cada una de ellas, aunque el proceso de difusión simple a través de la membrana parece ser predominante, como se ha puesto de manifiesto por ejemplo en la piperina, alcaloide presente en los pimientos (Khajuria *et al.*, 1998).

Las lectinas son proteínas vegetales «fijadoras de azúcares», es decir, tienen la propiedad de unirse con elevada afinidad a diversos carbohi-

dratos. Especialmente importante es su unión a las glucoproteínas de las membranas celulares, puesto que este mecanismo les confiere, entre otras, la capacidad de aglutinar los glóbulos rojos (de ahí que también se las conozca como hemaglutininas). Una de las lectinas más estudiadas, por su elevada capacidad de unión a la membrana, es la aglutinina del germen de trigo (*wheat germ agglutinin*, WGA), empleada actualmente en el desarrollo de mecanismos selectivos para la absorción y biodisponibilidad de fármacos (Gabor *et al.*, 2004). WGA no solo se une a células análogas a los enterocitos del intestino delgado, sino que también se absorbe en el intestino grueso uniéndose a la membrana de los colonocitos (Wirth *et al.*, 1998).

Recientemente se ha puesto de manifiesto la implicación del receptor para el factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor receptor*, EGFR) en la unión de WGA a la pared celular, por lo que su transporte puede atribuirse a una endocitosis mediada por receptor (Lochner *et al.*, 2003). Además de la citoadhesión, también existe evidencia de las propiedades citoinvasivas de WGA (Figura 2.12), lo que en términos farmacológicos abre una vía para el diseño selectivo de drogas.

3. Micotoxinas

La contaminación de los alimentos por hongos es un fenómeno que viene sufriendo el hombre ya desde la Edad Media, cuando el cornezuelo del centeno (*Claviceps purpurea*) producía alucinaciones más o menos colectivas (el «fuego de San Antonio») que podían desembocar en la muerte. Hoy en día se estima que existen más de 100.000 especies de hongos, que producen una gran variedad de toxinas (denominadas genéricamente micotoxinas) con diferentes efectos nocivos en nuestro organismo (Tabla 2.2).

Hablaremos a modo de ejemplo de la absorción de la ocratoxina A (OTA). Esta micotoxina, producida por diversas especies de *Penicillium* y *Aspergillus*, es un contaminante frecuente en alimentos de origen animal y vegetal. Su estructura química contiene una mitad dihidroisocuma-

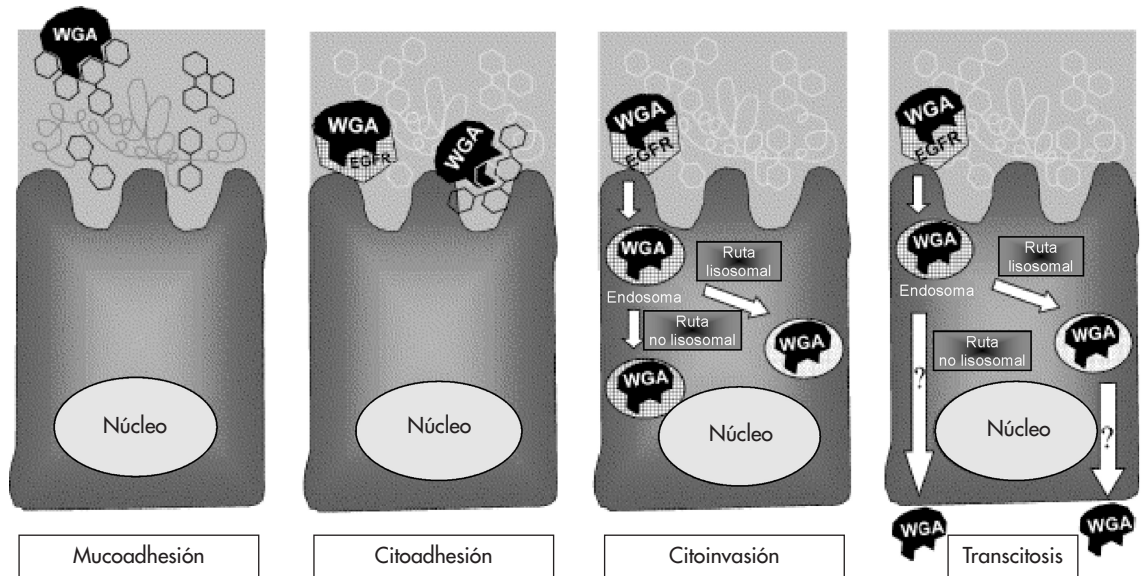


Figura 2.12. Posible ruta de absorción de lectinas mediada por receptor. WGA, *Wheat germ agglutinin*; EGFR, *Epidermal growth factor receptor*.

Tabla 2.2. Origen fúngico y efectos de algunas micotoxinas.

Micotoxina	Hongos responsables	Efectos tóxicos
Aflatoxinas	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	Cancerígeno, hepatotóxico, nefrotóxico, neurotóxico.
Ácido penicílico	<i>Penicillium puberulum</i> <i>Aspergillus ochraceus</i>	Citotóxico.
Ocratoxina A	<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Aspergillus alutaceus</i> <i>Penicillium verrucosum</i>	Teratógeno, hepatotóxico, nefrotóxico, neurotóxico.
Patulina	<i>Penicillium patulum</i> <i>Aspergillus giganteus</i>	Citotóxico.
Esterigmatocistina	<i>Aspergillus versicolor</i> <i>Aspergillus nidulans</i>	Cancerígeno.
Rubratoxina	<i>Penicillium rubrum</i> <i>Penicillium purpurogenum</i>	Mutagénico, teratógeno.
Tricotecenos	<i>Trichothecium roseum</i> <i>Fusarium divers</i>	Teratógeno, citotóxico, irritante de mucosas.
Zearalenona	<i>Fusarium graminearum</i>	Hepatotóxico, nefrotóxico, efectos endocrinos.

rínica que se une al grupo amino de un residuo de fenilalanina (Figura 2.13). Por ello, su toxicidad es debida a la competición con este aminoácido, impidiendo la síntesis de proteínas, promoviendo la peroxidación lipídica e inhibiendo la síntesis de ATP (Dirheimer, 1991).

La OTA se absorbe en el intestino delgado incluso cuando sus niveles en plasma son superiores a los del lumen intestinal. Una vez absorbida, se une casi en su totalidad a la albúmina plasmática, lo que facilita la absorción de nuevas moléculas de OTA por difusión simple y además retrasa su eliminación urinaria (Hagelberg *et al.*, 1989). Recientemente, Berger *et al.* (2003) han puesto de manifiesto, utilizando células de la línea Caco-2 (análogas a los enterocitos del intestino delgado) que la OTA podría también absorberse mediante transporte activo mediado por la proteína MRP2. Otros sistemas de transporte activo como los transportadores de aminoácidos neutros, OATPs o MDR1 no parecen estar implicados en la absorción de OTA, como señalan los experimentos de inhibición realizados. Una vez que la micotoxina alcanza el torrente sanguíneo, la rápida y prácticamente total unión a la seroalbúmina impide su secreción de vuelta a través de la membrana basolateral hacia el lumen intestinal.

4. Nitratos, nitritos y nitrosaminas

Los nitratos (NO_3^-) son compuestos muy estables y su problema radica en el hecho de que pueden reducirse en determinadas circunstancias a nitritos (NO_2^-), iones muy reactivos y dotados de numerosos efectos tóxicos. Estos a su vez pueden unirse a una amina para formar las nitrosaminas, aunque afortunadamente la

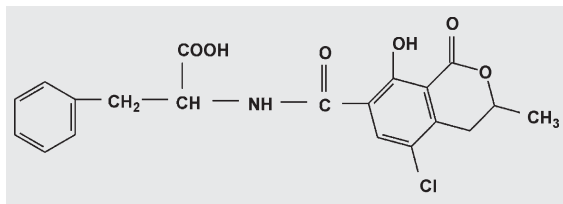


Figura 2.13. Estructura de la ocratoxina A.

reacción de nitrosaminación no es ni mucho menos automática. Cabe señalar que, aparte de su ingestión con los alimentos, los nitritos también se pueden producir endógenamente como consecuencia de la oxidación del óxido nítrico (NO), sustancia vasodilatadora liberada en el endotelio vascular.

Poco se conoce de la absorción de estos compuestos en el tracto digestivo. Parece ser que los nitritos pueden absorberse por transporte activo, compitiendo con el cloro (y, por tanto, pudiendo provocar una depleción de este elemento) en sistemas como el cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ y/o el cotransportador Na^+/Cl^- (Jensen, 2003). Por su parte, la absorción de nitrosaminas parece verse disminuida por el contenido en grasa de la dieta, mientras que los carbohidratos y proteínas no la afectan (Agrelo *et al.*, 1978).

5. Pesticidas

Los pesticidas o plaguicidas constituyen un conjunto muy complejo de compuestos utilizados en agricultura para controlar organismos potencialmente perjudiciales para las cosechas, como se expondrá en un tema posterior. El problema de estas sustancias, como es evidente, radica en que si no son eliminados adecuadamente durante el procesado de los alimentos pueden quedar residuos que serán incorporados a nuestro organismo, donde pueden ejercer sus efectos tóxicos. Veamos algunos aspectos de la absorción intestinal del clorpirifos (CPF), un pesticida organotiofosfato de los más utilizados en la actualidad.

Aunque la permeabilidad intestinal del CPF no ha sido determinada explícitamente en humanos, las predicciones a partir de experimentos en rata sugieren que este compuesto se absorbería en su práctica totalidad (Cook y Shenoy, 2003). La absorción tiene lugar, como casi siempre, por un proceso combinado en el que el transporte mediado parece ser evidente sobre todo en el duodeno e íleon, mientras que en el yeyuno predominarían los mecanismos de difusión simple. El transportador MDR1 se ha relacionado con la absorción intestinal, tanto del CPF como de su

metabolito activo inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa, el clorpirifos oxón (CPO) (Bain *et al.*, 1997). Sin embargo, son necesarios experimentos adicionales en células que expresen transportadores específicos para dilucidar el(los) sistema(s) implicado(s).

6. Hidrocarburos aromáticos policíclicos

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) del alquitrán de hulla fueron las primeras sustancias químicas cuyas propiedades cancerígenas fueron demostradas experimentalmente. A partir de entonces, el benzopireno ha servido de molécula modelo en el estudio de la carcinogénesis química y se ha demostrado que su absorción intestinal se favorece altamente tras disolverse con los lípidos de la dieta (Vetter *et al.*, 1985).

Se han identificado varios centenares de HAP en el medio ambiente. Una importante vía de entrada de estos compuestos al tracto digestivo, especialmente en niños, es el contacto de las manos contaminadas con la boca, incorporándose de este modo los HAP del suelo. Pero además, procesos como el ahumado o tratamiento térmico severo de alimentos puede añadir una contaminación suplementaria con HAP que en algunos casos es determinante desde el punto de vista toxicológico. En cualquier caso, y debido a propiedades fisicoquímicas como su aromaticidad, la absorción de PAH parece estar influenciada en gran medida por la emulsión con las sales biliares, del mismo modo que ocurre con los lípidos de la dieta (Van De Wiele *et al.*, 2004). Por lo tanto, proteínas de las superfamilias SLC y ABC podrían estar implicadas en el transporte de estos compuestos, aunque los datos existentes hasta la fecha no son concluyentes.

7. Medicamentos de uso veterinario

Los medicamentos en animales de granja se utilizan principalmente para curar o prevenir infecciones (como los antibióticos) o para favorecer su crecimiento (los anabolizantes, sustancias

que incrementan la síntesis proteica en la producción de carne). Muchos anabolizantes son hormonas esteroideas que se encuentran de forma natural en nuestro organismo. Por lo que respecta a los antibióticos, se utilizan muchos y de naturaleza muy variada, por lo que evidentemente no podemos generalizar un mecanismo de absorción específico. Así, mientras que pequeñas moléculas hidrofílicas como la penicilina pueden absorberse por la vía paracelular a través de las uniones estrechas, otras más lipofílicas como los macrólidos pueden atravesar la membrana por difusión simple sin mayores problemas. Antibióticos de este grupo, como la claritromicina y eritromicina, se ha visto que pueden transportarse en contra de su gradiente de concentración (Goddard, 1998), por lo que deben existir también procesos de transporte activo; sin embargo, aún no se conocen los sistemas implicados al respecto.

Bibliografía

- Abboud S, Haile DJ (2000). A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem* 275: 19906-19912.
- Agrelo C, Phillips JC, Lake BG, Longland RC, Gangolli SD (1978). Studies on the gastrointestinal absorption of N-nitrosamines: effect of dietary constituents. *Toxicology* 10: 159-167.
- Andersen O, Nielsen JB, Sorensen JA, Scherrebeck L (1994). Experimental localization of intestinal uptake sites for metals (Cd, Hg, Zn, Se) in vivo in mice. *Environ Health Perspect* 102 Suppl 3: 199-206.
- Arnich N, Cunat L, Lanhers MC, Burnel D (2004). Comparative in situ study of the intestinal absorption of aluminum, manganese, nickel, and lead in rats. *Biol Trace Elem Res* 99: 157-172.
- Bain LJ, McLachlan JB, LeBlanc GA (1997). Structure-activity relationships for xenobiotic transport substrates and inhibitory ligands of P-glycoprotein. *Environ Health Perspect* 105: 812-818.
- Berger V, Gabriel AF, Sergent T, Trouet A, Larondelle Y, Schneider YJ (2003). Interaction of ochratoxin A with human intestinal Caco-2 cells:

- possible implication of a multidrug resistance-associated protein (MRP2). *Toxicol Lett* 140-141: 465-476.
- Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J (1999). The multidrug resistance protein family. *Biochem Biophys Acta* 1461: 347-357.
- Boudene C (1990). Toxicidad de los metales. En: Derache R (ed.) *Toxicología y seguridad de los alimentos*. Omega, Barcelona, pp. 133-163.
- Bressler JP, Olivi L, Cheong JH, Kim Y, Bannona D (2004). Divalent metal transporter 1 in lead and cadmium transport. *Ann NY Acad Sci* 1012: 142-152.
- Burckhardt G, Wolff NA (2000). Structure of renal organic anion and cation transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 278: F853-F866.
- Cannon VT, Zalups RK, Barfuss DW (2001). Amino acid transporters involved in luminal transport of mercuric conjugates of cysteine in rabbit proximal tubule. *J Pharmacol Exp Ther* 298: 780-789.
- Christie DM, Dawson PA, Thevananther S, Shneider BL (1996). Comparative analysis of the ontogeny of a sodium-dependent bile acid transporter in rat kidney and ileum. *Am J Physiol* 271: G377-G385.
- Cook TJ, Shenoy SS (2003). Intestinal permeability of chlorpyrifos using the single-pass intestinal perfusion method in the rat. *Toxicology* 184: 125-133.
- Cragg RA, Christie GR, Phillips SR, Russi RM, Kury S, Mathers JC, et al (2002). A novel zinc-regulated human zinc transporter, hZTL1, is localized to the enterocyte apical membrane. *J Biol Chem* 277: 22789-22797.
- Dirheimer G, Creppy EE (1991). Mechanisms of action of ochratoxin A. En: Castegnaro M., Plestina R., Dirheimer G., Chernozemsky I. N., Bartsch H. (eds.) *Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumors*. International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, France, pp. 171-186
- Dresser MJ, Leabman MK, Giacomini KM (2001). Transporters involved in the elimination of drugs in the kidney: organic anion transporters and organic cation transporters. *J Pharm Sci* 90: 397-421.
- Drueke TB (2002). Intestinal absorption of aluminum in renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 17 Suppl. 2: 13-16.
- Elisma F, Jumarie C (2001). Evidence for cadmium uptake through Nramp2: metal speciation studies with Caco-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 285: 662-668.
- Felley-Bosco E, Diezi J (1992). Dietary calcium restriction enhances cadmium-induced metallothionein synthesis in rats. *Toxicol Lett* 60: 139-144.
- Ferguson CJ, Wareing M, Ward DT, Green R, Smith CP, Riccardi D (2001). Cellular localization of divalent metal transporter DMT-1 in rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 280: F803-F814.
- Gabor F, Bogner E, Weissenboeck A, Wirth M (2004). The lectin-cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 56: 459-480.
- Goddard AF (1998). Review article: factors influencing antibiotic transfer across the gastric mucosa. *Aliment Pharmacol Ther* 12: 1175-1184.
- Gotoh Y, Suzuki H, Kinoshita S, Hirohashi T, Kato Y, Sugiyama Y (2000). Involvement of an organic anion transporter (canalicular multispecific organic anion transporter/multidrug resistance-associated protein 2) in gastrointestinal secretion of glutathione conjugates in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 292: 433-439.
- Hagelberg S, Hult K, Fuchs R (1989). Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma-binding properties. *J Appl Toxicol* 9: 91-96.
- Hirohashi T, Suzuki H, Chu XY, Tamai I, Tsuji A, Sugiyama Y (2000). Function and expression of multidrug resistance-associated protein family in human colon adenocarcinoma cells (Caco-2). *J Pharmacol Exp Ther* 292: 265-270.
- Hooiveld GJ, van Montfoort JE, Meijer DK, Muller M (2001). Function and regulation of ATP-binding cassette transport proteins involved in hepatobiliary transport. *Eur J Pharm Sci* 12: 525-543.
- Jensen FB (2003). Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 135: 9-24.
- Jonker JW, Smith JW, Brinkhuis RF, Maliepaard M, Beijnen JH, Schellens JH, et al (2000). Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan. *J Natl Cancer Inst* 92: 1651-1656.
- Kerper LE, Ballatori N, Clarkson TW (1992). Methylmercury transport across the blood-brain barrier by an amino acid carrier. *Am J Physiol* 262: R761-R765.
- Khajuria A, Zutshi U, Bedi KL (1998). Permeability characteristics of piperine on oral absorption--an active alkaloid from peppers and a bioavailability enhancer. *Indian J Exp Biol* 36: 46-50.

- Lautier D, Canitrot Y, Deeley RG, Cole SP (1996). Multidrug resistance mediated by the multidrug resistance protein (MRP) gene. *Biochem Pharmacol* 52: 967-977.
- Lee G, Dallas S, Hong M, Bendayan R (2001). Drug transporters in the central nervous system: brain barriers and brain parenchyma considerations. *Pharmacol Rev* 53: 569-596.
- Lochner N, Pittner F, Wirth M, Gabor F (2003). Wheat germ agglutinin binds to the epidermal growth factor receptor of artificial Caco-2 membranes as detected by silver nanoparticle enhanced fluorescence. *Pharm Res* 20: 833-839.
- Mizuno N, Niwa T, Yotsumoto Y, Sugiyama Y (2003). Impact of drug transporter studies on drug discovery and development. *Pharmacol Rev* 55: 425-461.
- Moon J (1994). The role of vitamin D in toxic metal absorption: a review. *J Am Coll Nutr* 13: 559-564.
- Powell JJ, Jugdaohsingh R, Thompson RP (1999). The regulation of mineral absorption in the gastrointestinal tract. *Proc Nutr Soc* 58: 147-153.
- Rozman KK, Klaassen CD (2001). Absorption, distribution, and excretion of toxicants. En: *Casarett & Doull's Toxicology. The basic science of poisons* 6th ed. McGraw-Hill, New York, pp. 107-132.
- Sugawara N, Sugawara C (1991). Gastrointestinal absorption of Cd-metallothionein and cadmium chloride in mice. *Arch Toxicol* 65: 689-692.
- Van De Wiele TR, Verstraete W, Siciliano SD (2004). Polycyclic aromatic hydrocarbon release from a soil matrix in the in vitro gastrointestinal tract. *J Environ Qual* 33: 1343-1353.
- Vetter RD, Carey MC, Patton JS (1985). Coassimilation of dietary fat and benzo(a)pyrene in the small intestine: an absorption model using the killifish. *J Lipid Res* 26: 428-434.
- Wacher VJ, Salphati L, Benet LZ (2001). Active secretion and enterocytic drug metabolism barriers to drug absorption. *Adv Drug Deliv Rev* 46: 89-102.
- Wirth M, Hamilton G, Gabor F (1998). Lectin-mediated drug targeting: quantification of binding and internalization of Wheat germ agglutinin and Solanum tuberosum lectin using Caco-2 and HT-29 cells. *J Drug Target* 6: 95-104.
- Wright EM, Turk E, Zabel B, Mundlos S, Dyer J (1991). Molecular genetics of intestinal glucose transport. *J Clin Invest* 88: 1435-1440.
- Zalups RK (2000). Molecular interactions with mercury in the kidney. *Pharmacol Rev* 52: 113-143.
- Zalups RK, Ahmad S (2003). Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. *Toxicol Appl Pharmacol* 186: 163-188.
- Zhang Y, Benet LZ (2001). The gut as a barrier to drug absorption: combined role of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein. *Clin Pharmacokinet* 40: 159-168.

IMPORTANCIA DE LA MICROBIOTA DEL TRACTO GASTROINTESTINAL EN LA TOXICOLOGÍA ALIMENTARIA

Encarnación Mellado, Ángeles Jos, Isabel M.^a Moreno, Ana M.^a Cameán

Introducción. Microbiota intestinal. Función fisiológica de la microbiota intestinal. Efectos tóxicos de la microbiota intestinal. Factores que afectan a la microbiota intestinal. Perspectivas futuras. Bibliografía.

Introducción

El tracto gastrointestinal (g.i.) y en particular el intestino, hospeda a una extensa y diversa microbiota, con más de 10^{12} bacterias por gramo de contenido, por lo que no es de extrañar que esta población tenga un impacto significativo en la salud del hospedador. La microbiota interactúa con el hospedador tanto a nivel local (la mucosa intestinal) como de forma sistémica, lo que da lugar a un amplio rango de efectos inmunológicos, fisiológicos y metabólicos (Heavey y Rowland, 2004). Desde el punto de vista del hospedador, estos efectos tienen consecuencias tanto positivas como negativas en lo que respecta a la nutrición, infecciones, metabolismo de xenobióticos, toxicidad de los compuestos ingeridos, mutagénesis y carcinogénesis.

Como ya se ha avanzado, la microbiota intestinal muestra una intensa actividad meta-

bólica, lo que contribuye al metabolismo del material ingerido. A menudo, las biotransformaciones de la microbiota intestinal juegan un papel importante en los efectos globales y en la cinética de los xenobióticos en el organismo. Si bien la actividad metabólica microbiana tiene en algunos casos un papel beneficioso al degradar sustancias que de otra forma no se podrían asimilar por nuestro organismo (Savage, 1986); también, en otras ocasiones, los metabolitos resultantes pueden resultar más tóxicos que los compuestos originales, con actividad mutagénica o carcinogénica para el ser humano. Los microorganismos pueden afectar además al destino de compuestos endógenos liberados al lumen intestinal.

En este capítulo se revisan la función fisiológica, composición, distribución de la microbiota intestinal y factores que la afectan, y se hace hincapié en los efectos tóxicos derivados de ella, principalmente los resultantes de su extensa actividad metabólica.

Microbiota intestinal

El ser humano está colonizado por una numerosa y compleja comunidad de microorganismos, de tal manera que se ha considerado que el ser humano adulto está constituido por un mayor número de células procariontas (90%) que eucariotas (10%) (Savage, 1977). De hecho, la masa bacteriana constituye aproximadamente un tercio del peso seco de las heces (Pelkonen y Hänninen, 1986). El impacto que ejerce esta comunidad de microorganismos en nuestra fisiología es mucho más pronunciada en el intestino, porque es en este órgano donde se encuentran la mayoría de ellos.

Los recién nacidos poseen un tracto gastrointestinal estéril que pronto comienza a ser colonizado por microorganismos, produciéndose un aumento en la complejidad de la microbiota intestinal a lo largo del tiempo.

1. Composición

El término microbiota intestinal normal hace referencia a las especies de organismos que de forma habitual se encuentran en individuos sanos. Estudios recientes de ecología microbiana desarrollados en este nicho ecológico han puesto de manifiesto una gran complejidad tanto espacial como temporal.

La comunidad de microorganismos que coloniza el tracto intestinal depende de diversos factores, como son tanto el genotipo (Zoetendal *et al.*, 2001) y el desarrollo del individuo (Hopkins *et al.*, 2001; Favier *et al.*, 2002) como determinados factores ambientales tales como la exposición a fármacos (fundamentalmente antibióticos) y la dieta (Sullivan *et al.*, 2001).

La mayoría de los microorganismos que forman parte de esta microbiota son miembros del dominio Bacteria, aunque también se han encontrado representantes del dominio Archaea (Eckburg *et al.*, 2003) y del dominio Eukarya. Al menos 500 especies bacterianas colonizan el intestino adulto, de las cuales 30-40 espe-

cies constituyen el 99% de la población total (Moore y Holdeman, 1974; Drasar y Barrow, 1985; Berg, 1996).

En la Tabla 3.1 se resumen los principales grupos de bacterias que se han identificado en muestras de heces humanas (Heavey y Rowland, 2004).

Debido a la inaccesibilidad del intestino delgado, la toma de muestras ha sido una tarea difícil y esa es la razón por la que los estudios pioneros sobre la composición de la microbiota intestinal se realizaron en muestras fecales. El estudio de la población microbiana que constituye la microbiota humana se ha visto beneficiado por la aplicación de las nuevas técnicas moleculares de ecología microbiana (Tannock, 2001). La aplicación de las mismas ha permitido por una parte, el estudio e identificación de la población microbiana que no se ha podido cultivar con las técnicas convencionales debido a que se desconocen sus exigencias nutritivas y por otra parte, se han podido establecer perfiles de esta comunidad, contribuyendo a una mejor descripción del complejo ecosistema del tracto gastrointestinal. Entre estos métodos moleculares se encuentra la amplificación de genes conservados entre los organismos como el gen que codifica el ARNr 16S, utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de muestras intestinales o bien de heces.

Tabla 3.1. Bacterias presentes en heces humanas.

Grupo bacteriano	Log (bacteria)/g heces
<i>Anaerobios estrictos</i>	
Bacteroides	10-11
Bifidobacterias	10-11
Propionibacterias	9-10
Peptococos	9-10
Clostridios	6-9
Fusobacterias	5-10
<i>Microaerófilos</i>	
Lactobacilos	4-10
<i>Anaerobios facultativos</i>	
Enterococos	7-8
Enterobacterias	7-9

También se han utilizado distintas técnicas de electroforesis en geles sometidos a condiciones desnaturalizantes con la finalidad de determinar y analizar la composición de microorganismos de la microbiota intestinal (Tannock, 2001). La identificación rápida y fiable de los aislados bacterianos está asegurada debido a la aplicación de técnicas automatizadas de secuenciación del ADN amplificado por la técnica de PCR. Además, mediante la técnica de hibridación *in situ* (FISH) las especies bacterianas se pueden detectar e identificar directamente en las muestras bien intestinales o de heces utilizando sondas de oligonucleótidos complementarias de secuencias del ARNr 16S, marcadas con fluorocromos (Welling *et al.*, 1997).

Antes de la utilización de estas técnicas moleculares al estudio de los grupos bacterianos que constituyen la microbiota intestinal, se publicaron diferentes trabajos de investigación demostrando que aproximadamente el 90% de las bacterias pertenecían al grupo de los microorganismos anaerobios obligados, lo cual parece lógico en un ambiente carente de oxígeno. Entre las especies numéricamente predominantes se citan al menos cinco especies de *Bacteroides*, una de *Fusobacterium*, cuatro de *Eubacterium* y una especie de *Peptostreptococcus* (Sghir *et al.*, 1999). En cuanto a las especies bacterianas incluidas en el grupo de las enterobacterias, tales como *Escherichia coli*, estas representan menos del 0,1% de la población total de bacterias cultivables (Onderdonk, 1999).

También debemos destacar la alta prevalencia de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* y así, Mitsuoka (1992) describe las siguientes especies del género *Lactobacillus* como más representativas de la microbiota: *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. salivarius* y *L. reuteri*. Otras especies como *L. johnsonii*, *L. ruminis*, *L. casei* y *L. brevis* se detectaron de forma ocasional. En cuanto a las bifidobacterias, en adultos, la especie predominante es *Bifidobacterium longum*, mientras que *B. bifidum* solo se detecta de forma ocasional. Por el contrario, las especies más prevalentes en niños son *B. infantis* y *B.*

breve, encontrándose solo en algunos casos *B. longum* y *B. bifidum*.

Además, la utilización de las técnicas moleculares en el estudio de la microbiota intestinal ha mostrado que las especies bacterianas dominantes, desde el punto de vista numérico, en muestras de heces humanas pertenecen a los grupos *Bacteroides* y *Clostridium coccooides-Eubacterium rectale*, representando aproximadamente el 50% de la comunidad bacteriana (Franks *et al.*, 1998; Sghir *et al.*, 2000). Por otra parte, análisis comparativos de secuencias amplificadas del gen que codifica el ARNr 16S en heces humanas han indicado que menos del 25% de las especies identificadas corresponden con especies bacterianas conocidas, sugiriendo por tanto que nuestro conocimiento sobre la diversidad de microorganismos que constituyen nuestra microbiota intestinal es todavía muy limitado y que son muchas las especies bacterianas por describir integrantes de la misma (Suau *et al.* 1999).

Marteau *et al.* (2001) han realizado un estudio comparativo entre los grupos bacterianos que predominan en la zona inicial del colon humano y muestras de heces, que representan la microbiota presente en la zona distal del mismo. Estos autores indican que utilizando tanto métodos clásicos para el aislamiento de la población cultivable como técnicas moleculares para la identificación de la población de la microbiota no cultivable, la microbiota presente en la zona inicial del colon y en las heces difiere cuantitativamente, encontrando que el número de anaerobios estrictos, bifidobacteria, *Bacteroides* y miembros del grupo de *Clostridium coccooides* y del subgrupo de *Clostridium leptum* era más bajo en el caso de la microbiota cecal. Zoetendal *et al.*, (2002) han mostrado, utilizando técnicas moleculares que no implican cultivo previo de los microorganismos, que la comunidad bacteriana asociada a la mucosa del colon es diferente en composición con respecto a la encontrada en muestras de heces. Además, análisis taxonómicos polifásicos de bacterias en heces han puesto de manifiesto importantes diferencias en la composición de la microbiota en niños de distintas edades y adultos, indicando entre otras una

mayor proporción de bifidobacterias y clostridios en niños de corta edad (Hopkins *et al.*, 2001).

En este complejo ecosistema deben existir tanto microorganismos potencialmente patógenos como microorganismos beneficiosos para la salud humana, de tal manera que es muy difícil indicar aquellas especies que ejercen un papel beneficioso y aquellas que deben ser eliminadas por resultar perjudiciales para la salud humana. El grupo de los denominados patógenos oportunistas está constituido por una serie de especies tanto de bacterias como de hongos que en determinadas circunstancias pueden dar lugar a enfermedad en el hombre. Así, la ausencia de la microbiota normal cambia las condiciones microambientales del intestino, y favorece el establecimiento de estos microorganismos oportunistas, que habitualmente no crecen en el tracto gastrointestinal porque no son capaces de competir con la microbiota, debido a mecanismos de exclusión competitiva entre poblaciones patógenas y no patógenas. El grupo de los patógenos oportunistas se encuentra en una proporción muy baja en nuestra microbiota y son varias las especies bacterianas incluidas en el mismo, como *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Clostridium difficile*, *Bacteroides fragilis*, y entre los hongos la especie más representativa es *Candida albicans*. Debemos indicar que incluso los Lactobacilos, que están incluidos dentro de la categoría de bacterias beneficiosas en la microbiota intestinal, se han descrito como causantes de bacteriemia, en casos excepcionales (Husni *et al.*, 1997).

2. Distribución

Ningún fragmento del tracto gastrointestinal es estéril. Se estima que una persona normal porta alrededor de 10^{10} bacterias en la boca, que son constantemente deglutidas hacia el estómago. En estado fisiológico, el lumen del esófago y el estómago están casi libres de bacterias. La acidez normal del estómago reduce enormemente el número de microorganismos viables. No obstante, las infecciones agudas del tracto g.i. se encuentran entre las formas más comunes de

infección en las poblaciones humanas (Pelkonen y Hänninen, 1986). A valores de pH inferiores a 3, las bacterias capaces de vivir como comensales en el intestino son rápidamente eliminadas, por lo que las muestras de esta procedencia son estériles. Sin embargo, durante la comida, los ácidos gástricos son neutralizados, lo que permite a las bacterias ingeridas con la comida sobrevivir, al menos hasta que el valor del pH descienda. Por tanto, en estas condiciones, la microbiota gástrica puede ser considerada solo transitoria. Pero, cuando la secreción de ácidos gástricos está disminuida, permitiendo al pH permanecer por encima de 3, las bacterias pueden sobrevivir e incluso proliferar. La reducción de la secreción de ácidos gástricos (hipoclorhidria) ocurre de forma natural con la edad, es común tras cirugía gástrica y está asociada con determinadas enfermedades como la anemia perniciosa y la hipogammaglobulinemia. La microbiota gástrica de individuos con hipoclorhidria tiene significación toxicológica, puesto que aumenta la posibilidad de biotransformación de xenobióticos por las bacterias, particularmente debido a que el tiempo de vaciado gástrico en estos pacientes puede aumentar por encima de 5 horas. Se ha sugerido que el mayor riesgo de cáncer gástrico de los pacientes con aclorhidria está asociado a la mayor formación de compuestos N-nitroso por la microbiota gástrica (Heavey y Rowland, 2004).

Finalmente, la densidad de microorganismos en la zona proximal y media del intestino delgado es relativamente baja pero se incrementa de forma notable en la zona distal (aproximadamente 10^8 células/ml de contenido intestinal) y en el colon (10^{11} - 10^{12} células/g contenido intestinal) (Savage, 1977).

Función fisiológica de la microbiota intestinal

En un adulto saludable, la interacción constante entre las diversas especies bacterianas produce

un ecosistema estable en el colon, que mantiene la integridad del enterocito, modula los procesos metabólicos e inmunológicos, y protege frente a la colonización de patógenos invasivos (Levy, 2000).

La fermentación de determinados alimentos constituye uno de los principales papeles que ejerce la microbiota en la nutrición. Los principales productos que se derivan de estas reacciones son H₂, CO₂, ácido láctico, etanol, ácidos grasos de cadenas ramificadas, amonio, aminas, fenoles e indoles (Macfarlane *et al.*, 1986) y ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato y butirato) (Wolin, 1994; Cummings y Englyst, 1987) que son absorbidos y usados como fuente de energía por el hígado y otros tejidos, incluyendo el epitelio del colon (Heavey y Rowland, 2004). Los gases constituyen productos ubicuos del metabolismo anaerobio de microorganismos (Durand *et al.* 1994; Wolin y Miller, 1994), los ácidos grasos de cadena corta son productos finales del metabolismo, fundamentalmente de carbohidratos, mientras que los ácidos grasos de cadena ramificada se forman principalmente por la rotura oxidativa de aminoácidos. Cuando el alimento no-digerible está constituido principalmente por péptidos y proteínas, la fermentación bacteriana produce fundamentalmente ácidos grasos de cadena ramificada y metabolitos potencialmente tóxicos tales como amonio, aminas, fenoles, tioles e indoles.

En el papel que desempeña la microbiota intestinal en la nutrición, el metabolismo de lípidos o de ácidos grasos de cadena larga constituye el área más desconocida (Macfarlane *et al.*, 1992). Los microorganismos del colon desempeñan un papel destacado en el metabolismo de ácidos biliares primarios, participando de esta forma en su reciclado enterohepático, así como en el metabolismo del colesterol, produciendo los característicos esteroides neutros fecales (Rafter y Branting, 1991; Van Munster y Nagen-gast 1991). Asimismo, la microbiota normal sintetiza y excreta vitaminas, que pueden ser absorbidas como nutrientes por el hospedador (Levy, 2000).

La microbiota normal también es parte integrante de la morfología del intestino. En animales libres de bacterias la pared intestinal es más delgada, la superficie total de la mucosa es más pequeña y las vellosidades más delgadas que en animales microbiota normal (Pelkonen y Hänninen, 1986).

Efectos tóxicos de la microbiota intestinal

1. Interferencia en la absorción de compuestos

En el síndrome del asa ciega se produce una malabsorción de nutrientes esenciales, particularmente cobalamina, ácidos grasos, colecalciferol y azúcares, que da lugar a malnutrición. Diversos signos específicos de deficiencias nutricionales son evidentes en pacientes con este síndrome. Así, la anemia debida a una deficiencia de cobalamina es bastante común y la osteomalacia es una complicación ocasional por un defecto en la absorción de colecalciferol o bien a una deficiencia de sales biliares.

El defecto en la absorción de grasas, debido en parte a la desconjugación de las sales biliares por las bacterias intestinales da lugar a esteatorrea. Esto ocurre en aproximadamente un tercio de los pacientes con el síndrome del asa ciega. El transporte de agua, sodio y potasio es interferido por la bilis desconjugada. Este hecho puede explicar la presencia de diarrea en este síndrome, que ocurre más frecuentemente que la esteatorrea. A veces ocurre una malnutrición severa en estos pacientes, lo que sugiere que la digestión de proteínas o la absorción de aminoácidos está también afectada (Concon, 1988).

2. Defectos en la estructura de la mucosa

Cuando se comparan animales libres de microorganismos y animales normales, resulta evi-

dente que, de alguna forma, la microbiota intestinal influye en la estructura de la mucosa. Los animales libres de microorganismos carecen de las características histológicas usuales de la mucosa g.i. encontradas en los animales normales. Sin embargo, un marcado aumento de las poblaciones bacterianas en el tracto g.i. de animales normales causa cambios estructurales significativos en la mucosa, por ejemplo, un alisamiento de la superficie e inflamación. Mediante microscopía electrónica se ponen de manifiesto en estos casos más lesiones (Concon, 1988).

3. Mutagénesis y carcinogénesis

Las bacterias se han asociado al cáncer a través de distintos mecanismos, como la inducción de inflamación crónica tras una infección bacteriana y la producción de metabolitos tóxicos. Pueden tener un efecto directo, uniéndose a mutágenos potenciales, y liberar toxinas que pueden unirse a receptores específicos de la superficie celular y afectar a las señales de comunicación intracelular. Existen evidencias de distintas fuentes que apoyan la implicación de las bacterias en la etiología del cáncer y que se presentan resumidas en la Tabla 3.2.

La microbiota también se relaciona con efectos mutagénicos a través de los fecapentaenos, mutágenos potentes que se encuentran en alta concentración en las heces de algunos individuos. Estos compuestos son producidos *in vivo*

por especies comunes de la microbiota del colon, a partir de precursores de origen desconocido.

El tipo de microbiota intestinal presente, lo que depende de la dieta, como se verá más adelante, es un factor a tener en cuenta. Así, en poblaciones urbanas donde existe una mayor incidencia de cáncer de colon debido a la biotransformación de distintos nutrientes se observa una dominancia de especies bacterianas del género *Bacteroides* dentro de la microbiota intestinal, frente a poblaciones rurales donde el índice de esta enfermedad es muy bajo y en su microbiota intestinal predominan las bacterias lácticas (Moore y Moore, 1995).

4. Transformación metabólica de compuestos

Las propiedades toxicológicas de los compuestos pueden ser modificadas considerablemente por la actividad metabólica de los microorganismos, directamente o en asociación con el metabolismo endógeno del hospedador. La mayoría de las reacciones llevadas a cabo por la microbiota intestinal son de naturaleza degradativa y así los productos resultantes tienen pesos moleculares más pequeños. En el intestino delgado, donde predomina un ambiente oxigenado, la mayoría de las reacciones metabólicas llevadas a cabo por la microbiota son hidrolíticas mientras que en el intestino grueso, el metabolismo pre-

Tabla 3.2. Evidencias de la implicación de las bacterias intestinales en la etiología del cáncer.

Evidencia	Referencia
• Las heces humanas son mutagénicas y se han aislado de las mismas sustancias genotóxicas de origen bacteriano.	Venturi <i>et al.</i> 1997
• Las bacterias intestinales pueden producir, a partir de componentes de la dieta, sustancias con actividad genotóxica, carcinógena y promotora de tumores.	Hambly <i>et al.</i> 1997
• Las bacterias intestinales pueden activar procarcinógenos a agentes reactivos con el ADN.	Heavey y Rowland, 2004
• Ratas libres de microorganismos alimentadas con una dieta humana mostraron una menor cantidad de aductos de ADN en los tejidos en comparación con ratas convencionales.	Rumney <i>et al.</i> 1993
• Ratas libres de microorganismos expuestas al carcinógeno 1,2-dimetilhidrazina tienen menor incidencia de tumores de colon que ratas con una microbiota normal.	Reddy <i>et al.</i> 1975

dominante es el reductivo debido al ambiente anaerobio.

Los microorganismos intestinales son capaces de llevar a cabo distintos tipos de reacciones entre las que se encuentran: hidrólisis, descarboxilación, desaminación, desmetilación, apertura de anillos de compuestos heterocíclicos, reducción, deshidroxilación, aromatización y deshalogenación, entre otras.

A continuación se exponen algunas de las reacciones de biotransformación principales realizadas por la microbiota intestinal sobre sustancias de distinta naturaleza como productos alimentarios, fármacos, compuestos endógenos, etc.

4.1. Hidrólisis

Glucósidos

Los mamíferos adultos carecen de β -glucosidasa en la mucosa, por lo que su origen es microbiano. Especialmente *Streptococcus faecalis* exhibe una gran actividad β -glucosidasa, aunque hay otros géneros que también la muestran en menor intensidad (Pelkonen y Hänninen, 1986).

Muchas sustancias importantes desde el punto de vista toxicológico están presentes de forma natural en las plantas como glucósidos. Generalmente, no se absorben fácilmente y por tanto son poco tóxicos. Sin embargo, son hidrolizados por las bacterias intestinales a un aglucón (fracción no glucídica) y el correspondiente azúcar. Este aglucón puede ser el responsable de la toxicidad observada. Este es el caso, por ejemplo, de la cicasina, un glucósido natural presente en el fruto de la *Cyca* responsable de los efectos tóxicos observados en los consumidores de estos frutos. Los síntomas de la intoxicación varían desde hemorragias hasta parálisis. La ruta de administración de la cicasina es de gran importancia, ya que la toxicidad se produce sólo cuando el compuesto se ingiere por vía oral. La sustancia responsable de los efectos tóxicos es el metilazoximetanol, el aglucón liberado en la hidrólisis de la cicasina por las β -glucosidasas bacterianas. El metilazoximetanol es absorbido

y puede ser posteriormente transformado en los tejidos a metildiazonio, un agente alquilante muy potente (Roland *et al.*, 1993).

Los glucósidos cianogénicos muestran su toxicidad tras su hidrólisis microbiana intestinal. Así, la amigdalina, el gentobiósido de benzaldehído cianohidrina se degrada a mandelonitrilo, que se descompone a benzaldehído y ácido cianhídrico (Figura 3.1). Reacciones similares se pueden esperar de otros glucósidos cianogénicos encontrados en otros productos alimenticios.

El alcaloide de la patata, la solanina, puede reducir su toxicidad por la hidrólisis de la microbiota intestinal a solanidina, que es menos tóxica y menos absorbible.

La reacción de degradación inicial de los glucósidos flavonoides por las bacterias intestinales es mediante hidrólisis. Así, la hesperidina, un ramnoglucósido encontrado en la uva, se hidroliza primero a hesperitina y fenil- β -D-glucósido. Posteriormente la degradación microbiana conduce a fenol. El aglucón, hesperitina, es más liposoluble que el compuesto original. Una situación similar tiene lugar con la naringina, también encontrada en la uva, y la rutina, que está presente en relativa gran cantidad en el trigo y otras plantas.

Conjugados

Las sustancias absorbidas suelen conjugarse con ácido glucurónico, glicina, taurina y otros compuestos. Estos conjugados pueden ser excretados en la bilis y luego ser hidrolizados por los microorganismos intestinales. Los compuestos libres pueden ser posteriormente reabsorbidos sufriendo circulación enterohepática. De esta forma, la toxicidad de un compuesto puede aumentar, ya que la exposición del organismo al compuesto se ve prolongada (Rowland, 1988; Chadwick *et al.*, 1992).

Ejemplos de hidrólisis de glucurónidos por las bacterias intestinales son el dietilestilbestrol (DES) y el di-ter-butilhidroxibenzoato del BHT. La circulación enterohepática de los aglucones del DES-glucurónido y BHT-glucurónido ha sido demostrada en ratas.

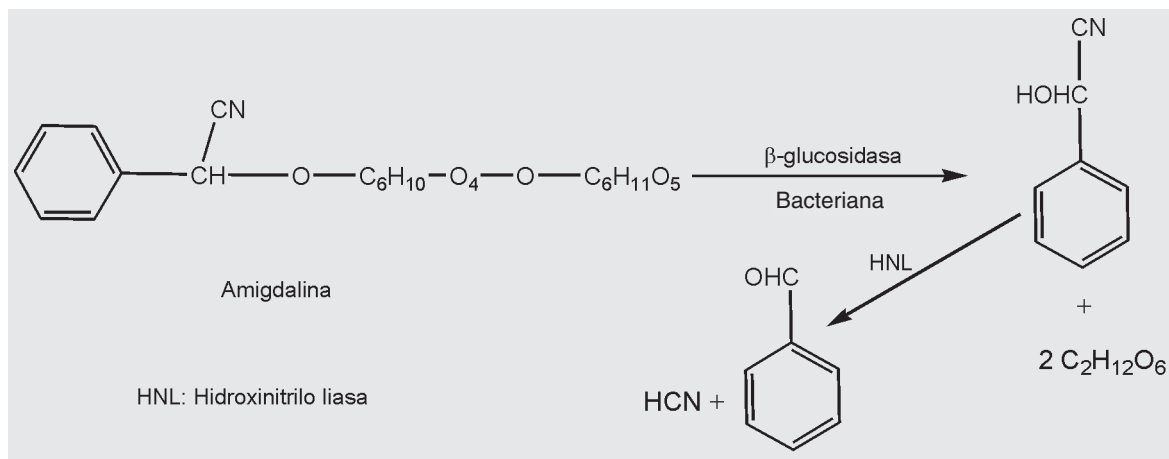


Figura 3.1. Biotransformación de la amigdalina.

Los fenoles de las plantas se excretan probablemente como glucurónidos en la bilis. De forma similar, estos glucurónidos están sujetos a hidrólisis intestinal microbiana previa a otro tipo de degradación microbiana. Así, el glucurónido del ácido ferúlico (ácido 3-metoxi-r-hidroxi cinámico) es hidrolizado por las bacterias intestinales. El ácido libre es luego reducido en el doble enlace, desmetilado y deshidroxilado. El producto final de estas reacciones, el ácido m-hidroxifenilpropiónico, es absorbido y excretado en la orina.

La enzima β -glucuronidasa se encuentra en muchas especies de bacterias intestinales, particularmente *E. coli*. El alto grado de actividad β -glucuronidasa en el colon y el ciego se correlaciona bien con la alta densidad microbiana en estas áreas del tracto g.i.

El ácido hipúrico, un conjugado con glicina del benzoato, también se hidroliza por las bacterias intestinales, particularmente por especies del género *Enterococcus*. Los benzoatos producidos, al ionizarse a pH alcalino, pueden ser pobremente absorbidos debido al ligero pH alcalino del colon donde tiene lugar una significativa hidrólisis del ácido hipúrico.

La N-hidroxifluorenilacetamida es un carcinógeno destoxicado por enzimas hepáticas y eliminado por vía biliar en forma de glucurónido. Weisburger y colaboradores (1970) encontraron

que la mayor parte del material excretado era desconjugado en ratas convencionales, en contraposición a lo que ocurría en ratas libres de microorganismos. El mismo tipo de estudio explica algunas de las acciones de la dimetilhidrazina (DMH), un carcinógeno usado para inducir cáncer intestinal. Se descubrió que la DMH era bioactivada en el hígado a un derivado carcinogénico muy potente, el azoximetano (posteriormente transformado a metildiazonio). El azoximetano es conjugado con glucurónico y secretado en la bilis, llegando de esta forma a las bacterias intestinales. Esto puede explicar por qué su potencial carcinogénico es mucho menor en ratas libres de microorganismos. Otras moléculas que aparentemente siguen el mismo tipo de biotransformación son el 1-nitropireno, el 3,2-dimetil-4-aminobifenil, el benzo[a]pireno, etc.

Los conjugados de la bilirrubina son hidrolizados por β -glucuronidasas bacterianas y los pigmentos biliares sufren circulación enterohepática.

Los glucurónidos de los estrógenos sufren una extensa recirculación. La administración de ampicilina aumenta en gran medida la excreción fecal de conjugados de estrógenos debido a la disminución del metabolismo bacteriano. Un efecto similar ocurre en el metabolismo de la progesterona.

En los últimos años se están reuniendo muchas evidencias acerca del papel de las aminas aromáticas heterocíclicas (AAH), productos de pirólisis de los aminoácidos contenidos en productos cárnicos y en el pescado, en la etiología del cáncer de colon en humanos, jugando las bacterias un papel crucial en su activación a intermediarios reactivos con el ADN. El mecanismo más importante implicado es la rotura de los glucurónidos por las bacterias intestinales, aunque hacen falta más estudios al respecto ya que los datos existentes hasta el momento son controvertidos (Knasmüller *et al.* 2001). No obstante, el papel de la microbiota intestinal en su activación es un hecho demostrado (Kassie *et al.*, 2001).

Ésteres

Ejemplos de la hidrólisis microbiana intestinal de ésteres son el ácido glicirretínico hemisuccinato, el metil galato, un antioxidante (Figura 3.2), y el ácido clorogénico, un éster de los ácidos cafeico y quínico. El ácido glicirretínico es liposoluble y puede ser absorbido fácilmente en el tracto g.i. El regaliz contiene el glucurónido, el ácido glicirrízico.

El ácido glicirrízico produce efectos similares a la deoxicortisona, por lo que ingerido en cantidad lo suficientemente alta puede producir retención de sales, hipertensión y cardiomegalia.

El ácido gálico es suficientemente soluble en lípidos, por lo que puede ser absorbido de forma significativa en el colon. Al ser metilado

en los tejidos, puede competir por grupos metilo esenciales. Se ha demostrado debilidad y otros desórdenes neurológicos en animales expuestos a ácido gálico, compuesto que puede ser metabolizado por las bacterias intestinales a derivados más tóxicos.

Uno de los productos de la hidrólisis microbiana del ácido clorogénico es el ácido cafeico, producto de degradación que puede dar lugar a sensibilización de tipo dermatitis (Concon, 1988).

Hidrólisis de sulfamatos

El ciclohexano sulfamato de sodio (ciclamato) es un agente edulcorante. Las bacterias intestinales lo degradan a ciclohexilamina y sulfato, probablemente por hidrólisis realizada por enzimas sulfatasas (Figura 3.3). La ciclohexilamina es más lipofílica que el compuesto original y es rápidamente absorbida y excretada en la orina (Bethizy y Hayes, 1994). Ante la sospecha de su posible carcinogenicidad y teratogenicidad, demostrada en animales de experimentación, algunos países como Estados Unidos, Japón e Inglaterra lo prohibieron. Actualmente, el ciclamato está autorizado en la Unión Europea, aunque en algunos alimentos en cantidad limitada, y la Administración para la Alimentación y los Medicamentos (FDA) americana está revisando una petición para volver a aprobarlo.

Se requiere una considerable exposición previa a ciclamato para descomponer el compuesto.

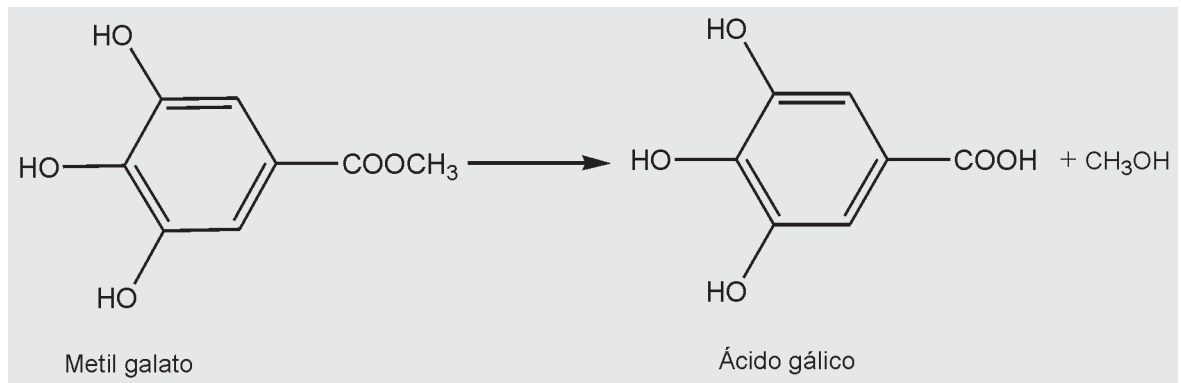


Figura 3.2. Hidrólisis del metil galato.

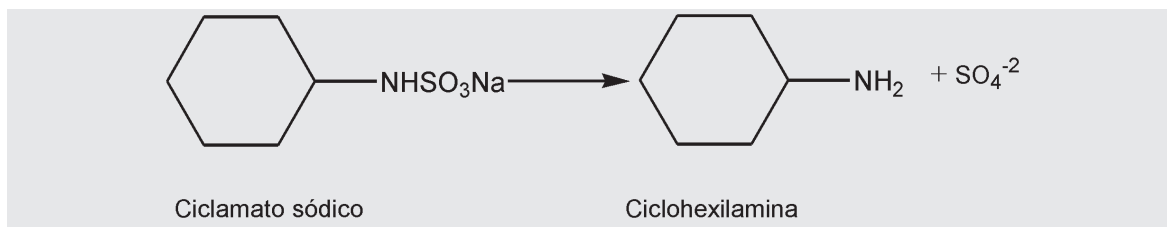


Figura 3.3. Hidrólisis del ciclamato.

Incluso entonces, está comprobado que no todos los humanos son capaces de descomponer extensamente el compuesto a ciclohexilamina. La mayoría de las ratas Wistar son capaces de descomponer el edulcorante, sin embargo, el conejo muestra un comportamiento similar a los humanos. Las bacterias responsables parecen ser del grupo *Enterococos*. Es de notar que la ciclohexilamina estará menos ionizada en el intestino y por tanto será más absorbible.

Hidrólisis de tiamina

Muchas especies de bacterias intestinales han demostrado su capacidad para descomponer la tiamina. Tres en particular fueron aisladas de la materia fecal de un paciente con una deficiencia de tiamina persistente, en individuos sanos y en pacientes hospitalizados. Los microorganismos fueron *Bacillus thiaminolyticus*, *Bacillus aneurinolyticus* y *Clostridium thiaminolyticum*.

Las dos primeras especies son aerobios formadores de esporas, y la última es un anaerobio. *B. thiaminolyticus* y *C. thiaminolyticum* producen la enzima tiaminasa I, y *B. aneurinolyticus* tiaminasa II. Estas dos enzimas difieren en su modo de acción. La tiaminasa I promueve las reacciones de intercambio con varios compuestos por el grupo tiazol, seguido de hidrólisis. Así, anilina, cisteína, ácido nicotínico y otros pueden ser intercambiados por el grupo tiazol. La tiaminasa II cataliza la hidrólisis directa del enlace $\text{CH}_2\text{-N-}$ entre los grupos pirimidina y tiazol (Figura 3.4).

4.2. Descarboxilación

La descarboxilación intestinal microbiana de ácidos fenólicos puede dar lugar a productos de mayor toxicidad que el compuesto original. Los siguientes ejemplos (Figura 3.5) ilustran este hecho:

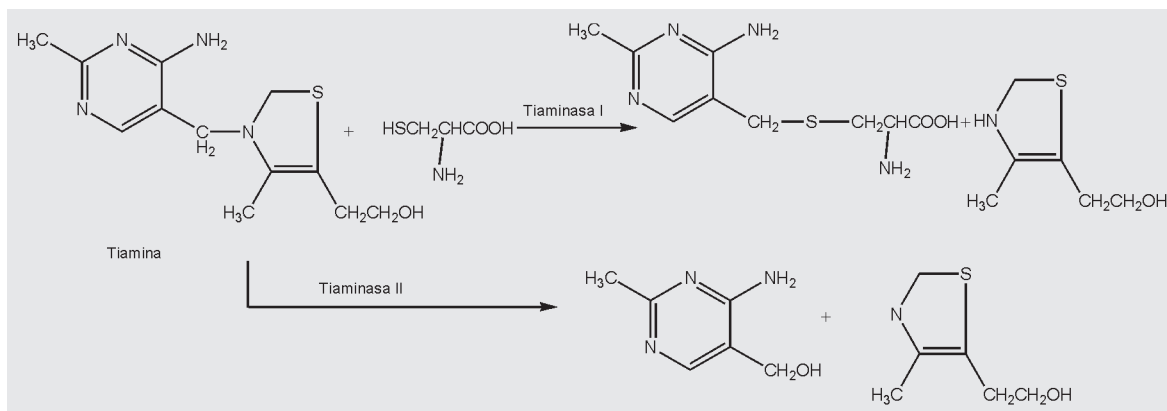


Figura 3.4. Hidrólisis de tiamina.

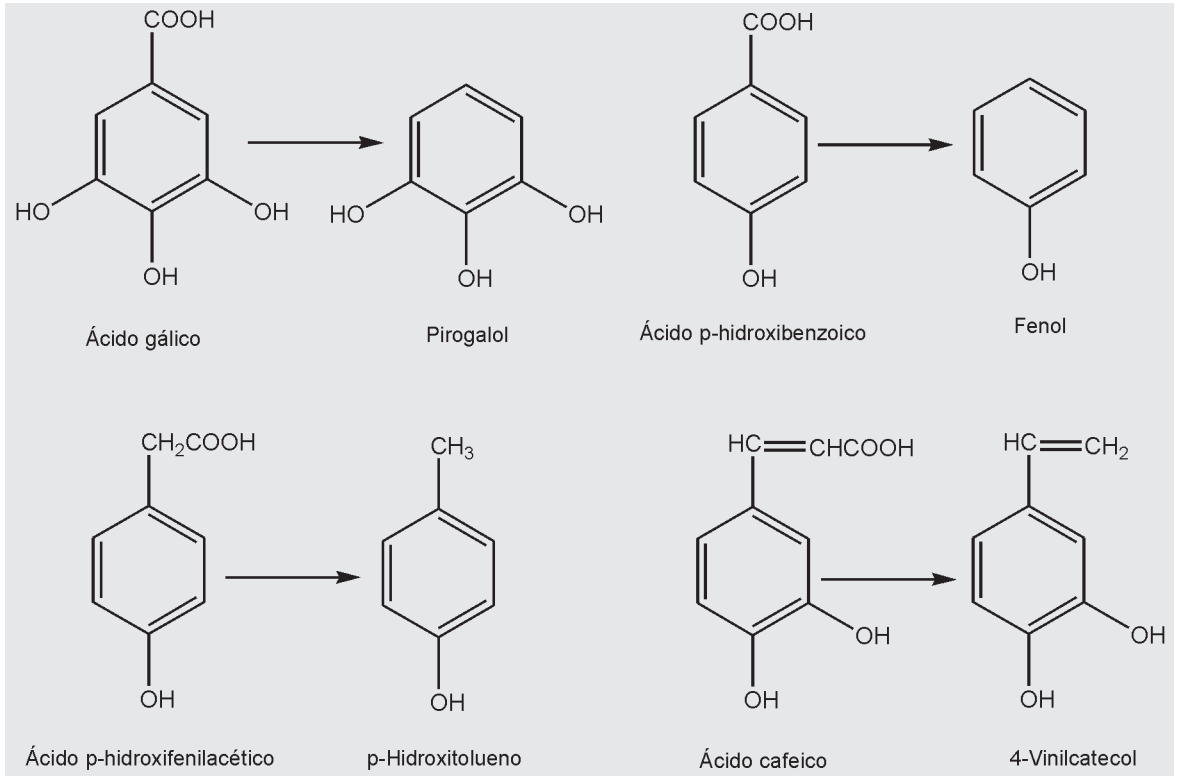


Figura 3.5. Ejemplos de descarboxilación bacteriana.

Es de notar que todos estos ejemplos tienen el grupo para-hidroxilo. A partir de estudios de descarboxilación con un gran número de ácidos benzoicos fenólicos con microorganismos del ciego de rata, se ha demostrado que el grupo hidroxilo en posición «para» es necesario para que la reacción de descarboxilación ocurra. Los productos de la descarboxilación son frecuentemente absorbidos y pueden ser detectados en la orina. Es preocupante la formación de vinilcatecol por descarboxilación microbiana intestinal del ácido cafeico, como se ha demostrado en rata, ya que la carcinogenicidad de compuestos vinílicos ha sido demostrada. Los productos fenólicos son más liposolubles, y más fácilmente absorbibles que los ácidos fenólicos de origen. El pirogalol es más tóxico que el ácido gálico. La toxicidad del fenol es bien conocida, pero además hay que tener en cuenta su posible papel como promotor de cáncer (Concon, 1988).

Una fuente de aminoácidos (aas) en el colon son las proteínas no digeridas y el detritus celular y microbiano, que son hidrolizados por proteasas bacterianas para formar aminoácidos. Esto, unido al escape de aas de la sangre al lumen intestinal y los aas no absorbidos de la digestión de las proteínas constituyen la fuente de aas que sirve como sustrato para las reacciones de descarboxilación y desaminación bacteriana. Los productos de estas reacciones poseen varios grados de toxicidad. Varios de estos productos tienen actividad presora. Así, la descarboxilación de la tirosina, triptófano, fenilalanina, histidina, cisteína y lisina da lugar a tiramina, triptamina, feniletilamina, histamina, cistamina (aminoetil mercaptano) y cadaverina, respectivamente. Las primeras tres aminas son compuestos hipertensores; las últimas tres son hipotensoras.

La descarboxilación de la arginina por las bacterias intestinales tiene lugar primero por eli-

minación de un grupo formamidina (HN=C-NH₂) para producir ornitina. La posterior descarboxilación y desaminación de los subsiguientes derivados por las bacterias produce D'-pirrolina, que es reducida a pirrolidina. Esta también puede ser producida por la descarboxilación de prolina por las bacterias intestinales. De forma similar la cadaverina procedente de la descarboxilación de la lisina sufre una reacción de ciclación para formar piperidina.

La formación de pirrolidina y piperidina por las bacterias intestinales es quizá de mayor significación toxicológica que aquella de las diaminas, ya que la cantidad formada en este último caso no suele ser suficiente para producir efectos tóxicos significativos. En contraste, las bacterias intestinales, por ejemplo *E. coli*, puede promover la formación de nitrosaminas a partir de estas aminas secundarias cíclicas. La nitrosopiperidina y nitrosopirrolidina son carcinógenos relativamente potentes.

Piperidina y pirrolidina se excretan en la orina en humanos en una tasa de 0,8 y 0,4 mg/día. Estas cantidades variarán por supuesto con la dieta y otros factores. Así, estas dos aminas puede que haya que considerarlas en la etio-

logía del cáncer g.i. y de vejiga, especialmente en condiciones de alta ingesta de nitratos en la dieta y el agua de bebida (Concon, 1988).

4.3. Desaminación

Los productos de la descarboxilación de aas pueden sufrir posteriormente desaminación, o los aas pueden ser desaminados previamente a su descarboxilación. Por ejemplo la tirosina puede sufrir la reacción indicada en Figura 3.6.

De forma similar, la cisteína puede ser degradada por ambas vías, produciendo etilmercaptano, que es degradado posteriormente a metilmercaptano y finalmente a H₂S. El H₂S es un gas extremadamente tóxico, produciendo la muerte en unos pocos segundos cuando se inhala a concentraciones letales. Sin embargo, la cantidad producida a partir de las proteínas raramente alcanza niveles tóxicos y no llega a producir efectos tóxicos significativos. El etilmercaptano es tóxico y puede producir efectos narcóticos si el hombre lo inhala a una concentración de 4 ppm. La DL50 de CH₃-SH en el ratón es 2,4 mg/kg, y la menor concentración letal por inhalación en rata es de 1.000 ppm.

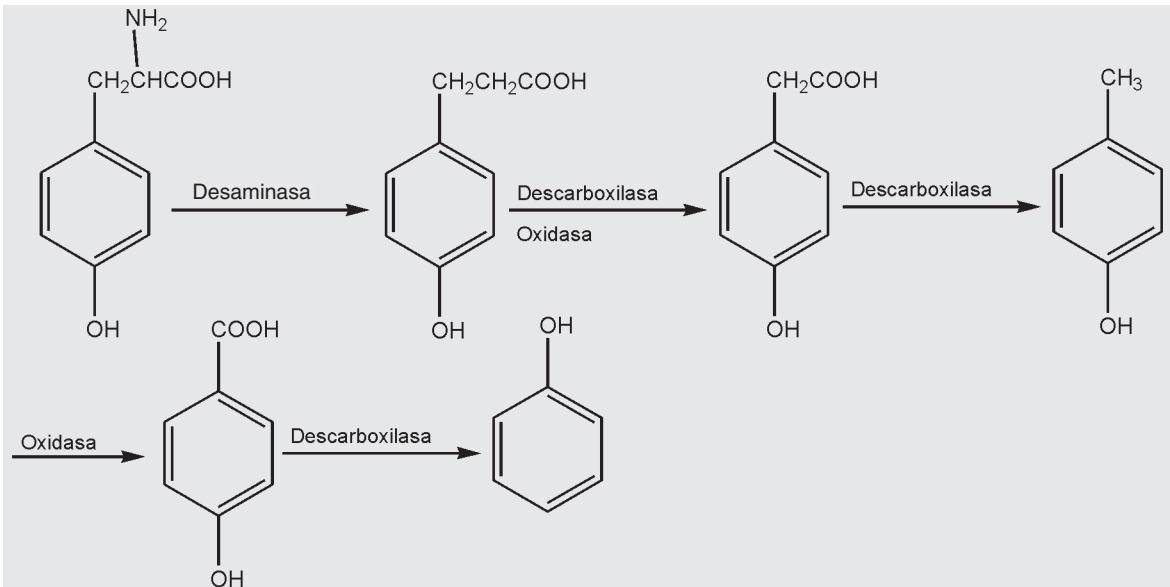


Figura 3.6. Desaminación de la tirosina.

El triptófano sigue una desaminación bacteriana a ácido indol propiónico, que posteriormente se degrada a ácido indolacético y finalmente a escatol e indol, siendo estos dos últimos compuestos los que le dan el olor característico a las heces. El indol tiene una DL50 oral en rata de 1g/kg. La DL50 i.v. para el perro es de 60 mg/kg. Se desarrollan tumores de vejiga en ratas alimentadas con 2-acetilaminofluoreno en la dieta con triptófano (1,4 o 4,9%), indol (0,8 o 1,6%), o ácido indol acético (1,0%). El 2-acetilaminofluoreno por sí solo no los produce. El indol es fácilmente soluble en grasas y debería ser rápidamente absorbido. La absorción del indol se pone de manifiesto por la presencia en la orina de indoxil sulfato un producto de detoxificación del indol.

En condiciones de enfermedad como hipoclorhidria, ictericia obstructiva y diarrea, puede ser excretado una cantidad de indoxil sulfato relativamente grande. Así, este producto de detoxificación del indol es un índice de la absorción de productos de la putrefacción por las bacterias intestinales.

En un estudio realizado en sistemas de cultivo semicontinuo, Harris *et al.* (1986) demostraron la conversión de la 5-fluorocitosina (5-FC) a 5-fluorouracilo (5-FU) por la microbiota intestinal humana. La 5-FC es una fluoropirimidina usada principalmente en el tratamiento de la micosis sistémica. Es desaminada a 5-FU por los microorganismos intestinales, particularmente *E. coli*, que presenta una gran actividad citosina desaminasa. Esta biotransformación se ha asociado con la toxicidad clínica de la 5-FC

que produce anemia, leucopenia y trombocitopenia en aproximadamente un tercio de los pacientes.

4.4. Deshidroxilación

Algunas especies de bacterias anaerobias pertenecientes a los géneros *Bacteroides*, *Clostridium*, y *Veillonella* y la especie *Streptococcus faecalis*, que habitan el tracto g.i. de los mamíferos, son capaces de deshidroxilar el ácido cólico a ácido desoxicólico.

Algunas cepas son incluso capaces de deshidroxilar en la posición 12 al ácido cólico, producto de la desconjugación de las sales biliares, para producir ácido quenodesoxicólico; la eliminación de OH en la posición 12 por las bacterias intestinales produce ácido litocólico. El ácido desoxicólico ha demostrado que induce sarcomas locales tras su inyección subcutánea en ratas o ratones.

Los metabolitos del triptófano también se deshidroxilan por las bacterias intestinales. Así, el ácido kinurénico y xanturénico son deshidroxilados a ácido quináldico y ácido 8-hidroxiquináldico (Figura 3.7).

El papel de las bacterias intestinales en promover la deshidroxilación ha sido confirmada por el uso de antibióticos para prevenir que esta reacción ocurra. Es interesante el hecho de que tanto el ácido xanturénico como 8-hidroxiquináldico se hayan considerado tumorigénicos, induciendo tumores de vejiga en ratones, al igual que otros metabolitos del triptófano.

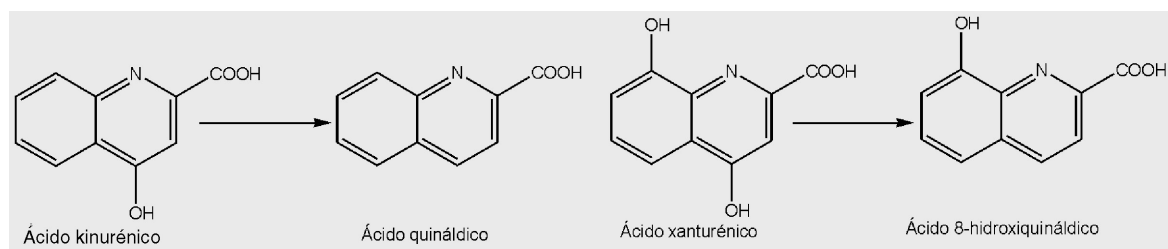


Figura 3.7. Ejemplos de deshidroxilación bacteriana.

4.5. Desmetilación

Algunos ejemplos de desmetilación promovidos por las bacterias intestinales ya se han visto en relación con otras reacciones. Tipos adicionales de reacciones de desmetilación inducidas por bacterias intestinales son la O- y N-desmetilación. Algunos compuestos degradados por O-desmetilación son los flavonoides y metoxiderivados de los ácidos benzoico, fenilacético, fenilpropiónico y cinámico. La O-desmetilación da lugar a la formación de O-dihidroxifenoles, que pueden tener efectos antitiamina.

Las bacterias intestinales también llevan a cabo N-desmetilación. La colina libre y los derivados de la lecitina, tras su hidrólisis, pueden ser N-desmetilados para dar una dimetilamina terciaria. La acción de fosfolipasas y fosfatasas enterobacterianas en la lecitina produce colina, que es degradada a trimetilamina por cepas de *Bacillus spp.* y *Clostridium spp.* La N-desmetilación de la trimetilamina tanto por *E. coli*, *Bacteroides fragilis*, *Bifidobacterium spp.*, y tanto *Clostridium spp.* como por *C. bifermetans* produce dimetilamina. Bacteroides, bifidobacterias y clostridios así como *E. coli* y *S. faecalis* pueden promover la nitroxilación de la dimetilamina a dimetilnitrosamina, pudiendo ser las dimetilaminas significativas en la formación de nitrosaminas (Figura 3.8).

El metilmercurio es un ejemplo típico de la importancia de la micorbiota intestinal en procesos de destoxicación. Roland *et al*, 1993 encontraron que la incubación de metilmercurio

orgánico con microbiota fecal humana o de rata daba lugar a mercurio inorgánico desmetilado. El compuesto original es rápidamente absorbido y entra en el ciclo enterohepático, mientras que la molécula desmetilada lo hace escasamente y por tanto es rápidamente excretada en las heces.

4.6. Deshalogenación

Un buen ejemplo de reacción de deshalogenación llevada a cabo por bacterias intestinales es la decloración reductiva del DDT (Figura 3.9).

Aerobacter aerogenes y *E. coli* aisladas de intestino de rata deshalogenan rápidamente el DDT. *A. erogenes*, sin embargo, puede degradar el DDT además a diversos metabolitos (Concon, 1988).

4.7. Reducción

La hidrogenación de ácidos grasos insaturados y otros ácidos insaturados, nitrocompuestos y grupos azo es una forma de reducción. La reducción de los ácidos grasos insaturados linoleico y linolénico tiene lugar en el intestino humano (Figura 3.10).

Especies bacterianas intestinales comunes como *Clostridium perfringens*, *Streptococcus faecalis*, *E. coli* y otros, individualmente o en cultivo mixto, hidrogenan los ácidos linolénico y oleico.

Las bacterias intestinales también hidrogenan al ácido cafeico y a otros ácidos fenólicos insaturados.

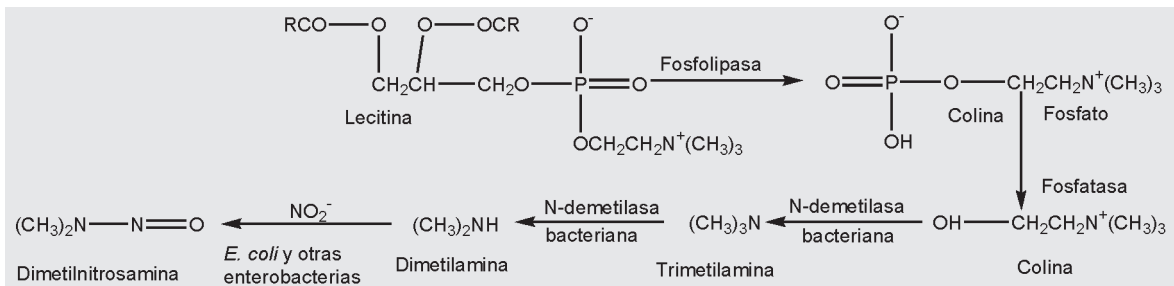


Figura 3.8. Ejemplo de desmetilación bacteriana.

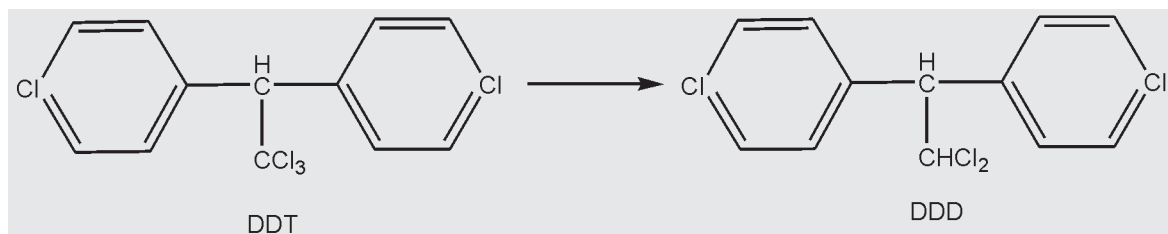


Figura 3.9. Deshalogenación del DDT.

Los nitrocompuestos son reducidos a las correspondientes aminas por las bacterias intestinales. *Proteus vulgaris* y *E. coli* reducen el cloramfenicol y otros nitrocompuestos orgánicos a las correspondientes arilaminas. Los nitrocompuestos aromáticos, 2,3,4,5-tetracloronitrobeneno, nitrobeneno, el ácido o-, m-, y p-nitrobenzoico y sus amidas, m- y p-nitrofenol, y o- y p-nitrotolueno pueden todos ellos ser reducidos por las bacterias intestinales.

La microbiota intestinal es responsable de la reducción de la digoxina, dando lugar a metabolitos inactivos. Estos metabolitos pueden constituir al menos el 5% de la excreción urinaria de digoxina, pero el 10% de los pacientes puede excretar más de un 40% de digoxina de esta forma. La reducción de la molécula original es inhibida en presencia de aire *in vitro* y de antibióticos tanto *in vitro* como *in vivo* en humanos. La administración de tetraciclina o eritromicina a pacientes que reducen en gran medida la digoxina aumenta las concentraciones séricas del fármaco. Esto sugiere que un paciente con una microbiota activa frente a la digoxina puede sufrir efectos tóxicos agudos cuando se le administra un antibiótico (Roland *et al.* 1993). Uno

de los microorganismos identificados como responsables de la reducción de la digoxina es el anaerobio *Eubacterium lentum* (Pelkonen y Hänninen, 1986).

El metronidazol es otro ejemplo de la importancia de las reducciones bacterianas. Las enzimas implicadas pertenecen al grupo de las nitroreductasas. Estas enzimas son responsables de la reducción de los nitrocompuestos dando lugar a la liberación de aminas a través de la producción de derivados nitroso o N-hidroxi reactivos. El metronidazol se ha usado extensamente, principalmente como fármaco antiparasitario y en el tratamiento y la profilaxis de infecciones por bacterias anaerobias. Se trata de un compuesto mutagénico en bacterias, y que administrado en grandes dosis aumenta la incidencia de tumores en ratones. Goldman (1980) mostró que la reducción del metronidazol da lugar a la formación de una amplia variedad de metabolitos. Entre ellos, dos han sido caracterizados por ser los más estables: la acetamida, un carcinógeno débil en roedores y el ácido N-(2-hidroxietyl) oxámico, ambos derivados del metabolismo bacteriano, como se demostró en experimentos con animales gnotobióticos (Koch *et al.*, 1979).

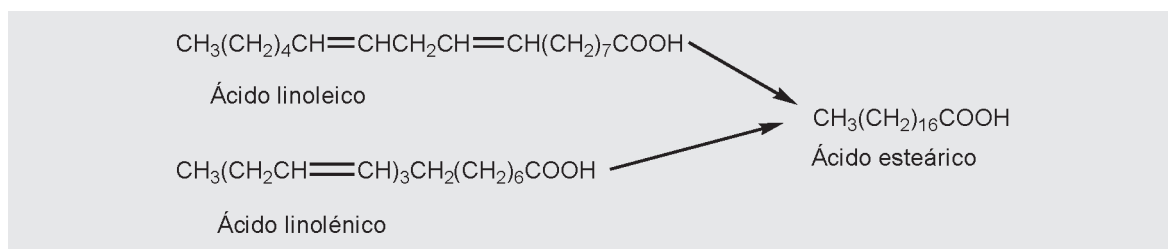


Figura 3.10. Ejemplos de reducción microbiana.

El herbicida trifluralin también se reduce a su derivado monoaminado, que es posteriormente absorbido en el intestino de rata.

Las nitrosaminas están consideradas como una de las principales causas de cáncer en humanos. Pueden ser formadas por la microbiota intestinal, por reducción de las bacterias de los nitratos a nitritos en presencia de aminos secundarias, muchas de ellas de origen alimentario. Las condiciones conducentes a un ambiente gástrico más apropiado para el crecimiento bacteriano pueden favorecer la formación de estos compuestos. De hecho, algunos agentes bloqueantes de H_2 usados para inhibir la secreción de ácido gástrico, aumentan la reducción de nitratos y así la liberación de nitrosaminas, al igual, que por otras razones lo hacen algunas enfermedades digestivas, resección gástrica, gastritis atrófica, etc. (Roland *et al.*, 1993).

Takeno y Sakai (1991) en un estudio realizado en ratas, demostraron que el nitrazepam sufre nitroreducción por la microbiota, lo que puede jugar un papel importante en la teratogenicidad de este compuesto.

La azoreducción por bacterias intestinales es de interés, ya que los azocolorantes se han empleado en la industria alimentaria. Entre ellos, la tartrazina, el ácido amarillo (4-aminoazobenceno-3,4-sodio sulfonato), etc., pueden sufrir la ruptura reductiva del azoenlace.

La especie *S. faecalis* ha sido implicada en un número de azoreducciones bacterianas. *E. coli*, *A. aerogenes* y *Bacillus proteus* han sido involucradas también en la azoreducción de colorantes solubles en grasas como el 1-fenila-

zo-2-naftol y el rojo metilo (ácido 4-dimetilaminobenceno-2'-carboxílico).

El fármaco sulfasalazina es otro ejemplo de azoreducción bacteriana, liberando la ruptura del azoenlace sulfapirina y 5-aminosalicilato. La sulfapiridina, al no tener carga, es rápidamente absorbida y entra en la circulación sistémica para ser eliminada posteriormente por la orina, mientras que el 5-aminosalicilato, al ser muy polar al pH del colon, permanece en el mismo para ser eliminado a través de las heces. De hecho, la molécula completa actúa como transportadora del 5-aminosalicilato, liberándolo en el colon, donde ejerce su efecto terapéutico en el tratamiento de la colitis ulcerosa (Goldman, 1982). Por el contrario, la sulfapirina es la responsable de los efectos adversos de la molécula original como *rash* y alteraciones hematológicas.

Las bacterias sulfato reductoras que llevan a cabo la reducción de sulfatos y sulfitos a sulfuro constituyen un grupo muy especializado de microorganismos dentro de las bacterias Gram negativas anaerobias que se encuentran colonizando el intestino delgado de los humanos adultos (Gibson *et al.*, 1993). La actividad de estas bacterias está controlada fundamentalmente por la disponibilidad de compuestos de azufre oxidados, fundamentalmente SO_4^{2-} y SO_3^{2-} que se encuentran en algunos conservantes de alimentos, y que por lo tanto, ingerimos. Existen varios estudios que demuestran la toxicidad del sulfuro para las células del epitelio del intestino, promoviendo tanto la proliferación celular como otros procesos típicos de colitis ulcerosas (Christl *et al.*, 1996; Pitcher y Cummings, 1996; Roediger *et al.*, 1993).

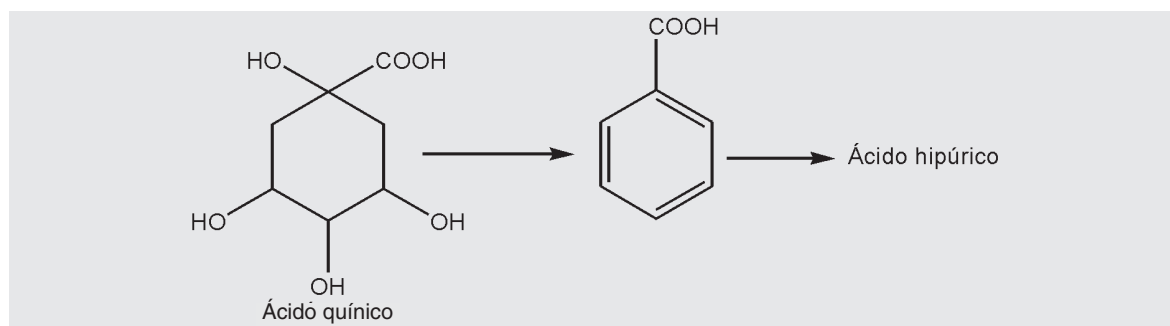


Figura 3.11. Aromatización del ácido quínico.

4.8. Aromatización

La aromatización llevada a cabo por las bacterias intestinales se ilustra por la deshidroxilación del ácido quínico (Figura 3.11) o el ácido sikímico, produciendo ácidos benzoico y vainilínico.

4.9. Otras

Aunque la mayoría de las reacciones de biotransformación llevadas a cabo por la microbiota intestinal son de naturaleza reductiva, esta también puede realizar oxidaciones. Así, se ha comprobado que microorganismos pertenecientes a la microbiota normal humana son capaces de oxidar el alcohol a acetaldehído mediante la alcohol deshidrogenasa. El metabolito primario del etanol, el acetaldehído es muy tóxico, produciendo efectos mutagénicos y carcinogénicos, además de otros efectos tóxicos. Existe un alto porcentaje de la población asiática que presenta una deficiencia genética en la destoxicación del acetaldehído, por lo que el riesgo de cáncer asociado al alcohol es particularmente alto entre ellos (Mikko, 2003; Sanz 1995).

Otras sustancias que sufren metabolismo oxidativo son los lignanos contenidos en productos de nuestra dieta, dando lugar a derivados aromáticos hidroxilados (Niemeyer y Metzler, 2002).

Factores que afectan a la microbiota intestinal

La composición y funcionalidad de la microbiota intestinal se encuentra muy influenciada por el tipo de alimentos que ingerimos, de esta forma los compuestos azufrados estimulan el metabolismo de las bacterias sulfato reductoras, produciéndose metabolitos tóxicos que son perjudiciales para el hospedador. Por el contrario, ciertos alimentos como los oligosacáridos estimulan el crecimiento y metabolismo de las bifi-

dobacterias que causan efectos beneficiosos para el hospedador. De la misma manera, los clostridios también responden selectivamente a componentes específicos de la dieta jugando un papel importante. De ahí la importancia que ha adquirido en los últimos años la incorporación de determinados alimentos denominados funcionales a la dieta, puesto que pueden modular significativamente la composición de la microbiota intestinal, considerándose una estrategia de importancia en el mantenimiento de la salud humana (Saarela *et al.*, 2002).

Los antibióticos tienen también una influencia obvia sobre la microbiota g.i. Modifican la composición de la misma y como resultado las reacciones de biotransformación mediadas por la microbiota cambian tanto cuali como cuantitativamente (Pelkonen y Hänninen, 1986).

Otros factores que afectan a la microbiota se resumen a continuación en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Factores que afectan a la microbiota del tracto g.i.

1. *Factores dependientes del hospedador:*
pH, secreciones como inmunoglobulinas, bilis, sales, enzimas
motilidad, e.j. velocidad, peristaltismo
fisiología, e.j. compartimentación
células exfoliadas, mucinas, exudados del tejido
2. *Factores dependientes de la microbiota:*
adhesión
motilidad
flexibilidad nutricional
esporas, cápsulas, enzimas, componentes antimicrobianos
tiempo de generación
3. *Interacciones microbianas:*
Sinergia:
cooperación metabólica
factores de crecimiento y excreción de vitaminas
cambios en pH, tensión de O₂
Antagonismo/estimulación:
ácidos grasos de cadena corta, aminas
cambios de pH, tensión de O₂
componentes antimicrobianos, sideróforos
requerimientos nutricionales
4. *Dieta:*
composición, fibra no digerible, fármacos, etc.

(Holzapfel *et al.* 1998)

Perspectivas futuras

En un momento de auge de la ecología microbiana, si bien es de suma importancia conocer la biodiversidad de microorganismos que integran la microbiota intestinal, de mayor importancia en el tema que nos ocupa es conocer las actividades desarrolladas por cada microorganismo dentro del ecosistema, ya que nos permitirá determinar el papel que desempeña esta microbiota en toxicología alimentaria. Los animales gnotobióticos constituyen un modelo experimental adecuado para determinar si los metabolitos de un xenobiótico se forman en el tracto digestivo, o para clarificar el papel de los microorganismos en la cinética de un compuesto en el organismo. Otros métodos que han mostrado su eficacia en este campo son los sistemas de cultivo semicontinuos (Manning *et al.*, 1987).

Un gran reto para el futuro será estudiar cómo los distintos microorganismos que integran esta comunidad interactúan tanto con otros miembros de la microbiota como con las células de su hospedador. La aplicación de técnicas moleculares a estos estudios ayudará a los microbiólogos a comprender el papel que los microorganismos juegan en su ambiente natural y las actividades que la microbiota intestinal lleva a cabo *in situ*.

Por otra parte, gracias al desarrollo de la genómica en los últimos años, otro importante reto para el futuro será determinar el genoma de los microorganismos que forman parte de la microbiota intestinal, conocido colectivamente como microbioma (incluyendo otros nichos del cuerpo humano). De hecho, ya se encuentran disponibles algunos genomas completos de bacterias que forman parte de la microbiota intestinal, lo cual permitirá llevar a cabo estudios complejos sobre la interacción entre las bacterias y el ser humano, tanto a nivel transcripcional como a nivel de proteínas (Natera *et al.* 2000). Además, recientemente se han dilucidado importantes aspectos relativos a la relación simbiótica entre la especie *Bacteroides thetaiotaomicron* y el ser

humano, y se ha descrito un complejo aparato sensor del ambiente que permite a esta especie bacteriana detectar y responder a distintas condiciones del nicho ecológico que habita, de tal manera que se establece una relación tanto con el individuo como con otros géneros integrantes de la microbiota (Xu *et al.*, 2004).

Otro de los retos del futuro será conocer los distintos factores que determinan la composición de la microbiota intestinal; en este sentido se deberá estudiar tanto la importancia de la constitución genética del hospedador humano en la predisposición a ser colonizado por determinadas especies como el impacto que ejercen los factores ambientales.

El conocimiento de todas estas facetas hará que en el futuro, una de las herramientas más valiosas de la medicina terapéutica y preventiva sea el control y la manipulación de la microbiota intestinal.

Bibliografía

- Bethizy JD, Hayes JR (1994). Metabolism, a determinant in toxicity. En: A. Wallace (ed.). *Principles and methods of toxicology*. 3rd Ed. Raven Press, New York. pp. 59-100.
- Berg RD (1996). The indigenous gastrointestinal microbiota. *Trends Microbiol* 4: 430-435.
- Chadwick RW, George SE, Claxton LD (1992). Role of the gastrointestinal mucosa and microbiota in the bioactivation of dietary and environmental mutagens or carcinogens. *Drug Metab Rev* 24: 425-492.
- Christl SU, Eisner HD, Scheppach W, Kasper H (1996). Effect of sodium hydrogen sulfide on cell proliferation of colonic mucosa. *Gastroenterology* 106: A664.
- Concon JM (1988). *Food toxicology*. Part A, B. Marcel Dekker, New York.
- Cummings JH, Englyst HN (1987). Fermentation in the human large intestine and the available substrates. *Am J Clin Nutr* 45: 1243-1255.
- Drasar BS, Barrow PA (1985). *Intestinal microbiology*. American Society for Microbiology, Washington DC.

- Durand M, Beaumatin P, Hannequart G *et al.* (1994). Effect of methanogenesis inhibition on human flora fermentation pattern in continuous culture. En: *Nouvelles tendances en microbiologie anaérobie*, Societe Francaise de Microbiologie, Paris. pp. 410-413.
- Eckburg PB, Lepp PW, Relman DA (2003). Archaea and their potential role in human disease. *Infect Immun* 71: 591-596.
- Favier CF, Vaughan EE, De Vos WM, Akkermans AD (2002). Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol* 68: 219-226.
- Franks AH, Harmsen HJ, Raangs GC *et al.* (1998). Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 64: 3336-3345.
- Gibson GR, Macfarlane S, Macfarlane GT (1993). Metabolic interactions involving sulphate-reducing and methanogenic bacteria in the human large intestine. *FEMS Microbiol Ecol* 12: 117-125.
- Goldman P (1980). Drug therapy: Metronidazole. *N Engl J Med* 303: 1212-1218.
- Goldman P (1982). Will there be a next generation of sulfasalazine? *Gastroenterology* 83: 1138-1141.
- Hambly RJ, Rumney CJ, Cunningham M (1997). Influence of diets containing high and low risk factors for colon cancer on early stages of carcinogenesis in human flora-associated (HFA) rats. *Carcinogenesis* 18:1535-1539.
- Harris BE, Manning BW, Federle TW, Diasio RB (1986). Conversion of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil by human intestinal microbiota. *Antimicrobiol Agents Chem* 29: 44-48.
- Heavey PM, Rowland IR (2004). Gastrointestinal cancer. Best practice and research clinical *Gastroenterology* 18: 323-336.
- Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis J (1998). Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* 41: 85-101.
- Hopkins MJ, Sharp R, Macfarlane GT (2001). Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles. *Gut* 48: 198-205.
- Husni RN, Gordon SM, Washington JA *et al.* (1997). Lactobacillus bacteremia and endocarditis: review of 45 cases. *Clin Inf Diseases* 25: 1048-1055.
- Kassie F, Rabot S, Kundi M, Chabicovsky M, Qin H, Knasmüller S (2001). Intestinal microbiota plays a crucial role in the genotoxicity of the cooked food mutagen 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f] quinoline (IQ). *Carcinogenesis* 22: 1721-1725.
- Knasmüller S, Steinkellner H, Hirschl AM *et al.* (2001). Impact of bacteria in dairy products and of the intestinal microbiota on the genotoxic and carcinogenic effects of heterocyclic aromatic amines. *Mutat Res* 480-481: 129-138.
- Koch RL, Chrystal EJT, Beaulieu BB (1979). *Acetamide*: a metabolite of metronidazole metabolism and bactericidal activity. *Antimicrobiol Agents Chemother* 18: 566-573.
- Levy J (2000). The effects of antibiotic use on gastrointestinal function. *American J Gastroenterol* 95: 8-10.
- Macfarlane GT, Cummings JH, Allison C (1986). Protein degradation by human intestinal bacteria. *J Gen Microbiol* 132: 1647-1656.
- Macfarlane GT, Gibson GR, Beatty E. *et al.* (1992). Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon. *J Appl Bacteriol* 72: 57-64.
- Manning BW, Federle TW, Cerniglia CE (1987). Use of a semicontinuous culture system as a model for determining the role of human intestinal microbiota in the metabolism of xenobiotics. *J Microbiol Methods* 6: 81-94.
- Marteau P, Pochart P, Doré J *et al.* (2001). Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. *Appl Environ Microbiol* 67: 4939-4942.
- Mikko PS (2003). Alcohol consumption and cancer of the gastrointestinal tract. *Best Practice Res Clin Gastroenterol* 17: 679-694.
- Mitsuoka T (1992). The human gastrointestinal tract. En: Wood BJ. (ed.) *The lactic acid bacteria, Volume 1, The lactic acid bacteria in health and disease*. Elsevier Applied Science. London. pp. 69-114.
- Moore WE, Holdeman LV (1974). Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl Microbiol* 27: 961-979.
- Moore WE, Moore LH (1995). Intestinal flora of populations that have a high risk of colon cancer. *Appl Environ Microbiol* 61: 3202-3207.
- Natera SH, Guerreiro N, Djordjevic MA (2000). Proteome analysis of differentially displayed pro-

- teins as a tool for the investigation of symbiosis. *Mol Plant Microbe Interact* 13: 995-1009.
- Niemeyer HB, Metzler M (2002). Oxidative metabolites and genotoxic potential of mammalian and plant lignans in vitro. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 777: 321-327.
- Onderdonk AB (1999). The intestinal microbiota and intra-abdominal sepsis. En: Tannock GW (ed.) *Medical importance of the normal microbiota*. Kluwer Academic Publishers. Great Britain. pp. 164-176.
- Pelkonen K, Hänninen O (1986). Interactions of xenobiotics with the gastrointestinal flora. En: Rozman K, Hänninen (eds.). *Gastrointestinal toxicology*. Elsevier. Amsterdam, pp. 193-212.
- Pitcher MCL, Cummings JH (1996). Hydrogen sulphide: a bacterial toxin in ulcerative colitis? *Gut* 39: 1-4.
- Rafter J, Branting C (1991). Bile acids-interaction with the intestinal mucosa. *Eur J Cancer Prev* 1: 49-54.
- Reddy BS, Narisawa T, Maronpot R (1975). Animal models for the study of dietary factors and cancer of the large bowel. *Cancer Research* 35: 3421-3426.
- Roediger WEW, Duncan A, Kapaniris O, Millard S (1993). Reducing sulfur compounds of the colon impair colonocyte nutrition: implications for ulcerative colitis. *Gastroenterology* 104: 802-809.
- Roland N, Nugon-Baudon L, Rabot S (1993). Interactions between the intestinal flora and xenobiotic metabolizing enzymes and their health consequences. *World Rev Nutr Diet*. 74: 123-148.
- Rowland IR (1988). Interactions of the gut microbiota and the host in toxicology. *Toxicol Pathol* 16: 147-153.
- Rumney CJ, Rowland IR, Coutts TM (1993). Effects of risk-associated human dietary macrocomponents on processes related to carcinogenesis in human flora associated (HFA) rats. *Carcinogenesis* 14: 79-84.
- Saarela M, Lahteenmaki L, Crittenden R *et al.* (2002). Gut bacteria and health foods-the European perspective. *Int J Food Microbiol* 78: 99-117.
- Sanz P (1995). Los polimorfismos genéticos como causa de la variabilidad individual de la toxicidad. En: Repetto M (ed.). *Toxicología avanzada*. Ed. Díaz de Santos. Madrid. pp. 87-116.
- Savage DC (1977). Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol* 31: 107-133.
- Savage DC (1986). Gastrointestinal microbiota in mammalian nutrition. *Annu Rev Nutr* 6: 155-178.
- Sghir A, Doré J, Mackie RI (1999). Molecular diversity and phylogeny of human colonic bacteria. En: Bell CR, Brylinsky M, Johnson-Green P (eds.). *Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology*. Halifax, Canada.
- Sghir A, Gramet G, Suau A *et al.* (2000). Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Appl Environ Microbiol* 66: 2263-2266.
- Simon GL, Gorbach SL (1982). Intestinal microbiota. *Med Clin North Am* 66: 557-574.
- Suau A, Bonnet R, Sutren M *et al.* (1999). Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol* 65: 4799-4807.
- Sullivan A, Edlund C, Nord CE (2001). Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microbiota. *Lancet Infect Dis* 1: 101-114.
- Takeo S, Sakai T (1991). Involvement of the intestinal microbiota in nitrazepam-induced teratogenicity in rats and its relationship to nitroreduction. *Teratology* 44: 209-214.
- Tannock GW (2001). Molecular assessment of intestinal microbiota. *Am J Clin Nutr* 73: 410S-414S.
- Van Munster IP, Nagengast FM (1991). The influence of dietary fibre on bile acid metabolism. *Eur J Cancer Prev* 1: 35-44.
- Venturi M, Hambly RJ, Ginghammar B (1997). Genotoxic activity in human faecal water and the role of bile acids: a study using the alkaline comet assay. *Carcinogenesis* 18: 2353-2359.
- Weisburger JH, Grantham PH, Horton RE (1970). Metabolism of the carcinogen N-hydroxy-N-2-fluorenyl-acetamide in germ-free rats. *Biochem Pharmacol* 19: 151-162.
- Welling GW, Elfferich P, Raangs GC *et al.* (1997). 16S ribosomal RNA-targeted oligonucleotide probes for monitoring of intestinal tract bacteria. *Scand J Gastroenterol Suppl* 222: 17-19.
- Wolin MG (1994). Control of short chain volatile acid production in the colon. En: Binder JH,

- Cumming J, Soergel K. *Short chain fatty acids/ Falk Symposium*. Kluwer Academic Publishers. Boston. pp. 30-40.
- Wolin MJ, Miller TL (1994). CO₂ acetogenesis in the human colonic ecosystem. En: Drake H. A. (ed.) *Acetogenesis*. Chapman and Hall. New York.
- Xu J, Chiang HC, Bjursell MK *et al.* (2004). Message from a human gut symbiont: sensitivity is a prerequisite for sharing. *Trends Microbiol* 12: 21-28.
- Zoetendal EE, Akkermans ADL, Akkermans-van Vliet WM *et al.* (2001). The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. *Microbial Ecol Health Dis* 13: 129-134.
- Zoetendal EG, von Wright A, Vilpponen-Salmela T *et al.* (2002). Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Appl Environ Microbiol* 68: 3401-3407.

BIODISPONIBILIDAD DE SUSTANCIAS TÓXICAS EN LOS ALIMENTOS

Amparo Alegría, Reyes Barberá, M.^a Jesús Lagarda, Rosaura Farré

Introducción. Biodisponibilidad. Minerales. Conclusiones. Bibliografía.

Introducción

Los alimentos pueden ser fuente de tóxicos, intrínsecos o contaminantes. En la mayoría de los casos, los alimentos actúan como vehículos de los tóxicos, que a menudo son contaminantes presentes en el medio ambiente o resultado de los procesos de elaboración de los mismos.

La vía dietética es la principal vía de exposición a tóxicos/contaminantes para todas aquellas personas que no están expuestas a los mismos como consecuencia de su actividad laboral. La importancia de dicha vía depende de la cantidad total de tóxico ingerido y de la proporción del mismo disponible para el organismo, a esta última se le da el nombre de biodisponibilidad (BD), que depende de la fuente dietética de procedencia y del proceso de elaboración aplicado al alimento (Wienk *et al.*, 1999; van het Hof *et al.*, 2000). Según sea su BD, la ingesta de un tóxico componente intrínseco o contaminante de un alimento puede provocar efectos tóxicos, mientras que la misma cantidad de tóxico procedente de otro alimento es posible que no cause efecto

alguno. Por tanto, la estimación del riesgo para la salud derivado de la presencia de un tóxico (intrínseco o contaminante) en el alimento implica conocer su BD, que depende de la forma o especie química del compuesto en el alimento y de la presencia de otros componentes de la matriz, que pueden ejercer efectos sobre su BD.

En resumen, la presencia de un tóxico en un alimento, inclusive cuando su concentración es alta, no es indicadora en sí misma de los efectos adversos que potencialmente puede provocar, pues estos dependerán en parte de su BD.

Biodisponibilidad (Baker *et al.* 2003; Caussy *et al.* 2003)

La BD de un compuesto que llega al organismo por vía oral puede considerarse resultado de los siguientes procesos:

1. Liberación, en el tracto gastrointestinal, del compuesto de la matriz en que se encuentra.

2. Transporte a través del epitelio intestinal (transporte intestinal-absorción).
3. Metabolización en la mucosa intestinal y en el hígado (metabolismo).

El primer requisito que debe de cumplir un compuesto para ser biodisponible es que se libere de la matriz alimentaria. Para ser absorbido necesita además ser soluble en el tracto gastrointestinal. A la fracción soluble se la califica de bioaccesible.

La BD propiamente dicha es la fracción de compuesto ingerido que llega a la circulación sistémica y se encuentra disponible para ejercer su acción y efecto en el organismo receptor.

Los componentes tóxicos de los alimentos sobre los que se han realizado estudios de BD son los contaminantes y entre ellos, los minerales, probablemente porque son también los nutrientes cuya BD ha sido objeto de mayor atención. Son, asimismo, numerosos los estudios relativos a la disponibilidad desde los suelos y las aguas de los minerales implicados en la contaminación trófica. Por todo ello este capítulo de BD de tóxicos en los alimentos se dedica a los minerales y en especial a los metales pesados.

Minerales

En numerosos estudios de toxicidad de metales pesados se comprueba la falta de correlación entre la exposición a un determinado elemento y el riesgo para la salud, lo que se atribuye en gran parte a la BD del elemento. Por ello, para evaluar el riesgo derivado de la exposición a un determinado elemento es imprescindible conocer cuál es la fracción del mismo, que se encuentra en forma potencial o realmente disponible, para ser captada por el organismo y por consiguiente capaz de ejercer efectos adversos (Baker *et al.*, 2003).

En la Tabla 4.1, que incluye elementos esenciales como hierro o cobre y cromo, junto a elementos tóxicos como arsénico, cadmio, mercurio y plomo, se indica la importancia relativa de

Tabla 4.1. Importancia relativa de la exposición, a través del agua o vía dietética, a minerales (adaptado de Caussy *et al.* 2003).

	Agua	Biota/alimentos
As	Muy importante	Importante
Hg	Muy importante Metilación en los sedimentos	Muy importante MeHg biomagnificación en pescado
Fe	Importante Óxido en tuberías	Importancia escasa
Sn	Importancia escasa	Importancia escasa Pesticidas orgánicos TBT (tributil-Sn) en pescado
Pb	Importante Tuberías y soldaduras	Importancia media Cerámica esmaltada y vidrio/ cristal Pimentón Trigo (El Cairo)
Cr	Importancia escasa	Importancia escasa

la exposición a elementos minerales vía dietética o a través del agua (adaptado de Caussy *et al.*, 2003). En la mayoría de los casos el principal riesgo de la exposición va ligado a la exposición laboral o medio ambiental, aunque en otros, como el As, los principales episodios de intoxicación han sido provocados por su presencia en el agua.

Factores que influyen en la BD y toxicidad de los minerales

En los elementos minerales se diferencia entre bioaccesibilidad (BA), también llamada BD externa, y la BD interna. La BA depende en gran medida de la capacidad de los minerales de ser solubilizados y liberados al medio (aguas, suelos y alimentos). Mientras que la BD (BD interna) indica la capacidad de los minerales para ser absorbidos y alcanzar el órgano diana, donde ejercen sus efectos beneficiosos o tóxicos.

Una vez se ha liberado el elemento del alimento que lo contiene en el tracto gastrointestinal, solo se absorbe una fracción del mismo, eliminándose el resto por las heces. La cantidad absorbida depende, en parte, de la capacidad intrínseca de absorción del órgano, y en parte de factores externos, principalmente dietéticos. En la Figura 4.1 se muestran los factores que pue-

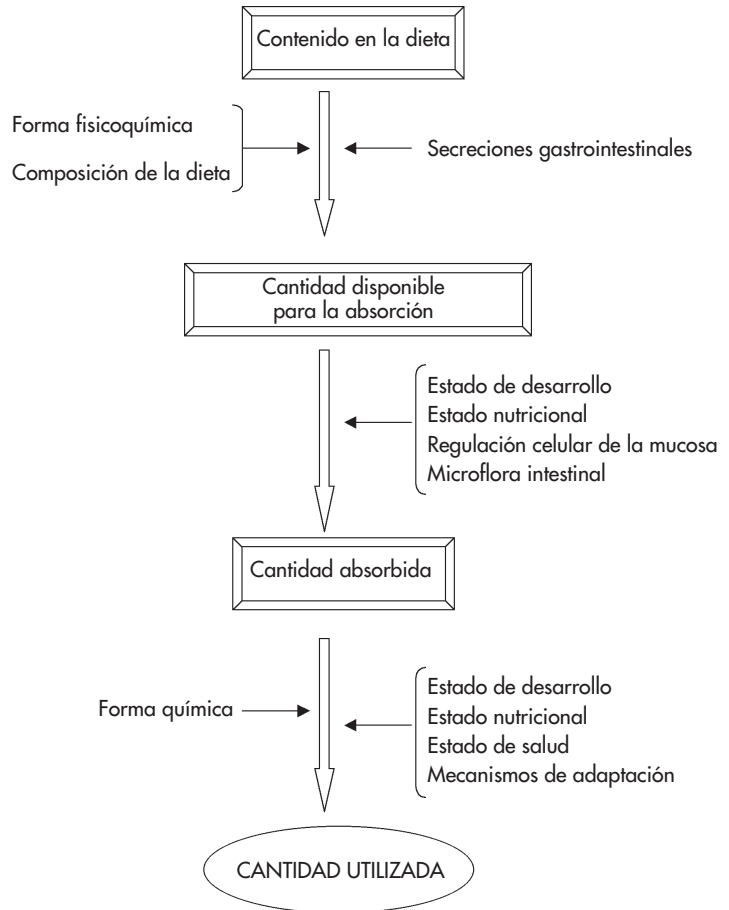


Figura 4.1. Importancia relativa de la exposición, a través del agua o vía dietética, a minerales (adaptado de Caussy *et al.* 2003).

den influir en la BD. El porcentaje de absorción varía en función del propio elemento, su forma química (estado de oxidación, compuestos orgánicos o inorgánicos) y de la presencia de otros componentes en el tracto gastrointestinal que pueden afectar a su solubilidad. Así, por ejemplo, el Hg en forma elemental se absorbe en menos de un 1%, mientras que en forma de metil mercurio (MeHg) la absorción es próxima al 100%.

La especie química en que el elemento se encuentra en el alimento es un importante factor en la BD y toxicidad de los minerales, que si bien se sabe desde hace décadas, solo desde hace relativamente pocos años se dispone de técnicas adecuadas para la especiación mineral. El conocimiento de las especies químicas presentes

en los alimentos permite estimar la forma en que los factores abióticos (dureza, pH, temperatura y estado de oxidación) y bióticos (metilación bacteriana, biomagnificación en la cadena alimentaria) pueden afectar a los cambios entre formas químicas y a la captación de las distintas especies minerales.

El estado nutricional del receptor y otros componentes de la dieta, en especial los aniones y los cationes, también tienen un papel en la absorción mineral. Son frecuentes las interacciones entre elementos, al competir los cationes por los mismos transportadores. Así por ejemplo, ingestas dietéticas adecuadas de Fe y Zn inhiben la absorción de Cd.

A continuación se describen aspectos relativos a la toxicidad, presencia en los alimentos y

BD de algunos elementos que pueden estar presentes en los alimentos y en ocasiones provocar efectos tóxicos.

1. Aluminio (Al)

El Al puede provocar intoxicaciones: a) crónicas, por ingestas dietéticas de Al (consecuencia de una contaminación ambiental continuada) que exceden la capacidad de adaptación del organismo humano; b) agudas, de origen iatrogénico, en pacientes tratados con dosis altas de medicamentos (antiácidos o antidiarreicos) que lo contienen (Berthon, 2002).

La asociación, estadísticamente significativa observada entre la ingesta de agua con bajos y relativamente bajos contenidos de sílice y Al, respectivamente, y la demencia senil tipo Alzheimer (intoxicación crónica) es objeto de especial interés. Se ha señalado la posibilidad de que el Al actúe como inductor ambiental del Alzheimer al detectarse pequeñas cantidades de Al, probablemente acumuladas a lo largo de décadas, en cerebros de personas que padecían dicha enfermedad (Gauthier *et al.*, 2000).

Biodisponibilidad

La absorción media del Al es baja (1%), aunque la variabilidad es alta (0,001 - 24%), y disminuye al aumentar la exposición. Pero, la baja absorción del Al no es garantía absoluta de seguridad en exposiciones a largo plazo. En enfermos de Alzheimer (Taylor *et al.*, 1992) y en personas con síndrome de Down (Moore *et al.*, 1997) se ha señalado un incremento significativo en la absorción de Al.

Los componentes de los alimentos forman complejos o precipitan, rápidamente, al Al del agua de bebida, por lo que, excepto cuando la capacidad de fijación se satura, queda muy poco Al(III) libre, pero su BD es muy alta al facilitar su elevada hidratación el paso a través del epitelio intestinal vía paracelular. El Al puede también utilizar las vías usadas por los elementos esenciales a los que sustituye o con los que se combina.

Se creía que el Al no era disponible, pues a pesar de disolverse por acción del HCl gástrico, precipitaba al llegar al duodeno, pero se comprobó que al igual que los elementos esenciales, que precipitan a pH neutro y se absorben gracias a las interacciones con ligandos del fluido intestinal, el Al puede unirse a los mismos, permanecer soluble durante el tránsito intestinal y absorberse en todos los tramos del mismo (duodeno, yeyuno e íleon) (Powell y Thompson, 1993). En pacientes tratados con Al(OH)₃ la acidez de la parte superior del tracto intestinal libera Al(III) iónico soluble y favorece la absorción del Al (Kaehny *et al.*, 1997). En presencia de citrato, que forma un complejo neutro con el Al en el intervalo de pH de 1 a 4, predomina el papel ligante del ácido cítrico, y las máximas concentraciones séricas de Al, alcanzadas a las 4 h de su administración, indican su absorción en intestino delgado (Weberg y Berstad, 1986). El citrato actúa, principalmente, en el intestino delgado proximal formando complejos con los iones endógenos de Ca (II) libre, que cubren las membranas basolaterales de las células intestinales, facilitando la absorción paracelular del Al (III) (Froment *et al.*, 1989). Por lo que, el citrato componente habitual de la dieta aumenta la permeabilidad de la mucosa proximal al Al favoreciendo su absorción (Whitehead *et al.*, 1997). Otros ácidos orgánicos, componentes usuales de la dieta como ascorbato, gluconato, lactato, malato, oxalato, succinato y tartrato, mantienen soluble el Al a valores de pH próximos a 8 y facilitan su absorción (Partridge *et al.*, 1989). Por el contrario, los fosfatos y la sílice (oligómeros solubles), forman compuestos poco solubles con el Al e impiden su absorción (Juddaohsingh *et al.*, 2000).

La fracción de Al que llega a la circulación sistémica y no se elimina por orina, principal vía de excreción, se acumula rápidamente en tejidos a los que se fija fuertemente. De ahí que la concentración plasmática de Al solo refleje una exposición reciente y no sea un buen indicador del contenido corporal de Al (Boyce *et al.*, 1987).

El Al puede llegar al cerebro, al igual que el Fe, por un mecanismo dependiente de la trans-

ferrina y alterar la función de la barrera hematocefálica. En las células del cerebro hay receptores con una elevada afinidad por la transferrina, sea cual sea el elemento que esta transporte. Así el Al puede interferir en la homeostasis del Fe y alterar los procesos celulares que dependen del mismo en el sistema nervioso central. En el cerebro de fallecidos que padecían la enfermedad de Alzheimer se han encontrado contenidos de Al en la ferritina, seis veces mayores a los del grupo control (Berthon, 1996).

Fuentes e ingesta dietética

La BD relativa del Al de los alimentos y bebidas es muy variable, al igual que las ingestas de los adultos (Delves *et al.*, 1993). La absorción del Al dietético se estima del 0,15%, aunque depende, según ya se ha señalado, de la presencia de otros componentes de la dieta.

La ingesta dietética media de Al se estima en unos pocos mg/día: 3,1 en los Países Bajos, 3,4 en el Reino Unido, 3,5 en Japón y entre 7 y 9 en los EE UU. El mayor valor de los EE UU se atribuye a los aditivos alimentarios (Flaten, 2002).

El té es uno de los escasos vegetales que acumulan Al; su contenido en las infusiones oscila entre 1 y 6 mg/L. En su mayor parte, el Al se encuentra unido a compuestos orgánicos, probablemente a polifenoles, pues el peso molecular está comprendido entre 4.000 y 8.500 Da, aunque se han detectado compuestos de mayor tamaño (> 10.000 Da). No parece que la BD del Al del té sea superior a la del procedente de otros componentes de la dieta (Flaten, 2002).

Debido a su estabilidad frente a la hidrólisis y tratarse, al parecer, de un neurotóxico poco frecuente, merece especial atención el maltolato de Al (Corain *et al.*, 1996). Se ha identificado maltol en el té verde, que puede contener otros complejos orgánicos de Al con propiedades similares al maltolato, y suficientemente estables para ser absorbidos y acumularse en el cerebro y el tejido óseo (van Ginkel, 1993).

La contribución de la cerveza a la ingesta de Al se ha estimado en 0,07 mg de Al/día, frente a los 0,2 mg/día que proporcionaría el agua de

bebida, de lo que se desprende que en relación al Al, el consumo de cerveza no conlleva para sus consumidores un riesgo mayor que el de agua potable (Sharpe y Williams, 1995).

La cesión de Al por los utensilios de cocina ha sido motivo de preocupación, estimándose la BD del Al de las cafeteras en un 60% (Erba *et al.*, 1995).

2. Arsénico (As)

Los alimentos pueden contener As en forma inorgánica (As-i) u orgánica (As-o). Los compuestos inorgánicos de As, As (III) y As(V), se absorben más y son más tóxicos que los compuestos organoarsenicales. El As-i puede bioacumularse en los organismos marinos, donde se biotransforma a arsenobetaína.

Las principales vías de exposición al As para los seres humanos son el aire, el agua, los alimentos y el suelo.

La Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) incluye al As-i en el grupo de compuestos carcinogénicos para el ser humano (Tsuda *et al.*, 1992). Por su parte, la OMS a partir de los contenidos de As-i del agua de bebida, establece una ingesta semanal tolerable provisional de 15 µg/semana/kg peso corporal (WHO 1989).

Los productos de origen marino, pescados, moluscos y crustáceos y algas comestibles son los alimentos más ricos en As. Su ingesta depende, en gran parte, de la presencia de alimentos de origen marino en la dieta, que pueden contener As-i (As III y V), y As-o, en forma de arsenobetaina (AB), especies metiladas (monometil-MMA, dimetil- DMA, trimetil-amina TMA), arsenocolina (AC), ión tetrametilarsenioso (TMA⁺), arsenozúcares y arsenolípidos, siendo baja la toxicidad de estos últimos (Suñer *et al.*, 2002).

Biodisponibilidad

La BD del As dietético depende, al igual que la de otros elementos, del tipo de matriz donde se encuentra (el As del suelo es mucho menos bio-

disponible que el del agua), la especie química presente, estado de oxidación, reactividad, solubilidad, capacidad para formar complejos organometálicos e interacción con factores individuales.

La matriz influye en gran medida en la BD del As, se dispone de más información acerca de la BD del As-i del agua y otras matrices medio ambientales, que sobre el As procedente de los alimentos. Encuestas alimentarias realizadas en los EE UU indican que en la dieta del 21 al 40% del As es As-i (Yost *et al.*, 1998); siendo las principales fuentes el arroz crudo, el zumo de uva y las espinacas cocidas (Schoof *et al.*, 1999). Los cultivos vegetales pueden acumular As, por captación a través de la raíz o por deposición aérea en las hojas del vegetal, pero no se dispone de información sobre su BD (Caussy, 2003).

Tras su absorción los compuestos de As son metilados a formas menos tóxicas, tales como MMA y DMA, que se excretan por orina (Tice *et al.*, 1997).

La etapa clave en el control de la absorción oral de As sería su disolución al pH ácido del estómago (Oomen *et al.*, 2002). En estudios in vitro se pone de manifiesto la influencia del pH gastrointestinal en la bioaccesibilidad del As, este es entre un 10 y un 30% más soluble al pH gástrico que al intestinal. Las especies solubles de As-i se absorben rápidamente en el tracto gastrointestinal del ser humano y de la mayoría de los animales de laboratorio, y puesto que se absorbe la mayor parte del As ingerido, los contenidos de As en orina serán buenos indicadores de su absorción por vía oral (Ruby *et al.*, 1999).

En relación a la BD del As de los alimentos, se ha estimado, mediante ensayos in vitro, la BD del As de algas comestibles (*Enteromorpha* sp., *Porphyra* sp. e *Hizikia fusiforme*), con contenidos de As que oscilan entre 2,9 y 99,4 $\mu\text{g As/g}$, correspondiendo el mayor valor a *H. Fusiforme*. El 50% del As de esta última es inorgánico, superando los máximos permitidos para este tipo de productos en Australia y Nueva Zelanda (1 $\mu\text{g/g}$) y también en Francia y los EE UU (3 $\mu\text{g/g}$). La ingesta de solo 3 g de algas al día, proporcionaría una cantidad de As-i similar a la

ingesta semanal tolerable provisional (15 $\mu\text{g As-i/día/kg}$ peso corporal). En las algas el porcentaje de As-i con respecto al total (55%) es muy superior al del resto de alimentos de origen marino (máximo 11% de As-i) y similar al de los vegetales en los que prácticamente todo el As es inorgánico. El tratamiento térmico durante la cocción reduce el contenido de As (As-i y As-total) de las algas, que a pesar de ello superan los máximos legales antes mencionados. La BA del As-total y del As-i de las tres algas estudiadas es alta (> 60%) (Laparra *et al.*, 2003).

La presencia de otros elementos afecta a la BD del As, así la ingesta de Zn aumenta la concentración de metalotioneínas que favorecen la detoxificación del As. Una elevada ingesta de As en relación a la de Se, favorece la competencia entre ambos elementos, de manera que el As sustituye al Se en las enzimas Se-dependientes, como por ejemplo la *glutathion-peroxidasa*, y la inactiva, por lo que la deficiencia de Se aumenta la toxicidad del As (Roychowdhury *et al.*, 2003).

El estado nutricional también influye en el riesgo de exposición al As. Diversos estudios indican que los aportes de vitamina C y de metionina reducen la toxicidad del As, y la deficiencia de vitamina A la incrementa. Dietas ricas en proteínas o hidratos de carbono o incluso ricas en grasa aumentan el efecto tóxico (Roychowdhury *et al.*, 2003).

Contenido en los alimentos e ingesta dietética

La información disponible sobre contenidos de As en los alimentos y las especies presentes es relativamente escasa. Según ya se ha indicado, los alimentos de origen marino constituyen la principal fuente dietética de As, elemento que se encuentra en distintas formas químicas que difieren en su toxicidad. Por otra parte, las especies químicas de As presentes varían en función de la especie animal considerada. Así por ejemplo, el pescado blanco es más rico en As que el azul, pero este tiene un mayor contenido de As-i, lo que se atribuye a la mayor riqueza en el pescado azul de aminas biógenas y otras aminas (análo-

gas de las especies organoarsenicales), que desviarían al As-i de la destoxicación por metilación, favoreciendo la acumulación de este (Muñoz *et al.*, 2000). Los crustáceos y moluscos son más ricos en As-i que los pescados (blanco y azul), y los menores contenidos de As-t y As-i corresponden a las conservas o salazones de pescado.

La arsenobetaina es el compuesto organoarsenical mayoritario de los productos de la pesca. En el pescado blanco representa más del 70% del As, le sigue la DMA (\cong 23% As) y un menor porcentaje (< 4% As-t) del resto de especies arsenicales (AC, MMA y TMA⁺) (Suñer *et al.*, 2002).

Las algas marinas son componentes tradicionales de la dieta de los países asiáticos, mientras que en los países occidentales se utilizan mayoritariamente como ingredientes por la industria alimentaria, aunque en los últimos años se ha incrementado el consumo de ciertas algas por su contenido en fibra, minerales y proteínas, junto a un bajo contenido lipídico (Mabeau y Florence, 1993), aunque según ya se ha mencionado, las algas pueden contribuir al aporte de As, con un elevado porcentaje de As-i (Laparra *et al.*, 2003).

En condiciones normales, los alimentos de origen marino constituyen la principal fuente dietética de As, pero los cereales y otros vegetales procedentes de áreas contaminadas por As, pueden contribuir de forma significativa a su aporte dietético. Como sucede en la región preandina de Chile, donde debido a la riqueza en As de sus suelos y acuíferos, los contenidos de As de los vegetales allí cultivados son altos. Dicho As es mayoritariamente As-i, lo que indica una baja tasa de metilación del As-i procedente del suelo, a diferencia de lo que ocurre en los alimentos de origen marino, en los que predominan las especies organoarsenicales. La presencia de As-i en los vegetales es motivo de preocupación en poblaciones con dietas ricas en ellos y que además puede que utilicen aguas contaminadas para cocinar (Muñoz *et al.*, 2002).

En un estudio realizado en los EE UU se pone de manifiesto que los cereales, y en con-

creto el arroz (73,7 ng As-i/g) son una buena fuente de As (Schoff *et al.*, 1999). Ello tiene especial importancia en los países cuyo alimento básico es el arroz y este procede de zonas de cultivo contaminadas por As, como ocurre por ejemplo, en áreas de la India, donde se han detectado contenidos medios de 123 ng As/g arroz) (Das *et al.*, 2004). A ello debe sumarse el As del agua utilizada en su cocción de manera que el arroz listo para su consumo puede alcanzar los 300 ng de As/g arroz, valores hallados en arroz procedente de Bangladesh, y muy superiores a los determinados en el Japón (40 ng/g) (Bae *et al.*, 2002).

En España, la ingesta dietética de As del País Vasco (1990-1995) se estimó en 297 μ g/día (Jalón *et al.*, 1997), valor alto que se atribuye al consumo de pescado, y del mismo orden que el estimado en Japón (280 μ g/día), en cuya dieta también es abundante el pescado (Tsuda *et al.*, 1995).

En los países en cuya dieta el pescado tiene escasa contribución las ingestas estimadas de As son mucho menores. Así, se señalan valores de 16,7-II-48,5 μ g en Canadá, 7-62 μ g en los EE UU, 89 μ g en Inglaterra, 12 μ g en Bélgica, 27 μ g en Australia, 55 μ g en Nueva Zelanda (Roychowdhury *et al.*, 2003). Mientras que los valores obtenidos en una zona contaminada por As (Bengala Occidental, India) y con una dieta a base de arroz con vegetales son mucho más altos, 600-880 y 351-432 μ g de As/ día, en adultos y niños, respectivamente. En este caso el As procede del agua utilizada para beber y cocinar (70% del total de As), y del arroz (90% del As aportado por los alimentos) (Roychowdhury *et al.*, 2002, 2003). Valores similares se han señalado en Deganga Block, también de Bengala Occidental (Chowdhury *et al.*, 2001) cuyos suelos y aguas son también ricos en As, del que más del 50% es inorgánico, lo que implica un elevado riesgo.

3. Cadmio (Cd)

La relación establecida en Japón en los años 70, entre la enfermedad itai-itai y una ingesta eleva-

da de Cd procedente del arroz y del agua de bebida despertó el interés por dicho elemento. El síndrome se caracteriza por lesiones en el túbulo renal proximal, pérdida mineral de la masa ósea con fracturas múltiples, enteropatía y anemia. Resultaron afectadas mujeres japonesas posmenopáusicas multíparas, que durante el periodo de exposición al Cd tuvieron bajas ingestas de calcio, hierro, proteínas, grasa y vitamina D (McLaughlin *et al.*, 1999).

En los tejidos el Cd está unido a la metalotioneína, proteína de bajo peso molecular, situada en la fracción subcelular y cuya síntesis es inducida por el elemento. El Cd tiene una vida media excepcionalmente larga (10-30 años en el riñón humano) y cuando su concentración en el cortex renal llega a 200 mg/kg, provoca lesiones tubulares con importantes pérdidas de Cd por orina, que van acompañadas de calcio, glucosa, aminoácidos y proteínas de pequeño tamaño. A largo plazo, ingestas dietéticas medias de Cd de 0,200 mg/día pueden dar lugar a concentraciones críticas en el cortex renal. Se carece de pruebas de la existencia de un mecanismo homeostático que limite la absorción de Cd cuando las ingestas son altas. (Spivey Fox, 1988).

El comité de expertos de aditivos alimentarios de la FAO/OMS (2003) mantiene la ingesta semanal tolerable provisional (PTWI) establecida para el Cd en 7 µg por kg de peso corporal (JECFA, 2003).

Presencia y especies químicas en los alimentos

Al igual que en el resto de elementos minerales, esenciales o tóxicos, la dietética es la principal vía de exposición para la población no expuesta profesionalmente, y puede proporcionar un 70% del Cd que llega al organismo (Groten *et al.*, 1994).

Los contenidos de Cd en el agua son muy bajos, por lo que su contribución a la ingesta dietética diaria es escasa (Groten *et al.*, 1994). Los alimentos más ricos en Cd son las vísceras (riñón, hígado), así como los mariscos y crus-

táceos (ostras, mejillones, cangrejos), y algunas especies de setas, con contenidos del orden de mg/kg. A pesar de sus bajos contenidos de Cd, los alimentos de origen vegetal constituyen, por su elevado consumo, una de las principales fuentes dietéticas de Cd (Spivey Fox, 1988, Groten *et al.*, 1994, McLaughlin *et al.*, 1999).

En las áreas contaminadas los contenidos de Cd de los cereales y las carnes pueden ser muy superiores a los usuales y provocar intoxicaciones como la mencionada enfermedad itai-itai (Groten *et al.*, 1994).

En los tejidos animales, la mayor parte del Cd está ligado a la denominada Zn-tioneína o metalotioneína, proteína de bajo peso molecular (6.000 a 7.000), rica en cisteína (30%), con un elevado contenido de metales (5-10% p/p) y cuya síntesis es inducida por distintos elementos (Spivey Fox, 1988; Jonnalagadda y Prasada Rao, 1993; Groten *et al.*, 1994).

Se sabe poco sobre la forma en que el Cd se encuentra en los vegetales. En parte, forma complejos con los ácidos orgánicos, las metalotioneínas y las denominadas fitoquelatinas, péptidos formados por unidades γ -glutamilcisteína con una carboxiglicina terminal (poly (γ -EC) Gs). Fitoquelatinas y metalotioneínas tienen estructuras distintas, pero funciones similares pues forman complejos Cd-cisteína, muy estables, inducibles por metales y por la síntesis de glutathion o de sus precursores γ -glutamilcisteína (Groten *et al.*, 1994).

En las ostras el Cd está unido a proteínas de elevado peso molecular, distintas a la metalotioneína, siendo baja su BD, si se tiene en cuenta que en fallecidos consumidores de ostras la concentración de Cd en el riñón es baja (Jonnalagadda y Prasada Rao, 1993).

Biodisponibilidad

La BD del Cd dietético depende, al igual que la de otros elementos minerales, de la forma o especie química presente en la dieta, de la composición de esta y del estado nutricional del receptor.

El Cd se absorbe poco por vía dietética (4-8%), menos que por vía respiratoria (15-40%), excepto en los niños (hasta el 37%) (Groten *et al.*, 1994; Eklund *et al.*, 2003). La mayoría de estudios de absorción y de toxicocinética se han hecho con sales inorgánicas de Cd, obteniéndose retenciones de Cd en seres humanos comprendidas entre el 3 y el 7% (Groten *et al.*, 1994).

En un estudio reciente (Eklund *et al.*, 2003) se evaluó la BA y la BD del Cd de alimentos infantiles mediante una digestión gastrointestinal en la que se simularan las condiciones del niño (mayor pH y menor concentración de enzimas digestivos que en el adulto), que provocan menor degradación de las proteínas y liberación y captación de Cd por células Caco-2. En las condiciones correspondientes a los niños se liberó mayor cantidad de Cd en la fase intestinal que en la gástrica, al revés de lo que ocurre en los adultos. La captación y el transporte de Cd por las células Caco-2 indica diferencias estadísticamente significativas entre los distintos alimentos. Y no se encontró correlación alguna entre la solubilidad (BA) y la BD del Cd estimada mediante la captación por células Caco-2.

El Cd se transporta, mayoritariamente, vía plasmática unido a albúmina y metalotioneína (CdMT). A corto plazo se almacena en hígado y riñón (en especial en la zona cortical), órganos que contienen alrededor del 40-80% del Cd corporal. En el ser humano los máximos contenidos renales de Cd se alcanzan a los 40-50 años, siendo los del cortex renal de 10 a 30 veces superiores a los del hígado, cuyo contenido de Cd disminuye a partir de los 30 años. El riñón es el órgano más afectado por exposiciones dietéticas prolongadas al Cd, se acumula más Cd cuando esta en forma de CdMT que cuando se trata de sales inorgánicas. Las enzimas proteolíticas no modifican a la CdMT ni a sus fragmentos presentes en la dieta, pueden atravesar la mucosa intestinal y mostrar la misma capacidad, que el Cd administrado vía intravenosa, para acumularse en el riñón (Groten *et al.*, 1994).

Cuando las exposiciones al Cd son altas (>10 mg/kg) se detectan diferencias en el metabolis-

mo, entre el Cd orgánico y el inorgánico, que dependen de la dosis, pero cuando la ingesta es baja, el Cd se libera del complejo CdMT, se absorbe en la mucosa intestinal y sigue la misma ruta que el inorgánico (Groten *et al.*, 1994).

Tras exposiciones orales prolongadas, no se observan diferencias entre la nefrotoxicidad provocada por Cd inorgánico y por CdMT, lo que sumado a un metabolismo prácticamente similar, indica que la CdMT dietética y el CdCl₂ administrado por vía oral o intravenosa, tendrán una toxicidad similar, por lo que los valores obtenidos en la exposición de roedores a bajas dosis de CdCl₂ serán aplicables a la estimación del riesgo derivado de la ingesta de CdMT (Groten *et al.*, 1994).

En los alimentos de origen vegetal se desconoce hasta qué punto el metabolismo de las Cd-fitoquelatinas es similar al de la CdMT (Spivey Fox, 1988; Groten *et al.*, 1994).

Factores que influyen en la BD (Spivey Fox, 1988; Jonnalagadda y Prasafa Rao, 1993; Groten *et al.*, 1994, McLaughlin *et al.*, 1999). Las diferencias en la absorción de Cd, de humanos y roedores se atribuyen principalmente a diferencias en la composición de la dieta.

A pesar de que los estudios relativos al efecto de los nutrientes en la absorción y metabolismo de ingestas bajas de Cd, similares a las habituales, son escasos, se considera que aportes nutricionales deficitarios y superiores a los requerimientos potenciarían y ejercerían un efecto protector, respectivamente, sobre los efectos adversos del Cd. Son varios los elementos (Ca, P, Mn, Mg, Fe, Zn, Cu, Se) que en las últimas décadas se ha señalado interfieren en el metabolismo del Cd. Este competiría con Ca, Fe y Zn por transportadores específicos. Así, dietas deficitarias en Ca aumentan la retención de Cd, hecho de especial importancia por el posible papel del Cd en el desarrollo de la osteomalacia, característica de la intoxicación por Cd (enfermedad itai-itai).

Cd y Zn son antagonistas mutuos, la absorción de Cd aumenta cuando el aporte dietético de Zn es bajo. Y el contenido de este en el cortex renal aumenta con la concentración de Cd, lo que

puede explicarse por un incremento en la síntesis de metalotioneína que fija ambos metales.

La absorción de Cd es mayor (24%) y más rápida en los seres humanos con deficiencia de Fe, que en aquellos cuyo estado es satisfactorio (1%). Los suplementos dietéticos de Fe protegen frente a la acumulación e intoxicación por Cd, al disminuir la absorción del Cd inorgánico liberado de la CdMT, sin afectar al de CdMT intacta.

En la Tabla 4.2 se muestran las interacciones entre el Cd y elementos minerales esenciales (McLaughlin *et al.*, 1999).

Aportes proteicos elevados favorecen los efectos adversos asociados a la exposición al Cd al aumentar su BD (Groten *et al.*, 1994). Mientras que la fracción insoluble (lignina y celulosa) de la fibra dietética forma complejos con el Cd, estables e insolubles al pH de la digestión gástrica (Eklund *et al.*, 2003).

Un estado nutricional adecuado protege frente a los efectos adversos del Cd; se ha visto que familias japonesas cuya dieta contiene arroz rico en Cd y pobre en Zn, desarrollan el síndrome de Fanconi (proteinuria del túbulo renal proximal provocada por el Cd), mientras que consumidores de ostras contaminadas (5 mg Cd/ kg) de Nueva Zelanda no muestran dicho síndrome. La principal diferencia entre ambas poblaciones son los mayores aportes dietéticos de Ca, Fe y Zn en Nueva Zelanda (Jonnalagadda y Prasada Rao, 1993).

De lo mencionado se concluye que en la acumulación del Cd influye más la magnitud del

aporte que su forma química (orgánica o inorgánica) por lo que se aconseja evitar un consumo medio/alto de productos de origen animal o mariscos ricos en Cd.

Además, el estado nutricional y la ingesta de nutrientes a largo y corto plazo, respectivamente, pueden tener una importante influencia en la absorción y retención de Cd. Deficiencias de elementos esenciales (Ca, Fe, Zn y Cu) favorecen la absorción del Cd a las concentraciones dietéticas habituales. Cabe señalar, que algunas de las fuentes dietéticas de Cd, también lo son de uno o más de los elementos esenciales, que afectan a su absorción.

4. Mercurio (Hg)

Las propiedades físicas del Hg (líquido a temperatura ambiente y 13,5 veces más denso que el agua) hacen que sus aplicaciones industriales sean múltiples y también las emisiones a la atmósfera. El Hg es, además, uno de los contaminantes ambientales tóxicos que experimentan una mayor bioconcentración en la cadena alimentaria, constituye un motivo de preocupación para la salud pública, y muchos organismos, nacionales e internacionales, consideran necesario controlar sus emisiones (Gochfeld, 2003).

El Hg está ampliamente distribuido en los alimentos, pero su forma más tóxica el metilmercurio (MeHg) se sintetiza principalmente en los sedimentos acuáticos, a partir del Hg⁰ o de especies inorgánicas de Hg (Hg-i), que pueden ser metiladas por microorganismos, y solo se encuentra en cantidades significativas en pescados y otros alimentos de origen marino, que constituyen la principal fuente dietética de Hg (> 85% del Hg) (Caussy *et al.*, 2003).

En otros alimentos, el Hg es mayoritariamente inorgánico (Hg-i), formas químicas mucho menos tóxicas que el MeHg, cuya toxicidad para el sistema nervioso y en especial para el cerebro en desarrollo es muy alta. En un estudio de cohortes en niños de las Islas Feroe, el grado de exposición prenatal a MeHg, procedente de la carne de ballena consumida por sus madres, se correlaciona con trastornos neuro-

Tabla 4.2. Interacciones entre el Cd y elementos esenciales (McLaughlin *et al.* 1999).

Elemento	Normal ^a	Deficiencia ^b	Exceso ^c
Calcio	+	+	∅ ^d
Cobre	+	+	+
Hierro	+	+	+(Fe ²⁺)
Selenio	+	+	+
Cinc	+	+	+

^a Metabolismo y/o función del elemento afectado por el Cd

^b La deficiencia del nutriente aumenta la toxicidad del Cd

^c El exceso del nutriente disminuye la toxicidad del Cd

^d Ausencia de efecto

psicológicos (deterioro de las funciones motoras y también de las áreas del lenguaje y la memoria) (Grandjean *et al.*, 1997).

En 1960 se reconoce por primera vez al MeHg como agente causal de una intoxicación en la bahía de Minamata (Japón). Los peces de dicha bahía acumularon MeHg, procedente de los vertidos de Hg de una planta química a las aguas de la bahía. Los elevados aportes dietéticos de MeHg provocaron graves trastornos neurológicos en los adultos, pero la manifestación más dramática fue la parálisis cerebral grave, ceguera y profundo retraso mental (enfermedad congénita de Minamata) que presentaban al nacer los hijos de mujeres expuestas al MeHg, (Gochfeld, 2003).

En la actualidad se dispone de datos que indicarían un aumento del riesgo de morbilidad y mortalidad cardiovascular ligado al incremento a la exposición a MeHg (JEFCA, 2003).

Basándose en los resultados de dos estudios epidemiológicos sobre la relación entre la exposición al Hg de la mujer gestante y las alteraciones en el desarrollo neuronal de los niños, la JECFA (2003) establece una ingesta semanal tolerable provisional de MeHg de 1,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal. Por su parte, el National Research Council (NRC) de los EE UU propone una ingesta máxima de 0,7 μg de Hg/kg de peso corporal y la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de los EE UU una dosis de referencia de 0,1 μg de Hg/kg/día para el MeHg, que estima suficiente para proteger al más sensible de los órganos diana durante el desarrollo neurológico fetal.

Ingestas dietéticas y presencia en los alimentos

El Hg⁰ y el Hg-i, procedentes de las actividades antropogénicas llegan a las aguas y se depositan en los sedimentos. Parte del Hg reacciona para formar HgS insoluble, y parte es biometilado por acción de las bacterias a MeHg, forma de Hg biodisponible y cuya presencia se amplifica en la cadena alimentaria, de manera que los peces de los niveles altos de la cadena trófica tienen contenidos de Hg 10⁶ veces superiores a los del agua donde viven.

Para la mayoría de la población el pescado es la única fuente dietética significativa de exposición al MeHg (75-95% del Hg del pescado). Una ingesta alta de pescado (incluso de especies con bajos contenidos de Hg) puede provocar una acumulación de MeHg, en un grado capaz de provocar trastornos, y si se trata de mujeres embarazadas, la cesión al feto de cantidades de MeHg suficientes para provocar una alteración en el desarrollo del sistema nervioso (Gochfeld, 2003).

Las ingestas dietéticas de Hg dependerán del consumo de pescado y variarán en función del país y de su dieta. En la mayoría de países, las ingestas medias de Hg son inferiores a la ingesta semanal tolerable provisional, aunque pueden superar el máximo propuesto por los EE UU.

Es posible, que la ingesta dietética de Hg se haya sobreestimado en aquellos casos en que los contenidos de MeHg en el pescado son bajos. No obstante, en algunas poblaciones europeas es frecuente el consumo de peces grandes depredadores (por ejemplo, pez espada y atún) con elevados contenidos de MeHg. El riesgo es alto para las mujeres embarazadas, pues incluso bajos niveles de exposición al MeHg pueden provocar efectos tóxicos, lo que aconseja reducir al mínimo el consumo de pescado que pueda contenerlo. No se ha encontrado correlación alguna entre el contenido de Hg y el tamaño y peso del pescado.

Biodisponibilidad

La toxicidad del Hg depende de la especie química, que también influye en la absorción. El Hg⁰ es muy volátil y su vapor se absorbe fácilmente por vía respiratoria (50-100%) y muy poco por vía dérmica o gastrointestinal. Las sales inorgánicas de Hg (Hg I y Hg II) difieren en sus propiedades y capacidad de ser absorbidas. La mayoría de los compuestos orgánicos de Hg se absorben fácilmente vía respiratoria y gastrointestinal, la absorción es prácticamente del 100% en forma de MeHg, en cuyo caso el único factor que la afecta es la eficiencia con que el alimento se digiere. MeHg y dimetil mercurio

(DMeHg) son las especies químicas más tóxicas, a lo que debe añadirse su elevada BD y la facilidad de bioconcentración en la cadena alimentaria. En la absorción también influyen la edad, la frecuencia de las comidas y la presencia de otros componentes de la dieta (Gochfeld, 2003).

Una vez en el torrente circulatorio, el Hg se encuentra implicado en procesos complejos que incluyen uniones y reacciones redox, extra e intracelulares, así como procesos de metilación y demetilación, que en su conjunto determinan la cantidad de Hg que se intercambia entre la sangre y los distintos órganos, incluyendo el cerebro (bio-disponibilidad interna). El MeHg tiene una semivida biológica de 1,5 a 2 meses (Gochfeld, 2003).

Los resultados de distintos estudios de toxicocinética del MeHg (Carrier *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 1994; Young *et al.*, 2001), sugieren que los elevados contenidos de Hg-i en orina y su estrecha relación con el contenido de MeHg en sangre indicarían una demetilación parcial de los compuestos metilados de Hg, aumentando la concentración de Hg-i en el riñón y, por tanto, en orina. Algunos estudios relacionan ligeros cambios en las funciones de coordinación y motoras de los adultos con niveles relativamente bajos de Hg-i (Echeverría *et al.*, 1998) y Hg-o (Dolbec *et al.*, 2000; Lebel *et al.*, 1998).

En un estudio, sobre los posibles efectos neurotóxicos asociados a absorciones relativamente bajas del Hg procedente del pescado, en dos grupos de adultos, uno de ellos formado por consumidores habituales de atún (> 1 µg de Hg/g) y otro control, se obtienen contenidos de Hg en orina, mayores en el primer grupo (media, 6,5 µg/g creatinina, intervalo 1,8-21,5) que en el control (media 1,5, intervalo 0,5-5,3) y una correlación significativa entre el consumo semanal de pescado y los contenidos de Hg en sangre y en orina (Carta *et al.*, 2003).

5. Plomo (Pb)

El Pb de las partes aéreas de los vegetales procede principalmente de la contaminación de los mismos por el polvo y aerosoles de la atmósfera (McLaughlin *et al.*, 1999).

Al igual que en la mayor parte de los minerales la vía dietética es la principal de exposición del ser humano al Pb. Su absorción en el tracto gastrointestinal varía con la edad (los adultos absorben entre el 7 y el 15% del Pb de la dieta y los lactantes y niños entre el 40 y el 53%), la dieta y el estado nutricional individual, y depende de la forma química y el tamaño de partícula cuando se trata de Pb^o (<http://plomo>).

En la BD del Pb por vía oral son importantes los procesos que controlan la velocidad de disolución, ya que la BA depende de la solubilidad durante el limitado periodo de tiempo de tránsito en el tracto gastrointestinal. La relación área/volumen es mayor en las partículas de pequeño tamaño que en las grandes, y ello favorece su solubilidad, BA y BD (Ruby *et al.*, 1999).

Al pH ácido del estómago los compuestos de Pb que se forman en medio ácido (por ejemplo, sulfato de plomo) tienden a ser más estables y menos bioaccesibles, que los formados en medio alcalino (por ejemplo, carbonato u óxido de plomo) menos estables y más bioaccesibles (Ruby *et al.*, 1999).

En la revisión bibliográfica realizada solo se ha encontrado un trabajo sobre la BD del Pb de los alimentos, en concreto de vinos, en el que se indica que prácticamente todo el Pb de los digeridos gástricos de los vinos se encuentra en forma soluble y por lo tanto potencialmente asimilable, siendo muy escasa la influencia de la especie química presente. El tipo de vino influye en la solubilidad intestinal del Pb, blancos (93-94%), verdes (74-77%) y tintos (36-39%) y también en su dializabilidad, menor en los vinos verdes y tintos que en los blancos, lo que se atribuye a los taninos condensados del vino tinto, que explicarían las diferencias de solubilidad y dializabilidad del Pb de los distintos tipos de vino (Azenha y Vasconcelos, 2000).

6. Selenio (Se)

La presencia de Se en la estructura de la glutatión peroxidasa hace que se considere un elemento esencial para seres humanos y animales. El Se desempeña un importante papel en la fun-

ción antioxidante citosólica, pues la glutatión peroxidasa protege a las membranas celulares frente a la peroxidación lipídica (Kim, 2000) y sus funciones biológicas están mediadas por al menos 13 selenoproteínas que contienen Se en forma de selenocisteína (Daniels, 1996). Entre ellas cabe mencionar la iotironina 5'-deiodinasa tipo 1, que interacciona con el yodo en la prevención de alteraciones en el metabolismo hormonal. Estados deficitarios en Se se asocian a alteraciones en la defensa antioxidante, regulación redox y producción de energía, debido a la expresión subóptima de uno o varios de las enzimas selenodependientes. Es probable que estas alteraciones no provoquen signos clásicos de deficiencia, pero contribuyen al deterioro de la salud por estrés oxidativo, de origen ambiental o fisiológico e infecciones. Paralelamente, ingestas de Se superiores a las necesarias para la expresión de la enzima Se-cisteína, parecen disminuir el riesgo de incidencia de cáncer.

En varias partes del mundo, las ingestas estimadas de Se son inferiores a las ingestas mínimas recomendadas y es probable que un estatus deficitario de Se contribuya a la morbilidad y mortalidad por infecciones y enfermedades crónicas; al tiempo que un aumento de su ingesta de Se podría reducir la incidencia de cáncer (Combs, 2001).

Pero el Se también puede ser responsable de intoxicaciones (selenosis) en seres humanos y animales. En algunas regiones de Australia se han descrito intoxicaciones por Se en ganado alimentado con especies vegetales que lo acumulan (Tinnggi, 2003).

Para la población en general, la principal vía de exposición a Se es la dietética seguida del agua y el aire. Los contenidos de Se de los suelos, vegetales y animales varían en función del área geográfica de referencia e influyen en el estado nutricional en Se de la población (Wasowicz *et al.*, 2003).

Biodisponibilidad

La toxicidad y la BD del Se dependen de su forma química. En general, los compuestos orgánicos de Se son más biodisponibles y menos

tóxicos que las formas inorgánicas (selenitos y selenatos) (Tinnggi, 2003).

El Se puede encontrarse en 4 estados de oxidación: Se⁰ elemental, seleniuro (-2), selenito (IV) y selenato (VI). En el agua predomina el Se inorgánico (selenito y selenato) y en los vegetales los compuestos orgánicos de Se (Se-metionina y Se-cisteína). En suelos ricos en Se las aguas también lo son (Barceloux, 1999).

La BD de los selenitos y selenatos es alta. Los vegetales absorben preferentemente selenatos y los transforman en compuestos orgánicos. Por su parte, los organismos acuáticos (por ejemplo bivalvos) pueden acumular y magnificar el Se en la cadena alimentaria (Barceloux, 1999).

La mayoría de los estudios sobre la absorción del Se en el tracto gastrointestinal indican que, en condiciones normales, dicho elemento se absorbe razonablemente bien de fuentes orgánicas e inorgánicas de interés desde el punto de vista nutricional (suplementos o componentes habituales de la dieta), por lo que la absorción no se considera un factor limitante para la BD del Se (Wolfram, 2000).

El selenato se transporta a través de la membrana del borde en cepillo de las células del intestino delgado por dos mecanismos diferentes. Mientras que la captación del Se del selenito se produce por simple difusión o mediante un transportador, tras una reacción espontánea del selenito con los tioles presentes en el lumen, ejemplo: glutatión, o cisteína. Los Se-aminoácidos (Se-metionina, o Se-cisteína) se absorben por el mismo mecanismo que los correspondientes aminoácidos azufrados (metionina y cisteína) (Wolfram, 2000).

En la leche de mujer el Se forma parte de compuestos orgánicos, pero su contenido puede modificarse tanto con suplementos orgánicos como inorgánicos de Se. Se utilizan selenitos y selenatos, que no se detectan en la leche debido a que en la glándula mamaria existen mecanismos reguladores de la síntesis y secreción de selenocompuestos a través de la lactación. El calostro es más rico en Se que la leche madura. En ambos el Se es componente específico de selenoproteínas y selenoaminoácidos (glutatión-peroxidasa >

selenocistamina> selenocistina > selenometionina) bien tolerados por los lactantes, inclusive en elevadas cantidades. (Dorea, 2002).

El estudio de la BD del Se procedente de pescado, selenato o levadura de cerveza, mediante isótopos estables permite concluir que, si bien en el ser humano, el Se del pescado y del selenato tienen una absorción aparente similar, la retención del primero es significativamente mayor que la del segundo. Por su parte, el Se de la levadura de cerveza se absorbe y retiene mucho menos que los dos antes mencionados. La elevada BD del Se del pescado, que no parece afectarse por el cocinado, hace que este sea una buena fuente dietética del elemento (Fox *et al.*, 2004).

Conclusiones

La revisión realizada pone de manifiesto que a pesar de su interés, los estudios sobre biodisponibilidad de componentes tóxicos de los alimentos son todavía escasos y corresponden básicamente a los elementos minerales. En relación a estos son relativamente abundantes los estudios sobre su presencia y BD en suelos y aguas, pero menos en alimentos. La importancia de la forma química en que se encuentre el tóxico sobre su BD y toxicidad despierta el interés por los estudios de especiación, para los que en la actualidad se dispone de técnicas que pueden ser útiles y cuya aplicación permitirá avanzar en dicho campo. Por otra parte, se pone de manifiesto la importancia de la matriz en la BD de los tóxicos, factor que a menudo no se tiene en cuenta en la evaluación de la toxicidad.

Bibliografía

Azenha MAGO, Vasconcelos MTSD (2000). Assessment of the Pb and Cu in vitro availability in wines by means of speciation procedures. *Food Chem Toxicol* 38: 899-912.

- Baker S, Herrchen M, Hund-Rinke K, Klein W, Kördel W, Peijnenburg W, Rensing C (2003). Underlying issues including approaches and information needs in risk assessment. *Ecotoxicol Environ Saf* 56: 6-19.
- Bae M, Watanabe C, Inaoka T, Sekiyama M, Sudo N, Bokul MH *et al.* (2002). Arsenic in cooked rice in Bangladesh. *Lancet* 360: 1839-1840.
- Barceloux DG (1999). Selenium. *J Toxicol Clin Toxicol* 37: 145-172.
- Berthon G (1996). Chemical speciation in relation to aluminium bioavailability, metabolism and toxicity. *Coord Chem Rev* 149: 341-280.
- Berthon G (2002). Aluminium speciation studies in relation to aluminium metabolism and toxicity. *Coord Chem Rev* 228: 319-341.
- Boyce NW, Holdsworth SR, Thomson NM, Atkins RC (1987). Rapid alterations in plasma aluminium intake in dialysis patients. *Nephron* 45:164.
- Carrier G, Bouchard M, Brunet RC, Caza M (2001). A toxicokinetic model for predicting the tissue distribution and elimination of organic and inorganic mercury following exposure to methyl mercury in animals and humans. II. Application and validation of the model in humans. *Toxicol Appl Pharmacol* 171: 50-60.
- Carta P, Flore C, Alivoni R, Ibba A, Tocco MG, Aru G *et al.* (2003). Sub-clinical neurobehavioral abnormalities associated with low level of mercury exposure through fish consumption. *Neurotoxicology* 24: 617-623.
- Caussy D (2003). Case studies of the impact of understanding bioavailability: arsenic. *Ecotoxicol Environ Saf* 56:164-173.
- Caussy D, Gochfeld M, Gurzau E, Neagu C, Ruedel H (2003). Lessons from case studies of metals investigating exposure, bioavailability and risk. *Ecotoxicol Environ Saf* 56: 45- 51.
- Chowdhury UK, Rahman MM, Mandal BK, Paul K, Lodh D, Biswas BK *et al.* (2001). Groundwater arsenic-contamination and human sufferings in West Bengal, India and Bangladesh. *Environ Sci* 8: 393-415.
- Combs GF Jr (2001). Selenium in global food systems. *Br J Nutr* 85: 517-547.
- Corain B, Bombi GG, Tapparo A, Perazzolo M, Zatta P (1996). Aluminium toxicity and metalspeciation: established data and open questions. *Coord Chem Rev* 149: 11-22.
- Daniels LA (1996). Selenium metabolism and bioavailability. *Biol Trace Elem Res* 54: 185-199.

- Das HK, Mitra AK, Sengupta PK, Hossain A, Islam F, Rabbani GH (2004). *Environ Int* 30: 383-387.
- Delves HT, Sieniawaska CE, Suchak B (1993). Total and bioavailable Al in foods and beverages. *Anal Proc* 30: 358-360.
- Dolbec J, Mergler D, Sousa Passos CJ, Sousa de Morass S, Lebel J (2000). Methylmercury exposure affects motor performance of a riverine population of the Tapajòs river, Brazilian Amazon. *Int Arch Occup Environ Health* 73: 95-203.
- Dorea JG (2002). Selenium and breast-feeding. *Br J Nutr* 88: 443-461.
- Echeverria D, Aposhian HV, Woods JS, Heyer NJ, Aposhian MM, Bittner ACJR (1998). Neurobehavioral effects from exposure to dental amalgam Hg⁰: new distinctions between recent exposure and Hg body burden. *FASEB J.* 12: 9711-9980.
- Eklund G, Linden A, Tallkvist J, Oskarsson A (2003). Bioavailability of cadmium from in vitro digested infant food studied in Caco-2 cells. *J Agric Food Chem* 51: 4168-4174.
- Erba D, Ciappellano S, Bermano G, Testolin G (1995). Aluminum level and availability in home-made coffee. *Riv Sci Alim* 24: 203-208.
- Flaten TP (2002). Aluminium in tea-concentrations, speciation and bioavailability. *Coord Chem Rev* 228: 385-395.
- Froment D, Molitoris BA, Buddington B, Miller N, Alfrey AC (1989). Site and mechanism of enhanced gastrointestinal absorption of aluminum by citrate. *Kidney Int* 36: 978-984.
- Fox TE, Van den Heuvel EG, Atherton CA, Dainty JR, Lewis DJ, Langford NJ *et al.* (2004). Bioavailability of selenium from fish, yeast and selenate: a comparative study in humans using stable isotopes. *Eur J Clin Nutr* 58: 343-349.
- Gauthier E, Fortier I, Courchesne F, Pepin P, Mortimer J, Gauvreau D (2000). Aluminum forms in drinking water and risk of Alzheimer's disease. *Environ Res* 84: 234-246.
- Gochfeld M (2003). Cases of mercury exposure, bioavailability and absorption. *Ecotoxicol Environ Saf* 56: 174-179.
- Grandjean P, Weihe P, White RF, Delves F, Araki S, Yokoyama K *et al.* (1997). Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol Teratol* 19: 417-428.
- Groten JP, van Bladeren PJ (1994). Cadmium bioavailability and health risk in food. *Trends Food Sci Technol* 5: 50-55.
- Van het Hof KH, West CW, Westrate JA, Hauvast JGAJ (2000). Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. *J Nutrition* 130: 503-506. <http://facultad.usfq.edu.ec/cesarz/Cursos/CosFolder/Plomo.htm>.
- Jalon M, Urieta I, Macho ML, Azpiri M (1997). Metales pesados y arsénico. En: Vigilancia de la Contaminación Química de los Alimentos en la Comunidad Autónoma del País Vasco 1990-1995. Vitoria-Gazteiz. Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco. 29-43.
- JECFA (2003). Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Sixty-first Scientific Meeting. Rome.
- Jonnalagadda SB, Prasada Rao PVV (1993). Toxicity, bioavailability and metal speciation. *Comp Biochem Physiol* 3: 585-595.
- Jugdohsingh R, Reffitt DM, Oldham C, Day JP, Fifield LK, Thompson RP H, Powell JJ (2000). Oligomeric but not monomeric silica prevents aluminum absorption in humans. *Am J Clin Nutr* 71: 944-949.
- Kaehny WD, Hegg AP, Alfrey AC (1977). Gastrointestinal absorption of aluminum from aluminum containing antacids. *N Engl J Med* 296: 1389-1390.
- Kim Y (2000). Differences in biological activity and metabolism of selenium due to its chemical form. *J Anim Sci Technol* 42: 835-848.
- Laparra JM, Velez D, Montoro R, Barberá R, Farré R (2003). Estimation of arsenic bioaccessibility in edible seaweed by an in vitro digestion method *J Agric Food Chem* 51: 6080-6085.
- Lebel J, Mergler D, Branches F, Lucotte M, Amorim M, Larribe F (1998). Neurotoxic effects of low-level methylmercury contamination in the Amazonian basin. *Environ Res* 79: 20-32.
- Mabeau S, Fleurence J (1993). Seaweed in food products: biochemical and nutritional aspects. *Trends Food Sci Technol* 4: 103-107.
- McLaughlin MJ, Parker DR, Clarke JM (1999). Metals and micronutrients-food safety issues. *Field Crops Res* 60:143-163.
- Moore PB, Edwardson JA, Ferrier IN, Taylor GA, Lett D, Tyrer SP *et al.* (1997). Gastrointestinal absorption of aluminum is increased in Dow's syndrome. *Biological Psychiatry* 41: 488-492.
- Muñoz O, Devesa V, Suñer MA, Velez V, Montoro R, Urieta I *et al.* Total and inorganic arsenic in fresh and processed fish products (2000). *J Agric Food Chem* 48: 4369-4376.

- Muñoz O, Díaz OP, Leyton I, Núñez N, Devesa V, Suñer MA *et al.* (2002). Vegetables collected in the cultivated andean area of northern Chile: Total and inorganic arsenic contents in raw vegetables *J Agric Food Chem* 50: 642-647.
- Oomen AG, Hack A, Minekus M, Zeijdner E, Cornelis C, Schoeters G *et al.* (2002). Comparison of five in vitro digestion models to study the bioaccessibility of soils contaminants. *Environ Sci Technol* 36: 3326-3334.
- Partridge NA, Regnier FE, White JL, Hem SL (1989). Influence of dietary constituents on intestinal absorption of aluminum. *Kidney Int* 35: 1413-1417.
- Powell JJ, Thompson RP (1993). The chemistry of aluminium in the gastrointestinal lumen and its uptake and absorption. *Proc Nutr Soc* 52: 241-253.
- Roychowdhury T, Uchino T, Tokunaga H, Ando M (2002). Survey of arsenic in food composites from an arsenic-affected area of West Bengal, India. *Food Chem Toxicol* 40: 1611-1621.
- Roychowdhury T, Tokunaga H, Ando M (2003). Survey of arsenic and other heavy metals in food composites and drinking water and estimation of dietary intake by the villagers from an arsenic-affected area of West Bengal, India. *Sci Total Environ* 308: 15-35.
- Ruby MV, Schoof R, Brattin W, Goldade M, Post G, Harnois M *et al.* (1999). Advances in evaluating the oral bioavailability of inorganics in soil for use in human health risk assessment. *Environ Sci Technol* 33: 3697-3705.
- Schoof RA, Yost LJ, Eickhoff J, Crecelius EA, Cragin DW, Meacher DM *et al.* (1999). A market basket survey of inorganic arsenic in food. *Food Chem Toxicol* 37: 839-846.
- Sharpe FR, Williams DR (1995). Content, chemical speciation, and significance of aluminum in beer. *J Am Soc Brew Chem* 53: 85-92.
- Smith JC, Allen PV, Turner MD, Most B, Fisher FL, Hall LL (1994). The kinetics of intravenously administered methylmercury in man. *Toxicol Appl Pharmacol* 128: 251-256.
- Spivey Fox MR (1988). Nutritional factors that may influence bioavailability of cadmium. *J. Environ Qual* 17: 175-180.
- Suñer MA, Devesa V, Clemente MJ, Velez D, Montoro R, Urieta I, Jalón M, Macho ML (2002). Organo-arsenical species contents in fresh and processed seafood products. *J Agric Food Chem* 50: 924-932.
- Taylor GA, Ferrier IN, McLoughlin J, Fairbairn AF, McKeith IG *et al.* (1992). Gastrointestinal absorption of aluminium in Alzheimer's disease: response to aluminium citrate. *Age Ageing* 21: 81-90.
- Tice RR, Yager IW, Andrews P, Crecelius E (1997). A chemical hypothesis for arsenic methylation in mammals. *Chem Biol Interact* 88: 89-114.
- Tinnggi U (2003). Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review. *Toxicol Lett* 137: 103-110.
- Tsuda T, Babazono A, Ogawa T, Hamad H, Mino Y, Aoyama H *et al.* (1992). Inorganic arsenic: A dangerous enigma for mankind. *Appl Organomet Chem* 6: 309-322.
- Tsuda T, Inoue T, Kojima A, Aoki S (1995). Market basket and duplicate portion estimation of dietary intakes of cadmium, mercury, arsenic, copper, manganese and zinc by Japanese adults. *J AOAC Int* 78: 1363-1368.
- van Ginkel MF, van der Voet GB, D'Haese PC, De Broe ME, de Wolf FA (1993). Effect of citric acid and maltol on the accumulation of aluminum in rat brain and bone. *J Lab Clin Med* 121:453-460.
- Wasowicz W, Gromadzinska J, Rydzynski K, Tomczak J (2003). Selenium status of low-selenium area residents: Polish experience. *Toxicol Lett* 137: 95-101.
- Weberg R, Berstad A (1986). Gastrointestinal absorption of aluminium from single doses of aluminium containing antacids in man. *Eur J Clin Invest* 16: 428-432.
- Wienk KJH, Marx JJM, Beynen AC (1999). The concept of iron bioavailability and its assessment. *Eur J Nutr* 38: 51-75.
- Whitehead MW, Farrar G, Christie GL, Blair JA, Thompson RPH, Powell JJ (1997). Mechanisms of aluminum absorption in rats. *Am J Clin Nutr* 65:1446-1452.
- WHO (1989) Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants 33rd report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *WHO Technical Report Series 759*. WHO: Geneva, Switzerland.
- Wolffram S (2000). Metabolism of nutritionally relevant inorganic and organic forms of selenium. *Uebersichten zur Tierernaehrung* 28: 65-94.
- Yost LJ, Schoof RA, Aucoin R (1998). Intake of inorganic arsenic in the North American diet. *Hum Ecol Risk Assess* 4: 137-152.
- Young JF, Wosilait WD, Luecke RH (2001). Analysis of methylmercury disposition in humans utilizing a PBPK model and animal pharmacokinetic data. *J Toxicol Environ Health* 63: 19-52.

EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE ADITIVOS Y CONTAMINANTES PRESENTES EN ALIMENTOS

Antonio Pla, Antonio Hernández, Fernando Gil

Introducción. Metodología para la «evaluación de la toxicidad». Criterios o parámetros de toxicidad. Bibliografía.

I. Introducción

La seguridad alimentaria es una de las grandes preocupaciones de la sociedad actual. Las enfermedades transmitidas por los alimentos siguen constituyendo uno de los grandes problemas de salud pública. Aunque históricamente las grandes tragedias toxicotóxicas han estado asociadas al consumo de alimentos contaminados, las últimas décadas del siglo XX y los primeros años del siglo XXI se han caracterizado por la aparición de nuevos problemas relacionados con los alimentos, lo que ha colocado a la seguridad alimentaria en el centro de atención de la sociedad, los gobiernos y las organizaciones internacionales.

Reflejo de esta preocupación es el *Libro Blanco sobre la Seguridad Alimentaria* presentado por la Comisión Europea (1999) que enumera los principios y acciones que deben caracterizar la política sobre seguridad alimentaria en Europa en los próximos años. Los principios contenidos en el *Libro Blanco de la Seguridad*

Alimentaria se refieren a la inocuidad de los productos alimenticios basada en una consideración integral de la cadena alimentaria: el análisis de los riesgos alimentarios, bajo la triple consideración de la evaluación, gestión y comunicación de riesgos, como herramienta más adecuada para promover los mayores niveles de confianza. Además, recientemente se ha creado la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se ha incorporado el sistema científico de análisis de riesgo (Reglamento 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo de 28 de enero de 2002).

A nivel nacional la respuesta a esta estrategia para garantizar la inocuidad de los alimentos está representada por la creación de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria (Ley 11/2001 de 5 de julio, BOE del 6/07/2001) cuyo estatuto ha sido aprobado recientemente por el RD 709/2002 de 19 de julio (BOE del 26/07/2002).

Las exigencias actuales de seguridad en todos los campos obligan a evaluar los niveles de riesgo que para el hombre y el medio ambiente puede presentar un determinado producto. En el campo de la «seguridad de los alimentos» el

hombre es el centro de interés y, aunque tradicionalmente ese tipo de información procedía de los datos obtenidos en intoxicaciones accidentales, en la actualidad la evaluación de la toxicidad y el riesgo se hace a partir de los datos obtenidos en la experimentación *in vivo* (animales de laboratorio) e *in vitro* (Glomot, 1990).

La «evaluación de la toxicidad» (llamada también «Toxicología Experimental») tiene como objeto determinar el grado y tipo de toxicidad (aguda, crónica, acción irritante, neurotoxicidad...) de una determinada sustancia siguiendo unos protocolos estandarizados, generalmente para cumplir unos requisitos legales para su registro, comercialización y utilización posterior.

Las metodologías propuestas para tal fin son muy numerosas y en general corresponden a «protocolos de estudio» con la mayoría de los factores estandarizados, de acuerdo con las propuestas de organismos internacionales o nacionales (OECD, 2003; ECB, 2004). La mayoría de estas reglamentaciones exigen, o al menos sugieren, que los estudios se realicen en laboratorios experimentados, con locales suficientemente grandes, material adecuado y personal experimentado donde se sigan las «Buenas Prácticas de Laboratorio» (normas GLP, Good Laboratory Practices).

En un sentido amplio, la contaminación de los alimentos puede ser debida a agentes biológicos, químicos o físicos. Sin embargo, desde el punto de vista de la toxicología alimentaria la contaminación se circunscribe a la presencia de sustancias químicas (potencialmente tóxicas) en los alimentos y que pueden ser responsables de efectos agudos, crónicos o cancerígenos en el consumidor (Miller, 1991; Koeman, 1996). De acuerdo con ese planteamiento, los contaminantes alimentarios serían: «Todos aquellos compuestos o sustancias químicas que pueden estar presentes en la cadena alimentaria y que pueden ser potencialmente peligrosos para la salud». El origen de estos contaminantes es muy variado (Figura 5.1):

- *Sustancias utilizadas en producción animal*, como es el caso de hormonas, antibióticos,

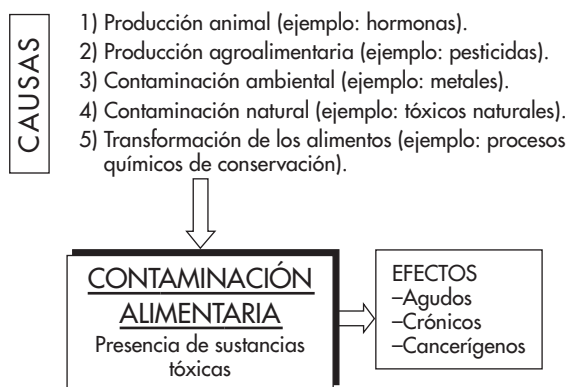


Figura 5.1. Causas de la contaminación alimentaria.

etc., que pueden aparecer finalmente en los productos destinados al consumo en cantidades suficientes para suponer un peligro para la salud.

- *Sustancias utilizadas en producción agrícola*. El caso más representativo es el de los plaguicidas que, si bien constituyen una exigencia actual en las técnicas agrícolas, implican un riesgo para la salud, cuando los residuos presentes en productos vegetales previamente tratados superan ciertos niveles de seguridad.

- *Contaminación natural*. En la Naturaleza existen muchas sustancias de carácter tóxico que pueden estar presentes en los alimentos y son capaces de producir efectos perjudiciales para la salud. En algunos casos sus efectos tóxicos son consecuencia de alcanzar concentraciones elevadas respecto a las que normalmente existen en dichos alimentos.

- *Transformación de los alimentos*. El proceso de elaboración, conservación y embalaje de los alimentos constituye una fuente importante de generación de sustancias tóxicas que permanecen en el alimento y pueden originar efectos nocivos en el consumidor. Es este un tema de gran actualidad en la contaminación alimentaria, que incluye los aditivos, colorantes, edulcorantes, hidrocarburos aromáticos policíclicos, acrilamida, etc.

- *Contaminación ambiental*. Representa uno de los grandes problemas actuales en la contaminación alimentaria. La contaminación del aire, suelo y aguas continentales y marinas es, sobre todo, una consecuencia de la actividad

humana (industrial, agrícola, doméstica) que, indirectamente, permite la incorporación de los contaminantes a plantas y animales que por sí mismos o a través de sus productos derivados pueden provocar efectos perjudiciales para la salud del consumidor (Figura 5.2).

Resulta evidente que la probabilidad de que haya sustancias tóxicas presentes en los alimentos es muy alta. Por otra parte, cualquier sustancia en cantidades suficientemente elevadas puede producir algún efecto adverso.

La evaluación de la seguridad requiere la identificación de los efectos tóxicos potenciales, así como disponer de información toxicológica adecuada para determinar los niveles de tóxico que pueden considerarse seguros para el consumidor. Por ello, se hace necesario disponer de metodologías adecuadas para valorar la toxicidad de los distintos contaminantes en los alimentos y establecer las condiciones de exposición para disminuir al máximo el peligro/riesgo para todos los grupos de consumidores.

Aunque los aditivos alimentarios constituyen uno de los principales problemas en toxicología alimentaria y sobre ellos se han hecho la mayoría de los estudios toxicológicos, otros muchos tóxicos (véase Figura 5.1) requieren una evaluación toxicológica, ya que pueden estar presentes en los alimentos por causas diferentes y muchos de ellos poseen una considerable toxicidad.

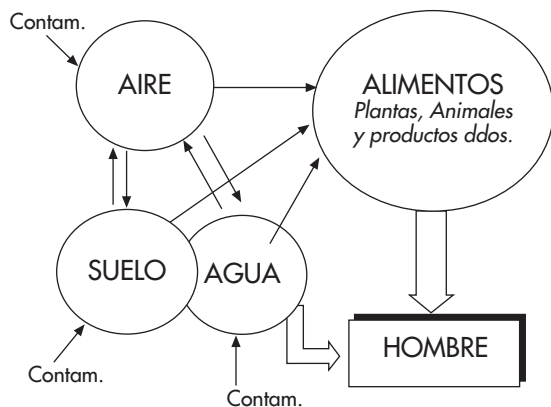


Figura 5.2. Contaminación alimentaria de origen ambiental.

Metodología para la «evaluación de la toxicidad»

Como se ha dicho anteriormente, la evaluación de la toxicidad se hace de acuerdo con metodologías estandarizadas, propuestas por Comités de expertos internacionales (OMS, 1958; OMS, 1987; OCDE, 2003 (www.oecd.org/document), European Chemicals Bureau, 2004 (<http://ecb.jrc.it/testing-methods>)). En este apartado se presentan los principios generales y el fundamento de los principales métodos utilizados en el campo de la seguridad alimentaria.

1. Principios generales de los ensayos de toxicidad

Los ensayos de toxicidad en animales se apoyan en dos principios fundamentales (Eaton y Klaassen, 1996).

1.º) *Los efectos que el tóxico produce en animales de experimentación son extrapolables a humanos.* Sobre la base de «dosis por unidad de superficie corporal», los efectos tóxicos en humanos se sitúan en el mismo rango que los animales de laboratorio. Sobre la base del «peso corporal», los humanos son generalmente más vulnerables que los animales de experimentación (por un factor corrector de 10). Teniendo en cuenta estas diferencias cuantitativas se pueden calcular dosis relativamente seguras en humanos utilizando factores apropiados.

2.º) *La exposición de animales de experimentación a dosis altas de agentes tóxicos es un método válido para descubrir posibles riesgos en humanos.* Este principio se basa en las curvas dosis-respuesta. El diseño de modelos experimentales requiere un pequeño número de animales en comparación con el tamaño de la población expuesta al riesgo. Para obtener resultados estadísticamente válidos en grupos pequeños de animales es necesario administrar dosis relativamente altas, de manera que el efecto aparezca con una frecuencia tal que sea suficiente para ser detectado.

Así, por ejemplo, si la incidencia de un efecto tóxico importante, como es el cáncer, es de un 0,01%, representaría 4.000 casos sobre un total de 40.000.000 de personas en España, incidencia que es inaceptablemente alta. Para detectar el mismo porcentaje sobre animales de experimentación serían necesarios como mínimo 10.000 animales, lo que resulta imposible en la práctica. De ahí que no haya más remedio que administrar dosis grandes de la sustancia tóxica a pequeños grupos de animales y luego utilizar «principios toxicológicos válidos» para extrapolar los resultados y estimar el riesgo de las dosis bajas.

2. Variables generales en la evaluación toxicológica

El diseño experimental es un aspecto clave en los estudios de evaluación de la toxicidad (OMS, 1987; Glomot, 1990). A continuación se comentan algunos de los aspectos a considerar.

2.1. Propiedades fisicoquímicas de la sustancia a estudiar

Esta información es imprescindible antes de iniciar cualquier estudio toxicológico. Permite definir las condiciones de manipulación y almacenamiento de dicha sustancia, los modelos experimentales (vía o modo de administración), explicar la aparición de algunos fenómenos tóxicos y comprobar que la sustancia estudiada tenga siempre las mismas características.

2.2. Elección de las especies

A pesar de las similitudes de algunas especies con el hombre, la extrapolación es siempre difícil. En general, ratón, rata, cobaya, conejo, perro y mono son las especies más utilizadas. La elección de una determinada especie depende de varios factores: tipo de efecto tóxico a estudiar, disponibilidad en un determinado momento, facilidad de manipulación del animal, condiciones de manutención, farmacocinética y biodisponibilidad del producto ensayado.

Así, por ejemplo, para los estudios de administración por vía oral, cutánea o por inhalación se prefieren los roedores y especialmente la *rata*. Para los estudios de toxicidad cutánea se utilizan el *conejo* o el *cerdo*. Para los estudios de toxicidad crónica en especies no roedoras se usan *perros* o *primates*. Para los estudios de carcinogénesis se utilizan usualmente el *ratón* y la *rata*, etc.

2.3. Elección de los grupos

En general se utilizan tres grupos tratados y uno control. Estos grupos se forman al azar a partir de lotes de animales del mismo origen, de edad y peso comparable y generalmente de ambos sexos. En los estudios de larga duración y de carcinogénesis se acostumbra a utilizar dos grupos control: un control negativo al que no se le administra nada o solo el vehículo de administración del tóxico, y un control positivo que recibe una sustancia de referencia.

2.4. Elección de la vía de administración

En el campo de la seguridad de los alimentos normalmente se utiliza la vía oral. El producto puede administrarse mediante una sonda esofágica o estomacal (estudios cortos) o mezclando el tóxico con la comida o bebida (estudios de larga duración).

2.5. Elección de las dosis

Siempre es muy difícil. Varía en función del estudio a realizar. En estudios de toxicidad aguda se usan dosis elevadas que produzcan intoxicaciones claras en los animales. En estudios de toxicidad crónica suele emplearse una gama de dosis que van desde dosis bajas, que corresponden a la utilización normal en el hombre, hasta dosis elevadas que producen efectos tóxicos en la especie escogida.

2.6. Duración del tratamiento

Es muy variable, dependiendo del tipo de estudio a realizar. Generalmente los estudios se

realizan de forma secuencial: empiezan por experimentos cortos (días-semanas), luego de 3-6 meses y en casos especiales podemos tener estudios de 12 meses a 2 años, e incluso más en los roedores.

2.7. Análisis estadístico de los datos

En cada ensayo los resultados obtenidos se someten a un análisis estadístico para determinar si la distribución de las respuestas en los grupos tratados difiere de las obtenidas en el grupo control. Existen numerosos métodos estadísticos para el análisis de resultados (OMS, 1987).

3. Tipos de ensayos utilizados

En la evaluación toxicológica se utilizan tests *in vivo* e *in vitro*, sobre los que conviene hacer tres observaciones generales (Glomot, 1990; Miller, 1991):

1. Los tests *in vivo* no son suficientes por sí mismos para establecer la toxicidad de una sustancia. Deberán estudiarse también otros aspectos farmaco-toxicológicos.
2. Los tests *in vivo* no permiten estudiar todos los problemas. Deben completarse con determinados ensayos *in vitro*, aunque solo como tests de screening (ya que no podemos admitir que un alimento que tenga un efecto mutágeno sea cancerígeno cuando se consume regularmente).
3. Los experimentos realizados no se hacen paralelamente sino de forma secuencial, en función de una estrategia definida de modo que en cualquier punto se puede parar el estudio si se prevén riesgos excesivos o bien reorientarlo en función de los resultados obtenidos.

3.1. Ensayos de toxicidad aguda

Estos estudios, si están correctamente diseñados y ejecutados, identifican los compuestos extremadamente tóxicos y proporcionan información

sobre: DL_{50} o CL_{50} , naturaleza de los efectos tóxicos y relación dosis-respuesta, riesgos por exposición a dosis elevadas del tóxico (accidente, intento de suicidio, etc.) y las diferencias entre especie y sexo. Cuando se ensayan varias especies o ambos sexos se obtiene información que puede ser útil para predecir si la toxicidad es mediada por la actividad hormonal o para establecer si una especie debe ser investigada más exhaustivamente. Además, permiten ofrecer recomendaciones sobre cómo llevar a cabo los estudios toxicológicos de más larga duración (Chan y Hayes, 1989; Glomot, 1990).

En ellos, se usan grupos homogéneos de animales (ratón, rata, conejo) que reciben dosis crecientes del tóxico. La vía de administración es, fundamentalmente, oral. Para determinar la «dosis máxima tolerada» se suelen emplear conejo, perro o primates. Los animales se observan durante 14 días. A los animales que mueren durante el estudio o son sacrificados al final se les hace la autopsia. Durante el ensayo se anotan los síntomas de intoxicación, mortalidad, lesiones de los órganos (autopsia) y toda la información se clasifica por dosis y sexo. Por una fórmula matemática se calcula la dosis que provoca la muerte del 50% de los animales. El valor estadístico DL_{50} debe ir siempre acompañado de unos límites de confianza, indicando el error estimado del valor obtenido. También se puede calcular la dosis letal mínima y la dosis máxima tolerada.

Aunque estos ensayos aportan información valiosa, tienen varias limitaciones. Así, por ejemplo, no indican los posibles efectos que aparecerían después de una administración reiterada del tóxico. Por otra parte, la DL_{50} es una variable aleatoria que puede calcularse por métodos estadísticos, sin necesidad de utilizar un número excesivo de animales (Chan y Hayes, 1989).

Una descripción detallada de los métodos actualmente recomendados podemos encontrarla en *OECD Guidelines for testing of chemicals*: métodos TG-420, TG-423, TG-425 (OECD, 2003) y en *Methods for the determination of toxicity and other health effects del European Chemicals Bureau*: métodos B.1-B.5 (ECB, 2004).

3.2. Ensayos de toxicidad subaguda/subcrónica

Proporcionan información sobre: efectos tóxicos principales y relaciones dosis-respuesta, órganos diana implicados, reversibilidad o irreversibilidad de los efectos precisando si son acumulativos o retardados, las dosis para los estudios de más largo plazo, que es uno de los principales objetivos de estos ensayos (Mosberg, 1989; Glomot, 1990; OMS, 2000a).

Estos ensayos se realizan según normas internacionales (OECD, 2003: métodos TG-407, TG-408, TG-409; ECB, 2004: métodos B.26, B.27). En general consisten en la administración regular o frecuente de varias dosis o concentraciones de la sustancia estudiada. Usualmente se incluyen tres niveles de dosis: una dosis alta que produzca toxicidad, una dosis baja que no produzca toxicidad y una dosis intermedia que permita calcular la relación dosis-respuesta. Las especies animales utilizadas son ratas, ratones (roedores); perro y mono (no roedores). La duración del estudio es de 14 días a 3 meses. Clásicamente se clasifican en subagudos (hasta 4 semanas) y subcrónicos (de 4 semanas a 3 meses). Durante el estudio los animales se someten a observación clínica (estado general, comportamiento, etc.) y se hace una evaluación del crecimiento ponderal, consumo de agua y alimentos. Se toman muestras periódicamente para realizar exámenes hematológicos y bioquímicos en sangre, orina y heces. A los animales que mueren o son sacrificados al final se les realiza la autopsia (peso y estudio histopatológico de los órganos extraídos).

Por análisis comparativo de los resultados obtenidos se pueden establecer las relaciones dosis/efecto, la dosis sin efecto (NOEL) y el NOAEL.

3.3. Ensayos de toxicidad crónica

Estos estudios tratan de detectar los efectos tóxicos que requieren un largo tiempo de latencia o que son acumulativos. Por ello son los únicos experimentos que permiten evidenciar determinadas

afecciones cardíacas o renales en los animales estudiados, de aparición a menudo ligada a la edad. Proporcionan información sobre el tipo y naturaleza de los efectos tóxicos (funciones dañadas, órganos diana), dosis sin efecto tóxico (dosis umbral), dosis con efectos tóxicos, tiempo de aparición de los efectos tóxicos (en función de la dosis o de la concentración), reversibilidad eventual de los efectos observados (Stevens y Gallo, 1989; Glomot, 1990). Los protocolos previstos para los ensayos de este tipo no permiten obtener información sobre el posible efecto cancerígeno (OCDE, 2003: método 452; ECB, 2004: método B.30).

En estos ensayos se administra el tóxico de manera reiterada a grupos de mamíferos (roedores o no roedores) en dosis variables. En general se utilizan 3 grupos tratados y 1 control (20-35/grupo/sexo, en roedores y 4-10/grupo/sexo, en no roedores). Las dosis se eligen en función de los resultados obtenidos en los experimentos de corta duración y generalmente se utiliza la vía oral.

Un determinado número de animales de todos los grupos, o algunos de ellos, se sacrifican durante el experimento para descubrir el momento de aparición de las lesiones histopatológicas y analizar su evolución en el tiempo.

El conjunto de los resultados se somete a un exhaustivo estudio estadístico y se determina un nivel de dosis sin efecto observado (NOAEL) que sirve de base para la fijación de la DDA, de los límites de tolerancia de las sustancias en los alimentos y en el agua de bebida, o los valores límite de exposición.

3.4. Estudios de la función reproductora

Hay dos métodos para evaluarla: *a)* el método fraccionado, que estudia sucesivamente las tres etapas: fertilidad, teratogénesis y periodo peri y postnatal; y *b)* método global del conjunto del proceso de la reproducción (Zenick y Clegg, 1989; Manson y Kang, 1989; Glomot, 1990).

Estudio fraccionado por etapas

Estudio de la fertilidad. Permite determinar si el tratamiento de machos y/o hembras puede pro-

vocar la esterilidad o malformaciones en la descendencia por afectación de los gametos masculino y/o femenino.

Estudios de teratogénesis. Tienen por finalidad poner en evidencia: embriotoxicidad que puede implicar la muerte del embrión, fetotoxicidad, un efecto teratogénico que se manifiesta por lesiones estructurales (malformaciones) o funcionales. El tóxico se administra en el primer tercio de la gestación. Este estudio necesita un mínimo de 20 ratas gestantes y 12 conejas gestantes por grupo o dosis.

Estudio peri y posnatal. Su finalidad es la determinación de posibles perturbaciones en el crecimiento del feto, el parto, la lactancia y el desarrollo del recién nacido. El tóxico se administra durante el último tercio de la gestación hasta el final de la lactancia. Permite también poner en evidencia efectos sobre el comportamiento (tests del recién nacido, estudio de reflejos, movimientos espontáneos, desarrollo de estatura, etc.) Se necesita igual número de animales que en el caso anterior.

Método global (estudio multigeneracional)

La sustancia se administra a la generación parental (F_0) antes del acoplamiento, durante un ciclo completo de la espermatogénesis en los machos y durante un periodo de maduración del oocito en las hembras. El tratamiento continúa sin interrupción durante el acoplamiento, gestación, parto y lactancia. La primera generación (F_1) se trata desde el destete hasta el destete de la generación siguiente (F_2) y, si es necesario, hasta el destete de la siguiente (F_3). Se evidencian así los efectos potenciales sobre la fertilidad sucesiva de varias generaciones así como la transmisión eventual de una anomalía de una generación a otra. Este estudio necesita 144 animales (48 machos y 96 hembras) para obtener 20 hembras gestantes por grupo como mínimo. Los protocolos actualmente aceptados para estos estudios son TG-414, TG-415, TG-416, TG-421 (OECD, 2003) y B.31, B.34, B.35 (ECB, 2004).

3.5. Estudios de carcinogénesis

Tienen como objetivo evidenciar el proceso por el cual las células se dividen a una frecuencia mucho mayor que la normal. Estos estudios se clasifican en dos categorías: los estudios a corto plazo (tests de mutagénesis), que son los tests de *screening* y los estudios a largo término (Glomot, 1990; Robens y Piegorch, 1989).

Estudios a largo término (OCDE, 2003: TG-451; ECB, 2004: B.32)

Los ensayos de carcinogénesis como medio de predecir el riesgo en el hombre se basan en las siguientes hipótesis (Pitot y Dragan, 1996).

- a) Los mecanismos de formación de tumores en el hombre son los mismos que en los animales.
- b) Existe una relación dosis-efecto en la aparición de tumores en el hombre y en los animales.
- c) El periodo de latencia para la aparición de tumores está en relación con la longevidad (el periodo de latencia para el humo del tabaco es de 20 años en el hombre y de 2 años en la rata).
- d) Los aspectos cualitativos y cuantitativos de las características toxicocinéticas del tóxico son comparables en el hombre y en los animales.
- e) El hombre y los animales poseen funciones fisiológicas semejantes.

El tóxico se administra por vía oral (varias dosis escogidas a partir de los estudios de toxicidad crónica) durante la mayor parte de la vida del animal (mínimo de 18 meses para ratón y hamster y 24 meses para la rata). El número de animales utilizado es de 100 por grupo (50 machos y 50 hembras) y se recomienda estudiar al menos dos especies animales, debido a las diferencias genéticas en la susceptibilidad al cáncer. Durante la duración del estudio se hace un seguimiento, mediante exámenes clínicos regulares, para detectar la aparición de masas palpables. Los animales que mueren durante el

estudio y los que se sacrifican al final se someten a un exhaustivo examen anatomopatológico (para detectar hipertrofias, hiperplasias o tumores). No obstante, la extrapolación de los resultados al hombre es difícil.

Ensayos a corto término (Tests de mutagenicidad)

Su finalidad es determinar la capacidad de un compuesto químico para producir alteraciones en el material genético. Estas alteraciones del ADN se traducen en efectos genotóxicos (que pueden transmitirse o no a las generaciones posteriores, según afecten a las líneas germinales o a células somáticas) (Brusick, 1989; Eaton y Klaassen, 1996). Los efectos genotóxicos pueden dar lugar a otros fenómenos tóxicos y procesos patológicos en los que exista algún tipo de control genético, entre los que cabe destacar la carcinogénesis, teratogénesis, esterilidad o semiesterilidad y ciertas enfermedades cardiovasculares. No obstante, el fin primordial de los estudios de mutagénesis es la predicción del potencial cancerígeno de un compuesto químico. Existen tests *in vitro* e *in vivo*. Un efecto mutágeno *in vitro* no significa necesariamente un efecto cancerígeno en el hombre, si bien se considera que un mutágeno es un cancerígeno en potencia. De ahí la importancia de los tests de mutagénesis *in vivo*, ya que representan una mejor aproximación a la realidad. Algunos de los más utilizados se describen brevemente a continuación (Brusick, 1989; Derache, 1990a).

1. *Test de mutagénesis en bacterias* (OECD, 2003: TG-471, TG-472; ECB, 2004: B13/B14). Intentan detectar una mutación tardía, una mutación temprana y un efecto relacionado con una deficiencia en la reparación del ADN. Son relativamente sencillos. Necesitan, sin embargo, la adición de preparaciones microsomales (rata) para metabolizar el procarcinógeno o promutágeno a un derivado reactivo.

Los test de mutación tardía se desarrollan sobre todo en *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. Se utiliza, por ejemplo, una cepa mutan-

te con una alteración en el gen que determina la síntesis de triptófano, de manera que la cepa no crece en un medio desprovisto de triptófano. Un mutágeno, en algunos casos produce una reversión, reapareciendo el triplete que codifica la glicina y que permite así la síntesis del triptófano.

En el «Test de Ames» (*Salmonella typhimurium*) se utiliza la mutante (his^-) incapaz de sintetizar histidina. Bajo la acción de un mutágeno se obtiene la cepa revertiente (his^+), capaz de sintetizar dicho aminoácido y, por lo tanto, de crecer en un medio desprovisto de histidina.

2. *Tests con hongos* (OECD, 2003: TG-480, TG-481; ECB, 2004: B.15, B.16). En *Sacharomyces cerevisiae* las mutaciones pueden darse en dos locus: *ade 1* ó *ade 2*, formándose colonias mutantes pigmentadas de rojo. Las colonias normales (blancas) no requieren adenina, siendo capaces de sintetizarla. Las colonias mutantes son fácilmente detectables por su coloración. En el experimento añadimos un agente mutágeno y cancerígeno, por ejemplo, benzantraceno, al medio de cultivo con células de *S. cerevisiae* y fracciones microsomales. Tras 18 horas de incubación se calcula el número de colonias supervivientes y la frecuencia de colonias mutantes rojas.

3. *Tests con células de mamífero en cultivo*. El material es relativamente fácil de cultivar y tenemos la ventaja de trabajar con material genético humano. El material más recomendable es probablemente un cultivo de linfocitos. Estas células pueden ser estimuladas *in vitro* por distintas sustancias, especialmente las fitohemaglutininas extraídas de las judías. Al ser estimuladas tendremos sucesivas mitosis durante las cuales se pueden detectar las aberraciones cromosómicas debidas a agentes mutágenos.

a) Modificaciones estructurales de los cromosomas (OECD, 2003: TG-473; ECB, 2004: B.10, B.19). Los cromosomas pueden observarse bien cuando están condensados en la metafase, a nivel de la placa ecuatorial antes de la separación de las cromátidas hacia los polos celulares. Para poder observar un gran número de células en metafase debemos bloquear la

división en este punto. La colchicina inhibe la formación del huso mitótico, los cromosomas se dispersan por el citoplasma y pueden observarse individualmente. También podemos observar en la fase siguiente (anafase) los puentes de separación de las cromátidas o los fragmentos de cromátidas no unidos al huso, dispersos alrededor del núcleo de las células hijas.

b) Mutaciones génicas en células en cultivo (OECD, 2003: TG-476; ECB, 2004: B.17). En estos experimentos se utilizan frecuentemente las mutaciones reversibles, más específicas que las mutaciones tempranas. Un caso concreto es la mutación $TK^+ \rightarrow TK^-$ (actividad timidina quinasa). Las células deficientes en timidina quinasa (TK^-) no pueden integrar ni la timidina ni la bromodesoxiuridina (BrdU), pero conservan la propiedad de síntesis «de novo». La célula normal (TK^+) sí podrá incorporar la timidina y la base con bromo (esta última actuará como agente citotóxico, impidiendo el crecimiento de la célula).

De ese modo, las células mutantes podrán crecer en presencia del análogo BrdU, mientras que las células normales no. El efecto tóxico se traducirá en una diferencia de velocidad de crecimiento del cultivo y, mediante el recuento del número de células supervivientes se calculará la frecuencia de la mutación. Cuando añadimos un análogo antimetabólico (metotrexate, antagonista del ácido fólico que bloquea la síntesis de novo tras un cierto tiempo) y un derivado mutágeno, la mutación permite la supervivencia de las células.

4. *Tests con animales in vivo*. En los tests *in vitro* podemos averiguar el carácter mutágeno de una sustancia, pero el efecto mutágeno real de este derivado en el hombre es mucho más aleatorio, de ahí el valor de los tests *in vivo*.

a) Análisis del cariotipo en la metafase (OECD, 2003: TG-475; ECB, 2004: B.11). Los animales se tratan con la sustancia y después de un intervalo de tiempo se examinan al microscopio los cromosomas de un tejido en división activa en la anafase (añadiendo colchicina). Las células más empleadas en la rata son los linfocitos circulantes o las células de la médula ósea (fémur).

b) El test del micronúcleo (OECD, 2003: TG-474; ECB, 2004: B.12). El micronúcleo es un resto de cromatina (fragmento de cromosoma después de la anafase) adherida al núcleo principal o, en algunos casos, a los núcleos de las células hijas. El eritrocito se adapta especialmente a este estudio, ya que después de la última maduración el núcleo desaparece y el micronúcleo queda bien visible en el citoplasma. El test consiste en analizar el número de eritrocitos policromáticos en la médula ósea después de la administración de un determinado producto.

c) El test de la dominancia letal (OECD, 2003: TG-478; ECB, 2004: B.22). Los efectos de la dominancia letal consisten en la muerte del embrión o del feto. Son la traducción de una alteración de los cromosomas, aunque no nos da información del lugar preciso de la mutación. Generalmente se trata el macho y después se acopla con una hembra. Posteriormente se observa el número de fetos muertos por hembra y se compara con una pareja normal. Para ser «significativa», la proporción de fetos muertos debe ser como mínimo el doble que la de los animales no tratados.

d) Los tests «spot» en el ratón (OECD, 2003: TG-484; ECB, 2004: B.24). Los embriones se someten durante su desarrollo a un derivado supuestamente mutágeno. Las células diana son las melanoblastos y los genes afectados los que controlan la pigmentación del pelaje. La mutación se traducirá en una mancha o cambio de color en la piel.

e) La translocación en el ratón (alteración en el número de cromosomas o en su tamaño) (OECD, 2003: TG-485; ECB, 2004: B.25). En la translocación una parte del cromosoma se une a otro. La hembra puede perder un cromosoma X transformándose en X0. Esto se traducirá en una fertilidad menor o incluso nula. Las hembras X0 se identifican por presentar solo 39 cromosomas en las células en mitosis de la médula ósea. También podemos observar un cromosoma anormalmente largo, que nos indicará una translocación importante.

f) Los tests en *Drosophila* (OECD, 2003: TG-477; ECB, 2004: B.20). El test de recesivi-

dad letal ligada al sexo utiliza machos que poseen un cromosoma X identificable por llevar un marcador dominante (Muller-5). Al acoplar machos expuestos a tóxicos mutágenos con hembras normales, todas las hijas de la primera generación llevarán el cromosoma X modificado. Si estas se acoplan con sus hermanos obtendremos machos con el cromosoma X afectado en la 2.^a generación y de color amarillo, salvo que se haya producido la mutación, en cuyo caso mueren. El test consiste en determinar el número de machos supervivientes (genotipo salvaje) en esta última generación. Es un test de aplicación fácil. Si el test con *Drosophila* es positivo podemos considerar con seguridad a la sustancia como mutágena, mientras que con el test de Ames no siempre puede detectarse. Un problema de este test es su excesiva duración (4 semanas).

En conclusión, los tests *in vitro* e *in vivo* a corto término que se proponen para detectar y prever la potencialidad cancerígena de un derivado a partir de un efecto mutágeno están justificados por dos factores: tiempo y coste. Un test a corto plazo puede durar algunos días (bacterias, levaduras) o unas semanas (roedores, *drosophila*) y el coste es muy inferior al de un ensayo a largo plazo en un animal.

Una crítica que se puede hacer a los ensayos *in vitro* es la dificultad para su extrapolación a humanos. Las causas del cáncer son múltiples y la mutagénesis, aun siendo importante, no es la única. Por otro lado, un derivado mutágeno a corto plazo no debe determinar necesariamente un cáncer a largo plazo. Los ensayos primarios de mutagénesis (con bacterias, levaduras y células en cultivo) deben interpretarse con prudencia en caso de ser positivos. Los tests con animales, roedores o *Drosophila* son mucho más fiables y de más ayuda para el «árbol de decisión». Nunca se dará luz verde a un aditivo que determine en *Drosophila* un carácter letal, aunque sea recesivo.

Los ensayos de mutagénesis poseen la ventaja de permitir tomar una decisión en relación con los productos alimentarios sin tener que iniciar ensayos de toxicidad más costosos.

Criterios o parámetros de toxicidad

Para referirnos a la toxicidad de una sustancia o comparar entre sí dos tóxicos necesitamos utilizar ciertos criterios o parámetros de toxicidad que nos den una indicación de la peligrosidad de dichos tóxicos sobre los humanos o cualquier otro organismo. Podemos distinguir tres tipos de parámetros o criterios de toxicidad: índices de toxicidad, límites tolerables de exposición y concentraciones máximas permisibles. Los índices de toxicidad se determinan en el proceso de «evaluación toxicológica» y a partir de ellos se deriva el resto de parámetros de toxicidad.

1. Índices de toxicidad

Son una medida cuantitativa de la toxicidad de una sustancia determinada experimentalmente en animales de laboratorio. Habría que distinguir entre índices de toxicidad aguda e índices de toxicidad para dosis repetidas (toxicidad subcrónica y crónica).

1.1. Índices de toxicidad aguda

El más empleado es la DE_{50} (Dosis efectiva 50) que expresa la cantidad de sustancia, en mg/kg, que en determinadas condiciones experimentales (muy precisas) produce efectos en el 50% de una especie animal determinada. Cuando el efecto buscado es la muerte se habla de DL_{50} (Dosis letal media). Otros índices de toxicidad aguda son la CE_{50} , CL_{50} , CI_{50} (Concentración inhibidora), que hacen referencia a la vía inhalatoria o a otro tipo de ensayos, que en principio no tienen interés en toxicología alimentaria.

La DE_{50} y DL_{50} se calculan mediante métodos gráficos o matemáticos (estadísticos), a partir de las curvas dosis-respuesta (Chan y Hayes, 1989). De forma similar pueden obtenerse los valores de DE_{1} , DE_{99} , DE_{90} , etc. Hay que destacar el hecho de que los valores de toxicidad se

refieren exclusivamente a la vía de entrada (oral, dérmica o respiratoria) y a la especie para la que se han determinado.

Aunque en los últimos tiempos se ha puesto en entredicho la validez y utilidad de la DL_{50} , este parámetro ha sido clásicamente utilizado como criterio de toxicidad a efectos comparativos entre distintos tóxicos. De hecho, la DL_{50} es un criterio utilizado por la Unión Europea para la clasificación y etiquetado de productos químicos como muy tóxicos, tóxicos o peligrosos (Directiva 2001/59/CE, Tabla 5.1).

1.2. Índices de toxicidad para dosis repetidas

En el caso de dosis repetidas el parámetro utilizado es el NOEL (*No observed effect level*) o «Dosis sin efecto» que podríamos definir como la dosis máxima diaria (expresada en mg/kg/día) que no produce efectos observables en el animal considerado (Hallenbeck, 1993, OMS, 1994). Normalmente se considera una exposición crónica (3 meses - 2 años).

Actualmente se prefiere usar el NOAEL (*No observed adverse effect level*) o «Dosis sin efecto adverso observable» que hace hincapié en el hecho de que no produzca efectos que puedan considerarse adversos. Otros índices son el LOEL y LOAEL (*Lowest observed effect level* y *Lowest observed adverse effect level*). El LOAEL se define como la dosis más baja capaz de producir efectos adversos. Estos mismos parámetros se pueden determinar para las concentraciones ambientales de tóxico (por ejemplo, NOAEC, LOAEC, etc.) y de igual manera que en los índices de toxicidad aguda los valores obtenidos dependen de la especie y las condiciones

experimentales utilizadas en el estudio, así como de la vía de entrada del tóxico. Evidentemente para cada «efecto» considerado tendremos unos valores de NOAEL, LOAEL, etc.

El NOAEL es sin duda alguna el parámetro toxicológico más importante ya que sobre él se apoya el cálculo de los límites tolerables de exposición y las concentraciones máximas permisibles. Es por ello que conviene hacer algunas consideraciones sobre el concepto y el cálculo del mismo (Yanes, 2002).

Es importante hacer una observación sobre el cálculo del NOAEL. El NOAEL debe ser, por definición, una de las dosis experimentales **probadas**. Es decir, que a diferencia de la DL_{50} , aquí no podemos hacer una extrapolación a partir de una serie de datos. El NOAEL/LOAEL debe ser una de las dosis usadas en el estudio. En la práctica se determina utilizando una serie de concentraciones decrecientes y se elige aquella que «no produce efectos adversos observables». A veces por mucho que bajemos la dosis siempre obtenemos un efecto adverso, siendo imposible establecer un NOAEL. En esos casos la dosis más baja que produce un efecto adverso se toma como LOAEL. Por lo tanto, el valor del NOAEL o LOAEL es un valor observado que depende del protocolo y del diseño de la investigación. Entre los factores «estudio-dependientes» que pueden influir en la magnitud del valor observado podemos citar la especie, el sexo, la edad, la resistencia y el estado de desarrollo de los animales estudiados, el tamaño del grupo, la sensibilidad de los métodos utilizados para medir la respuesta y la selección de los niveles de dosis, ya que con frecuencia están muy espaciadas, de manera que el valor observado del NOAEL puede ser, en algunos casos, considerablemente

Tabla 5.1. Clasificación de las sustancias químicas de acuerdo con la DL_{50}

CLASIFICACIÓN	DL_{50}	Especie/Vía de administración
Muy tóxico	≤ 25 mg/kg de peso	Rata/Oral
Tóxico	25-200 mg/kg de peso	Rata/Oral
Peligroso	200-2000 mg/kg de peso	Rata/Oral

Tabla 5.2. Resultados de un estudio de 90 días en rata (ejemplo de cálculo de NOAEL/LOAEL)

GRUPO	Dosis (mg/kg/día) durante el periodo de estudio	Resultados
Grupo control	0	No se observan efectos adversos.
Grupo tratado (1)	1	No hay diferencias estadísticamente significativas entre el grupo (1) y el grupo control.
Grupo tratado (2)	5	No hay diferencias significativas entre el grupo (2) y el grupo control.
Grupo tratado (3)	25	Se observan efectos adversos con diferencias significativas respecto al grupo control.

menor que el verdadero «nivel de efecto no adverso» (OMS, 1994).

A continuación se muestra un ejemplo de cálculo de NOAEL/LOAEL (Tabla 5.2). En ese estudio de 90 días sobre el efecto de un tóxico en ratas, se han encontrado los resultados que se indican en la tabla, y se asume que el diseño y ejecución del estudio experimental han sido correctos.

De los datos mostrados en la tabla se deduce que el NOAEL para este estudio es de 5 mg/kg/día, ya que esta es la mayor dosis usada en el ensayo en la que no aparecen efectos estadísticamente diferentes respecto a los controles. El LOAEL para este estudio sería 25 mg/kg/día, al ser la menor dosis que produce un efecto adverso con diferencias estadísticamente significativas respecto a los controles. En este ejemplo podemos ver cómo esta metodología puede dar lugar a errores en la estimación del NOAEL debido al espaciado de las

dosis. En efecto, con los resultados expuestos el NOAEL es de 5 mg/kg/día y la siguiente dosis empleada en el estudio es de 25 mg/kg/día. Como no disponemos de los datos para dosis intermedias (10, 15 y 20 mg/kg/día) es posible que el verdadero NOAEL fuese mayor de 5 mg/kg/día. El mismo error, podría argumentarse respecto al LOAEL.

Otra situación que se puede plantear se muestra con los datos de la Tabla 5.3. En esta todas las dosis empleadas en el estudio originan efectos adversos que presentan diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control. En consecuencia, en este supuesto no se puede establecer un NOAEL y el LOAEL sería de 1 mg/kg/día (la dosis más baja que produce efectos adversos observables).

Otro aspecto digno de discutir es el propio concepto de NOAEL. Clásicamente se ha considerado como un índice de toxicidad de «dosis repetidas», por lo que en principio solo podría

Tabla 5.3. Resultados de un estudio de 90 días en rata (ejemplo de cálculo de LOAEL)

GRUPO	Dosis (mg/kg/día) durante el periodo de estudio	Resultados
Grupo control	0	No se observan efectos adversos.
Grupo tratado (1)	1	Se observan efectos adversos con diferencias significativas respecto al grupo control.
Grupo tratado (2)	5	Se observan efectos adversos con diferencias significativas respecto al grupo control.
Grupo tratado (3)	25	Se observan efectos adversos con diferencias significativas respecto al grupo control.

derivarse de estudios subcrónicos o crónicos (≥ 90 días). En la propia definición se habla de mg/kg/día lo que implica la administración diaria del tóxico durante un periodo de tiempo determinado.

Sin embargo, también encontramos en la bibliografía reciente numerosas referencias a NOAEL agudo y NOAEL subagudo que, en principio, estarían en contra de lo expresado en la definición. No obstante, parece razonable ya que en exposiciones agudas y/o subagudas puede ser interesante conocer la dosis que no produce efecto adverso observable. En definitiva, se trataría de una «dosis sin efecto» que habría que incluir dentro de los índices de toxicidad aguda. La diferencia respecto a otros índices de toxicidad aguda, como se ha dicho antes, estaría en la metodología para el cálculo del índice correspondiente. En consecuencia, sería más correcto cuando se habla de «índices de toxicidad de dosis repetidas» hacer referencia a NOAEL subcrónico/crónico y dentro de los «índices de toxicidad aguda» considerar el NOAEL agudo.

La existencia de NOAEL para distintas condiciones de exposición (aguda, subaguda, subcrónica, crónica) es importante, como se verá en el apartado siguiente, para la derivación de límites tolerables de exposición en las distintas situaciones en que puede verse implicado el consumidor.

De hecho, en la actualidad, la mayoría de las agencias y organismos reguladores adoptan una definición de NOAEL más general: «La mayor concentración o cantidad de una sustancia, determinada experimentalmente o por observación, que no produce efectos adversos observables en el organismo diana bajo unas condiciones de exposición definidas» (OMS, 1994).

2. Límites tolerables de exposición

El límite tolerable de exposición, representa la dosis (expresada en mg/kg/día) de un producto que puede ingresar en el organismo diariamente,

durante toda la vida, sin que resulte perjudicial para la salud.

A partir de los valores experimentales de NOEL (NOAEL) y LOEL (LOAEL) se puede hacer una estimación de los límites de exposición tolerables, en cualquier medio, para humanos (OMS, 1987, 1994, 1999). Hay que tener en cuenta que la presencia de sustancias tóxicas en alimentos, agua y aire es prácticamente inevitable. Por ello y de acuerdo con los índices de toxicidad, es necesario fijar unos límites que garanticen la salud de los humanos y/o otros organismos vivos. Constituyen así la base para hacer una evaluación del riesgo de las sustancias tóxicas.

Estos límites tolerables (permisibles) de exposición son distintos en las diferentes ramas de la toxicología (industrial, alimentaria, etc.) y también varían en su nomenclatura según el organismo internacional que los fija (EPA, FDA, etc.).

Así, por ejemplo, en toxicología alimentaria el criterio básico es la DDA (Dosis Diaria Admisible) conocida también como IDA (Ingesta Diaria Admisible) (OMS, 1987; Derache, 1990).

La DDA es utilizada por la OMS para los pesticidas y aditivos. Se define como «la dosis de un producto que puede ser ingerida diariamente por un individuo durante toda su vida sin riesgo apreciable para su salud». Se expresa en mg/kg/día.

La DDA se fija a partir de ensayos experimentales con animales sobre la toxicidad aguda y crónica (investigando eventuales efectos mutágenos, teratógenos y cancerígenos). Se considera el efecto más sensible en la especie animal más sensible. Se determina la cantidad máxima que dicha especie animal puede ingerir diariamente, durante el tiempo de la experiencia, sin efecto nocivo (NOAEL crónico). Para extrapolar al hombre (que se considera la especie más sensible y vulnerable) se divide la dosis establecida para el animal por 10 y, para incluir las variaciones individuales y los casos especiales (embarazadas, niños, ancianos,...) se divide de nuevo por 10. En definitiva y, de forma gene-

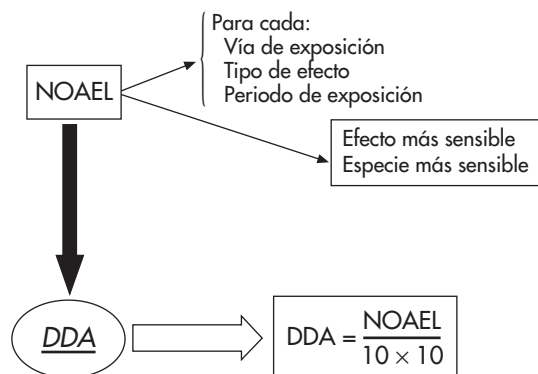


Figura 5.3. Cálculo de la dosis diaria admisible (DDA).

ral, la DDA es la centésima parte del NOAEL (expresada en mg/kg de peso y día) (Figura 5.3). Se usa, por lo tanto un factor de seguridad o incertidumbre para englobar diferencias inter e intraespecíficas.

En caso de no existir datos concluyentes sobre los estudios de toxicidad se pueden usar factores más altos. Así, por ejemplo, el LOAEL se usa cuando no existe un valor de NOAEL, aunque en tal caso se usa un factor de seguridad adicional al hacer los cálculos ($\div 10$). Hay que tener en cuenta que la DDA asume un consumo durante toda la vida, por lo que para el cálculo hay que usar el NOAEL «crónico». Si, por ejemplo, el NOAEL se ha obtenido en un estudio subcrónico (por ejemplo, 90 días) hay que aplicar otro factor adicional de 10 ($\div 10$).

En el ejemplo de la Tabla 5.2, la DDA se obtendría dividiendo el valor del NOAEL (5 mg/kg/día) por 1.000 (10 por las diferencias inter-específicas, 10 por las diferencias intraespecíficas y un factor adicional de 10 por tratarse de un estudio subcrónico). Así $DDA = 5/1.000 = 0,005$ mg/kg/día. Si consideramos los datos de la Tabla 5.3, donde no se ha podido establecer un NOAEL, la DDA se obtendría dividiendo por 10.000 el valor del LOAEL (100 por las diferencias intra e interespecíficas, 10 por tratarse de un estudio subcrónico y otro factor adicional de 10 por utilizar el LOAEL). En este ejemplo (Tabla 5.3) la $DDA = 1/10.000 = 0,0001$ mg/kg/día.

Por su parte la OMS utiliza la TDI (*Tolerable Daily Intake* o «Ingesta Diaria Tolerable»)

(OMS, 1987) para los contaminantes en general tanto en alimentos como en el agua de consumo. Estos valores pueden ser definitivos o provisionales en función de los conocimientos científicos sobre el tóxico en cuestión existiendo a su vez dos modalidades: PMTDI (*Provisional Maximum Tolerable Daily Intake* o «Ingesta Máxima Diaria Tolerable Provisional») para contaminantes no acumulativos y PTWI (*Provisional Tolerable Weekly Intake* o «Ingesta Semanal Tolerable Provisional») para tóxicos acumulativos como es el caso de los metales pesados.

Otros límites tolerables de exposición equivalentes a la DDA son la RfD (Dosis de referencia) que emplea la EPA (Environmental Protection Agency, USA) para contaminantes en general (Peña *et al.*, 2000) y los MRL (*Minimal Risk Level* o Nivel de Riesgo Mínimo) que utiliza la ATSDR (*Agency for Toxic Substances and Disease Register*, USA) (ATSDR, 1992). Tanto las TDI como las RfD y MRL se calculan de acuerdo con los principios generales indicados en la DDA y se expresan en mg/kg de peso/día.

Todo lo dicho con anterioridad es válido para los tóxicos no cancerígenos. Los agentes cancerígenos representan un caso especial, en el que no se pueden aplicar los mismos criterios a la hora de establecer valores de referencia (límites tolerables de exposición y concentraciones máximas permisibles). En primer lugar hay que distinguir los cancerígenos «no genotóxicos» y los «genotóxicos». A los primeros, aquellos que no afectan al material genético, se puede aplicar todo lo dicho para los agentes no cancerígenos, es decir, la DDA como nivel de seguridad para el consumidor. Sin embargo, en los cancerígenos genotóxicos, llamados así por actuar directamente sobre el material genético, se considera que no hay dosis libre de riesgo y por lo tanto cualquier dosis, por mínima que sea, puede tener consecuencias a largo plazo sobre la salud del consumidor (tolerancia cero). Resulta evidente que la única manera de salvaguardar la salud del consumidor sería evitando la presencia de estos contaminantes en los alimentos, situación que, en la mayoría de los casos, resulta totalmente imposible.

En la práctica, la evaluación de los agentes cancerígenos (Peña *et al.*, 2000) se hace de acuerdo con el «peso de la evidencia» que implica su calificación como cancerígeno según las clasificaciones de organismos internacionales como la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) u otras como la EPA (Agencia Americana de Protección Ambiental), NTP (Programa Nacional de Toxicología de USA), etc. Además se utilizan dos parámetros: el «Factor de pendiente de cáncer» (*Cancer Slope Factor*, CSF) y la «Unidad de Riesgo de Cáncer» (UR, *Unit Risk*) (Kolluru, 1998).

El *factor de pendiente de cáncer* (CSF, *Cancer Slope Factor*) es un índice de toxicidad que relaciona la dosis con la respuesta genotóxica (Peña *et al.*, 2000). Corresponde al *riesgo por unidad de dosis* (expresada en mg/kg/día). Se calcula a partir de la curva dosis–respuesta representando en ordenadas la probabilidad de que se produzca cáncer y en abscisas la dosis suministrada (dosis diaria vitalicia) (Figura 5.4). Debido a que los datos experimentales normalmente se encuentran en rangos de dosis de una magnitud muy superior a los que puede estar expuesto el hombre en condiciones normales, es necesario extrapolar los resultados observados hacia la región de dosis cercanas a cero (usando diferentes modelos matemáticos). La pendiente de la región linealizada de esta curva es el CSF y sus unidades son $(\text{mg/kg/día})^{-1}$.

Como, en el caso de los cancerígenos se admite que no existe dosis libre de riesgo, la ordenada en el origen es 0, con lo que la ecuación de la recta se simplifica ($y = b \cdot x$), donde «b» representa el CSF, «y» la probabilidad de cáncer y «x» la dosis de exposición vitalicia. Los CSF de muchos tóxicos han sido calculados por la EPA y pueden obtenerse en los perfiles toxicológicos de la ATSDR (www.atsdr.cdc.gov/toxpro2.html; www.epa.gov). De esta forma, el «factor de pendiente de cáncer» permite:

- Asumiendo un riesgo determinado (ej. un exceso de riesgo de cáncer de 1/100.000), establecer las dosis diarias vitalicias (límite tolerable de exposición) de un

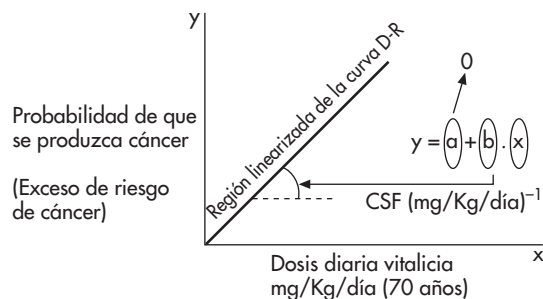


Figura 5.4. Cálculo del factor de pendiente de cáncer (CSF).

cancerígeno que producirían ese incremento de riesgo de cáncer en los consumidores y a partir de las cuales se puede también hacer una estimación de las concentraciones «permisibles» de cancerígenos en el agua y los alimentos.

- Conociendo la dosis de exposición (mg/kg/día) a un cancerígeno hacer una estimación del riesgo de padecer cáncer.

Así por ejemplo, para el arsénico, la EPA ha estimado que la ingestión de por vida de $1 \mu\text{g/kg/día}$ (alrededor de $50\text{-}100 \mu\text{g/día}$ en un adulto) se asocia con un riesgo de cáncer de piel de aproximadamente el 0,1% (1/1.000). Esta dosis es equivalente a consumir agua potable durante toda la vida con una concentración de arsénico de $25\text{-}50 \mu\text{g/L}$. La CMP para el arsénico en agua potable ha sido de $50 \mu\text{g/L}$ (BOE 20/09/1990) hasta finales del 2003 (en la actualidad la CMP ha sido rebajada a $10 \mu\text{g/L}$). Puesto que hay una considerable incertidumbre en el proceso de evaluación del riesgo de cáncer, las estimaciones cuantitativas como el ejemplo anterior son intencionadamente muy conservadoras. Por ello, el riesgo real en la ingestión de las cantidades indicadas en el ejemplo sería probablemente menor de lo estimado, pero nunca mayor.

La *unidad de riesgo de cáncer*, URC (UR, *Unit Risk*) se define como «el riesgo incremental de cáncer por la ingestión de $1 \mu\text{g/L}$ o $1 \mu\text{g/kg}$ de tóxico en el alimento durante toda la vida. En este caso se trata del *riesgo por unidad de concentración* del contaminante en el alimento

(µg/kg o µg/L). Así, por ejemplo, si la URC para el arsénico en agua es de $5 \times 10^{-5} \text{ (}\mu\text{g/L)}^{-1}$, esto indica, aproximadamente, cinco casos de incremento de cáncer por 100.000 en la población expuesta a 1 µg/L de arsénico en el agua durante toda su vida.

De esta forma, la probabilidad (riesgo) de cáncer vendrá dada por la siguiente expresión:

$$\text{Riesgo de cáncer} = \text{Concentración de tóxico} \times \text{URC}$$

Y, si fijamos el riesgo, podemos calcular la CMP para ese tóxico en el alimento.

En definitiva también en el caso de los cancerígenos existe una metodología que permite, fijando un nivel de riesgo aceptable, establecer los límites tolerables de exposición y las concentraciones máximas permisibles en agua y alimentos.

3. Concentraciones máximas permisibles

La concentración máxima permisible (CMP) es la concentración máxima de un tóxico (expresada en mg/kg o mg/L) que se permite en un medio determinado (alimento, agua) (ATSDR, 1992). Como en casos anteriores, reciben distintos nombres en función del organismo que los establece y la rama de la toxicología, considerada. En el caso del agua se conocen como «Valores Guía» (OMS, 1996) y en el caso de pesticidas o residuos de medicamentos veterinarios como «Límites Máximos Residuales» (LRM) (Mestres, 1990). Por su parte, la ATSDR, utiliza las Guías de Evaluación Medioambientales (EMEG, para no cancerígenos y CREG, para cancerígenos) como expresión de las concentraciones máximas permisibles (ATSDR, 1992).

A partir de los valores de la DDA (o cualquiera de los otros parámetros equivalentes) se pueden establecer las Concentraciones Máximas Permisibles (CMP) en un alimento o bebida, que se expresan como mg/kg de producto fresco o por litro de producto líquido. Estos valores se calculan a partir de la DDA teniendo en cuenta

$$\text{CMP} = \frac{\text{Lim. Tolerable expos. (mg/kg/día)} \times \text{Peso (kg)}}{\text{Tasa de ingestión (L/día, kg/día, m}^3\text{/día)}}$$

mg/L (agua)
mg/kg (alimento)

Peso corporal: 70 kg (adulto) y 10 kg (niño)

Consumo: 1L/día (niño); 2L/día (adulto)

Figura 5.5. Cálculo de las concentraciones máximas permisibles.

el peso medio de una persona, la cantidad media ingerida por día y la contribución de ese producto al total de la dieta.

En la Figura 5.5 se muestra la expresión para el cálculo de las CMP, considerando un peso de 70 kg para el adulto y 10 kg para un niño (ATSDR, 1992).

Para el cálculo de las concentraciones máximas permisibles es necesario conocer el consu-

Tabla 5.4. Consumos medios por persona y día.

PRODUCTO	Gramos/día
Cereales	208
Arroz	9
Patatas y féculas	230-250
Citricos	50
Frutos y bayas	150
Verduras	325
VEGETALES (en su conjunto)	240
TOTAL CARNES	295
Músculo	300
Hígado	100
Riñón	50
Grasa	50
Total leche y productos lácteos	343
Huevos	100
TOTAL PESCADOS Y CRUSTÁCEOS	48
Consumo medio en diversos países:	
Suecia	56
EE UU	18
Japón	88
Francia	48
Leche	1,5 L/día
AGUA	1,5-2 L/día

Datos procedentes de OECD, UE y OMS (Adaptado de Mestres, 1990).

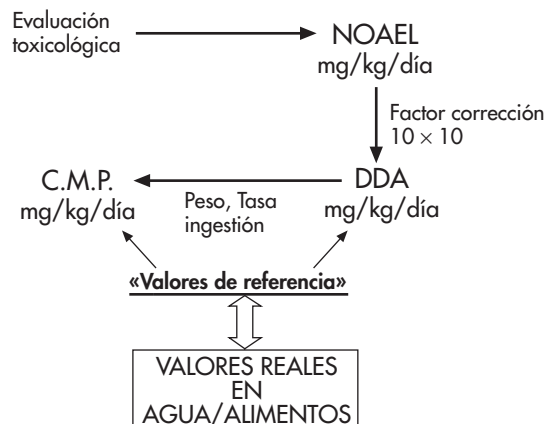


Figura 5.6. Valores de referencia para el análisis de riesgo.

mo diario del alimento en cuestión o de la bebida considerada. Estos datos se pueden obtener de las encuestas de consumo que se realizan en los diferentes países. A modo de ejemplo, en la Tabla 5.4 se muestran los datos de consumo medio para distintos alimentos en la Unión Europea (Mestres, 1990). Para el agua se considera un consumo de 2 L/día para un adulto (ATSDR, 1992).

Los límites tolerables de exposición y las concentraciones máximas permisibles son los valores de referencia que constituyen la herramienta básica para la evaluación del riesgo, como se esquematiza en la Figura 5.6.

Bibliografía

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (1992). *Evaluación de riesgos en salud por la exposición a residuos peligrosos*. U.S. Department of Health and Human Services. Atlanta, Georgia.
- Brusick D (1989). Genetic toxicology. En: Hayes AW (ed.). *Principles and methods of toxicology*, Raven Press, New York, 407-434.
- Chan PK, Hayes AW (1989). Principles and methods for acute toxicity and eye irritation. En: Hayes A. W. (ed.). *Principles and methods of toxicology*, Raven Press, New York, 169-220.
- Derache R (1990). Los tests de mutagénesis a corto plazo. En: Derache R (ed.). *Toxicología y seguridad de los alimentos*, Editorial Omega, Barcelona, 73-88.
- Derache R (1990a). La seguridad alimentaria. Reglamentación europea. En: Derache R (ed.) *Toxicología y seguridad de los alimentos*, Editorial Omega, Barcelona, 475-485.
- Directiva 2001/59/CE. DOCE n.º L225 de 21/08/2001, 1-333.
- Eaton DL, Klaassen CD (1996). Principles of toxicology. En: Klaassen CD (ed.). *Casarett and Doull's Toxicology. The basic science of poisons*, McGraw-Hill, New York, 13-33.
- European Chemicals Bureau (2004). Testing methods and directives. Anex V to Dir. 67/548/EEC. <http://ecb.jrc.it/testing-methods>.
- Glomot R (1990). Estudio toxicológico in vivo. En: Derache R (ed.). *Toxicología y seguridad de los alimentos*, Editorial Omega, Barcelona, 57-72.
- Hallenbeck W (1993). *Quantitative risk assessment for environmental and occupational health*. Lewis Publishers, Boca Raton.
- Koeman JH (1996). Introduction to nutritional toxicology. En: Niesink RJM, de Vries J, Hollinger MA (eds.). *Toxicology. Principles and applications*, CRC Press, Boca Raton, 1045-1053.
- Kolluru RV (1998). Evaluación de riesgos para la salud: principios y prácticas. En: Kolluru RV, Bartell SM, Pitblado RM, Stricoff RS (eds.). *Manual de evaluación y administración de riesgos*, McGraw-Hill, México, 4:3-4:68.
- Manson JM, Kang YJ (1989). Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. En: Hayes AW (ed.). *Principles and methods of toxicology*, Raven Press, New York, 311-359.
- Mestres R (1990). El análisis de los residuos tóxicos, su interés y sus límites; ejemplos de residuos de pesticidas. En: Derache R (ed.). *Toxicología y seguridad de los alimentos*, Editorial Omega, Barcelona, 89-107.
- Miller SA (1991). Food additives and contaminants. En: Amdur MO, Doull J, Klaassen CD (eds.). *Casarett and Doull's Toxicology. The basic science of poisons*, Pergamon Press, New York, 819-853.
- Mosberg AT (1989). Subchronic toxicity testing. En: Hayes AW (ed.). *Principles and methods of toxicology*, Raven Press, New York, 221-236.
- OECD (2003). OECD Guidelines for the testing of chemicals. Overview of currently available test gui-

- delines. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris. www.oecd.org/document.
- OMS (1958). *Métodos de ensayo toxicológico de los aditivos alimentarios*. Segundo Informe del Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios. Ginebra.
- OMS (1987). Principles for the safety assessment of food additives and contaminants in food. *Environmental Health Criteria 70*. Geneva: International Programme on Chemical Safety in cooperation with the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), World Health Organization. Geneva.
- OMS (1994). Assessing human health risks of chemicals: Derivation of guidance values for health-based exposure limits. *Environmental Health Criteria N.º 170*. Geneva.
- OMS (1996). *Guidelines for drinking-water quality*. Vol. 2. Health criteria and other supporting information. Geneva.
- OMS (1999). Principles for the assessment of risks to human health from exposure to chemicals. *Environmental Health Criteria N.º 210*. Geneva.
- OMS (2000) Human exposure assessment. *Environmental Health Criteria N.º 214*. Geneva.
- OMS (2000a) Guidelines for the preparation of toxicological working papers for the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). International Programme on Chemical Safety. Geneva.
- Peña CE, Carter DE, Ayala-Fierro F (2000). Toxicología ambiental. Evaluación de riesgos y restauración ambiental, Universidad de Arizona. <http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb/>
- Pitot HC, Dragan YP(1996). Chemical carcinogenesis. En: Klaassen CD (ed.). *Casarett and Doull's Toxicology. The basic science of poisons*, McGraw-Hill, New York, 201-267.
- Robens JF, Piegorch WW (1989). Methods of testing for carcinogenicity. En: Hayes AW (ed.). *Principles and methods of toxicology*, Raven Press, New York, 251-273.
- Stevens KR, Gallo MA (1989). Practical considerations in the conduct of chronic toxicity studies. En: Hayes AW (ed.). *Principles and methods of toxicology*, Raven Press, New York, 237-250.
- Yanes L (2002). Límites de exposición ocupacional y ambiental: una visión crítica. *Salud de los Trabajadores* 10 (1-2): 63-91.
- Zenick H, Clegg ED (1989). Assessment of male reproductive toxicity: a risk assessment approach. En: Hayes AW (ed.). *Principles and methods of toxicology*, Raven Press, New York, 275-309.

LA APLICACIÓN DE PROCEDIMIENTOS *IN VITRO* EN LA EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA ALIMENTARIA

Guillermo Repetto, Ana del Peso, Jorge Luis Zurita

La seguridad alimentaria. Métodos alternativos. Modelos experimentales *in vitro*. Validación y aceptación: ¿Para qué fin? Detección de toxinas alimentarias. Detección de otros compuestos. Estudios de toxicocinética, metabolismo e interacción. Toxicidad aguda. Corrosividad e irritación. Fototoxicidad. Inmunotoxicidad. Toxicidad sobre la reproducción. Disrupción endocrina. Genotoxicidad y carcinogenicidad. Toxicidad a largo plazo y de órgano diana. Futuro ¿o presente de las alternativas? Bibliografía

La seguridad alimentaria

La preocupación actual por los problemas alimentarios se confirma con la publicación por la Comisión de las Comunidades Europeas del *Libro Blanco sobre Seguridad Alimentaria (UE, 2000)*. La política de seguridad alimentaria en Europa se basa en una aproximación global, integrada del análisis del riesgo a través de la cadena alimentaria, es decir, «desde la granja hasta la mesa».

El análisis del riesgo tiene tres componentes principales: evaluación del riesgo (revisión científica y análisis de la información), gestión del riesgo (regulación y control) y comunicación del riesgo (Smith, 2002; Repetto *et al.* 2004a). La evaluación del riesgo comprende la identifica-

ción del peligro, la caracterización del peligro, la evaluación de la exposición y la caracterización del riesgo.

Según el Codex General Estándar para Contaminantes y Tóxicos en Alimentos, para poder evaluar los niveles máximos de contaminantes en los alimentos es necesaria información al menos sobre los siguientes aspectos: identificación de la sustancia, metabolismo en humanos y animales, toxicocinética y toxicodinámica, información sobre toxicidad aguda y a largo plazo en animales y humanos, incluyendo datos epidemiológicos, y conclusiones de expertos toxicológicos, con referencias, incluyendo información sobre grupos vulnerables de población o animales.

Hasta ahora la mayoría de los datos toxicológicos para la evaluación del riesgo se obtienen en estudios en animales, suplementados con

investigaciones *in vitro* para ayudar en la interpretación mecanicista de los resultados.

Los estudios *in vivo* pretenden identificar el principal efecto tóxico y el nivel de exposición que no provoca efectos adversos (NOAEL). La ingesta diaria admisible (IDA) se calcula dividiendo el NOAEL por unos factores de incertidumbre que tratan de compensar la incertidumbre de la extrapolación de los resultados desde los animales al hombre, y la variabilidad interindividual entre humanos. La IDA representa la cantidad de un compuesto que puede ingerirse diariamente durante toda la vida sin riesgo apreciable para la salud.

En esta estrategia es preciso que las dosis ensayadas en los animales sean mucho mayores que los niveles esperados de exposición en humanos. Ello se realiza añadiendo el compuesto al alimento del animal, por ejemplo para los aditivos alimentarios (Smith, 2002). Sin embargo, es técnicamente imposible usar dosis altas para macroconstituyentes de la dieta, ya que se producirían efectos tóxicos por alteraciones nutricionales (Munro *et al.* 1996).

Para la FDA ha sido necesario revisar el procedimiento de evaluación de la seguridad alimentaria, ya que los avances en la tecnología y nutrición han provocado la introducción de nuevos alimentos y sustancias que no encajan en el modelo tradicional (Raiten, 1999). Además de la alta exposición prevista para estos materiales, que complica los ensayos de evaluación de alimentos completos en animales, la identificación y aplicación de factores de seguridad es más compleja, ya que no se pueden ensayar dosis mucho más altas que la verdadera exposición prevista si es mayor del 0,1% en la dieta; la complejidad en la composición de los nuevos productos dificulta su evaluación; y el potencial para producir efectos en humanos que no sean reproducibles o detectables en animales complica aún más la evaluación.

Por ello deben combinarse las aproximaciones existentes con nuevas alternativas. Para evitar tener que recurrir a utilizar más estudios en humanos, se presenta una gran oportunidad para la aplicación de sistemas *in vitro*. Los probables

avances científicos permitirán el desarrollo de una nueva generación de estrategias de métodos *in vitro* de fundamento mecanicista para la caracterización del peligro que puedan emplearse en la evaluación del riesgo (Eisenbrand *et al.* 2002).

Recientemente han sido publicados por Gleit *et al.* (2003) dos ejemplos de la aplicación de procedimientos *in vitro* en la aplicación en la evaluación inicial de alimentos funcionales. Para ello, extractos acuosos de té verde y de zanahorias negras fueron evaluados usando las células de colon humano HT29 clone 19A. Los extractos redujeron la viabilidad y proliferación celulares y causaron alteraciones al ADN. Con excepción de la cianidina, ninguno de los componentes protegió las células frente a peróxido de hidrógeno. Se demuestra la utilidad de procedimientos *in vitro* para explorar los efectos citotóxicos y protectores.

Métodos alternativos

La evaluación de la seguridad y eficacia de compuestos utilizados como aditivos alimentarios, plaguicidas, medicamentos, cosméticos, o compuestos industriales ha supuesto una de las grandes áreas de impulso de los métodos alternativos al empleo de animales en experimentación. Los métodos utilizados en experimentación, ensayo y enseñanza están en continuo progreso ya que los investigadores están en permanente búsqueda de posibles alternativas que mejoren la calidad de su trabajo. Ello es debido, en parte, a la lógica evolución de los conocimientos científicos y de sus aplicaciones tecnológicas, y en parte, a consideraciones éticas, logísticas, económicas, sociopolíticas y legales. (Tabla 6.1).

Los tres principios básicos que identifican el amplio concepto de *métodos alternativos*, también conocidos por las letras iniciales, las «tres erres», son: *reemplazo* de los procedimientos que emplean animales por otros que no los precisen como las técnicas *in vitro*, *reducción* en el núme-

Tabla 6.1. Métodos experimentales alternativos.**1. Evitar la repetición innecesaria de experimentos *in vivo* e *in vitro*:**

Protocolos y estudios previos:

Disponibilidad de la información, intercambio.
Flexibilidad. Estrategias integradas.**2. Modelos predictivos:**

Cinética ambiental de compuestos químicos.

Fármaco-toxicocinética (PB-PK).

Relación Cuantitativa Estructura-Actividad (QSAR).

3. Mejoras en el diseño de estudios animales:

Reducción: número de animales usados.

Refinamiento: minimización del dolor y «distres»;
nuevos modelos.**4. Uso de organismos inferiores no protegidos:**Bacterias, hongos, protozoos, algas, plantas, animales
invertebrados.**5. Vertebrados en etapas iniciales de desarrollo:**

Peces, anfibios, reptiles, pájaros, mamíferos.

6. Métodos *in vitro* :Organos: baños, perfusión, cultivo, cortes, órganos
reconstituidos.

Explantes, reagregados celulares, micromasas, cocultivos.

Cultivo primario de células dispersadas.

Líneas celulares/transgénesis.

Sistemas libres de células.

7. Otros:Estudios en humanos: voluntarios, epidemiológicos,
vigilancia.Modelos en la enseñanza y formación: modelos
mecánicos, sistemas audiovisuales, y simulaciones por
ordenador y de realidad virtual.

ro de animales utilizados y *refinamiento* de los métodos usados. Por ello, los métodos alternativos comprenden desde evitar la repetición de experimentos innecesarios con animales y la mejora en su diseño para disminuir el estrés y sufrimiento, los estudios en humanos, el empleo de técnicas *in vitro* y el uso de modelos teóricos y modelos matemáticos, hasta el empleo de sistemas visuales y de realidad virtual.

El desarrollo de los *métodos in vitro* ha sido espectacular en estos últimos tiempos, tanto por la gran evolución de métodos moleculares, como por las facilidades actuales para el uso de cultivos celulares y cultivos de tejidos. En la Tabla 6.2 se reflejan algunas de sus ventajas de interés en

relación con aplicaciones alimentarias (Eisenbrand *et al.* 2002). Entre los avances producidos en los métodos experimentales *in vitro* pueden destacarse los derivados de mejoras en los cultivos, incluyendo el empleo de factores de crecimiento, matrices, cocultivos y microagregados. Mención aparte merecen los modelos manipulados genéticamente, cuya aplicación multiplica enormemente nuestras expectativas, facilitando la comprensión de los mecanismos de acción.

Tabla 6.2. Principales ventajas de los procedimientos *in vitro*.

- Proporcionan un medio efectivo y rápido para la selección (*screening*) y clasificación de los compuestos.
- Permiten el desarrollo en sistemas humanos de evaluaciones basadas en los mecanismos.
- Proporcionan herramientas importantes para incrementar nuestro conocimiento de los efectos tóxicos a nivel celular y molecular.
- Son puentes esenciales entre los animales de experimentación y los humanos.
- Proporcionan sistemas bien definidos para estudiar las relaciones estructura-actividad.
- Permiten investigaciones de tejido diana que no pueden realizarse adecuadamente por otros métodos, como:
 - Análisis en profundidad de los mecanismos de toxicidad a los niveles molecular y celular, y de las respuestas iniciales y adaptativas.
 - Identificación de los cambios moleculares claves implicados en la toxicidad, permitiendo el desarrollo de biomarcadores de efecto.
 - El análisis detallado de las consecuencias toxicológicas de la variación genética de la población.
 - Evaluación de efectos célula-específicos (ejemplo: hígado, corazón, sistema nervioso, inmunitario), y cuando es posible, tejido-específicos (ejemplo, embrionarios).
 - Establecimiento de la naturaleza de las relaciones concentración efecto y de la existencia de umbrales específicos de efectos en células de diferentes especies y tejidos.

Modelos experimentales *in vitro*

La configuración de los modelos experimentales empleados *in vitro* se fundamenta en dos pilares básicos, que son el sustrato biológico y

los indicadores de toxicidad. El *sustrato biológico* es el material generalmente orgánico, vivo o no, sobre el que se aplica *in vitro* el xenobiótico, y cuyas reacciones ante tal estímulo queremos comparar con las de los animales superiores y posteriormente extrapolar al hombre. Estas alteraciones se valoran mediante los denominados *indicadores de toxicidad*, que son los parámetros que determinamos para cuantificar las modificaciones producidas en la estructura o fisiología de los componentes del sustrato de ensayo. El valor predictivo del modelo experimental *in vitro* dependerá de la buena conjunción entre su sustrato biológico y los indicadores de toxicidad aplicados, aunque también presentan gran transcendencia el protocolo utilizado para la exposición al tóxico y el procedimiento empleado para evaluar la significación estadística de los resultados. En los estudios de toxicocinética se investigan los compuestos y sus metabolitos en lugar de las alteraciones producidas, como se expondrá posteriormente.

El diseño de un modelo experimental *in vitro* supone la asociación armónica de cada uno de estos factores para obtener un sistema a microescala que permita predecir un determinado tipo de efecto tóxico. En teoría, es prácticamente ilimitado el número de modelos posibles, ya que existen muy diferentes posibilidades de sustrato biológico, sobre los que pueden estudiarse muy diversos marcadores de toxicidad.

1. Sustratos biológicos empleados *in vitro*

Las alternativas biológicas al uso de animales superiores vivos para el estudio de la toxicidad producida por los compuestos químicos son muy variadas (Repetto y Repetto, 1995). Entre ellas figuran el uso de invertebrados (Repetto *et al.*, 1988), microorganismos, plantas, microalgas y preparaciones *in vitro*.

Para incrementar la capacidad predictiva de los efectos en humanos utilizando modelos experimentales *in vitro* se está aumentando la

complejidad de los sistemas mediante el empleo de cortes de tejidos o cultivos con diferentes tipos celulares, o alargando los periodos de exposición mediante bioreactores. El empleo de sistemas transgénicos resulta también muy útil. La aplicación de modelos más completos y con capacidad metabolizadora permite estudios cinéticos y metabólicos, además de predecir la influencia de los polimorfismos genéticos.

2. Indicadores de toxicidad empleados *in vitro*

Para el estudio *in vitro* de los efectos tóxicos de los compuestos químicos, hemos de considerar dos tipos de mecanismos, referidos como citotoxicidad general y citotoxicidad organoespecífica. En primer lugar, los mecanismos de *citotoxicidad general* se deben a las interferencias producidas por un xenobiótico o sus metabolitos, sobre los procesos basales comunes a la mayor parte de las células del organismo. La toxicidad *organoespecífica*, por su parte, concreta la existencia de órganos que son diana para ciertos tóxicos y explica la mayor susceptibilidad y sensibilidad de estos. A su vez, puede deberse a modificaciones de la actividad basal de células especializadas, como ocurre con los inhibidores de la división celular, que manifiestan sus efectos de forma más severa sobre la médula ósea debido a que es un tejido con una alta velocidad de reproducción; o pueden alterar mecanismos celulares exclusivos de ese órgano o sistema, como por ejemplo la neurotransmisión.

En muchos casos, la toxicidad organoespecífica en humanos aparece causada por mecanismos de citotoxicidad basal inducidos por la distribución de los compuestos en el correspondiente órgano. Además, la citotoxicidad basal es un mecanismo común de toxicidad general que no está restringido a altas dosis, y que puede ser también causa de efectos tóxicos leves (Ekwall y Ekwall, 1988).

Por todo ello, para evaluar la capacidad tóxica y los mecanismos por los que actúan los compuestos tóxicos se emplea una gran diversidad

de determinaciones y ensayos para cuantificar diferentes bioindicadores, que investigan desde cambios morfológicos hasta bioquímicos y moleculares (Bottrill, 1998).

Se han producido numerosos avances tecnológicos que han incrementado la especificidad y sensibilidad de los biomarcadores empleados, incluyendo los bioquímicos, morfológicos y electrofisiológicos. Las técnicas de biología molecular nos permiten conocer la expresión de diversos genes y la trascendencia de su alteración. Se están aplicando los avances de la proteómica y genómica, con el apoyo de la bioinformática, en la detección y cuantificación de efectos mucho menos aparentes. Todo ello, además, puede realizarse en nuestros días con un alto grado de robotización, lo que incrementa la productividad y repetitividad de los ensayos. (Tabla 6.3).

El diagnóstico molecular juega un importante papel en la seguridad alimentaria. La tecnolo-

gía de *microarrays* de ADN ofrece una nueva dimensión de la profundidad en el diagnóstico molecular permitiendo el análisis simultáneo de un gran número de genes. La automatización del ensayo y las herramientas bioinformáticas la convierten en una técnica robusta (Liu-Stratton *et al.* 2004).

Validación y aceptación: ¿para qué fin?

La comunidad científica admite sin reservas la utilidad y los resultados obtenidos por diversos procedimientos *in vivo* e *in vitro* en la investigación básica o aplicada de los efectos farmacológicos, fisiológicos, de los mecanismos toxicodinámicos, de los procesos toxicocinéticos, etc.

Sin embargo, para que los datos toxicológicos suministrados por un método experimental puedan ser utilizados para la evaluación del riesgo/peligro y el *registro* de un nuevo alimento, aditivo, compuesto químico, medicamento, fitosanitario, etc., o para el *control medioambiental*, se requiere que su protocolo haya sido previamente *validado* científicamente y *aprobado* por las autoridades reguladoras.

La *validación* es el proceso por el que se establece la reproducibilidad y relevancia de ese procedimiento para un determinado propósito. No se trata solo de una comprobación intralaboratorio, sino de un largo proceso que incluye el ensayo de compuestos codificados en varios laboratorios para demostrar su utilidad, generalmente en comparación con otro ensayo en animales incluido en las normativas.

La *aceptación* por las autoridades reguladoras de un nuevo procedimiento consiste en su aprobación e inclusión en las recomendaciones y normativas, tanto nacionales, como multinacionales (OCDE, UE), lo que le confiere validez para su aplicación en estudios de valoración del

Tabla 6.3. Bioindicadores usados *in vitro*.

1	Morfología celular y tisular	Forma, tamaño, diferenciación membranas, organelas.
2	Viabilidad celular	Colorantes, adhesión, fagocitosis.
3	Proliferación celular	Proteínas, ADN, ciclo celular.
4	Actividad Metabólica	Sustancias reguladoras. Uso de la energía, enzimas, bioluminiscencia. Calorimetría. Síntesis de macromoléculas. Inducción selectiva de proteínas.
5	Citoesqueleto/ Membranas	Composición y estabilidad. Permeabilidad iónica. Sistemas de transporte.
6	Sistemas de señalización	GJIC, citocinas.
7	Acidos nucleicos	Expresión/inhibición genes. Mutación/degradación/apoptosis.
8	Sistemas biotransformadores	MFO, P450.
9	Sistemas de defensa	GSH, G6PDH, metalotioneínas.
10	Indicadores específicos	SN, hígado, sistema inmune, sistema reproductor

riesgo. En la progresión de nuevos ensayos desde su concepción hasta su aceptación reguladora pueden considerarse actualmente cinco fases: desarrollo del ensayo, prevalidación, validación, evaluación y progreso hacia su aceptación reguladora (Balls *et al.* 1995; Repetto, 1995).

Para otros objetivos toxicológicos o no, diferentes de la valoración del riesgo, los métodos experimentales no han de seguir este proceso complicado y sobre todo lento de validación y aceptación reguladora, ya que pueden utilizarse las técnicas que sean consideradas útiles por quien las emplea.

La gestión de los riesgos asociados al uso de las sustancias químicas industriales en la Unión Europea se basa en la Directiva 67/548 de la Comisión sobre clasificación embalaje y etiquetado de sustancias peligrosas, sobre la base de los peligros potenciales intrínsecos que la sustancia puede producir. Los métodos de ensayo estandarizados y legalmente válidos de la UE para determinar las propiedades intrínsecas de las sustancias químicas se publican en el Anexo V de la citada Directiva. La lista de procedimientos del Anexo V y la lista de las directrices de la *Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OECD)* coinciden aproximadamente en un 80%.

En la Unión Europea, la coordinación del desarrollo de nuevos ensayos y la puesta al día de los existentes, corresponde a la Oficina Europea de los Productos Químicos (European Chemicals Bureau, *ECB*). Para impulsar el proceso de validación de nuevos procedimientos, la UE creó en 1991 el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (*ECVAM*), situado también en el Centro Común Europeo de Investigación en Ispra (Italia). El centro norteamericano de validación, denominado *Comité Coordinador Interagencias para la Validación de Métodos Alternativos (ICCVAM)* ha centrado su actividad en revisar los resultados de estudios de validación patrocinados por otras instituciones, ya que el Programa Nacional de Toxicología no ha aportado fondos para la validación.

La inminencia de la entrada en vigor de la prohibición de la experimentación animal en la evaluación de cosméticos ha tenido efectos estimulantes tanto en los científicos como en las empresas afectadas para intentar disponer de tecnologías alternativas. Así mismo, la Comisión Europea, a través de sus programas y organismos, incluyendo el Centro para la Validación de Métodos Alternativos, ha promovido la realización de proyectos de desarrollo, optimización y validación de métodos. A pesar de que no fue posible cumplir los plazos iniciales, sí se han producido importantes avances en áreas relacionadas con la evaluación de productos, incluyendo la validación de procedimientos *in vitro* para evaluar la corrosividad, fototoxicidad o absorción percutánea.

En la evaluación de la seguridad tóxica de los alimentos ha de tenerse presente que se incluyen compuestos naturales como fitotoxinas y micotoxinas; compuestos introducidos deliberadamente en la cadena alimentaria, como aditivos alimentarios, plaguicidas y otros fitosanitarios, aditivos de los piensos animales y medicamentos veterinarios; contaminantes; micronutrientes y suplementos nutricionales; macronutrientes; alimentos completos; nuevos alimentos; compuestos derivados del procesado de los alimentos; y organismos modificados genéticamente. Esto implica que estén regulados por una gran variedad de legislaciones y que existan muy diversas áreas de la toxicología alimentaria en las que pueden emplearse procedimientos *in vitro*. A continuación se revisan algunos de ellos.

Detección de toxinas alimentarias

Existen una gran variedad de toxinas, es decir de compuestos tóxicos generados por seres vivos, que pueden ser vehiculizadas por los alimentos y provocar diversos cuadros toxicológicos muy graves que van desde parálisis, amnesia, hepatotoxicidad, hasta alteraciones gastrointestinales.

Es preciso prevenir el consumo de los alimentos y el agua posiblemente contaminados, y a la vez es necesario efectuar el diagnóstico diferencial de urgencia ante casos de intoxicación, ya que en la mayoría de los mismos no existen antídotos específicos.

A pesar del gran desarrollo experimentado por las técnicas de análisis químico, los bioensayos son todavía las técnicas de referencia en el control sanitario de un gran número de toxinas con implicaciones en el ámbito de la salud pública, representando en muchos casos la base única o principal del control analítico de este tipo de productos (Leira, 2004).

Las principales ventajas del empleo de procedimientos biológicos o funcionales en la detección de compuestos químicos son su simplicidad y el amplio espectro de cobertura. Sin embargo, los bioensayos en mamíferos presentan inconvenientes éticos por el empleo de animales, tienen una alta tasa de variabilidad interlaboratorio e intralaboratorio, sensibilidad y precisión bajas, posibles interferencias asociadas a sustancias co-extraídas a partir de las matrices analizadas, y protocolos de análisis muy diferentes entre países. Por estas razones se está aplicando un gran esfuerzo que persigue la validación y armonización de los procedimientos.

Las Directivas europeas específicas de diferentes alimentos recogen criterios generales relativos a la «ausencia de compuestos tóxicos». Sin embargo, existen dos Directivas que tratan de forma específica las biotoxinas marinas (Directivas 91/493 y 91/492), que fijan las normas sanitarias aplicables a la producción y puesta en el mercado de productos pesqueros y moluscos bivalvos, respectivamente), y establecen límites máximos y métodos de control para las toxinas DSP y PSP. Sin embargo, son bastante ambiguas en lo relativo a las técnicas de control, especificando únicamente que «el método de referencia será biológico» sin definir un protocolo concreto.

Se describe a continuación la aplicación de ensayos *in vivo* e *in vitro* en el ámbito del control sanitario y el diagnóstico de la intoxicación por diversas toxinas alimentarias.

1. Toxinas botulínicas

La intoxicación alimentaria por toxinas botulínicas sigue presentándose hoy día por diferentes cepas de *Clostridium botulinum*, y exige un diagnóstico de urgencia para el tratamiento de los pacientes con parálisis flácida con fallo respiratorio. El bioensayo en ratón es el único método con reconocimiento internacional para su control. La inoculación intraperitoneal de extractos de las muestras a ratones provoca erizamiento del pelo, disnea, retracción abdominal, parálisis progresiva y muerte. Aunque es una técnica sensible, que detecta todas las toxinas botulínicas, es lento y exige se realicen pruebas de neutralización paralelas con antisueros específicos, además de los controles calentados.

Los bioensayos *in vitro* se basan en la actividad proteasa de las neurotoxinas botulínicas, que afecta a diferentes isoformas de 3 proteínas que controlan la unión de las vesículas sinápticas a la membrana plasmática (SNAP-25, sintaxina y sinaptobrevina).

Sheridan *et al.*, (1999) compararon la utilidad del bioensayo *in vivo* con un ensayo *in vitro* basado en la contractilidad de preparaciones del músculo diafragma para evaluar antagonistas frente a la toxina botulínica. Observaron que el ensayo *in vivo* fue más de un orden de magnitud más sensible que el procedimiento *in vitro* cuando se aplicó la toxina botulínica (Ser A). Sin embargo, el ensayo *in vitro* fue tres veces más sensible a la aplicación de antagonistas de la misma que *in vivo*.

2. Toxinas diarreicas de moluscos (DSP)

El *bioensayo* en ratón es el método más ampliamente utilizado para la detección de toxinas DSP. Se observa la supervivencia de tres ratones albinos machos de unos 20 g de peso tras la inyección intraperitoneal de un extracto de los moluscos bivalvos. Este ensayo puede dar lugar a falsos resultados positivos por las interferencias derivadas de la co-extracción de otros compuestos. El empleo del crustáceo *Daphnia magna* es una alternativa *in vivo* 10 veces más sensible que el bioensayo en ratón.

Se han desarrollado varios *ensayos de citotoxicidad* para la determinación de toxinas DSP. El primero se basó en la medición de la liberación de LDH en hepatocitos de rata, que se complementó estudiando los cambios morfológicos, la observación microscópica del daño en células de carcinoma humano (KB), la incorporación de rojo neutro, o la metabolización de MTT.

Diversos *ensayos de inhibición enzimática* aprovechan la acción inhibitoria de las toxinas pertenecientes al grupo del ácido okadaico sobre las subunidades catalíticas de las fosfatasas de proteína PP1 y PP2A. Se han desarrollado ensayos colorimétricos, isotópicos con ^{32}P -fosfohistona como sustrato del enzima, y fluorescentes. Este ensayo se encuentra en fase de validación.

3. Toxinas paralizantes de moluscos (PSP)

El *bioensayo en ratón* constituye el método de mayor difusión para el control de toxinas fitoplanctónicas PSP desde 1965 (AOAC, 1990). Es muy rápido y cuantitativo, pero presenta sensibilidad limitada y se pueden producir falsos negativos por la presencia de sales, y falsos positivos por metales.

En los *ensayos de receptor* se utiliza la competición establecida entre la [^3H]-STX empleada en el ensayo y las toxinas PSP presentes en la muestra por la unión a los receptores específicos de los canales de Na^+ .

Los ensayos de citotoxicidad se basan en la acción antagonista de las toxinas PSP frente, provocando el hinchamiento y muerte celular. Las toxinas PSP bloquean la entrada celular de Na^+ inducida por ouabaína y veratridina. Se ha empleado la línea celular de neuroblastoma de ratón Neuro-2a con indicadores morfológicos, colorimétricos y fluorescentes, en este caso para estudiar los cambios en el potencial de membrana en una línea celular de neuroblastoma humano.

4. Toxina amnésica (ASP)

La técnica de elección es la HPLC, ya que el bioensayo por inyección i.p. en ratón, que es

el método rutinario, es poco sensible para los actuales niveles de seguridad de toxinas ASP (20 $\mu\text{g/g}$), aunque presenta sintomatología patognomónica con rascado de los hombros con las patas traseras a concentraciones de ácido domoico superiores a 40 $\mu\text{g/g}$.

Los ensayos de receptor en micro placa para el análisis de ácido domoico utilizan sinaptosomas de cerebro de rana y [^3H]-ac. kaínico como competidor.

Se ha desarrollado un ensayo de citotoxicidad con cultivos primarios de neuronas cerebelares de rata para la detección del ácido domoico, valorando la metabolización de MTT. Se precisan cultivos primarios neuronales con receptores activos, ya que el potente síndrome ASP por ácido domoico se produce por estimulación de los receptores No-NMDA del sistema nervioso central, potenciando a su vez la acción neurotóxica de otros aminoácidos excitadores que se unen específicamente a los receptores del tipo NMDA.

5. Toxinas de cianobacterias

El bioensayo en ratón continúa utilizándose en algunos laboratorios por ser un método relativamente rápido y estandarizado, diferenciando las neurotoxinas por provocar la muerte más rápidamente y sin las lesiones orgánicas específicas que inducen las hepatotoxinas.

El efecto hepatotóxico de microcistinas y nodularinas, ha sido aprovechado para desarrollar un ensayo de citotoxicidad en cultivos primarios y líneas celulares de hepatocitos, valorando los cambios morfológicos, bioquímicos y la liberación de LDH (Jos *et al.* 2005).

El efecto inhibitorio ejercido por la anatoxina-a(s) sobre la enzima acetilcolinesterasa permite su detección mediante un ensayo de inhibición enzimática. Sin embargo, son mucho más específicos los ensayos de inhibición de fosfatasas de proteína PP1 y PP2A utilizando enzimas comerciales y sustratos colorimétricos o fluorimétricos de la enzima, representando una de las alternativas actuales de mayor solidez para el control de estas toxinas.

6. Ciguatoxinas

El bioensayo en ratón es el método más ampliamente utilizado para el análisis de ciguatoxinas en peces tropicales, si bien constituye una técnica muy poco específica aunque segura desde el punto de vista de protección de la salud pública.

Los ensayos de receptor se basan en la afinidad de las ciguatoxinas por los canales de sodio en preparaciones de membranas de cerebros de rata, evaluando mediante ensayos competitivos con brevetoxinas la tasa de unión a los receptores.

Para detectar toxinas bloqueantes o activadoras de los canales de sodio se utilizan células excitables como las líneas celulares de neuroblastoma de ratón y diferentes agonistas o antagonistas de los canales de sodio (ouabaína, veratridina), evaluando la citotoxicidad mediante MTT. La sensibilidad es cuatro órdenes superior a la del bioensayo en ratón.

Detección de otros compuestos

Existen diferentes procedimientos *in vitro* que pueden emplearse para detectar la presencia de otros tipos de contaminantes en alimentos, agua, etc. El sistema CALUX, de activación química del gen de la luciferasa se basa en dos líneas celulares de hepatoma (Hepa-1c de ratón y H4.IIe de rata) transfectadas con el gen de la luciferasa. Cuando un compuesto presenta afinidad por el receptor Ah (aril hidrocarburo hidroxilasa) se provoca la emisión de luz. Este procedimiento permite detectar cantidades mínimas de organohalogenados (ejemplo: dioxinas), algunos de los cuales presentan grandes dificultades para su determinación analítica por métodos químico-toxicológicos.

La gran preocupación por la presencia casi ubicua de disruptores endocrinos ha generado diversos sistemas *in vitro* para detectarlos, en levaduras y células. El denominado ensayo E, emplea la línea celular humana MCF-7 y permite detectar la presencia de compuestos con acti-

vidad estrógena (y antiestrogénica), ya que estos inducen su proliferación. Un refinamiento de la técnica consiste en la introducción de un gen informador, concretamente de la luciferasa, lo que permite evaluar la respuesta mediante bioluminiscencia.

La presencia de plaguicidas organofosforados o carbamatos puede detectarse mediante ensayos simples de inhibición de la enzima específica acetilcolinesterasa en eritrocitos, células neuronales o extractos de tejidos, o bien de pseudocolinesterasa en suero (Rios *et al.* 2005). La presencia de antibióticos puede comprobarse por inhibición del crecimiento bacteriano, y la de herbicidas en cultivos de algas.

Estudios de toxicocinética, metabolismo e interacción

Independientemente de conocer los efectos y los mecanismos de actuación de los compuestos, es necesario estudiar su toxicocinética y metabolismo para poder efectuar una eficiente evaluación del riesgo. Para cualquier tipo de producto se necesita conocer no solo su absorción y distribución, sino también los cambios que experimenta en esos procesos y la concentración efectiva en los órganos dianas de cada uno de los compuestos. Ello es particularmente importante en el caso de los compuestos presentes en los alimentos, ya que en el propio sistema digestivo empiezan modificaciones importantes que cambian en gran medida, por ejemplo, su capacidad alergizante.

Los estudios de toxicocinética son también útiles para: decidir la profundidad de los estudios toxicológicos, ya que por ejemplo, pueden reducirse si los compuestos no se absorben; la selección de las especies apropiadas de ensayo, niveles de dosis y duración de los estudios de toxicidad; la interpretación y evaluación de otros datos de toxicidad; y la comprensión de los mecanismos de toxicidad (SCF, 2001; Dybing *et al.* 2002).

Aunque los protocolos oficiales de *toxicocinética* solo incluyen todavía estudios *in vivo* (OCDE TG 417, UE B.37), con la excepción de la absorción dérmica, se han desarrollado numerosos procedimientos *in vitro* que se están aplicando de forma rutinaria, no ya como alternativas, sino como procedimientos de elección, por ejemplo en el desarrollo de medicamentos.

Para ello, se están utilizando cada vez más diferentes modelos *in vitro* que permiten obtener una información, que aunque parcial, facilita enormemente el proceso de evaluación del riesgo. Los modelos experimentales se componen de sustratos biológicos, de un protocolo de exposición, y de la determinación en diferentes medios de las concentraciones de las sustancias aplicadas y/o sus metabolitos.

Generalmente los resultados obtenidos a partir de diferentes sistemas se integran, bien en forma aislada o incluidos en esquemas jerarquizados, en *modelos predictivos de cinética y metabolismo*. En la actualidad están perdiendo interés los modelos basados en los datos y la división en compartimientos, ya que son mucho más efectivos los de fundamento fisiológico (PBPK) (Worth y Balls, 2002; Eisenbrand *et al.* 2002). Estos últimos modelos computarizados se basan en dos tipos de parámetros: en primer lugar las diferencias interespecíficas en anatomía y fisiología, como la frecuencia ventilatoria pulmonar; y en segundo lugar, los parámetros específicos del compuesto, como son los coeficientes de partición sangre/tejido, sangre/aire, y los parámetros cinéticos como las constantes de Michaelis Menten, V_{max} y K_m . Con todo ello, es posible la extrapolación ruta a ruta, dosis a dosis y entre especies. Los principales sistemas computacionales de cinética y metabolismo son Meteor, MetabolExpert, Compact y Meta.

Las modificaciones gastrointestinales inducidas en los elementos de la dieta son debidas a muchos elementos de la fisiología gastrointestinal, incluyendo el pH, las enzimas digestivas del estómago, páncreas y borde de los enterocitos, bilis, peristaltismo, periodo de tránsito, fer-

mentación bacteriana y la permeabilidad y absorción intestinal, así como interferencias externas como las matrices de los alimentos. Se han desarrollado muchos modelos *in vitro* para estudiar estos efectos, desde sistemas muy simples con mezclas de enzimas o bacterias, hasta simulaciones complejas de todo el tracto gastrointestinal.

En relación con la alergenicidad de las proteínas de la dieta, en estudios en ratón puede inhibirse la endopeptidasa con aprotinina provocando la inhibición de la habitual inducción de tolerancia ante proteínas. Estudios *in vitro* de estabilidad a pH ácido y de digestibilidad han mostrado que la digestión enzimática de alérgenos puede incluso aumentar su capacidad de unión a IgE (Houben *et al.* 1997).

La *absorción gastrointestinal* solía estudiarse con el método clásico del colon aislado, pero actualmente se investiga en cultivos en monocapa de células de colon Caco-2 crecidas durante 3 o 21 días sobre una membrana semipermeable, lo que permite además estudiar el metabolismo y los efectos. Estas células, al igual que otras líneas celulares intestinales como HT-29 y T 84, se diferencian en cultivo sobre una membrana estableciendo fuertes uniones entre ellas y polarizándose para formar una típica barrera epitelial, que permite diferenciar los efectos de las sustancias sobre su polo apical (o luminal) y el basolateral (Le Ferrec *et al.* 2001).

Para la absorción *pulmonar* se emplean también cultivos en membrana. El paso de la barrera hematoencefálica suele modelarse mediante monocapas de células endoteliales de capilares cerebrales, o células MDCK o CaCo-2 cultivadas en filtros. Aunque los sistemas deben perfeccionarse, una línea celular CaCo que expresa la proteína de resistencia múltiple a drogas 1 (MDCKmdr-1) permitiría distinguir los compuestos que atraviesan la barrera hematoencefálica mediante difusión pasiva de los que precisan transporte activo (Worth y Balls, 2002).

La absorción *percutánea* se cuantifica con membranas dérmicas humanas o de rata en célula de difusión, estudiando la proporción de sustancia que las atraviesa. Este robusto procedi-

miento *in vitro* (OCDE TG 428) fue aceptado en 2002 tras numerosas controversias de índole político y a pesar de que no existía aún un procedimiento validado *in vivo* (TG 427).

El paso de membranas por transporte pasivo es determinado por las *propiedades fisicoquímicas* como la lipofilia (LogP, LogD), pKa, solubilidad y peso molecular. La permeabilidad gastrointestinal se favorece al incrementarse la liposolubilidad de los compuestos, pero se bloquea a partir de un coeficiente de partición octanol/agua de 3000, ya que se impide la solubilidad en el lumen. La capacidad de formar uniones con hidrógeno entorpece el paso de las membranas (Dybing *et al.* 2002). Básicamente la absorción a través de las membranas es óptima si se cumple alguna de las siguientes condiciones (Lipinski *et al.* 1997): peso molecular < 500; log P < 5,0; número de donadores de uniones a hidrógeno < 5; y número de aceptores de hidrógeno < 10.

No debe olvidarse el importante papel y la posible interferencia en los transportadores activos. Entre los transportadores de absorción destacan el transportador de ácidos biliares, los transportadores de péptidos, el de glucosa y el de aniones orgánicos. Entre los transportadores que devuelven al lumen los compuestos absorbidos destacan las bombas dependientes de ATP, la glicoproteína P y las proteínas de resistencia múltiple a drogas 1 y 2 (MRP1 y MRP2)

En relación con la *distribución* de los compuestos a órganos y tejidos, el coeficiente de Partición tejido/plasma (Kp) se cuantifica *in vitro* comprobando la afinidad de lonchas de los diferentes tejidos incubadas con una solución del compuesto, y la unión a macromoléculas como proteínas, enzimas y receptores se investiga por procedimientos clásicos bien establecidos (*binding*) marcando radiactivamente los compuestos (Worth y Balls, (2002).

En las fases de metabolismo y biotransformación, el aclaramiento metabólico intrínseco (CLint), las actividades Km y Vmax de enzimas metabolizadoras, la estabilidad y el perfil metabólico suelen investigarse en hepatocitos (aislados, cultivados o criopreservados) y lonchas. La

utilización de orgánulos (microsomas, S9) ha disminuído, ya que en ellos están poco representados los sistemas biotransformadores en fase II, aunque se ha popularizado el empleo de material hepático humano. Los procedimientos *in vitro* son particularmente útiles para el estudio de los metabolitos formados, lo que permite conocer cuáles son las vías metabólicas predominantes y cuáles de los metabolitos son los realmente activos (Eisenbrand *et al.*, 2002). Por el contrario, en estudios *in vivo* es enormemente compleja la detección de metabolitos de vida muy corta. También se emplean otros tejidos para estudiar la metabolización extrahepática. Para estudiar el aclaramiento renal se emplean lonchas o riñón perfundido, y para la excreción biliar se utilizan membranas canaliculares biliares aisladas.

Un aspecto de gran interés son las *interacciones metabólicas* que diversos compuestos pueden tener entre sí debido a las interferencias en su metabolización, bien por inhibición o inducción enzimática. Los procedimientos *in vitro* son particularmente sensibles para investigar cambios en los citocromos P450 de hepatocitos, lonchas hepáticas o líneas celulares y las modificaciones en la regulación de la expresión, muy difíciles de estudiar *in vivo*. Se investiga prioritariamente la inducción de la expresión génica de los sistemas biotransformadores.

La existencia de *polimorfismos genéticos* en la biotransformación puede investigarse *in vitro* mediante elegantes baterías de células manipuladas genéticamente para expresar diferentes isoenzimas humanas del citocromo P450 o la N-acetiltransferasa (Eisenbrand *et al.* 2002). Con ello se pretende conocer la estabilidad del compuesto, si la toxicidad cambia con la metabolización y cuál es la isoenzima responsable de la biotransformación. Esto permite predecir grupos de riesgo, que difícilmente se identificarían mediante ensayos *in vivo*, conocer las diferencias entre especies y optimizar el diseño de ensayos en animales (selección especie y cepa) y de ensayos clínicos (selección de individuos), además de predecir interacciones estudiando la modificación de la isoenzima.

Toxicidad aguda

Los ensayos de toxicidad aguda pretenden determinar el peligro potencial por una única exposición a un producto por una determinada vía. La evaluación de la letalidad se ha realizado convencionalmente estimando la dosis letal media (DL50), es decir, aquella que provocaría la muerte a la mitad de los individuos de una determinada especie. Este valor se utiliza para la clasificación de los compuestos según su peligro potencial y para seleccionar las dosis en otros tipos de ensayo.

Tras años de crítica, en los que se permitió su determinación aproximada y el empleo de ensayos límites, la OCDE ha sustituido el ensayo de la determinación de *la toxicidad aguda por vía oral* (DL50 según TG 401) por sus tres alternativas *in vivo* (420, 423 y 425). Estos ensayos reducen significativamente el número de animales empleados, y en muchos casos, el dolor y estrés asociado a los mismos. Tras el periodo de un año, que comenzó en julio del 2001, la comunidad reguladora no debería utilizar más el ensayo de la DL50. La UE sigue aproximadamente el mismo calendario.

El método clásico (TG 401, B1) utilizaba varios grupos experimentales tratados simultáneamente con diferentes dosis, y una vez evaluada la mortalidad en cada grupo, se calculaba la DL50, generalmente mediante sistemas Probit. Ha sido prohibido en vertebrados y sustituido por sistemas secuenciales, en los que se ensaya un grupo por etapa, y la dosis se decide según el resultado del grupo anterior. En el método de la *Clase Tóxica Aguda ATC* (TG 423, B1tris) se emplean 3 animales de cada sexo por etapa. En el método *Arriba y Abajo UD* (TG 425) se utiliza un animal por etapa. En el método de la *Dosis Fijada FDP* (TG 420, B1bis) se usan 5 animales por dosis, y se tiene en cuenta cualquier efecto tóxico evidente, además de la muerte. Aunque no es posible calcular exactamente la DL50, sí permite clasificar los compuestos

En relación con los ensayos *in vitro*, se ha propuesto una variedad de procedimientos como alternativas a la DL50. La mayor parte de ellos se fundamentan en la hipótesis de la toxicidad basal (Ekwall y Ekwall, 1988), según la cual la mayoría de los tóxicos provocan toxicidad aguda por interferencia en los mecanismos celulares comunes a la mayoría de las células. Por ello se aplican centenares de indicadores en cientos de modelos experimentales *in vitro*, particularmente líneas celulares.

El Estudio Multicéntrico de Citotoxicidad *in vitro* (MEIC) ha tratado de conocer si es posible predecir la *concentración letal humana* a partir de procedimientos *in vitro* (Ekwall *et al.* 2000). Para ello se seleccionaron los 50 compuestos de los cuales existían mejores datos de toxicidad aguda en humanos, y se invitó a los científicos que lo desearan a que los ensayaran en sus propios modelos *in vitro*. Transcurridos unos años se evaluaron todos los datos obtenidos para los 50 compuestos en 69 modelos, comprobando, en primer lugar, que la correlación entre la concentración letal en humanos y la DL50 en rata y ratón era muy baja ($R^2 = 0,61$ y $0,65$, respectivamente).

Al comparar los datos en humanos con los obtenidos en los diferentes sistemas, se observó que las líneas celulares presentaban una correlación mejor, y particularmente las humanas ($R^2 = 0,74$ de media). A partir de ahí seleccionaron una batería de tres líneas celulares humanas, que una vez compensada para la presencia de la barrera hematoencefálica obtuvo una correlación de 0,83, mucho mejor que la obtenida a partir de animales. Se ha iniciado el programa EDIT (Evaluation-guided Development of New *In Vitro* Test Batteries) que pretende conjuntar la mejor batería posible de ensayos.

Dado que la dosis letal media, el indicador más utilizado en toxicidad aguda suele expresarse en forma de dosis en vez de concentración, existe un gran interés por conocer si es posible predecir la *dosis letal* por vía oral en rata a través de métodos *in vitro*. Para ello, Halle y Gores (1988) prepararon una gran base de datos deno-

minada como Registro de Citotoxicidad. En ella incluyeron 1.912 concentraciones inhibitorias de sustancias seleccionadas de centenares de estudios *in vitro* y las DL50 de 347 compuestos. A partir de esto concluyen que es posible la predicción de la DL50 según los datos obtenidos *in vitro*, ya que la relación viene dada por la siguiente función:

$$\log(\text{DL50}) = 0.435 \times \log(\text{CI50}\times) + 0.625$$

expresados en mmol

En la actualidad se están llevando a cabo diversos estudios de validación para comprobar la utilidad de esta correlación, siendo los resultados preliminares muy esperanzadores. Por lo tanto es muy probable que en un futuro podrá estimarse con fiabilidad la DL50 con cultivos celulares, y que mientras tanto deberían usarse estudios *in vitro* al menos para seleccionar las dosis de inicio de los ensayos para determinar la DL50 *in vivo*.

También se propone una estrategia secuencial con estudios de relación estructura actividad (Worth y Balls, 2002)), seguido de un ensayo de citotoxicidad, y si fuera necesario un ensayo de toxicidad célula-específica.

Corrosividad e irritación

En la evaluación de la *capacidad corrosiva sobre la piel*, cuatro ensayos fueron sometidos por ECVAM a un estudio de prevalidación, y posteriormente a un estudio formal de validación utilizando 60 compuestos de ensayo en tres laboratorios diferentes (Fentem *et al.* 1998). Dos de los ensayos han sido considerados científicamente validados como alternativas para sustituir al ensayo de corrosividad en animales y aceptados reguladoramente: el ensayo de la resistencia eléctrica transcutánea en piel de rata o humana (TER) (TG 430) y el ensayo EPISKIN (modelo de piel humana reconstituida) (TG 431). El ensayo TER identifica correctamente corrosivos y no

corrosivos, y el EPISKIN distingue además entre corrosivos y corrosivos severos. Para corrosividad dérmica, el ensayo de la *resistencia eléctrica transcutánea*, y el procedimiento de *piel humana reconstituida* fueron aceptados por la UE en 2000 (B.40).

Posteriormente el modelo EPISKIN dejó de estar disponible comercialmente, por lo que tras un estudio corto, el Comité Científico Asesor de ECVAM ha aprobado mediante una validación *catch up* la utilidad del modelo de piel humana *epiderm* para distinguir entre compuestos corrosivos y no corrosivos de acuerdo con la UE y la OCDE (2000).

Por su parte, el Departamento de Transporte de Estados Unidos y el de Canadá aceptaron dos ensayos comerciales *in vitro* para clasificar las sustancias de acuerdo con su capacidad corrosiva según la reglamentación de las Naciones Unidas. El método alternativo CORROSI-TEXTM, aceptado en 1993, se basa en el tiempo que precisa un compuesto para destruir una biomembrana que separa dos compartimientos de un frasco, permitiendo el paso de un colorante de un compartimiento a otro. Suministra los resultados en 4 horas. El procedimiento SKIN^{2TM} ZK 1350, aceptado en 1994, se fundamenta en la pérdida de viabilidad, determinada de acuerdo con la reducción de una sal de tetrazolio (MTT), que sufre un cultivo análogo de piel humana a las 24 horas de una breve exposición a la sustancia.

Posteriormente, varias agencias norteamericanas (the Environmental Protection Agency, the Occupational Safety and Health Administration, the Consumer Product Safety Commission) han aprobado el uso del ensayo *in vitro* Corrositex en USA como alternativa de reemplazo al ensayo con conejos. ESAC/ECVAM por su parte apoyó la medida pero indicó los tipos de compuestos para los que no es válido.

También establecieron la UE y OECD (Actualización de la Directriz 404) un protocolo jerarquizado para detectar *corrosivos o irritantes severos sobre ojos y piel*. Tras considerar las propiedades fisicoquímicas, pH y el resultado de ensayos *in vitro* validados, los compuestos pueden ser clasificados directamente como irritan-

tes severos sin llegar a ensayarse en animales. Solo cuando no han resultado irritantes *in vitro* puede pasarse a su ensayo *in vivo*. La inclusión de un sistema predictivo de relación estructura actividad en la primera etapa simplifica en gran medida el procedimiento.

A pesar de que se han realizado seis estudios de validación de procedimientos *in vitro* para irritación ocular, no se han obtenido resultados esperanzadores. Algunos países han aceptado para la evaluación de la irritación ocular producida por cosméticos el ensayo de la membrana corioalantoidea de embrión de pollo (HET-CAM).

Fototoxicidad

En la evaluación de la *capacidad fototóxica*, no existe un método *in vivo* validado ni aceptado, pero se ha aceptado recientemente un ensayo *in vitro* en cultivos de fibroblastos de la línea celular de ratón, 3T3 [OECD, UE B.41, ICC-VAM], que son expuestos a la sustancia ensayada e irradiados o no con luz ultravioleta, para a continuación comparar la captación del colorante vital rojo neutro. En el caso de sustancias fototóxicas se produce un incremento en la toxicidad en las células irradiadas debido a la activación por la luz de la mismas. Este fue el primer ensayo de toxicidad *in vitro*, diferente de genotoxicidad, experimentalmente validado y aceptado para funciones reguladoras (Directiva 2000/33/CE de la Comisión de 25 de abril de 2000 por la que se adapta por 27.^a vez al progreso técnico la Directiva 67/548/CEE, Anexo V). Previamente ECVAM realizó un estudio de validación que demostró la validez del procedimiento con 20 sustancias. El estudio fue criticado por el Comité Científico en Cosmetología y Productos no Alimentarios de la UE porque no se habían incluido suficientes filtros solares. Por ello se realizó un nuevo estudio que demostró la validez del método para los filtros solares, lo que fue también confirmado por ESAC.

Para evaluar la fotomutagenicidad se ha propuesto el uso combinado de un ensayo de mutación bacteriana en *Escherichia coli* y un ensayo de citogenicidad en la línea celular de embrión de hamster chino (CHO), pudiendo incluirse también un ensayo en levaduras.

Inmunotoxicidad

Dentro de las *alteraciones inmunotóxicas* se incluye cualquier alteración que incremente o reduzca la función inmunitaria (Barlow *et al.* 2002). Las reacciones adversas a alimentos no implican necesariamente al sistema inmunitario, y pueden ser de tipo alérgica o de intolerancia. La *respuesta alérgica* consiste en una reacción específica antigénica frente a un compuesto o proteína en individuos predispuestos genéticamente, generalmente con atopia. Las alergias alimentarias se producen por reacciones de hipersensibilidad tipo I y están mediadas por inmunoglobulina E (IgE), aunque también son posibles las mediadas por células. Los sujetos normales desarrollan tolerancia oral ante las proteínas ingeridas. Sin embargo, algunos individuos desarrollan sensibilización ante contacto oral o inhalatorio, induciendo la síntesis específica de IgE y la sintomatología subsiguiente. Entre los productos alergénicos figuran muchos compuestos de bajo peso molecular como medicamentos, compuestos industriales y ambientales, así como grandes moléculas como proteínas alimentarias, vacunas, o medicamentos o alimentos derivados de técnicas recombinantes, anticuerpos y de terapia génica.

Las alergias alimentarias suponen una causa substancial de alteraciones en los humanos. Diferentes sistemas biotecnológicos pueden aplicarse para reducir la antigenicidad de las proteínas presentes en la dieta, por ejemplo para producir fórmulas hipoalergénicas para niños. Además se sintetizan nuevas proteínas. Por razones de seguridad es preciso evaluar su antigenicidad y la posible creación de reacciones

cruzadas ante otras proteínas (Houben *et al.* 1997).

La evaluación de la capacidad alérgica de los alimentos, y sobre todo de los nuevos alimentos supone un importante reto en la evaluación del riesgo de los mismos. Los síntomas de las alergias pueden ser desde leves hasta mortales, según el individuo, y también es variable la dosis necesaria para desencadenar la reacción. Dado que los alimentos genéticamente modificados suelen contener nuevas proteínas, la evaluación de su inocuidad debe incluir una evaluación de la alergenidad de las mismas (García Parrilla y Troncoso, 2004).

Las proteínas capaces de causar reacciones alérgicas cumplen al menos uno de los siguientes criterios, que son los que deben evaluarse: peso molecular entre 10 y 70 kDa, concentración de la proteína intacta en plasma, estabilidad al calor, estabilidad a las condiciones de procesado, estabilidad a las condiciones desnaturizantes ácidas de los jugos gástricos, homología en la secuencia de aminoácidos con alérgenos conocidos y prevalencia en el alimento.

Dado que se considera que los modelos con animales no están aún suficientemente validados para la evaluación de la alergenidad de nuevos alimentos, deberán usarse varios modelos experimentales que incluyan administración oral e intraperitoneal, se deberán estudiar los perfiles de anticuerpos Th1/Th2 y contrastar frente a alérgenos débiles e intensos.

La alergia alimentaria está bien descrita y existen pruebas diagnósticas. Sin embargo, es difícil la predicción mediante estudios animales o *in vitro*. No existe ningún buen modelo animal único para evaluar la alergia alimentaria, ya que debería ser capaz de predecir la capacidad alérgica de un compuesto o proteína teniendo en cuenta sus modificaciones e interacciones con la vía de entrada (Barlow *et al.*, 2002).

Las reacciones de *intolerancia alimentaria* son menos frecuentes y de mecanismos generalmente poco conocidos, por lo que no existen modelos para su predicción (Barlow *et al.* 2002).

Aunque el cobayo es la especie habitual en los estudios de sensibilización, no es la especie

ideal para los estudios inmunotoxicológicos debido al escaso conocimiento sobre su sistema inmunitario y a la limitada disponibilidad de herramientas para su estudio (anticuerpos). El ratón presenta, con demasiada facilidad, tolerancia a la sensibilización enteral. La rata ofrece varias ventajas para estudiar la sensibilización oral. En primer lugar, se conoce muy bien su sistema inmunitario y los efectos de muy diversas sustancias, disponiéndose de herramientas para su estudio. Además, la inducción de inmunotoxicidad mediada por células y las respuestas de IgG antígenoespecíficas son características de la presentación del antígeno, mientras que las respuestas anafilácticas con IgE tienen requisitos específicos (Houben *et al.* 1997). Además, la inducción de tolerancia no ocurre de forma generalizada, al igual que otras características comunes con los humanos.

El ensayo clásico de evaluación de la sensibilización dérmica o en general de antigenicidad se realiza en cobayo (OCDE TG 406, UE B.6). En la versión del test de maximización se realiza la aplicación intradérmica a 15 animales (antes se exigían 30), mientras que en el test del parche ocluido de Buehler la aplicación se realiza tópicamente. Posteriormente se evalúa la respuesta inflamatoria. Para conseguir suficiente sensibilidad, se inyecta el coadyuvante de Freund, que provoca bastantes reacciones adversas.

Para la evaluación de compuestos puros se ha considerado que el ensayo del nódulo linfático local (LLNA) en ratón está científicamente validado y debiera usarse para la evaluación de la capacidad de *sensibilización dérmica* en lugar del ensayo en cobayo, que es más doloroso y estresante, además de emplear más animales (OCDE TG 429). Se cuantifica la proliferación linfocitaria en los ganglios linfáticos a los que drene la zona de aplicación del producto, y se considera que este es alérgico si incrementa la población al menos tres veces con respecto al control. Ha sido aceptado por 4 agencias norteamericanas (the Consumer Product Safety Commission, the Environmental Protection Agency, the Occupational Safety and Health Administration, Food and Drug Administration)

como alternativa al ensayo en cobayo. ESAC/ECVAM también apoyó la preferencia del LLNA sobre el método en cobayo, que debería reservarse para casos especiales (2000).

También se propone el empleo del ensayo en la oreja del ratón (MEST), la liberación de IgE en cultivos expuestos y la aplicación de parches dérmicos en humanos (CAN). Los procedimientos más prometedores *in vitro* son el cultivo de células dendríticas humanas a partir de mononucleares periféricos evaluando la liberación de IL-1 β o la producción de sus ARNm, junto al empleo de modelos de piel humana reconstituida, cultivos de células de Langerhans, cultivos de queratinocitos y cocultivos de células T y células dendríticas.

ECVAM ha propuesto una estrategia para evaluar la capacidad de sensibilización dérmica (Worth y Balls, 2002) que comenzaría por la búsqueda de datos previos sobre el compuesto, seguida de la evaluación de las propiedades fisicoquímicas del mismo y la estimación mediante sistemas predictivos computacionales. A continuación se realizaría un estudio de los parámetros de partición, un ensayo *in vitro* de sensibilización, y finalmente, si no se han podido excluir los efectos, el ensayo de nódulo linfático local.

La Directriz 407 de la OCDE de estudio por dosis repetidas de 28 días fue revisada en 1995 para permitir su uso como primera etapa para detectar efectos inmunotóxicos (Barlow *et al.* 2002). Se incluyó la pesada del timo y el estudio histopatológico de las placas de Peyer, timo, nódulos linfáticos y médula ósea. Para una mejor evaluación se sugirió posteriormente realizar un estudio histopatológico especializado de las células y los órganos linfoides y linfáticos, y en caso de detectar alteraciones, aplicar un ensayo de eritrocitos de carnero. El estudio de 90 días, Directriz 408, puede ser más sensible, no solo por el periodo de exposición, sino también por el empleo de mayor número de animales.

La EPA publicó en 1998 una directriz para detectar la supresión inmunitaria que investiga la respuesta de anticuerpos ante eritrocitos de carnero. Si el compuesto provoca inmunosupresión, se estudia la expresión de marcadores

fenotípicos en sangre o células esplénicas. Si no se produce efecto, se aplica un ensayo funcional para células asesinas (NK-cells).

El National Institute of Public Health and Environment de los Países Bajos sugiere una aproximación en dos etapas (Barlow *et al.* 2002). En la primera se incluyen tests no funcionales como la cuantificación de IgM, IgG, Ig e IgE séricas, el análisis de subpoblaciones linfocitarias en bazo mediante citometría de flujo, y de las circulantes mediante sistemas de activación de fluorescencia celular (FACS), el estudio inmunohistoquímico y análisis morfométrico de los órganos linfoides.

En la segunda etapa se aplicarían tests funcionales de inmunidad humoral como el de aplicación *in vivo* durante 14-28 días de eritrocitos de carnero, que es muy sensible al requerir la cooperación celular, o bien los ensayos de actividad macrofágica, y de inmunidad celular en un ensayo de hipersensibilidad retardada, de la función NK, de la mitogénesis en la serie B o T, de resistencia a patógenos, etc. En muchos casos se estudian *in vitro* células expuestas *in vivo* o directamente *in vitro*.

En los ensayos de desgranulación de mastocitos o basófilos, tras su aislamiento se cargan con anticuerpos específicos frente a los antígenos considerados, obtenidos de animales o humanos sensibilizados. Posteriormente se incuban con el producto y se estudia la desgranulación, por ejemplo cuantificando la liberación de histamina. Estos ensayos pueden realizarse *in vivo* mediante el test de anafilaxia pasiva cutánea (PCA) o en el de anafilaxia activa sistémica (ASA) (Houben *et al.* 1997).

Pueden realizarse ensayos de actividad adyuvante incluyendo la producción de citocinas proinflamatorias en cultivos primarios, líneas celulares y células dendríticas. Los ensayos de estimulación de linfocitos T son difíciles *in vitro*, pero pueden realizarse *ex vivo* para detectar la memoria en sujetos alérgicos.

Se aplican inmunoensayos en fase sólida para detectar componentes alérgicos en los alimentos mediante el test del radioalergoabsorbente (RAST) o mediante ELISA. Se utiliza

suero con IgE procedente de al menos 14 individuos alérgicos al alimento del que se obtuvo el gen insertado (Eisenbrand *et al.* 2002).

La estabilidad a la digestión y procesado es un requisito básico para los alérgenos alimentarios, dado que les asegura un mayor tiempo de contacto con la mucosa para ser absorbidos. La estabilidad al calor se comprueba porque los alimentos habituales se degradan en 15 segundos, mientras que los alérgicos resisten más de una hora.

Pueden emplearse algunos ensayos en humanos en la evaluación de la alergenidad residual de productos hipoalérgicos, en la evaluación de alergias cruzadas o en la evaluación de posible alergenidad de productos biotecnológicos en los que se hayan introducido genes de una especie con capacidad alérgica conocida. Debido a consideraciones éticas, lo ideal sería emplear suero de estos pacientes y ensayarlos *in vitro*, así como establecer controles de toxicovigilancia tras su introducción en el mercado.

Puede ser muy útil el empleo de modelos predictivos basados en el conocimiento, como DEREK (Deductive Estimation of Risk from Existing Knowledge), TOP-KAT (Toxicity Prediction by Computer-assisted Technology) o CASE (Computer Automated Structure Evaluation). Estos sistemas pueden emplear datos puramente teóricos, pero también datos fisicoquímicos y otros aportados por procedimientos *in vitro*. La similitud en el epítipo, es decir, la secuencia proteica que es reconocida por los linfocitos T y B, parece necesaria para al menos ocho aminoácidos en al menos ocho regiones contiguas, en el caso de las células T para producirse alergia alimentaria.

Toxicidad sobre la reproducción

La reproducción y el desarrollo comprenden una compleja sucesión de procesos fisiológicos encadenados desde la producción de los gametos, la fertilización, la implantación, la organo-

génesis, el desarrollo fetal, el desarrollo posnatal y la maduración sexual.

La toxicología de la *reproducción* incluye el estudio de los trastornos sobre la fertilidad de los padres y sobre el desarrollo de los hijos (Repetto, 1997). Los trastornos tóxicos de la fertilidad abarcan los efectos sobre la libido, comportamiento sexual, espermatogénesis, ovogénesis, actividad hormonal, el proceso de fertilización y el desarrollo del huevo fecundado hasta la fase de implantación. La toxicología del *desarrollo* comprende los efectos inducidos o manifestados en la época prenatal, así como los que aparecen tras el nacimiento. Se incluyen los efectos embriotóxicos o fetotóxicos como disminución del peso corporal, retraso del crecimiento y del desarrollo, lesiones en los órganos, muerte, aborto, defectos estructurales, funcionales o periposnatales, trastornos en la lactancia, y problemas del desarrollo físico o mental.

Por lo tanto para detectar las alteraciones consideradas básicamente es preciso realizar dos tipos de estudios:

1. Estudios multigeneracionales.
2. Estudios de desarrollo embrionario (teratogénia).

1. Estudios multigeneracionales de reproducción

Informan de efectos en la libido, potencia y fertilidad, capacidad de desarrollar los embarazos, lactancia, supervivencia pre y posnatal; crecimiento, desarrollo de los hijos y su capacidad reproductiva; e identificación de órganos diana

Se administra la sustancia continuamente a la generación parental antes de la fecundación (P) y a las subsecuentes generaciones (F1, F2, etc.). Actualmente ya no se considera necesario extender rutinariamente los estudios a la tercera generación, ya que aunque ocasionalmente se disminuye el NOAEL, no suelen detectarse más efectos. Por el contrario, puede ser más útil estudiar una nueva camada de las dos primeras generaciones (Bradlow, 2002). Estos ensayos son complejos, largos, caros y requieren muchas

horas de trabajo, por lo que se acepta se realicen en una sola especie, generalmente la rata.

Dado que se trata de un conjunto muy complejo de posibles efectos, la organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) ha ido adoptando diversos protocolos específicos para la evaluación de los efectos sobre la reproducción en mamíferos, alguno de los cuales son los aceptados por la Unión Europea como procedimientos de evaluación:

- *TG 421: Método de cribado de toxicidad sobre la reproducción y desarrollo (1995)*. Es el ensayo de diseño más simple, útil como cribado o para seleccionar dosis en estudios posteriores. Se realiza el sacrificio a las crías a los 4 días de edad, lo que restringe los indicadores estudiados en los hijos (abortos, pérdidas, prematuridad, distocia, fecundidad, proporción de sexos, diferenciación sexual, crecimiento y desarrollo) y limita la investigación de la conducta maternal (tiempo hasta la cópula, conducta sexual, duración de la gestación, habilidad en la lactancia). Se estudian alteraciones anatomopatológicas en los órganos sexuales de los padres, lo que se podría ampliar a los hijos. Se realiza en rata.

- *TG 422: Estudio combinado: toxicidad por dosis repetida y cribado de toxicidad sobre la reproducción y desarrollo (1996)*. Se trata de un procedimiento similar al 421, aunque incluye posibles indicadores opcionales, como niveles hormonales, cuerpo luteo, etc., aprovechando mejor los animales del ensayo por dosis repetidas. También se realiza en rata.

- *TG 415/B34: Estudio de reproducción en una generación (1983)*. Es similar al anterior, pero podría extenderse para incluir estudios del desarrollo físico y conductual, memoria y aprendizaje. Puede realizarse en rata o ratón.

- *TG 416/B35: Estudio de reproducción en dos generaciones (2001)*. Es el ensayo de reproducción más riguroso en mamíferos entre los protocolos de la OCDE y UE. Supone un estudio profundo de crecimiento, desarrollo y función sexual en la generación F1, con monitorización de la F2. Incluye con mayor profundidad los indicadores comentados en los demás procedimientos.

- *TG 426: Neurotoxicidad sobre el Desarrollo (1999)*. La sustancia se administra a los animales durante la gestación y la lactancia y se realizan observaciones para descubrir gruesas anomalías neurológicas o en el comportamiento: la valoración de desarrollo físico, ontogenia del reflejo, la actividad motora, y la función motora y sensorial, el aprendizaje y la memoria, y la evaluación neuropatológica durante el desarrollo posnatal y la madurez.

Para la evaluación en no mamíferos destacan los siguientes procedimientos:

- *Función reproductiva en aves (OECD 206)*: se administra el compuesto durante al menos 20 semanas. Los huevos se incuban y las crías se observan durante 14 días. Se estudia la supervivencia, conducta, producción y viabilidad de los huevos, grosor del cascarón, y patología básica de las gónadas y glándulas accesorias, que puede ampliarse en profundidad.

- *Etapas iniciales en peces (OECD 210, C14)*: se estudian las primeras fases, pero podrían incluirse el crecimiento y desarrollo.

- *Ensayo de reproducción en Daphnia magna (OECD 211)*: al comprobar la capacidad reproductiva se detectarían además interferencias hormonales, aunque sin aportar información mecanicista.

Otras entidades que disponen de protocolos similares para evaluar la toxicidad sobre la reproducción y desarrollo son la ASTM-American Society for Testing and Materials, EPA-US Environmental Protection Agency, FDA-US Food and Drug Administration, ICH- International Conference on Harmonisation, y JMAFF-Japanese ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries.

2. Estudios de toxicidad sobre el desarrollo: TG 414/ B31. Estudio de desarrollo prenatal (2001)

Su objetivo es identificar efectos letales, *teratogénicos* (malformaciones) o de otro tipo en el embrión o feto, además de los efectos sobre la

madre. El tratamiento de las hembras se realiza al menos desde la implantación, hasta el sacrificio un día antes del parto. Se cuentan los embriones y las reabsorciones y muertes fetales, peso fetal (muy sensible), la relación entre sexos, y se estudia detalladamente la morfología externa, visceral y esquelética.

Deben emplearse las especies más relevantes, por ejemplo con metabolismo similar del compuesto a los humanos. En general se producen falsos positivos por tener mayor sensibilidad que los humanos. Se usan obligatoriamente dos especies, una roedora (preferiblemente la rata) y una no roedora (como el conejo). El conejo tiene diferente placenta y fisiología del embarazo que los roedores, y presenta reducción de extremidades con la talidomida, al contrario que la rata. El conejo es inapropiado para antibióticos y materiales poco absorbibles, ya que producen diarrea y reducción del consumo de alimentos, que genera abortos. Desde 2001 se recomienda un mínimo de 20 animales por dosis, frente a los 12 usados antes.

Como procedimientos alternativos para evaluar la embriotoxicidad, el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos ha validado científicamente (2001) tres ensayos:

- *Un ensayo in vitro con células precursoras embrionarias de ratón (EST)*, que permite distinguir entre compuestos moderados, fuertes y no embriotóxicos. No precisa de animales por lo que en la actualidad es la mejor opción.
- *El cultivo de embrión completo de rata (WEC)*, con la misma aplicación que el anterior, pero precisando usar roedores.
- *El ensayo de cultivo de células disociadas de encéfalo de embrión de rata en micro-masas (MM)*, que identifica embriotóxicos potentes.

Otros ensayos, como el de embrión de rana *Xenopus laevis* (FETAX), no han podido ser validados por ICCVAM, al considerar que precisan optimizarse para su empleo regulatorio (2001). El ensayo de selección de embriotoxicidad en pollo (CHEST) es relativamente sencillo,

pero no permite distinguir entre toxicidad general y efectos específicos sobre el desarrollo.

Disrupción endocrina

Se denominan «disruptores hormonales u endocrinos» a *un conjunto heterogéneo de compuestos químicos con actividad hormonal* (COM, 1999). O expresado de otra manera, una *sustancia exógena o mezcla que altera funciones del sistema endocrino y causa efectos adversos sobre la salud de un organismo intacto, o sus descendientes o sobre (sub)poblaciones* (WHO/ IPCS 2002).

El sistema endocrino consiste en un conjunto de glándulas tales como el tiroides, gónadas y adrenales, y las hormonas producidas y secretadas al torrente circulatorio como hormonas tiroideas, estrógenos, testosterona, las cuales contribuyen al desarrollo, crecimiento, reproducción y comportamiento de animales y seres humanos.

La *legislación norteamericana* requiere el ensayo de la actividad endocrina de los compuestos (the Food Quality Protection Act of 1996, Public Law 104-170, y the Safe Drinking Water Act Amendments of 1996, Public Law 104-182; 3). Otras regiones en el mundo, particularmente Japón y Europa, están también introduciéndolos en su legislación.

La *Comisión de las Comunidades Europeas* presentó en 1999 su estrategia comunitaria en materia de alteradores endocrinos, y en el 2001 hizo una comunicación sobre su seguimiento. En una primera etapa se seleccionaron 553 compuestos según su producción, persistencia, exposición y efectos sobre la reproducción. De ellos, 118 presentaban características de disrupción endocrina, pero 109 están ya regulados debido a sus características tóxicas o de persistencia. Por ello, los 9 restantes y 3 hormonas se sometieron a evaluación. Los 435 de los que no se dispone de datos suficientes sobre su actividad endocrina deben estudiarse en profundidad.

En la *Unión Europea* la mayoría de las sustancias químicas que alteran el sistema endo-

crino estarán sujetas a autorización dentro del sistema REACH, lo que justificará que una sustancia se clasifique como carcinogénica o tóxica para la reproducción (CMR). Sin embargo, en la actualidad, ninguno de los protocolos de la OCDE o UE fue diseñado específicamente para detectar disrupción endocrina. De los pocos ensayos en no-vertebrados, el test de reproducción en *Daphnias* es el único que pudiera ayudar a detectar este tipo de efectos.

Las limitaciones de los actuales procedimientos de evaluación para detectar efectos adversos mediados por disrupción endocrina han impulsado a diversas agencias reguladoras a tratar de aumentar la sensibilidad de los mismos. Se está ampliando la cobertura de los periodos del desarrollo en los ensayos multigeneracionales de reproducción e incluyendo una serie de nuevos indicadores más profundos, como el estudio de la longitud y normalidad del ciclo estrogénico en las madres y las hijas de la generación F1; el recuento del número de espermatozoides, su viabilidad y morfología, peso de los testículos, epidídimo, vesículas seminales y próstata, y de un detallado examen anatomopatológico de los testículos en los padres e hijos F1; el control de la edad y peso de las crías el día de la apertura vaginal o separación balanoprepucial; la observación de pezones y areolas en crías macho; la medición de la distancia anogenital en el nacimiento en la generación F2 si se observaron cambios en la proporción de sexos o tiempo de maduración sexual en la F1, etc.

Se ha propuesto una gran variedad de procedimientos específicos para detectar y cuantificar la capacidad disruptora endocrina, pero existe una gran controversia sobre su verdadera relevancia. Ningún ensayo ha sido aceptado, por lo que ha sido necesario realizar urgentemente estudios de validación de diferentes procedimientos, que aún no han finalizado.

1. Principales ensayos propuestos de disrupción endocrina *in vivo*

- *Ensayo uterotrófico de 3 días para detectar capacidad estrogénica.* Se controla

fundamentalmente el incremento del peso uterino debido a estimulación de la mitogénesis. Se ha comprobado recientemente que pueden emplearse animales inmaduros en vez de adultos ovariectomizados.

- *Ensayo de Hershberger de 5 o 7 días para la detección de andrógenos y anti-andrógenos en roedores macho.* En este caso se investiga el cambio del peso de vesículas seminales y próstata. Podrían también usarse animales inmaduros en vez de los castrados empleados clásicamente.
- *Ensayo de pubertad en machos durante 30 días con indicadores tiroideos.* Permite también la detección de alteraciones de causa tiroidea exponiendo ratas macho de 23 días y evaluando la pubertad, histología y serología.
- *TG 407 Ampliado.* Consiste en ampliar el ensayo de dosis repetidas de 28 días en roedores. Se amplía el estudio histológico y de bioquímica clínica para detectar diversos tipos de alteraciones endocrinas, además de las neurológicas. Podría usarse para cribado.
- *Ensayo in útero de desarrollo (lactancia).* Exposición in útero y estudio general de reproducción incluyendo alteraciones neuroconductuales, de actividad, hormonales, malformaciones, pubertad, espermatogénesis...
- *TG 416 Ampliado.* Estudio de reproducción en dos generaciones ampliado con indicadores endocrinas para detectar actividad androgénica, estrogénica, tiroidea y neuroconductual.

2. Principales ensayos propuestos de disrupción endocrina *in vitro*

- *Modelos predictivos de relación estructura actividad (QSAR).*
- *Procedimientos de Unión a receptores.*
- *Proliferación celular:* ensayo E, que empleando la línea celular humana MCF-7 detecta estrógenos (y antiestrógenos), o versiones similares usando levaduras.

- *Expresión de genes informadores*, más sensibles que los anteriores.
- *Esteroidogénesis en células de Leydig*: producción de testosterona en tejido de testículo.
- *Inhibición de aromataza* y por tanto de la síntesis estrogénica: ejemplo (línea celular humana H295R).

3. Otros ensayos propuestos de disrupción endocrina

- *Ensayo de metamorfosis en rana. Ejemplo FETAX.*
- *Vitelogenina en pez.*
- *Ensayo de histopatología gonadal en pez.*
- *Ensayo multigeneracional en aves.*
- *Ensayo multigeneracional de reproducción en pez.*
- *Ensayo multigeneracional de reproducción en invertebrados.*
- *Inducción de vitelogenina in vitro* (cultivo primario de hepatocitos de aves, peces o anfibios).

En 1999 un comité específico de la Agencia de Protección Ambiental Norteamericana (EDS-TAC EPA) propuso un sistema de cribado y ensayo de disruptores endocrinos que está siendo evaluado y transformado en una estrategia integrada, formado básicamente por:

- Tests *in vitro* de unión a receptores y activación transcripcional para estrógenos y andrógenos.
- Test *in vitro* de esteroidogénesis en tejido testicular.
- Ensayo uterotrófico de 3 días *in vivo* en roedores.
- Ensayo de pubertad de 20 días en hembras de roedor con evaluación tiroidea.
- Ensayo de Hershberger de 5-7 días en roedores macho.

No existe, por lo tanto, un consenso en los procedimientos útiles para detectar la capacidad disruptora endocrina de los compuestos

químicos. Los ensayos actualmente disponibles tanto *in vivo* como *in vitro* solo indican que una sustancia es un potencial disruptor endocrino en humanos y deberían usarse en forma similar al ensayo de micronúcleo en médula ósea para detectar genotoxicidad (Barlow *et al.* 2002).

Genotoxicidad y carcinogenicidad

1. Evaluación de la genotoxicidad

El primer procedimiento básico *in vitro* aceptado reguladoramente fue el ensayo de reversión de la mutación en *Salmonella tiphimurium*. Este ensayo, desarrollado por Ames, permite evaluar la mutagenicidad y se basa en que los compuestos mutagénicos provocan una mutación en un gen codificante de una enzima, con lo que la bacteria mutada es capaz de multiplicarse en un medio deficiente que no permite la supervivencia de las no mutadas. Siguiendo la estela de este procedimiento, durante la década de 1980 se diseñaron más de un centenar de tests de genotoxicidad, es decir, de la capacidad de alterar el ADN. Ello dio lugar a una intensa actividad investigadora impulsada muy especialmente desde el ámbito de la industria farmacéutica, que veía en estas pruebas la posibilidad de una alternativa rápida y económica a los tests de carcinogénesis a largo término. Si bien estas esperanzas han debido ser posteriormente matizadas.

Hasta el año 2000 habían sido aceptados por las autoridades varios ensayos *in vitro*, todos ellos tests de *genotoxicidad*, que curiosamente no fueron sometidos a un proceso de evaluación científica tan riguroso y completo como el que actualmente se exige.

En la actualidad parece fuera de toda duda que no existe un único test de mutagénesis capaz de proporcionarnos por sí solo información realmente relevante sobre la actividad del compuesto en estudio, sino que es imprescindible la rea-

lización de una batería de pruebas en la que se combinen tests *in vitro*, sensibles a mutaciones que afectan incluso a un solo par de bases y que, además, permiten adquirir un cierto conocimiento sobre los mecanismos de acción, con otros *in vivo*, realizados en condiciones más realistas, que, a pesar de su menor sensibilidad y de ser en general de realización más engorrosa, permiten integrar determinados factores que resultan omitidos al utilizar sistemas experimentales procariontes o bien de un nivel de organización inferior al del individuo.

La aproximación reguladora habitual para la evaluación de la genotoxicidad consiste en un sistema jerarquizado en el cual en el primer nivel se emplean al menos dos ensayos *in vitro*: un ensayo de mutagenicidad en bacteria (OCDE TG 471, usualmente el test de Ames con *Salmonella* (pero a veces con *Escherichia coli*), y un ensayo citogenético (OCDE TG 473), usualmente análisis de metafases en linfocitos humanos o líneas celulares de roedores. Se requieren dos indicadores diferentes, ya que los compuestos pueden provocar mutaciones génicas y/o daño cromosómico (Worth y Balls, 2002).

Estos ensayos iniciales se emplean para tratar de establecer la potencia de un compuesto para provocar un efecto mutagénico y es particularmente importante para compuestos que presenten un uso generalizado tratar de confirmar *in vivo* tales efectos. Es decir, que al contrario que en sistemas secuenciales para otros tipos de toxicidad, un resultado negativo *in vitro* se suele considerar suficiente para excluir la capacidad mutagénica, y un resultado positivo no es suficiente para indicar un riesgo mutagénico.

Batería mínima para la evaluación genotóxica de compuestos de bajo peso molecular

1. Un ensayo de inducción de mutación génica en bacteria (OCDE TG 471), usualmente el test de Ames con *Salmonella*.
2. Un ensayo de inducción de mutación génica en células de mamífero, preferiblemente el ensayo de linfoma de roedor.
3. Un ensayo de inducción de aberraciones cromosómicas en células de mamífero (OCDE TG 473).

Algunas agencias reguladoras promueven el empleo del ensayo en linfoma de ratón (TG 473) en lugar del test citogenético, ya que el primero detecta tanto mutaciones puntuales como daño cromosómico. Sin embargo es complicado de realizar y precisa el contaje exacto de las colonias. También podrían emplearse células manipuladas genéticamente para expresar una o más enzimas de las fases I y II de metabolización, evitando la necesidad de sistemas exógenos de metabolización, con lo que los metabolitos se generan intracelularmente.

La batería puede reducirse si existen justificaciones científicas, como la falta de absorción, o aumentarse, por ejemplo ante alertas estructurales sobre su posible genotoxicidad, o vías toxicocinéticas poco comunes (Eisenbrand *et al.* 2002). Para los nuevos ingredientes alimentarios, incluyendo los producidos por biotecnología e ingeniería genética, no es probable la interacción con el ADN. Por ello debe decidirse caso por caso, como se sugiere para medicamentos (CEC, 1989; Gocke *et al.* 1999) y utilizar una estrategia mínima o no ensayarlos. Si es preciso, puede emplearse un ensayo de mutación génica para detectar la genotoxicidad de impurezas o contaminantes.

El análisis de una amplia base de datos sobre programas de genotoxicidad ha permitido conocer que en general, el incremento en el número de ensayos en una batería estandar no incrementa necesariamente su sensibilidad en la predicción de la carcinogénesis (Benigni, 1992; Zeiger, 1994). Ello permite emplear baterías reducidas de tests complementarios entre sí, no estando justificado emplear ensayos *in vivo* con finalidades de cribado (Eisenbrand *et al.* 2002).

Los ensayos *in vivo* de genotoxicidad se consideran insatisfactorios y limitados a solo algunos tipos de mecanismos y dianas. La aproximación usual en genotoxicidad *in vivo* consiste en investigar el daño citogenético en médula ósea, bien mediante el ensayo de micronúcleo

(TG 474), o de análisis de metafase. Un resultado positivo en médula ósea indica capacidad genotóxica sobre células germinales y también carcinogenicidad por vía genotóxica.

Otros ensayos *in vivo* aún no validados se pueden emplear si existe evidencia toxicocinética de que existe otro órgano diana diferente de la médula ósea. Entre ellos se incluye la síntesis no programada de ADN (UDS) en hígado (TG 486) y el empleo de roedores transgénicos

Los cambios en el número de cromosomas (poliploidia o aneuploidia) pueden investigarse *in vitro* e *in vivo* mediante técnicas de análisis de metafase y de marcado, pero requieren mucha dedicación. En relación con la aneuploidia, puede evaluarse fácilmente en un ensayo de micronúcleo *in vitro*, aunque su validación ha resultado compleja.

2. Evaluación de la carcinogenicidad

El ensayo por dosis repetidas en rata y ratón de ambos sexos con análisis anatomopatológico completo es el procedimiento básico para evaluar la capacidad carcinogénica. Es un ensayo a largo plazo, realizado casi en exclusiva en rata o ratón, para evaluar la capacidad de inducción tumoral de un agente sobre la mayoría de la vida del roedor, es decir, de año y medio a dos años (OCDE TG 451, 1981). Sin embargo este ensayo requiere mucho tiempo, dedicación, es muy costoso, y exige un gran número de animales, más de 400 animales por cada una de las dos especies empleadas. Además, no presentan buena correlación entre sí, y su extrapolación al hombre es compleja.

Básicamente se emplean al menos 50 animales por sexo y grupo, de unas seis semanas al inicio, observando al menos semanalmente cambios clínicos que incluyen palpación para detectar masas tumorales y control del peso, así como del consumo de alimento durante el primer mes. Se realiza estudio hematológico al menos dos veces, necropsia básica a todos los individuos, y estudio histopatológico al menos a los grupos control y de dosis más alta. Otros parámetros generalmente investigados en estudios crónicos no se inclu-

yen debido a la gran variabilidad de los mismos en animales viejos. Otra opción es realizar estudios combinados de toxicidad crónica con carcinogenicidad (OCDE TG 453 1981).

La selección de las dosis en estudios de carcinogenicidad es objeto de debate. Históricamente se ha escogido como dosis más alta la más elevada que no provoca cambios clínicos, cambios en longevidad o induzca una reducción mayor del 10% en la ganancia de peso (MTD). Sin embargo, esta dosis puede considerarse en muchos casos como no relevante toxicológicamente, al ser excesivamente elevada. La Conferencia Internacional de Armonización de Medicamentos aprobó una directriz en 1997, que se está utilizando en otras áreas (<http://www.ichpma.org/ich5s.html>).

Se están proponiendo nuevos modelos de carcinogenicidad con animales transgénicos, que presentan la ventaja de precisar menor tiempo de exposición para desarrollar los tumores. Se emplean fundamentalmente el ratón p53+/-deficiente, el ratón Tg.AC, al que se le ha incluido el gen Tg.AC-v-Ha-ras, el ratón rasH2, al que se le añadió el gen c-Ha-ras, y el ratón XPA-/- deficiente en reparación.

En el momento actual, y tras un completo estudio de validación impulsado por el International Life Sciences Institute (ILSI) los modelos transgénicos pueden usarse eficientemente como parte de estrategias basadas en la evidencia para la evaluación del riesgo, pero no como definitivos (Worth y Balls, 2002). En ciertas circunstancias, la información proporcionada por un estudio de carcinogenicidad en una segunda especie no es concluyente, y serían mucho más útiles estos ensayos cortos.

En relación con los carcinógenos epigenéticos, es decir, los que actúan por mecanismos no genotóxicos, generalmente manifiestan sus efectos en una sola especie, sexo o tejido, y a dosis altas. Por ello, no son previsibles mediante las baterías de genotoxicidad. Por lo tanto, compuestos que no son genotóxicos *in vivo* e *in vitro* pueden requerir el bioensayo de carcinogenicidad en roedores según su uso y si la exposición humana prevista es alta.

Recientemente se han desarrollado nuevos protocolos para dos ensayos de transformación celular *in vitro*, los ensayos en células Balb/c 3T3 y en la línea celular de embrión de hamster sirio SHE, que han mejorado su predictividad para detectar carcinógenos y su reproducibilidad entre laboratorios. Se espera que puedan mejorarse con el empleo de células humanas.

Entre los procedimientos propuestos para detectar carcinógenos no genotóxicos se incluyen la detección de mitogénesis (por ejemplo por activación del receptor AhR para dioxina y compuestos relacionados, CAR para inductores tipo I o fenobarbital, y PPARα para proliferadores de peroxisomas), los ensayos de transformación celular *in vitro*, el empleo de líneas celulares transgénicas, la detección de patrones de metilación en el ADN (ejemplo MethylLight) y los sistemas predictivos.

Existen dos tipos fundamentales de sistemas expertos aplicables en la predicción de genotoxicidad y carcinogenicidad. Entre los de inducción automática de reglas (ARI) figuran TOPKAT (Toxicity Prediction by Computer-assisted Technology), CASE (Computer Automated Structure Evaluation) y COMPACT Computerised Optimised Parametric Analysis of Chemical Toxicity). Entre los basados en el conocimiento se encuentran HazardExpert, DEREK (Deductive Estimation of Risk from Existing Knowledge) y ONCOLOGIC.

Toxicidad a largo plazo y de órgano diana

Los efectos por exposiciones prolongadas y de órgano diana se estudian básicamente en ensayos por dosis repetidas por vía oral durante 14 o 28 días (OECD TG 407), por vía dérmica (TG 410) e inhalatoria (TG 412), y posteriormente en estudios de 90 días (OECD TG 408), y los de cribado combinado de dosis repetida y toxicidad para la reproducción. Estos procedimientos exigen la investigación de alteraciones morfolo-

Tabla 6.4 Evaluación de la neurotoxicidad.

In vivo:

Ensayos agudos y crónicos «amplificados».
Ejemplo: 28 días + exploración neurológica, histopatológica.
Ensayos dirigidos: OPIDN, inhibición de NTE (esterasa diana de neuropatía) en gallina.

In vitro:

Líneas celulares neuronales y gliales (OPIDN: inhibición en células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) de NTE (EPA).
Neuronas de ganglios dorsales (SNP).
Astrocitos/neuronas.
Esferas de microagregados cerebrales (SNC).
Barrera hematoencefálica.
Cocultivos: activación.

gicas e histológicas, a la vez que funcionales, bioquímicas y comportamentales.

Se están desarrollando diversos modelos que tratan de mimetizar algunos de esos aspectos *in vitro*. Las principales dificultades radican en la necesidad de obtener sistemas estables durante más de 5 días y en utilizar indicadores representativos de los efectos a largo plazo. Algunos modelos como los cortes de tejido cerebral, los cultivos celulares estáticos, las líneas celulares transformadas o inmortalizadas son ya suficientemente estables, particularmente si se emplean sistemas de perfusión continua en células adheridas a soportes porosos, y en cocultivo.

Los estudios sobre órgano diana, aunque aún se encuentran lejos de la validación, están permitiendo desarrollar modelos muy útiles para cometidos concretos. Los órganos que están

Tabla 6.5. Modelos hepáticos *in vitro*.

Hígado perfundido.
Lonchas hepáticas.
Hepatocitos en suspensión/monocapa/criopreservados.
Hepatomas.
Líneas celulares transgénicas.
Microsomas.

Tabla 6.6. Evaluación de la nefrotoxicidad *in vitro*.

Riñón perfundido aislado.
 Nefrona aislada perfundida.
 Lonchas corticales renales.
 Glomérulos aislados.
 Fragmentos tubulares proximales o distales aislados.
 Cultivos: (ejemplo en membrana, sandwich).
 Primarios.
 Líneas celulares renales.
 Células transgénicas.
 Fracciones subcelulares.

Tabla 6.7. Retos futuros en toxicología.

Procedimientos más eficientes en la evaluación del riesgo.
 Desarrollo de procedimientos no invasivos en animales.
 Selección de las especies, cepas y etapas del desarrollo más apropiadas para el ensayo.
 Reducción en el número de ensayos y/o animales/ensayo.
 Uso de dosis realistas y ensayos no letales.
 Integración de procedimientos de ensayo (*in vivo*, *in vitro*):
 flexibilidad + combinación.
 Ensayos mecanicistas basados en nuevos y relevantes indicadores (*in vivo*, *in vitro*).
 Sustitución del NOEL por sistemas de estimación por regresión.

siendo más estudiados son el sistema nervioso y la diferenciación celular (Ríos *et al.* 2003), el sistema renal y el hígado.

Futuro ¿o presente? de las alternativas

Como se ha comentado, la validación ha de hacerse para un determinado propósito. Ello implica que puedan existir ensayos cuya aceptación reguladora puede ser complicada, pero que son totalmente válidos y aceptables para la toma de decisiones. Muchos de estos procedimientos se emplean de forma rutinaria en la evaluación de medicamentos, aditivos, etc., aunque sólo los resultados de algunos de ellos se incluyen en los informes para el registro de los mismos. Entre ellos caben citar los nuevos modelos de sensibilización dérmica. En la Tabla 6.7 se indican algunos de los retos actuales.

En un sentido más amplio, es necesario reconducir las estrategias actuales empleadas en la evaluación de la seguridad para flexibilizarlas, haciéndolas más efectivas.

La 52.^a Asamblea General de la Asociación Médica Mundial aprobó el 7 de octubre de 2000 por unanimidad la 5.^a revisión desde que fueron adoptados por primera vez en 1964 los

principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos, es decir, la Declaración de Helsinki. En la línea de la propuesta efectuada en el 3.^{er} Congreso Mundial de Métodos Alternativos, ya no se exige realizar siempre ensayos con animales previamente a los humanos. En concreto, el Artículo 11 queda redactado así: «La investigación médica en seres humanos debe conformarse con los principios científicos generalmente aceptados, y debe apoyarse en un profundo conocimiento de la bibliografía científica, en otras fuentes de información pertinentes, así como en experimentos de laboratorio correctamente realizados y en animales, cuando sea oportuno». Por lo tanto, los procedimientos alternativos pueden proporcionar un considerable ahorro en el número de animales empleados.

Los cambios propuestos en el *Libro Blanco sobre la Estrategia para la Futura Política en Materia de Sustancias y Preparados Químicos* suponen en la práctica la necesidad de disponer de métodos de ensayo más eficaces que los actuales y que presenten menos requerimientos logísticos (UE, 2001). La prohibición europea del empleo de animales en la evaluación de cosméticos también obliga a disponer de alternativas. Ello supone una excelente oportunidad para la inclusión de nuevos métodos *in vitro* para la evaluación de la seguridad en las normativas, una vez que han sido aceptados varios de ellos.

Bibliografía

- Balls M, Blaauboer BJ, Fentem JH, Bruner L, Combes RD, Ekwall B *et al.* (1995). Practical aspects of the validation of toxicity tests procedures. The report and recommendations of ECVAM Workshop 5. *Altern Laboratory Animals* 23: 129-147.
- Barlow SM, Greig JB, Bridgesc JW, Carered A, Carpye AJM, Gallif CL *et al.* (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. *Food Chem Toxicol* 40: 145-191.
- Benigni R, Andreoli C, Giuliani A (1994). QSAR models for both mutagenic potency and activity: application to nitroarenes and aromatic amines. *Environm Mol Mutagenesis* 24: 208-219.
- Bottrill K, (1998). The use of biomarkers as alternatives to current animal tests on food chemicals. *ATLA* 26: 421-480.
- CEC (1989) Guidelines on the Preclinical Safety Testing of Medicinal Products Derived from Biotechnology - Commission of the European Communities notes to the applicants for premarketing authorizations. TIBTECH 7.
- COM 706. (1999) Comisión de las Comunidades Europeas. Estrategia comunitaria en materia de alteradores endocrinos (Sustancias de las que se sospecha interfieren en lo sistemas hormonales de seres humanos y animales). Bruselas. http://www.europarl.eu.int/meetdocs/committees/envi/20000418/123706_es.pdf.
- Dybing E, Doe J, Groten J, Kleiner J, O'Brien J, Renwick AG *et al.* (2002). Hazard characterisation of chemicals in food and diet: dose response, mechanisms and extrapolation issue. *Food Chem Toxicol* 40: 237-282.
- Eisenbrand G, Pool-Zobel B, Baker V, Balls M, Blaauboer BJ, Boobis A *et al.* (2002). Methods of *in vitro* toxicology. *Food Chem Toxicol* 40: 193-236
- Ekwall B, Clemedson C, Ekwall B, Ring P, Romert L (1999). EDIT: a new international multi-centre programme to develop and evaluate batteries of *in vitro* tests for acute and chronic systemic toxicity. *Atla* 27, 339-349.
- Ekwall B, Ekwall K (1988). Comments on the use of diverse cell systems in toxicity testing. *Atla* 15: 193-201.
- Ekwall B, Sjöstrom M (2000). MEIC evaluation of acute systemic toxicity. Part VIII. Multivariate partial least squares evaluation, including the selection of a battery of cell line tests with a good prediction of human acute lethal peak blood concentrations for 50 chemicals. *Atla* 28, Suppl. 1: 201-234.
- García MC, Troncoso AM (2004) Evaluación de nuevos alimentos. En: M. Repetto (ed.). *Toxicología de Postgrado-2004*. Módulo 20. Toxicología de los Alimentos. Área de Toxicología. Universidad de Sevilla. CD-ROM. Sevilla.
- Glei M, Matuschek M, Steiner C, Bohm V, Persin C, Pool-Zobel BL (2003). Initial *in vitro* toxicity testing of functional foods rich in catechins and anthocyanins in human cells. *Toxicology in Vitro* 17: 723-729.
- Gocke E *et al.* (1999). Genotoxicity testing of biotechnology-derived products. Report of a GUM task force. *Mutation Research* 436: 137-156.
- Halle W, Goeres E (1988). Register der zytotoxizität (IC50) in der zellkultur und möglichkeiten zur abschätzung der akuten toxizität (LD50). En: Oehme P, Loewe H, Goeres E (eds.). *Beiträge zur Wirkstoffforschung*. Institute für Wirkstoffforschung, Berlin, pp. 1-108.
- Houben GF, Knippels LMJ, Penninks AH (1997). Food allergy: predictive testing of food products *Environm Toxicol Pharmacol* 4: 127-135.
- Jos A, Pichardo S, Zurita J, Salguero M, Camean AM, Repetto G (2005). Use of two fish cell lines RTG-2 and PLHC-1 to evaluate toxic effects produced by microcystins LR and RR. *Toxicology in vitro*. En prensa.
- Le Ferrec E, Chesne C, Artusson P, Brayden D, Fabre G, Gires P *et al.* (2001). *In vitro* models of the intestinal barrier. The report and recommendations of ECVAM workshop 46. *Atla* 29: 649-668.
- Leira F (2004). Bioensayos empleados para la detección de toxinas. En: Repetto, M (ed). *Toxicología de Postgrado-2004*. Capítulo en Módulo 18. Evaluación Toxicológica y de riesgos específicos. Área de Toxicología. Universidad de Sevilla.
- Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and perme ability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* 23: 3-25.
- Liu-Stratton Y, Roy S, Sen CK (2004). DNA microarray technology in nutraceutical and food safety. *Toxicology Letters* 150: 29-42.
- Maurice S (2002). Food Safety in Europe (FOSIE): risk assessment of chemicals in food and diet:

- overall introduction. *Food and Chemical Toxicology* 40: 141-144.
- Munro IC, McGirr LG, Nestmann ER, Kille JW (1996). Alternative approaches to the safety assessment of macronutrient substitutes. *Regulat Toxicol Pharmacol* 23: S6-S14.
- Raiten DJ (1999). Alternative and traditional models for the safety evaluation of Food Ingredients: Summary Report. *Regulat Toxicol Pharmacol* 29: 182-183.
- Repetto G (1995). Recientes avances en la validación y aceptación de métodos alternativos *in vivo* e *in vitro*. *Rev Toxicol* 12: 3-9.
- Repetto G y Repetto M (1995). Métodos alternativos: Estudios toxicológicos *in vitro*. En: Repetto M (ed.). *Toxicología avanzada*. Díaz de Santos. Barcelona, 37-59.
- Repetto G, Gotelli C, Rodríguez Vicente MC, Del Peso A y Gascó P (2004a). Tendencias en evaluación del riesgo tóxico. Módulo 10. En: Repetto M (ed.). *Toxicología de postgrado 2004*. Área de Toxicología. Universidad de Sevilla. CD-ROM. Sevilla.
- Repetto G, Sanz P, Repetto M (1988). *In vivo* and *in vitro* Effect of Trichlorfon on esterases of the Red Crayfish *Procambarus Clarkii*. *Bull Environm Contam Toxicol* 41: 597-603.
- Repetto M (1997). *Toxicología fundamental*, 3.^a ed. Díaz de Santos, Madrid.
- Ríos JC, Repetto G, Galleguillos I, Jos A, Del Peso A, Repetto M (2005). High doses of pralidoxime can be most effective in the reactivation of erythrocyte acetylcholinesterase *in vitro*. *Toxicology in Vitro*. En prensa.
- Ríos JC, Repetto G, Jos A, Del Peso A, Salguero M, Cameán A *et al.* (2003). Tribromophenol induces the differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells «*in vitro*». *Toxicology in Vitro*. 17: 635-641.
- SCF (2001). Guidance on Submissions For Food Additive Evaluations by the Scientific Committee on Food. European Commission SCF/CS/ADD/GEN/26 Final, Brussels
- Sheridan RE, Deshpande SS, Smith T (1999). Comparison of *in vivo* and *in vitro* Mouse bioassays for botulinum toxin antagonists. *J Applied Toxicology* 19: S29-S33.
- UE (2000). *Libro Blanco Sobre Seguridad Alimentaria*. Comisión de las Comunidades Europeas. Bruselas, 12.1.2000 COM (1999) 719 final.
- UE Comisión Europea (2001). *Libro Blanco sobre la estrategia para la futura política en materia de sustancias y preparados químicos*. <http://www.europa.eu.int/comm/environment/chemicals/whitepaper.htm>.
- WHO/ IPCS (2002). Damstra T, Barlow S, Bergman A, Kavlock R, Van der Kraak G. Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors. WHO publication no. WHO/IPCS/EDC/02.2. World Health Organization, Geneva, Switzerland. http://www.who.int/pcs/emerg_site/edc/global_edc_TOC.htm.
- Worth AP, Balls M (2002). Alternative (non-animal) methods for chemical testing: current status and future prospects. *Atla* 30 Supp 1: 1-125.
- Zeiger E (1994). Strategies and philosophies of genotoxicity testing. What is the question? *Mutation Res* 304: 309-314.

El concepto general de evaluación de riesgos y de clasificación. Evaluación de la exposición. Caracterización del riesgo. Bibliografía.

El concepto general de evaluación de riesgos y de clasificación

Datos y fases para establecer la peligrosidad y para la evaluación de riesgos

Para la «identificación de la peligrosidad» de una sustancia se requieren datos que permitan:

- *evaluar los efectos* tóxicos (peligrosidad y relación dosis-respuesta);

y con ello,

- *clasificar* y decidir sobre el etiquetado de la sustancia y sus productos formulados;
- *restricciones* de uso y *límites* permitidos.

Para «evaluar los riesgos de efectos tóxicos» (Figura 7.1) en humanos de una sustancia se necesitarán datos que permitan:

- a) *evaluar la exposición* (real o previsible) en humanos como consecuencia del uso en la aplicación prevista de la sustancia;
- b) *evaluar los efectos* tóxicos (peligrosidad, relación dosis-respuesta, establecimiento de nivel sin efecto adverso observable y de la ingesta aceptable);

y con ello,

- c) *caracterizar el riesgo* comparando ambos tipos de datos para establecer hasta qué grado los niveles de exposición esperables pueden causar un riesgo de producir efectos a la salud humana o al medio ambiente;
- d) *gestionar el riesgo* (autorizaciones, restricciones, medidas de seguridad y controles).

La evaluación de los efectos tóxicos ha sido descrita en detalle en un capítulo anterior y requiere los datos resultantes de ensayos toxicológicos. Se describen aquí estas fases de forma general y luego se discute en más detalle la eva-

luación de exposición y el concepto de caracterización de riesgos. Se analizarán las consecuencias de la evaluación de riesgos en cuanto a restricciones de uso de sustancias químicas, centrado en cuestiones de seguridad alimentaria. Como ejemplo se presentarán algunas consecuencias en las normas de calidad de aguas de consumo. Aunque la clasificación y etiquetado, no implica evaluación de riesgos, se comentarán también los criterios de clasificación y etiquetado, en tanto afectan a restricciones en las autorizaciones de uso.

1. Caracterización de riesgos frente a clasificación y etiquetado: consecuencias

La evaluación de los efectos tóxicos requiere datos de ensayos toxicológicos cuyos protocolos internacionalmente aceptados están descritos en el Anexo V de la Directiva 67/548/CEE o en las guías de ensayos de la OCDE.

Con los datos de toxicidad de la sustancia, sin necesidad de datos de exposición esperable, puede identificarse la «peligrosidad» de la sustancia y con ello establecer la *clasificación y etiquetado* de la sustancia que en Europa se establece de acuerdo con los criterios descritos en el Anexo VI de la Directiva 67/548/CEE.

Las consecuencias de la clasificación son, además de las obligaciones de etiquetado, determinadas restricciones en la autorización en el uso y aplicación de la sustancia, sin considerar si esa aplicación generará o no un nivel de exposición que represente riesgos. Bajo el «principio de precaución» puede condicionar a decisiones de restricciones, incluso aunque se demostrase que su

uso no represente un riesgo inaceptable. Esto es especialmente así para sustancias que se clasifiquen por efectos tóxicos que generan especial sensibilidad social, como carcinógenas, mutágenas o tóxicas a la reproducción (sustancias CMR).

2. Las fases del proceso de evaluación de riesgos

Evaluar la exposición (exposure assessment), implica o bien la monitorización midiendo la exposición real que se produce en el uso de la sustancia o la estimación de la potencial exposición con modelos predictivos. Se tendrá en cuenta la posible exposición a través del medio ambiente, por la actividad laboral o profesional, y por la ingesta de residuos en el consumo de alimentos y agua, así como por el contacto con productos de consumo. Se valorarán los niveles de exposición en diferentes escenarios de uso o bien por monitorización con medidas de niveles en situaciones reales o bien haciendo predicciones con modelos para estimar la exposición esperable y la ingesta diaria máxima estimada en su uso normal y en el «peor de los casos razonable».

Evaluar los efectos, implica por un lado, *identificar la peligrosidad* de la sustancia (*hazard identification*), es decir conocer el tipo de efectos que la sustancia puede producir, y establecer la *relación dosis respuesta* para los diferentes tipos de efectos tóxicos y regímenes de dosificación (efectos de exposición aguda; de exposición repetitiva a corto plazo, subcrónica y crónica; estudios de mutagénesis, carcinogénesis y de reproducción; datos de metabolismo; datos en humanos). En cada estudio de exposición repetitiva, será necesario poder establecer:

a) el tipo de efectos que permita ayudar a decidir sobre la *clasificación y etiquetado*;

b) la *relación dosis-respuesta*, y con ello, lo que es más importante, el *nivel de exposición o dosis al que no se observan efectos adversos (NOAEL)*. Del conjunto de datos se podrá establecer el «*NOAEL relevante más bajo*», que nos indica el nivel de dosis al que no se observa el efecto crítico más sensible en la especie más

Tabla 7.1

El proceso de evaluación de riesgos implica:
 (a) evaluar la exposición,
 (b) evaluar los efectos tóxicos, y
 (c) caracterizar el riesgo, comparando los datos de exposición o ingesta estimada con datos de toxicidad (nivel sin efecto adverso o con probabilidad de riesgo aceptable).

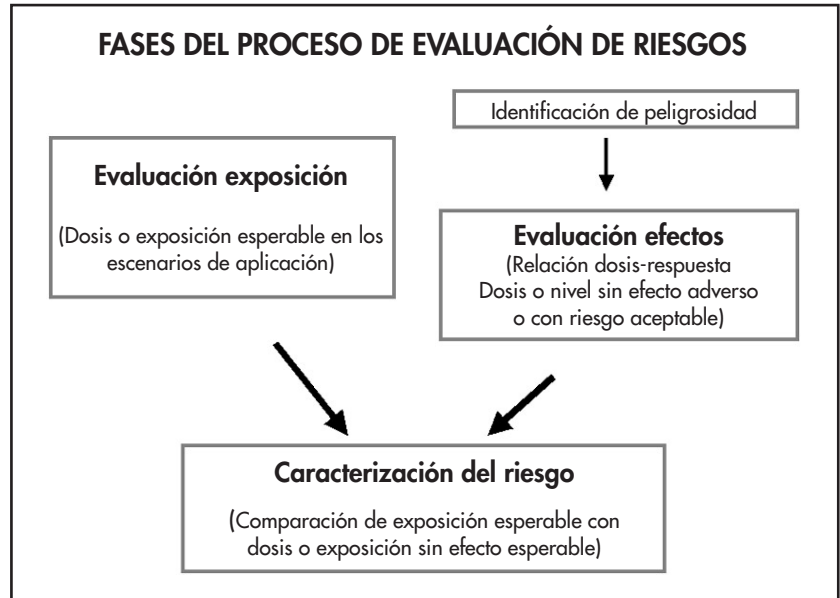


Figura 7.1. Esquema general de las fases del proceso de evaluación de riesgos de sustancias.

sensible. A partir de este valor, siguiendo criterios aceptados se aplicará un factor de incertidumbre o de seguridad (habitualmente mínimo 100) para establecer la *ingesta diaria admisible* (IDA). En el caso de sustancias carcinógenas con mecanismo genotóxico, la exposición admisible se basará en criterios probabilísticos. Por ejemplo, en aguas de consumo en Europa se establece en un incremento de riesgo menor de $1/10^6$ en la exposición por vida y en guías de la OMS en $1/10^5$.

La *caracterización de riesgos* es el objetivo final del proceso de evaluación de riesgos (*risk assessment*).

La Figura 7.1 expresa el esquema general de evaluación de riesgos en el que el concepto fundamental es que para la *caracterización de riesgos* se tendrá que comparar los niveles de exposición esperable en los diferentes escenarios de uso, para

los ambientes laborales, consumidores y población general con los niveles establecidos de ingesta diaria admisible, deducidos de los valores de niveles sin efecto adverso o de criterios probabilísticos de riesgo aceptable. Si la exposición o ingesta esperable es mayor que la aceptable sin efecto, se concluye que hay riesgo. Una vez caracterizado el riesgo será necesaria la toma de decisiones, es decir, la *gestión del riesgo*. Si se dedujo que existe riesgo en el uso o aplicación prevista, la sustancia no podrá ser autorizada o deberán tomarse las medidas apropiadas para disminuir o eliminar el riesgo. Las consecuencias de la caracterización de riesgos son las restricciones de uso de sustancias para minimizar el riesgo.

Evaluación de la exposición

1. Estrategias de evaluación de exposición a sustancias a través de alimentos

La evaluación de la exposición a contaminantes químicos a través de alimentos puede basarse en dos procedimientos:

Tabla 7.2

La caracterización de riesgo es la fase final de la evaluación de riesgos. Implica comparar:

- (a) los niveles de exposición esperable, con
- (b) el nivel de exposición o de ingesta admisible sin efecto adverso esperable o con probabilidad de riesgo aceptable.

a) Medida de las concentraciones reales en los alimentos que se consumen y establecer la ingesta real del contaminante en un determinado supuesto sobre la base de las costumbres dietéticas de consumo de la población objeto de evaluación. Este procedimiento puede ser realista, pero requiere que la sustancia ya esté en uso en el mercado, no permite predecir las consecuencias de una nueva aplicación o incremento de uso, ni permite asumir situaciones como el «peor de los casos razonables».

b) Si la sustancia tiene ya establecidos unos límites máximos en alimentos y agua de consumo, se puede estimar la exposición en humanos asumiendo que estos contienen el máximo límite permitido y teniendo en cuenta la dieta de la población que se quiere evaluar.

c) Modelización sobre la base del uso o aplicación de la sustancia de sus propiedades físicoquímicas.

En cualquier caso, la posible ingesta diaria total de una sustancia en las personas deberá tener en cuenta no solo la ingesta a través de alimentos, sino considerar las diferentes fuentes o rutas de exposición (Figura 7.2), especialmente las siguientes:

- (a) Por vía indirecta a través del medio ambiente:
 - aire,
 - agua,
 - alimentos.
- (b) Exposición laboral.
- (c) Uso o contacto con productos de consumo.

En algunos casos podrían tener que considerarse también otras fuentes de exposición:

- contacto directo con el suelo,
- contacto directo con aguas marinas o de superficie, aguas recreativas.

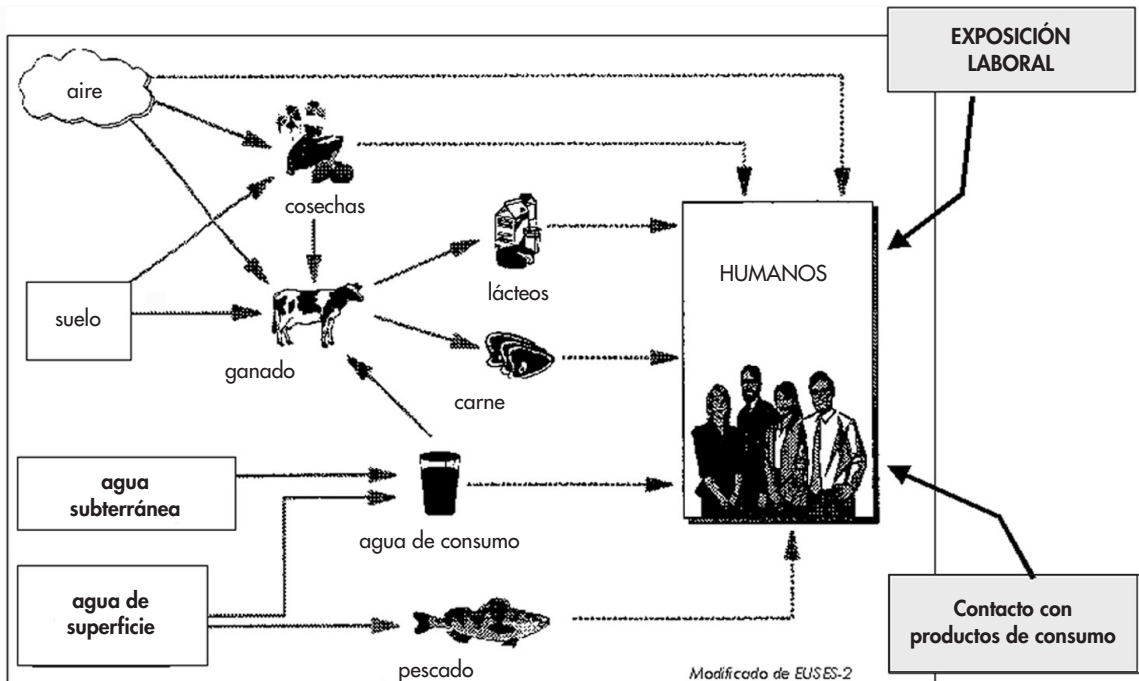


Figura 7.2. Rutas de exposición de sustancias a personas: (a) Por vía indirecta a través del medio ambiente (aire, agua, alimentos). (b) Exposición laboral. (c) Uso o contacto con productos de consumo. (Obtenido de EUSES, European Chemical Bureau).

2. Evaluación de exposición vía alimentos en función del tipo de sustancia

El planteamiento para evaluar la exposición tiene facetas diferentes en los casos de:

- sustancias tóxicas de forma natural en los alimentos (biotoxinas);
- aditivos alimentarios autorizados introducidos deliberadamente con alguna finalidad en el alimento;
- contaminantes ambientales como consecuencia de actividad industrial o urbana;
- residuos de productos fitosanitarios de uso en el proceso agrícola precosecha o en tratamientos postcosecha. Incluye los plaguicidas y otras sustancias agroquímicas.

En todos los casos, la ingesta total en un consumidor de una sustancia a través de los alimentos será la suma de los contenidos en todos los alimentos que consuma, y esto está condicionado por las costumbres dietéticas. Se pueden hacer estimaciones para la dieta media de una población, o para sectores de población, como consumidores con una ingesta especialmente alta de algún tipo de alimentos, en infantes, personas con dietas vegetarianas, altamente consumidoras de pescado, etc., o hacer estimaciones en el peor de los casos, asumiendo en un mismo individuo la ingesta más alta habitual de cada alimento del sector de más consumo. Por ejemplo, para el peor de los casos razonable en una evaluación media europea, asumir que se consume pescado como la media en España o Noruega, carne de cerdo como en Alemania, pasta como en Italia. Si se concluye que no hay riesgo incluso en esa situación exagerada, entonces *no* es necesario afinar más la estimación. Sin embargo, si se deduce que hay riesgo, se puede volver a revisar la estimación considerando situaciones más realistas.

2.1. Estimación de la exposición a componentes naturales

La estimación de la exposición de un componente natural en los alimentos implica conocer

los contenidos habituales y máximos en los alimentos de forma natural habitual o en situaciones especiales. Sobre la base de las costumbres en la ingesta de alimentos, o asumiendo el peor de los casos razonables de alto consumo de un alimento, estimar la máxima ingesta diaria que habitualmente cabe esperar, o la que se puede producir en situaciones de especial alto consumo o circunstancias especiales (por ejemplo, formación de microtoxinas en mareas rojas).

2.2. Estimación de la exposición a aditivos

Dado que los aditivos alimentarios autorizados son una lista positiva regulada, la exposición a aditivos puede hacerse asumiendo que en los alimentos en los que un aditivo está autorizado, este se encuentra a la máxima concentración admitida y estimar la ingesta total posible, la que resultaría asumiendo el peor de los casos razonable de la ingesta individual de los alimentos que los pueden contener. La máxima concentración permitida se habrá previamente considerado como la más baja posible que cumpla los requisitos para la finalidad prevista (por ejemplo, antioxidante) y que en ningún caso permitirá que los individuos puedan superar en sus hábitos alimenticios la ingesta diaria admisible (IDA). Esta se habrá deducido, como se ha indicado en un capítulo anterior, a partir de la dosis diaria sin efecto adverso observable (NOAEL) en estudios a medio o largo plazo.

2.3. Estimación de la exposición a residuos de plaguicidas

La presencia de residuos de plaguicidas, otros productos fitosanitarios de uso agrícola y de residuos de productos veterinarios (medicamentos, promotores de crecimiento, u otros) podrá estimarse o bien la situación real midiendo en los alimentos o estimar el peor de los casos razonable de la misma forma que los aditivos, considerando su presencia en todos

los alimentos al límite máximo de residuos autorizados para cada alimento. La estimación de la exposición se realizará considerando la proporción de los diferentes alimentos en la dieta de la población objeto de estudio. De forma similar, el límite máximo de residuos autorizados se establece considerando los niveles que se producen aplicando el producto a las cantidades que se requieren para ser eficaces para su finalidad y siguiendo las buenas prácticas agrícolas recomendadas. A su vez, cuando se establecen esos límites, se habrá tenido en cuenta que los límites y prácticas autorizadas no deben generar residuos, de tal forma que condujeran a los consumidores a tener ingesta total de la sustancia superior a la IDA (Figura 7.3).

2.4. Estimación de la exposición a contaminantes ambientales

La evaluación de la exposición a un contaminante ambiental puede basarse en dos aproximaciones:

- Medida de la situación real por la determinación analítica de las concentraciones de la sustancia en los alimentos.
- Predicción, usando en modelos de estimación basados en el conocimiento del ciclo de vida de la sustancia, sus fuentes de emisión al medio ambiente, la distribución de las sustancias químicas en los diferentes medios de los ecosistemas, aire, aguas y suelos y de su comportamiento en la cadena alimentaria.

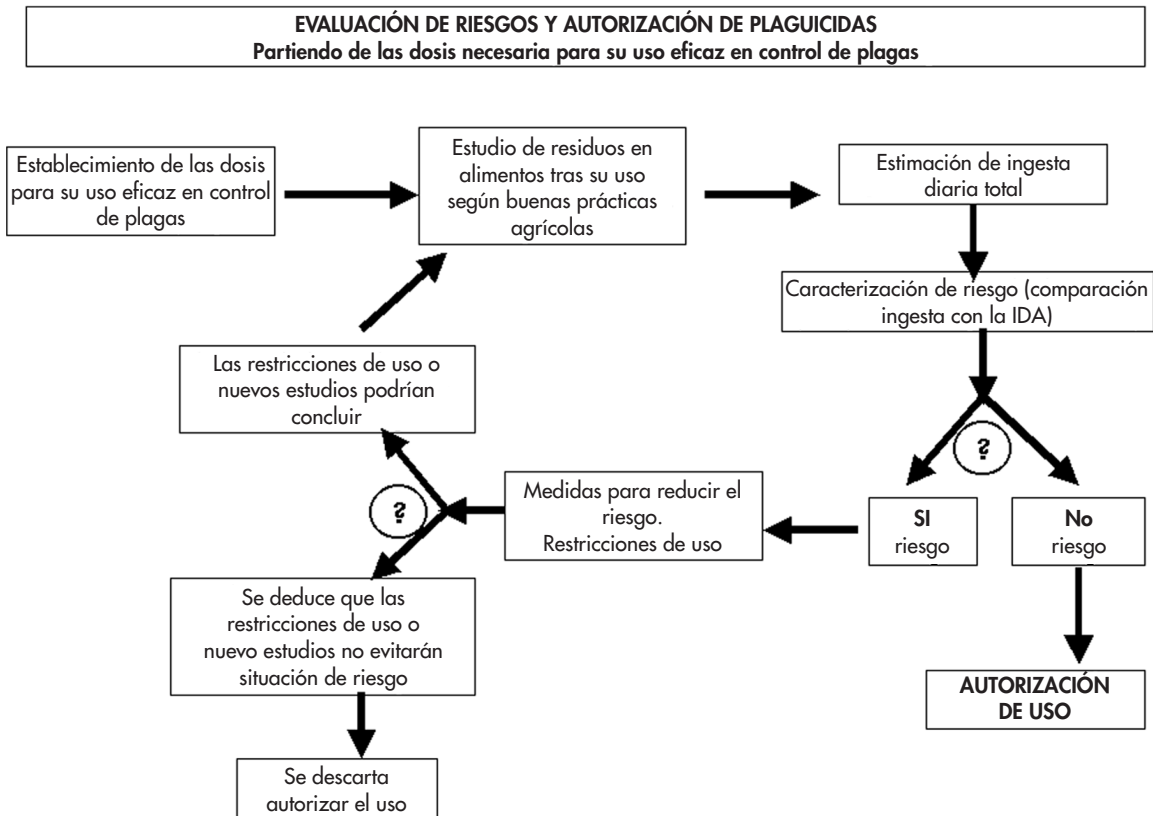


Figura 7.3. Proceso de evaluaciones de niveles de residuos, caracterización de riesgo y toma de decisiones de autorización de plaguicidas. La autorización se podrá dar si no hay riesgo en otros escenarios (medio ambiente, trabajadores que lo manipulan).

- c) Procedimientos mixtos, en los que se conocen algunos datos en situaciones reales o de estudios piloto de campo que permiten afinar los modelos predictivos.

3. Modelos para predicción de la exposición de contaminantes ambientales

Existen sistemas para modelizar y predecir la exposición a contaminantes ambientales. Un buen ejemplo es el sistema desarrollado en el ECB (*European Chemical Bureau*) conocido como EUSES (*European System for Evaluation of Substance*). Este sistema, se basa en un sistema informático que permite introducir muchos datos sobre sus propiedades y comportamiento en el medio ambiente. Partirá de datos básicos de la producción, campo de aplicación, tipos de uso, para establecer el ciclo de vida de la sustancia y propiedades fisicoquímicas. Permite que aquellos datos de los que no existen estudios sobre su comportamiento en el medio ambiente, los deduzca asumiendo el peor de los casos razonables a partir de los datos básicos disponibles. Por ejemplo, si no existen datos reales de campo de su distribución en agua-suelo, los deduce de las propiedades fisicoquímicas de hidrofobicidad y composición de materia orgánica en los suelos habituales de uso de la sustancia. Si no existen datos de bioacumulación en peces, lo deducirá de forma aproximada de sus propiedades fisicoquímicas. De esa forma, el modelo permite refinar las estimaciones y dará estimaciones más realistas cuanto más datos se conozcan.

Para la evaluación de la exposición a contaminantes ambientales se requieren al menos desarrollar las siguientes fases:

- 0) Obtención de datos primarios (propiedades, producción, usos-aplicaciones).
- 1) *Estimación de la emisión* o liberación en los compartimentos ambientales.
- 2) *Distribución y comportamiento* en el medio ambiente a nivel local y regional.

- 3) *Evaluación de la exposición* a ecosistemas acuáticos, terrestres, suelos, sedimentos y al hombre a través del medio ambiente.

3.1. Estimación de la emisión

Para la estimación de la emisión, es necesario establecer las fuentes de contaminación, la producción total anual y si esta es localizada o dispersa, clasificarla por el tipo de uso y campo de aplicación, establecer el ciclo de vida de la sustancia (Figura 7.4) y la proporción de la sustancia que se emitirá al medio ambiente (agua, aire) en cada etapa de su ciclo de vida.

3.2. Estimación de la distribución y comportamiento en el medio ambiente

La distribución y comportamiento en el medio ambiente, se ha de evaluar principalmente en dos escalas espaciales:

- a nivel local, en la vecindad del punto de emisión;
- a nivel regional, que incluye todas las fuentes (puntos de emisión y fuentes difusas).

Para ello es necesario establecer

- Coeficientes de partición en los diferentes medios.
- Tasas de degradación en el medio ambiente.

Lo que entendemos por transporte y transformación en medio ambiente, o por «destino» o «comportamiento» es la descripción de la distribución de una sustancia en el medio ambiente, o en los organismos, y los cambios que la sustancia tiene con el tiempo, en la concentración y forma química en cada compartimento y cómo se intercambia entre estos. Debido a que datos reales medidos del proceso de distribución no están usualmente disponibles para los varios compartimentos, deben de extrapolarse a partir de datos primarios. Así, la evaluación de la distribución y comportamiento en el medio ambiente, implica realizar las siguientes fases y estimaciones:

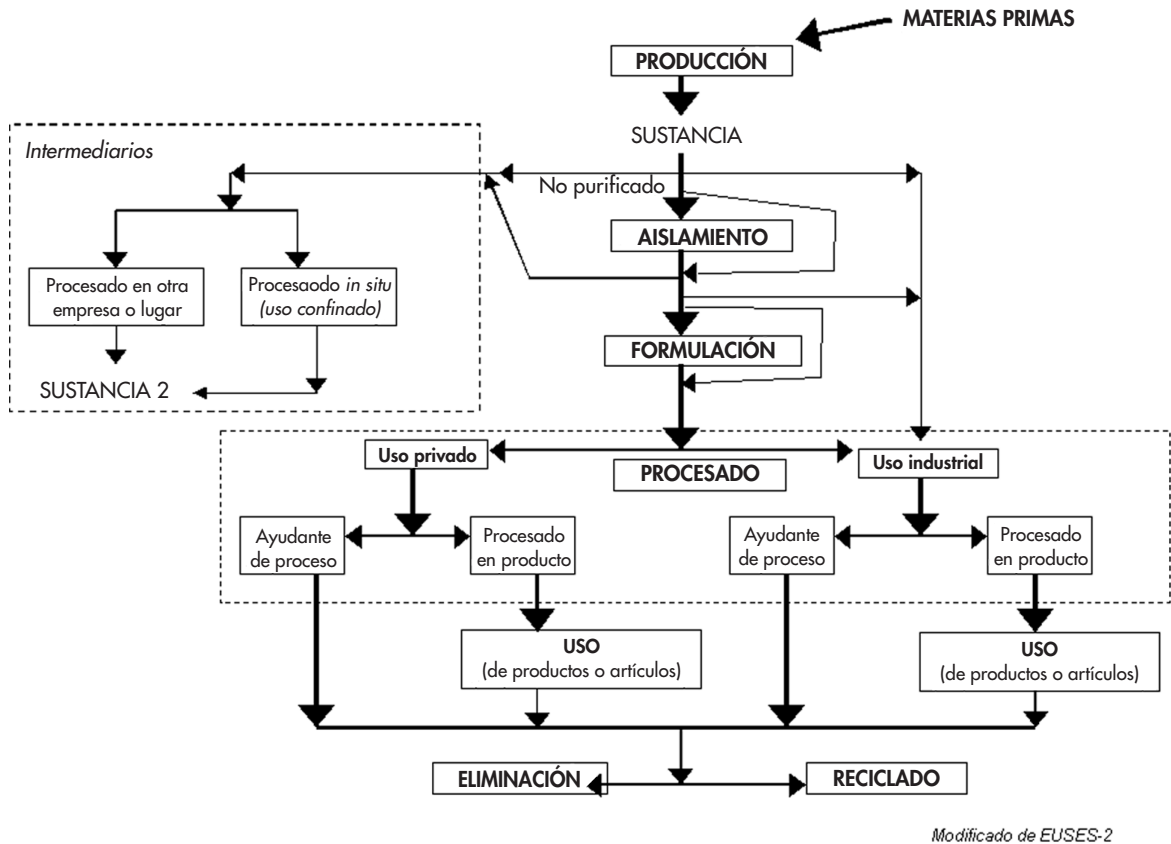


Figura 7.4. Ciclo de vida de una sustancia. (Obtenido de EUSES, UE).

3.3. Estimación de coeficientes de partición, degradación y bioacumulación

1. Determinar los coeficientes de partición gas-aerosol, aire-agua, agua-sólido, a fin de establecer la distribución en los compartimentos, en función de sus afinidades relativas condicionadas por sus propiedades fisicoquímicas, como fuente de datos primarios,

2. Estimar las tasas de degradación en el medio ambiente que condicionarán su distribución y vida en los compartimentos. Se tendrá que considerar básicamente (a) la hidrólisis, y (b) fotólisis en agua, (c) reacciones fotoquímicas en atmósfera, (d) eliminación química y biodegradación en plantas de tratamiento de

aguas residuales, (e) biodegradación en aguas de superficie, sedimentos y suelos. Se preferirán datos medidos, de campo o en estudios piloto experimentales normalizados, pero si no se dispone de ellos se podrán hacer estimaciones en modelos matemáticos a partir de datos primarios de estructura y propiedades fisicoquímicas.

3. Establecimiento de factores de bioconcentración, bioacumulación desde el medio al interior del organismo. La bioacumulación es especialmente importante en peces para sustancias hidrófobas y persistentes. La biomagnificación o incremento de concentración entre especies en la cadena hacia depredadores superiores es especialmente importante al llegar a aves que se alimentan de peces (Figura 7.5).

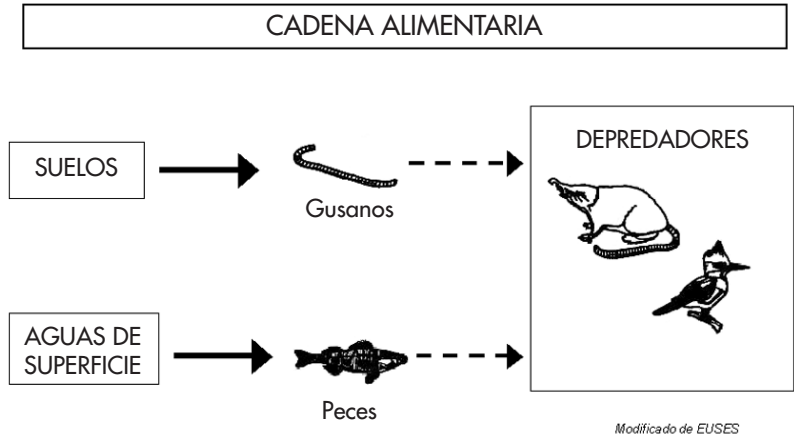


Figura 7.5. Cadena alimentaria desde el medio (agua, suelo) a través de los organismos intermedios en la escala trófica hasta los depredadores superiores. (Obtenido de EUSES).

3.4. Estimación de la concentración en medios y ecosistemas

4. Como consecuencia de la distribución y biodegradación en los diferentes compartimentos se estimarán las concentraciones en los diferentes medios y ecosistemas: aire, aguas de superficie, aguas marinas, aguas subterráneas y suelos naturales y agrícolas. Se asumirá que los humanos estarán expuestos directamente a las concentraciones estimadas en el aire y del agua de bebida tras la modificación de las aguas de superficie o subterráneas con las plantas de potabilización. Animales silvestres y ganado estarán expuestos directamente a las concentraciones en el aire, en sus aguas de bebida correspondientes y al contacto con el suelo. Los vegetales pueden absorber la sustancia desde el aire o a través del suelo. Los peces la ingerirán sobre todo por su absorción a través del agua de su medio.

3.5. Estimación de la concentración en alimentos consumibles por el hombre

5. Así llegaremos a poder estimar, a su vez, las concentraciones esperables en alimentos consumidos por el hombre como vegetales que se contaminaron por el aire o suelos, carne de ganado que pudo contaminarse por el aire, agua de bebida, contacto con suelo y consumo de piensos

vegetales (o eventualmente animales) y en los productos derivados, especialmente lácteos y huevos.

4. Estrategias de estimación de la exposición en humanos

4.1. Dos aproximaciones, monitorización o predicción

a) Utilizar datos disponibles de medidas en situaciones reales en las que se han monitorizado las concentraciones en alimentos, aguas, aire, medio laboral.

b) Hacer predicciones de exposición sobre la base de los datos de volumen de producción tipo de uso, propiedades fisicoquímicas, estimaciones de emisión, distribución y comportamiento el medio ambiente, incluyendo biodegradación y bioacumulación y comportamiento en la cadena alimentaria

Datos disponibles

Para muchas de las sustancias existentes no existe información de dosis y las concentraciones de exposición son muy limitadas o inexistentes, y los datos disponibles son muy variables en tiempo y espacio. Además, en muchos casos no existen datos de potenciales situaciones que podemos considerar «el peor de los casos» o de

situaciones poco favorables en escenarios posibles en los que no se ha monitorizado.

Por ello es casi siempre necesario hacer predicciones que a su vez se apoyen en datos existentes, si se dispone de ellos para refinar estas predicciones.

Objetivo de evaluación

Son habitualmente objetivo de evaluación de exposición:

El hombre:

- Trabajadores y manipuladores.
- Consumidores de productos industriales y alimentos.
- Población humana a través del medio ambiente.

Ecosistemas y poblaciones:

- Microorganismos en STP.
- Ecosistemas acuáticos.
- Ecosistemas terrestres.
- Ecosistemas en sedimentos.
- Depredadores superiores.

La exposición a humanos de contaminantes a través de alimentos forma parte de lo que se conoce como «exposición a través del medio ambiente», tal como se realizan los procesos de evaluación de riesgos en la Unión Europea, en los procesos armonizados de evaluación en la reglamentación europea (EC Reg.1488/94) y las correspondientes Guías Técnicas (TGDs EC 1996), por lo que comenta en más detalle a continuación.

Estimación de la exposición en humanos a través del medio ambiente (aire, agua y alimentos)

Como resultado de los datos de distribución y comportamiento en el medio, se llega a la estimación de la exposición. Los niveles consecuentes en los compartimentos serán las exposiciones esperables para los seres vivos primarios propios de ese compartimento. Se requiere considerar los procesos de intercambio entre com-

partimentos y la bioacumulación y bioconcentración en las cadenas tróficas, para establecer la exposición en depredadores superiores.

La exposición humana a través del medio ambiente considerará la ingesta a través de aire, alimentos vegetales, pescado, ganado (carnes y lácteos) y aguas de bebida. En algunas situaciones habrá de considerarse otras fuentes de exposición por contacto con suelos y con aguas de baño.

Exposición total en humanos

Los humanos podrán, además, tener exposición a la sustancia a través de su actividad laboral y por contacto con productos de consumo (Figura 7.2). La suma de todas estas fuentes de exposición dará lugar a la estimación de la ingesta diaria total que se puede producir. Para algunas sustancias, por su tipo de aplicación y comportamiento, algunas de las fuentes de exposición pueden ser insignificantes.

Se deben distinguir situaciones de exposición en el consumidor habitual o en trabajadores que pueden manipular la sustancia. En estos casos, a su vez, se debe distinguir en la evaluación del riesgo para situaciones de potencial exposición crónica a bajas dosis, más propia del la situación del consumidor de alimentos que las posibles exposiciones agudas, a corto plazo o subcrónicas a dosis mayores que son más habituales en trabajadores que las manipulan.

Por ejemplo, en el caso de plaguicidas de uso agrícola, para el consumidor, la exposición laboral a plaguicidas no es significativa, mientras que la exposición crónica a través de alimentos y aguas puede ser su fuente principal de exposición crónica. Sin embargo para un operador agrícola, la exposición subcrónica o a corto plazo es el riesgo más significativo, junto con el riesgo de intoxicaciones agudas accidentales. En contraste, en el uso de biocidas utilizados como plaguicidas de uso doméstico de interior, el contacto directo como producto de consumo puede ser la fuente principal de exposición en humanos.

Todo este tipo de estimaciones se exigen en Europa a través de los procedimientos de evaluación de sustancias de acuerdo con las exigencias de las diferentes Directivas. Ello implica la evaluación de un dossier que el «notificador» debe presentar con todos los datos que se exigen para poder hacer las estimaciones en los diferentes escenarios de exposición que son utilizadas para la caracterización del riesgo y, posteriormente, evaluadas en las reuniones técnicas entre los expertos de los países miembros de la UE en el ECB, en Ispra (Italia), que propondrán las resoluciones de autorizaciones, restricciones de uso o prohibiciones a la Comisión Europea. Los mecanismos de estos procesos están en previsión de cambios con la creación de la Agencia de Sustancias Químicas ubicada en Helsinki. En otros países y regiones del mundo con alto desarrollo, se han establecido procesos similares, y en países menos desarrollados suelen partir de las evaluaciones de las sustancias activas realizadas en Europa o en EE UU, y partir de ahí autorizar o no productos formulados específicos

Caracterización del riesgo

1. Las consecuencias de la identificación de peligrosidad por los estudios de los efectos tóxicos

La caracterización del riesgo requiere como se indicó en la introducción de este capítulo, la comparación de los datos de toxicidad (evaluación de efectos) con los datos de exposición. Sin embargo, con sólo los datos de toxicidad (y la consecuente identificación de peligrosidad), se producen consecuencias que afectan a conceptos de evaluación de riesgos y a la gestión de riesgos, es decir, a las decisiones a tomar en cuando a la autorización de uso y a las restricciones del mismo. Las consecuencias principales son (Figura 7.6):

1. La clasificación y etiquetado que afecta principalmente desde un punto de vista cualitativo, aunque tiene en consideración la relación dosis-respuesta.
2. Establecimiento de límites máximos permitidos que tiene una base fundamentalmente cuantitativa en base a la relación dosis respuesta.

1.1. Consecuencias en la clasificación y etiquetado

Partimos de que se han evaluado las propiedades toxicológicas de la sustancia, siguiendo los procedimientos y protocolos de ensayos de toxicidad descritos en capítulo anterior y que en Europa son los establecidos en el Anexo V de la Directiva 67/548/CEE. En esa evaluación de los efectos se habrá identificado la «peligrosidad» de la sustancia, es decir, qué tipo de efectos podrá producir. Este tipo de información nos lleva a poder establecer la clasificación de la sustancia bajo criterios que en Europa son los descritos en el Anexo VI de la Directiva 67/548/ CEE. La clasificación se puede establecer sin necesidad de evaluar la existencia de riesgos pero puede condicionar restricciones de uso, especialmente por propiedades que despiertan especial sensibilidad social en las autoridades reguladoras.

1.2. El NOAEL y la IDA condicionan el establecimiento de límites permitidos

Por otro lado, los resultados cuantitativos de la relación dosis-respuestas en estudios repetitivos a corto plazo, exposición subcrónica y a largo plazo, incluyendo estudios de toxicidad crónica, carcinogénesis y estudios de reproducción, además de su papel para establecer la clasificación, permitirán establecer a qué dosis ocurren los efectos, y lo que es más importante en seguridad química, establecer el nivel de dosis sin efecto adverso observado (NOAEL) en cada estudio, y establecer, de entre todos los estudios, qué efectos son más críticos, por su severidad y porque se

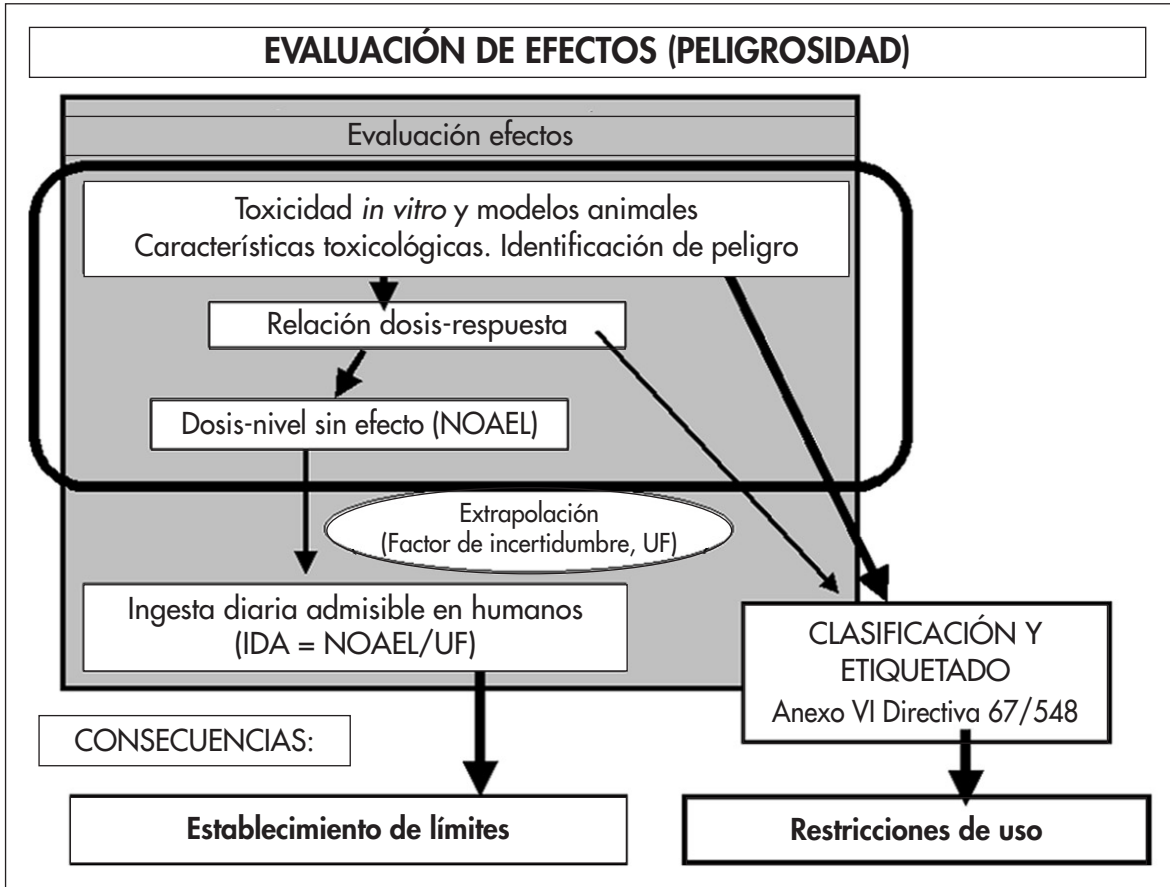


Figura 7.6. Consecuencias de la identificación de peligrosidad por los estudios sobre los efectos tóxicos. Hay consecuencias sobre el etiquetado, de restricciones de uso sobre la clasificación y sobre el establecimiento de límites permitidos en aguas, alimentos, medio laboral y otros.

produzcan a dosis más bajas. Así se establecerá el «NOAEL relevante más bajo». A partir de ello y siguiendo criterios consensuados, se aplicará un factor de incertidumbre, que habitualmente será de 100, para considerar las incertidumbres de la extrapolación de los datos en animales para evaluar riesgos en humanos y la variabilidad interindividual. Este factor podrá aumentarse si hay razones adicionales de incertidumbre o más bajo si el NOAEL se basa en datos relevantes en humanos. El NOAEL dividido por el factor de incertidumbre nos permitirá establecer el valor de la ingesta diaria admisible (IDA) que sería la ingesta que podríamos admitir para las personas de consumo por vida sin riesgos para la salud.

1.3. El caso de sustancias carcinogénicas, genotóxicas y tóxicas a la reproducción (sustancias CMR)

Esta aproximación sobre la base del NOAEL e IDA es aceptable para sustancias cuyo efecto tóxico relevante se admite que tiene un umbral de dosis por debajo del cual no se produce efecto adverso. Sin embargo, esto no es aceptado para sustancias carcinogénicas por mecanismo de daño al genoma (genotóxicas), especialmente en el caso de sustancias mutágenas. En estos casos se considera que el mecanismo de toxicidad condiciona a la necesidad de una eva-

luación sobre base probabilística y que, aun existiendo una clara relación dosis-respuesta, no existe un umbral sin efecto, sino que la probabilidad de inducción de tumores disminuye con la dosis pero nunca es cero. Este es el principio científico por lo que, por ejemplo en el tabaco, (el principal causante de cáncer en humanos) el no fumador (potencial fumador pasivo) puede exigir el derecho de no estar expuesto a ninguna concentración al humo del tabaco, aunque el fumador reclame poder decidir sobre un riesgo individualmente aceptado para sí mismo. Datos del Ministerio de Sanidad (véase Web Ministerio de Sanidad y Consumo. España) estiman que miles de personas fallecen en España anualmente por enfermedades derivadas y causadas por el humo del tabaco sin ser fumadores.

Esa circunstancia, en las sustancias carcinogénicas y mutagénicas, genera una especial sensibilidad, y se producen dos consecuencias reguladoras:

a) Se producen determinadas restricciones de uso por el mero hecho de tener esa propiedad, independientemente de que el riesgo o probabilidad en la aplicación real de la sustancia sea o no significativa.

b) Cuando se autoriza la sustancia, en los casos en los que nos es posible impedir la exposición cero, se regula sobre la base de que la exposición producida por los límites de máxima concentración admitida (MCA) en un determinado medio, agua o alimento, no produzca una probabilidad mayor que la aceptable. Así por ejemplo, el criterio general en la OMS para límites permitidos en agua potable es que el consumo de por vida de agua contaminada al límite permitido tenga una incidencia menor de 1/100.000, mientras que en Europa el criterio es que el riesgo máximo aceptable es de 1/1.000.000.

La cuestión de especial sensibilidad se produce también en sustancias que originan efectos en la reproducción. Por lo que las sustancias conocidas como CMR (clasificadas como carcinógenas, mutagénicas o tóxicas a la reproducción) tienen restricciones especiales indepen-

diente de la evaluación cuantitativa del riesgo. Por ejemplo, en la directiva de productos cosméticos (Directiva 2003/15/CE) se prohíben el uso de ingrediente, que sean sustancias clasificados como CMR en las categoría 1 2 y 3, aunque en algunos casos pueden admitirse los de categoría 3, tras su demostración de que no provocan riesgos y lo admita el Comité de Cosméticos. En la directiva de Biocidas (Directiva 98/8/CE) los biocidas en categoría 1 y 2 no se autorizan para uso no profesional, por ejemplo insecticidas de uso doméstico, incluso aunque se demostrase que no existe riesgo significativo ni para los usuarios ni el medio ambiente.

1.4. Los límites permitidos se establecen en función de la aportación a la IDA de los diferentes alimentos

La consecuencia de la estimación cuantitativa de la relación dosis respuesta y el estableciendo de un valor aceptado del IDA es la posibilidad de establecer límites máximos permitidos para garantizar que el uso previsto de la sustancia no podrá producir exposición en humanos superiores a la IDA. En el caso de alimentos, implica previamente establecer qué proporción de la IDA se podrá aportar a través del consumo de un tipo de alimentos. El caso más sencillo y mejor establecido es el criterio para establecer la máxima concentración admitida en agua potable.

2. El ejemplo de los criterios de calidad del agua potable

2.1. Asunciones y criterio habitual

El criterio habitual para establecer límites de concentración en agua potable en sustancias no carcinogénicas es que el agua potable no aporte una determinada proporción de la IDA. Para la protección a personas adultas, tanto en la OMS, como en la UE, el criterio es que el agua no debe aportar más del 10% de la IDA. En la UE se asume como referencia básica, un adulto de 70 kg de peso que consume 2 litros de agua por día.

2.2. *Un ejemplo basado en NOAEL e IDA*

Así, por ejemplo, de una sustancia de la que se ha establecido un valor de NOAEL de 10 mg/día/kg peso corporal, si se acepta un factor de incertidumbre habitual de 100, la IDA aceptada sería de 0,1 mg/día/kg. Para un adulto de 70 kg de peso, implica 7 mg/día/persona. Si admitimos que solo el 10% debe ser aportado por el agua, y el consumo diario es 2 litros, el límite permitido bajo este criterio toxicológico sería de 3,5 mg/litro de agua. Ahora bien, este criterio toxicológico sirve para establecer el límite máximo que podría aceptarse sin riesgo para la salud, pero suelen tenerse en cuenta otras consideraciones: consideraciones de sensibilidad social, dificultades o posibilidades técnicas de su eliminación o necesidades para resolver otros riesgos sanitarios.

2.3. *Contraste entre lo deducido y lo legislado*

El ejemplo citado corresponde a una sustancia concreta usada como plaguicida agrícola en tratamientos poscosecha para protección contra gusanos. La directiva de agua potable (Directiva 98/83/CE y la correspondiente transposición en España por el RD 140/2003) establece un máximo individual para cada plaguicida de 0,1 microgramos/litro, lo que sería un valor 3.500 veces menor que el que se deduciría por criterio toxicológico. Ello es debido a que dado que los plaguicidas no cumplen ninguna función necesaria en el agua, que su presencia en ella es solo por contaminación y que puede evitarse, se desea que esta sea reducida al mínimo posible y se establece un límite por criterios de sensibilidad de los métodos analíticos de control, no sobre la base del riesgo. Ahora bien, el límite estimado por criterios toxicológicos de seguridad puede tenerse en cuenta cuando por una situación transitoria se produce una contaminación, y si no existen fuentes alternativas de abastecimiento técnicamente viables, puede admitirse no cortar el suministro a la pobla-

ción, siempre que no implique un riesgo y se tomen las medidas necesarias para eliminar la contaminación lo antes posible. La propia directiva europea permite procedimientos de exención, informando a la Comisión y manteniendo principios de transparencia en la información al consumidor.

La protección a un sector especialmente sensible a la población determinó la reducción del límite de plomo de 50 microgramos/litro a 10 microgramos por litro para la protección al infante en desarrollo. En este caso la OMS usó el criterio de que un niño de menos de 30 kg de peso consume 1,5 litros de agua y un infante de menos de 10 kg, consume 1 litro de agua, y que asumiendo que usa biberones de leche maternizada preparados con agua del grifo, y que por lo tanto, la mayoría de la ingesta de plomo puede proceder del agua, asumió que la ingesta de plomo a través del agua fuese del 50 % de la IDA. Este criterio fue también aceptado en la UE y se estableció un límite de 10 microgramos/litro. Debido a la dificultad técnica que obliga a la supresión total de las tuberías de plomo, se estableció un periodo transitorio con un límite de 25 microgramos/litro.

2.4. *El caso de sustancias carcinógenas*

Para las sustancias carcinógenas, el criterio de seguridad es que el consumo en agua contaminada a la máxima concentración admitida durante toda la vida (referencia 70 años), no debe producir un incremento en la probabilidad de cáncer de más de 1 a un millón bajo criterios de extrapolación que de por sí normalmente hipervaloran el riesgo. Este criterio es el que determina los límites permitidos de sustancias como benceno, acrilamida y otros. Sin embargo, los límites del arsénico y de derivados halogenados de bajo peso molecular (haloformos) están establecidos a valores que producen un riesgo mayor que el estándar de $1/10^6$. En el caso de los derivados clorados, que se forman mayoritariamente por la reacción del cloro con la materia orgánica, una exigencia más restrictiva implicaría reducir la cloración del agua con los riesgos microbio-

lógicos y las posibles graves consecuencias en salud pública. Sólo mejorando la eliminación de materia orgánica antes de la cloración y las técnicas de eliminación de derivados halogenados podrá permitir una legislación en el futuro más restrictiva. En el caso del arsénico, el nivel máximo permitido, que en España en algunas zonas se acerca a su límite legal, se ha demostrado que puede producir un incremento de incidencia de un cáncer de piel no mortal (una especie de dermatitis) con una probabilidad de 2/10.000. Aunque esta estimación es bajo criterios que hipervaloran el riesgo, en cualquier caso es dos órdenes de magnitud superior al criterio estándar de 1 a un millón. No es un cáncer mortal y existen dificultades técnicas para su reducción, pero en todo caso es un valor que en el futuro deberá revisarse.

3. La caracterización del riesgo y margen de seguridad (MOS)

Es importante insistir en que la caracterización del riesgo implica comparar la exposición o dosis que se produce o que se prevé que se pro-

ducirá, con la dosis que se considera aceptable sin riesgo para la salud o con probabilidad de riesgo aceptable. Por lo tanto, se basa en dos pilares de datos (Figura 7.7):

- Datos de exposición (estimación de la exposición en el escenario de uso a evaluar).
- Datos de los efectos (estimación de la dosis aceptable sin efecto o sin riesgo inaceptable).

A partir de estos datos se podrá:

- Caracterizar el riesgo.

Si no existen ambos tipos de datos (exposición y de efectos) bajo ningún concepto puede haber *caracterización de riesgo* y por lo tanto no se puede completar el proceso global de *evaluación de riesgos*. Esta idea es fundamental y es frecuente oír o leer grandes errores conceptuales por mal uso o desconocimiento de este principio tan elemental y fundamental.

Cuando partimos de una sustancia que está en uso, tal como hemos insistido anteriormente, el nivel de exposición puede medirse en los

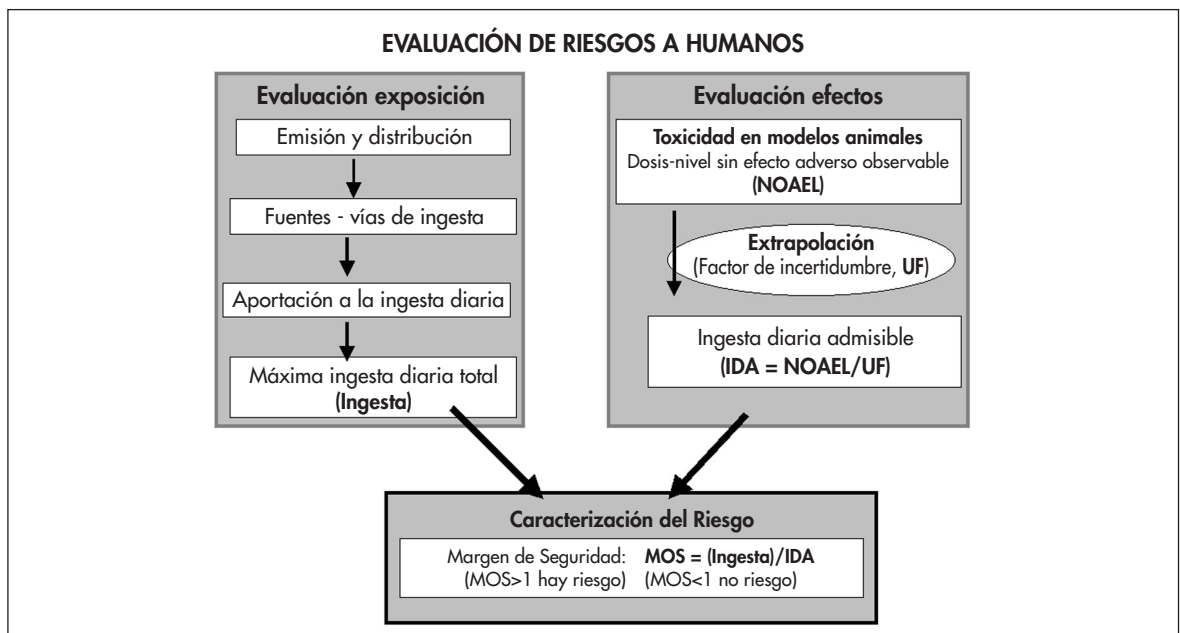


Figura 7.7. La caracterización del riesgo se basa en dos pilares: datos de exposición y datos de efectos tóxicos.

medios, en las aguas y en los alimentos y establecer la ingesta en personas sobre esta base acompañada del conocimiento de las costumbres dietéticas tanto para el ciudadano medio como para sectores especiales de población. Para la autorización de sustancias nuevas (Directiva 92/32) o para la evaluación de fitosanitarios (Directiva 91/414/CEE), es necesario en cualquier caso hacer estimaciones bajo escenarios que asuman, no ya la situación real o de estudios piloto, sino situaciones que asuman situaciones razonables de riesgo de exposición tanto en ecosistemas como en la exposición al hombre a nivel laboral y a través del medio ambiente.

En cualquier caso, para evaluar la ingesta en humanos es necesario establecer las diferentes posibles fuentes de dicha ingesta para calcular la ingesta diaria total real o predecible con los datos disponibles.

El dato toxicológico crítico (TOX) que representa la ingesta máxima admisible o nivel de exposición aceptable podrá ser la IDA, deducida del NOAEL dividido por el factor de incertidumbre o la dosis que produzca un riesgo de cáncer menor que el aceptable (normalmente 1 a un millón).

3.1. Margen de seguridad (MOS) o razón de caracterización de riesgo (RCR)

La razón entre el parámetro que nos indica el nivel de exposición máximo aceptable (TOX) y el parámetro que nos indica el nivel de exposición que se produce o que se predice que puede producirse nos da lo que se conoce en general como la «razón de caracterización del riesgo» (RCR). También se utiliza a veces la expresión razón de toxicidad de exposición (TER, *toxicity exposure ratio*). Como tal razón, los dos parámetros de numerador y denominador deben estar en las mismas unidades. Por ejemplo, en evaluación de riesgos en ecosistemas acuáticos, se expresa siempre como concentración en el medio, tanto la concentración predecible en el medioambiente (PEC) como la concentración

que se considera sin riesgo de efectos tóxicos para el ecosistema (PNEC).

En la evaluación de riesgos a humanos se usa habitualmente la expresión de «margen de seguridad» (MOS *margin of safety*). En la evaluación de riesgos en el medio laboral los dos parámetros en numerador y denominador pueden expresarse también en forma de concentración en el aire en el medio laboral. Ahora bien, en la evaluación por la exposición a través del medio ambiente, y especialmente por aguas y alimentos, se suele expresar en forma de dosis ingerida, en mg de sustancia absorbida por kg de peso corporal (por día en efectos de exposición repetitiva). Si el MOS es menor de 1 implica que la ingesta esperable (exposición) que está en el denominador es mayor que la aceptable sin efectos, y por lo tanto se deduce que hay riesgos. Por el contrario, si el MOS es mayor de 1, indica que la ingesta es menor que la exposición en tantas veces como indica el MOS, y que, por lo tanto, no hay riesgo (Figura 7.8).

Pueden hacerse estimaciones del MOS para situaciones de exposiciones agudas o de exposiciones repetitivas a corto plazo a exposición subcrónica o exposición crónica a largo plazo, dependiendo de la situación que se quiere evaluar. También pueden hacerse estimaciones del MOS para exposiciones por vía oral, dérmica o inhalatoria, o considerar la situación con exposiciones simultáneas por todas las vías.

Aquellas sustancias o situaciones en que la exposición por fuentes diferentes a los alimentos o agua de bebida no sea significativa, solo se considerará la ingesta oral. Sin embargo, en muchas circunstancias las personas pueden estar expuestas por diversas rutas, especialmente en contaminantes de amplio uso o muy diseminados en el medio ambiente.

La evaluación de riesgos, y la consecuente caracterización de riesgos, es pues un proceso complejo, requiere el manejo de mucha información y procedimientos que precisan especialistas en estos procedimientos. El dossier de datos que se exigen para la evaluación toxicológica de una sustancia puede ocupar del orden de un metro cúbico de documentación en papel (o un simple CD-ROM). No es solo un proceso científico, sino

Razón de caracterización de riesgo (uso general)

$$\text{RCR} = \frac{\text{Nivel de exposición máximo aceptable sin efecto (TOX)}}{\text{Nivel de exposición que se produce o que se predice}}$$

Margen de seguridad (uso en riesgos a humanos)

$$\text{MOS} = \frac{\text{IDA o dosis con probabilidad de efecto aceptable}}{\text{TDI (Ingesta que se produce o que se predice)}}$$

Valor	Conclusión
MOS < 1	Hay riesgo.
MOS = 1	Motivo de preocupación.
MOS > 1 Y < 10	No hay riesgo teórico pero hay motivo de preocupación.
MOS > 10	No hay riesgo

Figura 7.8. Margen de seguridad como resultado de la caracterización del riesgo.

que requiere unas estrategias y procesos administrativos y de gestión para garantizar unas evaluaciones armonizadas e internacionalmente aceptadas. Aunque existen herramientas informáticas que ayudan, como la bases de datos IUCLID /) o el sistema de evaluación USES, las conclusiones no son el resultado simple de aplicar un algoritmo, necesitan el juicio de expertos, el consenso en comités de expertos y la toma de decisiones finales. Hay pues una parte científica, no exenta de discusión, hasta establecer el NOAEL, posible discusión en adoptar factores de incertidumbre para establecer el IDA, motivos de discrepancia en la validez de los supuestos en las estimaciones y escenarios de estimación de la exposición, en la caracterización final del riesgo, y sobre todo motivos de discrepancia en las decisiones finales de clasificación y en la posterior gestión del riesgo para decidir restricciones de uso y medidas para mitigar el riesgo.

Ahora bien, es un campo apasionante, y que con las tendencias actuales a evaluar todas las sustancias existentes en el mercado (véase *Libro blanco* y proyectos de regulación del nuevo sistema europeo REACH) en donde hay necesidad de formación de toxicólogos expertos en evaluación de riesgos, por lo que es imprescindible

su inclusión en las materias docentes básicas de toxicología y el desarrollo de cursos especializados de postgrado.

Bibliografía

- Benford D (2000). The acceptable daily intake. A tool for ensuring food safety. ILSI Europe Concise Monograph Series. ILSI Press. ILSI Europe Brussels. (Disponibile en Internet (www.ilsa.org)).
- Comisión Europea (2001). Libro Blanco. Estrategia para la futura política en materia de sustancias y preparados químicos. Bruselas, 27.2.2001 COM(2001) 88 final.
- Commission Regulation (EC) N.º 1488/94 of 28 June 1994 laying down the principles for the assessment of risks to man and the environment of existing substances in accordance with Council Regulation (EEC) N.º 793/93.
- Council Regulation (EEC) N.º 793/93 of 23 March 1993 on the evaluation and control of the risks of existing substances.
- Decisión 2002/150/CE, Decisión 2001/721/CE, Decisión 2004/333/CE, Decisión 2004/34/CE, Decisión 2004/335/CE, Decisión 2004/336/CE, Decisión 2003/867/CE.

- Decisiones CE sobre autorizaciones de grasas amarillas para untar, lácteos con fitoesteroles fitoestanoles, saltarín, añadidos, proteínas de patata coagulada, y trehalosa.
- Directiva 67/548/CEE del Consejo, de 27 de junio de 1967, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en materia de clasificación, embalaje y etiquetado de las sustancias peligrosas.
- Directiva 2001/59/CE de la Comisión de 6 de agosto de 2001 por la que se adapta, por vigésima octava vez, al progreso técnico la Directiva 67/548/CEE del Consejo relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en materia de clasificación, embalaje y etiquetado de las sustancias peligrosas. (28 adaptación al progreso técnico de la Directiva 67/548/EEC).
- Directiva 98/8/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de febrero de 1998 relativa a la comercialización de biocidas.
- Directiva 91/414/CEE del Consejo de 15 de julio de 1991 relativa a la comercialización de productos fitosanitarios. (Modificada por Directivas 96/68/CE, 2000/80/CE y 2001/21/CE).
- Directiva 98/83/CE del consejo de 3 de noviembre de 1998 relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano.
- EUSES 2.0 (European Union System for Evaluation of Substances). EC (2004) European Union System for the Evaluation of Substances 2.0 (EUSES 2.0). Prepared for the European Chemicals Bureau by the National Institute of Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, The Netherlands. Available via the European Chemicals Bureau, <http://ecb.jrc.it>. Hofer M, Shuker L (2000). Workshop on Assessing Health Risk from Environmental Exposure to Chemicals: the Example of Drinking Water. *Food Chem Toxicol* 38, Supplement 1. (Reimpreso en ILSI Press 2002, disponible en Internet: www.ilsi.org).
- ILSI (1995). The safety assessment of novel foods. Guidelines. ILSI Europe Report Series. Novel Food Task Force. (Disponible en Internet (www.ilsi.org)).
- ILSI (2003). The safety assessment of novel foods and concepts to determine their safety in use. ILSI Europe Report Series. Expert group report reviewed at a workshop held in november 2002. Organised by the ILSI Europe Novel Food Task Force. (Disponible en Internet (www.ilsi.org)).
- Kroes R, Renwick AG, Cheeseman M, Kleiner J, Mangelsdorf I, Piersma A *et al.* (2004). Structure-based thresholds of toxicological concern (TTC): guidance for application to substances present at low levels in the diet. *Food Chem Toxicol* 42: 65-83.
- Reglamento (CE) n.º 641/2004 de la Comisión de 6 de abril de 2004 sobre las normas de desarrollo del Reglamento (CE) n.º 1829/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a la solicitud de autorización de nuevos alimentos y piensos modificados genéticamente, la notificación de productos existentes y la presencia accidental o técnicamente inevitable de material modificado genéticamente cuya evaluación de riesgo haya sido favorable.
- Reglamento (CE) n.º 1829/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2003 sobre alimentos y piensos modificados genéticamente.
- Reglamento (CE) N.º 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo de 27 de enero de 1997 sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios.
- Proceedings of the International Symposium on Functional Foods: Scientific and Global Perspectives (2002) *Br J Nutr* 88[S2]:S123-S235).
- Schilter B, Andersson C, Anton RC, Constable A, Kleiner J, *et al.* (2003). Guidance for the safety assessment of botanicals and botanical preparations for use in food and food supplements. *Food Chem Toxicol* 41: 1625-1649.
- Verschuren PM (2002). Functional foods – scientific and global perspectives. Summary report of an international symposium held in october 2001 Paris, France. ILSI Europe Functional Food Task Force. ILSI Press. ILSI Europe Brussels. (Disponible en Internet (www.ilsi.org)).
- Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano (boe 21 FEB 2003).
- Directiva 80/777/CEE de 15 de julio de 1980. Aproximación de las legislaciones sobre explotación y comercialización de aguas minerales naturales.
- WHO. *Guidelines for Drinking-Water Quality*, 2nd edition. Vol. 1 - Recommendations WHO, Geneva, 1993. Volume 2 - Health criteria and other supporting information WHO, Geneva, 1996. Volume 3 - Surveillance and control of community supplies. WHO, Geneva, 1997. (Disponible en Internet en www.who.int y seguir la ruta WHO > WHO sites > WSH > Drinking Water Quality).

Ana Isabel Gago-Martínez, Isabel Ruppén, James Hungerford

Introducción. Intoxicación paralizante (PSP). Intoxicación diarreica (DSP). Pectenotoxinas (PTX). Yessotoxinas (YTX). Intoxicación amnésica (ASP). Toxinas emergentes. Conclusiones. Bibliografía.

Introducción

El fitoplancton marino se ve frecuentemente afectado por la presencia de algas microscópicas que sirven de alimento a especies tales como moluscos bivalvos (mejillones, almejas, vieiras, ostras, etc.) así como larvas de crustáceos y otras especies marinas. La proliferación masiva de algas es beneficiosa para la agricultura, sin embargo, dicha proliferación puede tener también efectos negativos, y causan importantes daños socioeconómicos.

La primera referencia a episodios tóxicos de este tipo podría encontrarse en la Biblia: (*Éxodo* 7:20-21) «...las aguas de los ríos se convirtieron en sangre, los peces murieron, los egipcios no podían beber el agua del río».

Uno de los primeros casos fatales de envenenamiento tras la ingestión de mariscos contaminados con toxinas de dinoflagelados fue informado en 1793 (Poison Cove, British Columbia). En aquel entonces, a las tribus locales de la India

no se les permitía consumir mariscos cuando las aguas del mar se volvían fosforescentes debido a proliferaciones de dinoflagelados, este hecho fue entonces atribuido a la presencia de ciertas toxinas alcaloides, hoy en día denominadas como «toxinas paralizantes», *paralytic shellfish poisoning* (PSP). Desde entonces se ha informado de al menos 2.000 casos de intoxicaciones de este tipo a lo largo de la geografía mundial. Por todo ello se planteó la necesidad de controlar los compuestos responsables para asegurar la salubridad de los alimentos de origen marino.

La proliferación masiva cada vez más frecuente de organismos fitoplanctónicos (dinoflagelados y diatomeas principalmente) que da origen a episodios tóxicos está determinada por las condiciones ambientales del medio en el que viven y la influencia de un gran número de factores físicos (salinidad, temperatura, luz del medio...) y químicos, como es la presencia de nutrientes (nitrógeno, fósforo, ácidos húmicos, etc.) debido al aumento de la contaminación en aguas costeras y al uso de fertilizantes en agricultura.

Entre las contaminaciones más importantes de alimentos de origen marino por proliferaciones de algas tóxicas, y consecuentemente de humanos consumidores de los mismos, se encuentran las intoxicaciones PSP (*paralytic shellfish poisoning* o envenenamiento por toxinas paralizantes), DSP (*diarrhetic shellfish poisoning* o envenenamiento por toxinas diarreicas) y ASP (*amnesic shellfish poisoning* o envenenamiento por toxinas amnésicas).

Intoxicación paralizante (PSP)

La intoxicación paralizante (PSP) es un síndrome neurotóxico que resulta del consumo humano de alimentos marinos contaminados. Las toxinas asociadas con este síndrome fueron denominadas «saxitoxinas», ya que en un principio se creía que la saxitoxina era la única responsable de este tipo de intoxicación. La incidencia de estos episodios se incrementó considerablemente desde 1970 y en la actualidad esta contaminación está apareciendo en regiones del mundo donde no había surgido con anterioridad.

1. Organismos productores

Los organismos considerados responsables de este tipo de intoxicación son mayoritariamente dinoflagelados de los géneros *Gonyaulax*, *Alexandrium* y *Pyrodinium*, así como ciertas especies de cianobacterias, o algas verdeazuladas presentes en aguas dulces, tales como *Aphanizomenon flos-aquae*, las cuales se ha descubierto recientemente que contienen saxitoxina o compuestos derivados de la misma, y son además responsables de envenenamientos de animales terrestres y marinos que habían bebido en estanques contaminados con este tipo de algas. El vínculo entre toxicidad de alimentos de origen marino, fundamentalmente mariscos y dinoflagelados, se estableció por vez primera en 1927, después de un episodio tóxico en la Bahía de San

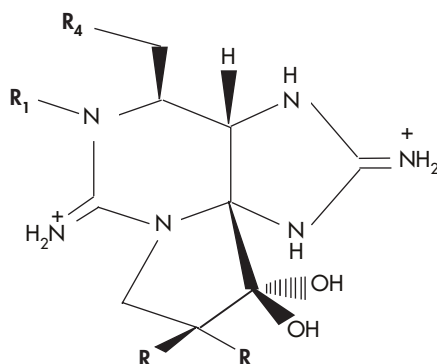
Francisco. El dinoflagelado tóxico fue asignado al género *Gonyaulax* y denominado *G. catenella*. Posteriormente se encontraron ciertos dinoflagelados de similar morfología como responsables de este mismo tipo de toxicidad; estos organismos se han asignado normalmente al género *Gonyaulax*. Recientes revisiones taxonómicas han hecho que dichos dinoflagelados sean hoy día considerados como *Alexandrium* (Balech, 1985). Especies de *Pyrodinium bahamense* fueron encontrados también como responsables de un episodio tóxico en Papua, Nueva Guinea. Recientemente se han detectado nuevos análogos de saxitoxina (GC1, GC2 y GC3) en muestras de *Gymnodinium catenatum* (Negri *et al.*, 2003).

2. Propiedades químicas

Los componentes tóxicos del grupo PSP constituyen un grupo de compuestos solubles en agua con elevado carácter polar. Su estructura química se muestra en la Figura 8.1. A pesar de que la saxitoxina fue considerada inicialmente como el único compuesto responsable de esta intoxicación, hoy en día se conocen más de veinte análogos de la misma de ocurrencia natural. La molécula de saxitoxina es una tetrahidropurina compuesta por dos grupos funcionales guanidinio. En el C-11 la saxitoxina posee una función diol. Tradicionalmente las toxinas PSP, se dividieron en tres grupos: carbamatos, sulfocarbamatos y decarbamatos (Oshima *et al.*, 1989). Recientemente se han añadido a este grupo unos cuantos compuestos deoxicarbamatos y nuevas formas de saxitoxina denominadas GC1, GC2 y GC3, en las que un grupo p-hidroxibenzoato está unido al carbón 17. Las relaciones estructurales entre estos compuestos sugieren la posibilidad de múltiples bioconversiones entre estos componentes PSP.

3. Toxicología

Los efectos *in vitro* de las saxitoxinas han sido cuidadosamente estudiados (Kao *et al.*, 1971). La saxitoxina da lugar a una depresión en músculo cardíaco, así como a un bloqueo fisiológico de los canales de sodio entre las membranas nerviosas.



R ₁	R ₂	R ₃	Carbamato	N-Sulfocarbamato	Decarbamato	p-hidroxibenzoato
			R ₄ = -OONH ₂ ⁻	-OONHSO ₃ ⁻	-OH	
H	H	H	STX	GTX5	dcSTX	
H	H	OSO ₃ ⁻	GTX2	C1	dcGTX2	GC1
H	OSO ₃ ⁻	H	GTX3	C2	dcGTX3	GC2
OH	H	H	NEO	GTX6	dcNEO	GC3
OH	H	OSO ₃ ⁻	GTX1	C3	dcGTX1	
OH	OSO ₃ ⁻	H	GTX4	C4	dcGTX4	

Figura 8.1. Estructura de las toxinas PSP.

Los principales síntomas de este tipo de intoxicación incluyen temblores y entumecimiento en la boca y los labios en un corto periodo de tiempo tras la ingestión de especies contaminadas con PSP, extendiéndose al resto de la cara y cuello. También se observa una sensación de hormigueo en los dedos seguida de dolores de cabeza y mareos. En algunos casos se observan también náuseas y vómitos cuando se inicia la intoxicación. En casos de intoxicaciones moderadas o severas pueden darse parestesias en brazos y piernas. Posteriormente los pacientes pueden presentar incoherencia en el habla y sensación de debilidad, así como dificultades respiratorias en pacientes con intoxicaciones severas, produciéndose parálisis en los músculos y finalmente la muerte como consecuencia del incremento progresivo de las dificultades respiratorias (Prakash *et al.*, 1971).

La principal fuente de la intoxicación es el consumo de bivalvos, incluyendo mejillones, almejas, ostras, etc.; sin embargo, algunos otros alimentos marinos, tales como cangrejos y

otros peces, pueden ser responsables también de este tipo de intoxicación.

Estas toxinas son absorbidas rápidamente por el tracto intestinal. La eliminación de las toxinas PSP dura aproximadamente 90 minutos y los estudios clínicos han mostrado que los pacientes que sobreviven las primeras 24 horas, normalmente se recuperan aparentemente sin efectos posteriores (Kao, 1993). En términos de toxicidad los compuestos sulfocarbamilados son considerados como los menos tóxicos, sin embargo, estos compuestos pueden convertirse en carbamatos, que son los compuestos PSP más tóxicos en condiciones ácidas (Hall *et al.*, 1990). Los niveles de toxinas que pueden causar intoxicaciones varían considerablemente, probablemente debido a diferencias sensibles entre individuos así como a la precisión de los métodos utilizados para la cuantificación. Las intoxicaciones suaves en adultos se pueden dar a dosis de toxinas PSP entre 304-4.128 µg/persona, mientras que las intoxicaciones severas están causados por dosis entre 576 y 8.272 µg (Prakash

et al., 1971). Otras fuentes consideran que los síntomas suaves pueden aparecer entre 144 y 1.660 µg STX-equivalentes/persona, y las intoxicaciones fatales entre 456 y 12.400 µg STX-equivalentes (Acres *et al.*, 1978).

No hay un antídoto específico para las toxinas PSP. El tratamiento clínico de los pacientes intoxicados con estas toxinas es de soporte, si el vómito no ocurre espontáneamente, se inducirá mediante eméticos o lavado gástrico. Las toxinas pueden ser efectivamente absorbidas por carbón activo.

En casos moderadamente severos la ventilación es una primera preocupación, así como el controlar el pH de la sangre y los gases de la misma para asegurar una oxigenación adecuada. En caso de que la acidosis no sea compensada por la hiperventilación, la terapia con fluidos es esencial para corregirla y adicionalmente se deberá facilitar la excreción renal de las toxinas.

El límite de tolerancia para las toxinas PSP es de 80 µg STX-equivalentes/100 g de carne de mejillón (equivalente a 400 unidades ratón).

En cuanto a los análogos de saxitoxina descubiertos recientemente (GC1, GC2 y GC3), se ha demostrado, mediante experimentos de *receptor binding*, que son ligeramente menos tóxicos que la saxitoxina (Negri *et al.*, 2003).

4. Métodos de análisis

El método más común utilizado para el control de toxinas PSP es el bioensayo con ratones (*Official Methods of Analysis*, AOAC, 1990), este método es todavía el oficial en la mayoría de los países y mide la toxicidad global en extractos de mariscos y puede servir para controlar eficazmente la salubridad de las especies analizadas. Este método presenta algunas carencias con respecto a su selectividad, sensibilidad, variabilidad de los resultados, así como por el hecho de tener que disponer de un constante suministro e instalaciones para el mantenimiento de ratones no disponibles en todos los laboratorios analíticos. El método más ampliamente utilizado para la determinación sensible y selectiva de estos compuestos es la cromatografía de

líquido de alta eficacia (HPLC) con detección por fluorescencia. Para llevar a cabo esta determinación es preciso llevar a cabo una reacción de derivatización sobre la base de la inicialmente propuesta por Bates y Rapoport (Bates *et al.*, 1975) cuando desarrollaron el primer método por vía química para la determinación de estos compuestos, de modo que los componentes tóxicos paralizantes se conviertan en sus correspondientes homólogos de carácter fluorescente utilizando dos alternativas importantes, una de las cuales utiliza una reacción de derivatización postcolumna y fue propuesta por Oshima (Oshima *et al.*, 1989) mientras que la otra opción utiliza una derivatización precromatográfica y fue propuesta por Lawrence (Lawrence *et al.*, 1995). Las toxinas PSP serán oxidadas con peróxido o peryodato, teniendo en cuenta que, a pesar de que la oxidación con peróxido permite incrementar la sensibilidad, los compuestos hidroxilados, tales como los derivados N-1 hidroxil, no son suficientemente oxidados en estas condiciones. La fluorescencia producida será utilizada para estimar la concentración de los compuestos PSP.

Ambas alternativas difieren además en el modo de elución, mientras que para la alternativa precromatográfica se utiliza una elución en gradiente, el método postcolumna utiliza tres isocráticos distintos para cada uno de los grupos de toxinas. La ventaja de utilizar un método químico es la capacidad para separar los diferentes análogos y poder cuantificarlos individualmente. La opción precromatográfica surgió especialmente para resolver problemas de tiempo asociados con la utilización de los tres isocráticos, así como para evitar la utilización de equipos especiales con módulos para la derivatización postcolumna. La *electroforesis capilar* (CE) es una alternativa para la separación y análisis de los compuestos citados (Piñeiro *et al.*, 1999). Los acoplamientos con la espectrometría de masas tanto de HPLC como de CE han proporcionado datos muy útiles de una gran variedad de análogos de PSP (Gago-Martínez *et al.*, 1996). Dichas técnicas no son particularmente útiles para análisis de rutina, sin embar-

go proporcionan una información muy útil acerca de las toxinas presentes en muestras contaminadas.

Se han desarrollado también diversas alternativas bioquímicas. Entre ellas los métodos ELISA son los más interesantes. El uso de métodos ELISA lleva asociado una pérdida de sensibilidad frente a muchos compuestos PSP. También se ha empleado un test rápido para detección cualitativa de PSP empleando el ensayo inmunocromatográfico MIST Alert™ en paralelo al oficial bioensayo (Jellet *et al.*, 2002).

Últimamente se están desarrollando también otro tipo de ensayos utilizados para *screening* rápido, como es el caso del ensayo de neuroblastomas. También se han propuesto el ensayo electrofisiológico (Velez *et al.*, 2001), ensayo de citotoxicidad (Manger *et al.*, 2003), ensayos citológicos usando marcadores fluorescentes sensibles a potenciales (Louzao *et al.*, 2001; Louzao *et al.*, 2003). El principal obstáculo para el desarrollo de métodos analíticos está asociado con la obtención de estándares y materiales de referencia.

Intoxicación diarreaica (DSP)

La primera evidencia de la presencia de este tipo de enfermedad gastrointestinal asociada con el consumo de mejillones contaminados tras la ingestión de dinoflagelados tuvo lugar en Holanda en la década de 1960 (Kat, 1979). Otro incidente tóxico de este tipo tuvo lugar en Japón en 1976-1977, cuando un elevado número de personas sufrieron síntomas gastrointestinales. Dichos síntomas se asociaron entonces con el consumo de vieiras contaminadas con ácido okadaico (OA) y compuestos relacionados (Yasumoto *et al.*, 1978). Episodios de este tipo tuvieron lugar también en Escandinavia durante los años 60, no obstante, no se confirmó ningún episodio de este tipo hasta 1980 (Kumagai *et al.*, 1986).

El descubrimiento de este tipo de intoxicación se atribuye a Yasumoto y su grupo de investigación, que encontraron una correlación entre dinoflagelados del género *Dinophysis fortii* y este tipo de contaminación. Así, las toxinas asociadas fueron denominadas DTX y como consecuencia de los síntomas diarreicos, el síndrome fue denominado como «Intoxicación diarreaica», DSP (*diarrhetic shellfish poisoning*) (Yasumoto *et al.*, 1980).

Las toxinas diarreaicas solían dividirse en tres grupos: ácido okadaico (OA) y derivados, dinophysistoxinas, pectenotoxinas (PTX) y yessotoxinas (YTX). Estos dos últimos grupos de toxinas fueron incluidos inicialmente en este grupo a pesar de presentar una sintomatología y efectos tóxicos distintos; mientras las pectenotoxinas son claramente hepatotóxicas, las yessotoxinas muestran una sintomatología típicamente cardiotóxica. Hoy día se consideran grupos aparte y serán tratados en diferentes apartados.

Existían varias razones por las que incluir los YTX y PTX en el grupo DSP, ya que coexisten en muestras de moluscos bivalvos, son coextraídos de las glándulas digestivas de estos debido a su naturaleza lipofílica y provocan un efecto tóxico tras inyección intraperitoneal en ratones. Por tanto, generan resultados positivos en los bioensayos, ampliamente utilizados como método de *screening* en los programas de monitorización. Además, y al igual que el OA y sus análogos, son producidos por organismos fitoplanctónicos.

Sin embargo, debido principalmente a que no provocan toxicidad diarreaica, los grupos PTX y YTX hoy día son considerados como un grupo aparte del complejo DSP. Así, en la Decisión de la Comisión de las comunidades europeas publicada el 15 de marzo de 2002 en el *Official Journal of the European Communities* (2002/225/EC), se establecen reglas detalladas de implementación del Consejo Directivo 91/492/ECC en lo que se refiere a niveles máximos y métodos de análisis de determinadas biotoxinas marinas en moluscos bivalvos, equinodermos, tunicados y gasterópodos marinos y establece el bioensayo con ratones como método oficial para

la detección de biotoxinas. Este documento considera los grupos por separado, y establece un máximo permitido de 1 mg de equivalente de yessotoxina por kg de peso de ratón empleado en el bioensayo, mientras que para el complejo DSP y PTX establece un máximo de 160 µg/kg.

1. Organismos productores

Los dinoflagelados del género *Dinophysis*, han estado implicados en episodios tóxicos de DSP. La confirmación de su toxicidad fue difícil debido a la dificultad para cultivar ese tipo de dinoflagelados. Especies de dinoflagelados *Prorocentrum lima* fueron también responsables de la producción de ácido okadaico y derivados.

La DTX-1 se encontró como la máxima responsable de episodios tóxicos DSP en Japón en 1976 y 1977; el organismo responsable fue la especie *Dinophysis fortii*. Los acilderivados DTX-3 fueron los máximos responsables de contaminaciones de vieiras en 1982, sin embargo los compuestos DTX-3 no fueron encontrados en especies de *Dinophysis spp.* Así pues, se cree que su origen pueda estar en la acilación de la DTX-1 en los hepatopáncreas de dichas vieiras (Murata *et al.*, 1982).

En episodios de DSP en Francia, España, Portugal, Italia y Suecia, se informó de la presencia de ácido okadaico como componente DSP mayoritario, siendo las especies *D. acuminata* y *acuta* las responsables de dichas toxinas. Episodios de DSP en Holanda fueron debidos mayormente a elevadas concentraciones de *Prorocentrum spp.* Importantes episodios de DSP en Noruega y Suecia en 1985 y 1986 fueron atribuidos a la presencia de *D. acuta* (Aune *et al.*, 1993).

Aunque el ácido okadaico ha sido considerado el máximo responsable de la toxicidad DSP en Irlanda, también se detectó la presencia de DTX-2. Lo mismo ocurre con la toxicidad DSP en Galicia, donde la DTX-2 ha sido también identificada como la máxima responsable de la toxicidad DSP, a pesar de considerarse en un principio que el OA era el único componente DSP en esta zona (Gago-Martínez *et al.*, 1996).

Episodios tóxicos de DSP en América están asociados con la presencia de OA y DTX-1, siendo los dinoflagelados pertenecientes a las especies *Prorocentrum spp.* responsables de dicho perfil tóxico en Canadá, mientras que *Dinophysis spp.* fueron responsables de la toxicidad DSP en EE UU y Chile.

2. Propiedades químicas

En un principio, este grupo estaba compuesto por el ácido okadaico (OA) y la dinophysistoxina-1 (DTX-1). Más tarde, una nueva dinophysistoxina (DTX-2) fue aislada en Irlanda (Hu *et al.*, 1992) y posteriormente se encontró en dinoflagelados y mejillones de las rías gallegas (Gago-Martínez *et al.*, 1996). Las estructuras químicas de estos compuestos, que se muestran en la Figura 8.2, son complejas, pesadas y solubles en lípidos (Wright *et al.*, 1995). Recientemente se han encontrado más dinophysistoxinas tales como DTX-3, acilderivados de las anteriores, que aún no han sido detectados en fitoplancton tóxico pero que han sido aisladas a partir de muestras de vieiras (Yasumoto *et al.*, 1985). Dichos compuestos también poseen actividad tóxica, pero solo fueron hallados en tejidos de mariscos, sugiriendo su probable origen metabólico. Se identificaron además otros análogos de este grupo (DTX-2B, DTX-2C) en mariscos (James *et al.*, 1997; James *et al.*, 1998; Draisci *et al.*, 1998a). La primera evidencia de la existencia de diol ésteres del OA viene del aislamiento de una mezcla de los mismos de especies de *Prorocentrum Lima* (Yasumoto *et al.*, 1989). Otros ésteres del OA tales como OA-DE1 se aislaron también de diversos tipos de *Prorocentrum sp.* tales como *Prorocentrum lima* y *Prorocentrum maculosum* (Hu *et al.*, 1992). Dichos diol ésteres se encontraron también en especies de *P. lima* (Norte *et al.*, 1994).

Un nuevo componente DSP denominado DTX-4 ha sido descubierto recientemente (Hu *et al.*, 1995). Las toxinas DSP son compuestos lipídicos de cadena larga conteniendo anillos polieter cíclicos. Son solubles en acetona, cloroformo, cloruro de metileno y dimetilsulfóxido.

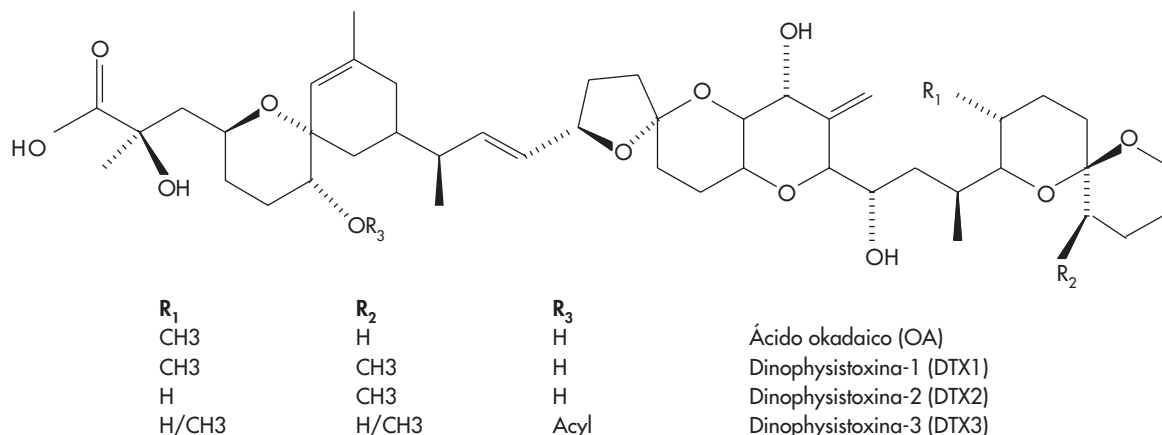


Figura 8.2. Estructura de las toxinas DSP.

3. Toxicología

Los efectos tóxicos del OA y sus derivados, descritos tras el episodio de Japón en 1978, incluyen vómitos y diarrea. En los resultados obtenidos con el bioensayo con ratones se encontró una correlación entre toxicidad de esos compuestos en humanos y efectos en ratones. El contenido de toxina requerido para producir enfermedades en humanos fue definido mediante unidades ratón: 1 Unidad ratón (UR) se define como la cantidad de toxina requerida para causarle la muerte a un ratón de 20 g durante un periodo de 48 horas.

La cantidad de toxina necesaria para causar intoxicaciones suaves a adultos es de 12 UR. De los estudios efectuados sobre este tipo de compuestos se concluye que las toxinas DSP presentan efectos crónicos, pudiendo inducir promoción de tumores (Fujiki *et al.*, 1999). Respecto al mecanismo de acción del ácido okadaico y la DTX-1, son potentes inhibidores de las proteína-fosfatasa 1 y 2A (PP1 y PP2A, respectivamente) afectando al funcionamiento de las células eucariotas. Se han realizado también algunos estudios acerca de los efectos mutagénicos y genotóxicos del OA y la DTX-1. Los daños asociados con la exposición a toxinas del grupo DSP están relacionados con los efectos tóxicos de los compuestos individuales. Los sín-

tomas de DSP comienzan después de la ingestión de OA o DTX por encima de 40-50 μg por persona (adulto). Los pacientes se recuperan después de unos cuantos días. La toxicidad crónica (promoción de tumores, mutagénesis) no puede ser estimada todavía.

4. Métodos de análisis

El método utilizado como rutinario para la detección de toxinas DSP es el bioensayo con ratones (Yasumoto *et al.*, 1978; Marcaillou-Lebaut *et al.*, 1994). Este método presenta muchas desventajas, y una de las mayores objeciones es el uso de animales con fines de investigación; también se observa una pérdida de selectividad ya que otras toxinas o ácidos grasos pueden entrar a formar parte de la fracción lipídica dando lugar a interferencias que pueden dificultar la identificación de las toxinas estudiadas o causar falsos positivos. El bioensayo con ratones no distingue entre los diferentes tipos de toxinas pero proporciona información sobre la toxicidad total de las muestras estudiadas.

Los ensayos de citotoxicidad fueron desarrollados después del descubrimiento de que las toxinas DSP eran responsables de cambios morfológicos en algunas células (Amzil *et al.*, 1992; Croci *et al.*, 1997). Se consideran ensayos rápidos y sensibles, y éticamente más satisfactorios

que los ensayos con animales vivos. Se desarrollaron también otros ensayos basados en la inhibición de las proteínas fosfatasa que proporcionan una detección sensible de las toxinas DSP (Vieytes *et al.*, 1997). Sin embargo la respuesta no es específica, y al igual que el bioensayo con ratones da una información global acerca de la toxicidad. Los inmunoensayos pueden ser utilizados también para detectar OA y algunos de sus análogos (Chin *et al.*, 1995; Morton *et al.*, 1996). Sin embargo, esos análisis muestran una pobre reactividad, especialmente para los compuestos DTX-3.

Se desarrollaron también alternativas físico-químicas para una determinación sensible de las toxinas DSP. Las técnicas cromatográficas mediante HPLC son las utilizadas más habitualmente, acopladas con diversos sistemas de detección.

La detección por fluorescencia (FLD) proporciona una respuesta muy sensible y esta alternativa ha sido ampliamente utilizada como herramienta de control en rutina. Se han utilizado diversos reactivos para la derivatización de las toxinas DSP, convirtiéndolas en los correspondientes derivados fluorescentes, mediante la derivatización del ácido carboxílico correspondiente para formar los correspondientes ésteres de carácter fluorescente, los cuales son posteriormente separados por cromatografía en fase inversa. El método que se ha utilizado más ampliamente hasta la fecha es el desarrollado por Lee (Lee *et al.*, 1987). Ese método utiliza 9-antracildiazometano (ADAM) como reactivo de derivatización y ha sido sometido a un gran número de modificaciones, especialmente en la etapa de *cleanup*. Por otra parte, dado que el ADAM es un reactivo caro y de estabilidad limitada, se han planteado alternativas al mismo, utilizando otros reactivos de derivatización o incluso sintetizando el reactivo inmediatamente antes de ser utilizado (Quilliam *et al.*, 1998). También se han desarrollado métodos de análisis con CE (Boland *et al.*, 1993; Bouaicha *et al.*, 1997). El acoplamiento de HPLC/MS ha sido la única técnica que ha proporcionado una determinación directa del OA y las DTX (James *et al.*, 1997;

Draisci *et al.*, 1998; Quilliam, 1998). Dicha técnica permitió además la confirmación de las toxinas DSP presentes en muestras contaminadas y resultó ser muy útil cuando no se disponía de estándares.

Pectenotoxinas (PTX)

Al igual que el grupo anterior, las pectenotoxinas han sido objeto de una amplia investigación. Se descubrieron en Japón en 1984, y su denominación viene de la especie de vieira en la que se detectaron por vez primera, *Patinopecten yessoensis*.

1. Organismos productores

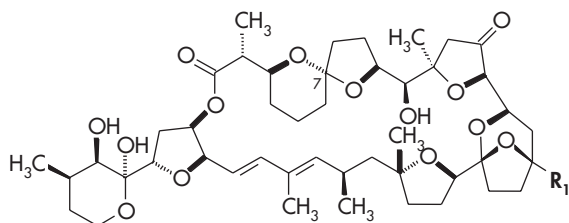
La PTX-2 es el único análogo de las PTX detectada hasta la fecha en fitoplancton, de manera que las especies fitoplanctónicas que se han identificado como responsables de la producción de estas toxinas son *Dinophysis fortii* y *Dinophysis acuta* (Draisci *et al.*, 1996; James *et al.*, 1999a; Draisci *et al.*, 1999a).

Se cree que el resto de componentes del grupo PTX encontradas en mariscos pudiera tener su origen en diversos tipos de biotransformaciones.

2. Propiedades químicas

Estructuralmente este grupo de polieter lactonas es muy diferente al OA y sus análogos, ya que en vez de la típica estructura abierta tienen un anillo característico en el carbono 33 (Figura 8.3a) (Murata *et al.*, 1986).

En un principio se aislaron los análogos PTX-5, aunque solo se determinaron las estructuras de PTX-1 y PTX-2 (Figura 8.3a). Posteriormente, se determinó la estructura de PTX-3 (Murata *et al.*, 1986), PTX-4 como 7-*epi*-PTX-1, y PTX-7 como 7-*epi*-PTX-6 (Yasumoto *et al.*, 1995). La elucidación de los análogos PTX-8, PTX-9 y PTX-10 también ha sido publicada. Otras pectenotoxinas de reciente descubrimien-

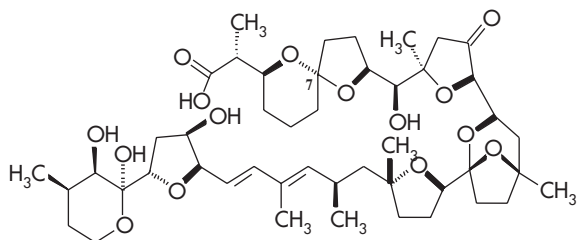


Nombre	R ₁	C 7
PTX-1	CH ₂ OH	R
PTX-2	CH ₃	R
PTX-3	CHO	R
PTX-4	CH ₂ OH	S
PTX-5	*	*
PTX-6	COOH	R
PTX-7	COOH	S
PTX-8	CH ₂ OH	S
PTX-9	COOH	S
PTX-10	CH ₂ OH	R

* no publicado

Figura 8.3a. Estructura general de las pectenotoxinas.

to fueron aisladas y denominadas pectenotoxinas-2-secoácidos (PTX-2SA) y 7-*epi*-PTX-2SA. Estas toxinas poseen un ácido carboxílico de cadena abierta en vez del anillo lactona de los análogos PTX (Figura 8.3b) (Daiguji *et al.*, 1998).



Nombre	Sitio 7
PTX-2SA	R
7- <i>epi</i> PTX-2SA	S

Figura 8.3b. Estructura general de las pectenotoxinas.

3. Toxicología

Los efectos tóxicos difieren mucho a los provocados por el grupo del ácido okadaico, ya que no generan problemas gastrointestinales en seres humanos. Mediante el bioensayo con ratones se ha comprobado que la PTX-1 no afecta al intestino delgado, sino al hígado (Terao *et al.*, 1986) y en seres humanos la PTX-2 genera efectos negativos sobre tejidos del colon, pulmón y pecho (Jung *et al.*, 1995).

4. Métodos de análisis

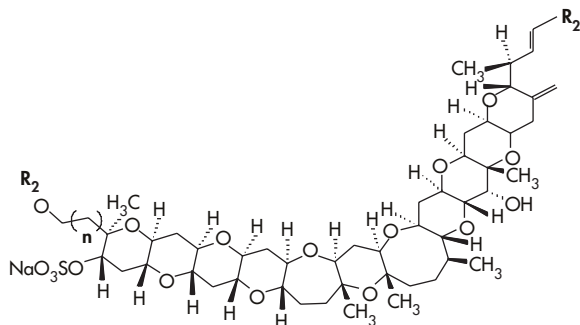
Los métodos que se han desarrollado para el análisis de pectenotoxinas incluyen el bioensayo con ratones (Hamano *et al.*, 1985), los ensayos de citotoxicidad (Aune *et al.*, 1989) y métodos instrumentales como HPLC-UV (Yasumoto *et al.*, 1989; Sasaki *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 1998), HPLC-FLD (Sasaki *et al.*, 1998; James *et al.*, 1999a) y CL-EM (James *et al.*, 1999b; Suzuki *et al.*, 2000; Draisci *et al.*, 1999a; Ito *et al.*, 2002).

Yessotoxinas (YTX)

A lo largo de la última década, el grupo de las yessotoxinas ha provocado la preocupación de las autoridades en sanidad pública e industria productora de moluscos y suponen un tema controvertido para los científicos a medida que la investigación en ficotoxinas progresa. El grupo YTX, que en el pasado estaba restringido a ambientes acuáticos específicos, se ha detectado en numerosas áreas oceánicas, junto a nuevas toxinas.

1. Organismos productores

Las especies de dinoflagelados *P. reticulatum*, (Satake *et al.*, 1997c; Ciminiello *et al.*, 2003), y *Gonyaulax polyedra*, (Tubaro *et al.*, 1997; Draisci *et al.*, 1999b) han sido confirmadas como fuentes de producción de YTX. Esto implica un riesgo global de contaminación en



Nombre	R ₁	R ₂	n
YTX	SO ₃ Na	I	1
1-desulfoYTX	H	I	1
45-OH-YTX	SO ₃ Na	II	1
45,46,47-trinorYTX	SO ₃ Na	III	1
HomoYTX	SO ₃ Na	I	2
45-OH-homoYTX	SO ₃ Na	II	2
CarboxiYTX	SO ₃ Na	IV	1
CarboxihomoYTX	SO ₃ Na	IV	2

Figura 8.4a. Estructura general de las yessotoxinas.

moluscos de consumo, ya que estas especies son muy comunes en comunidades fitoplanctónicas de aguas costeras, y sus quistes de resistencia son ubicuos en los sedimentos marinos, ya que se pueden adaptar a diferentes condiciones medioambientales, como temperatura, pH, salinidad, regímenes de luz y niveles de nutrientes.

2. Propiedades químicas

La estructura química (Figuras 8.4a, 4b, 4c) de la yessotoxina y sus análogos (YTX) posee 11 grupos éter en forma de anillos contiguos, una cadena lateral insaturada de nueve carbonos, un esqueleto con 47 átomos de carbono, dos ésteres

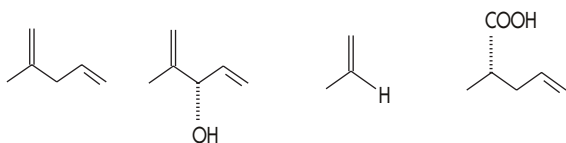


Figura 8.4b. Estructura de los grupos R₂ de las yessotoxinas.

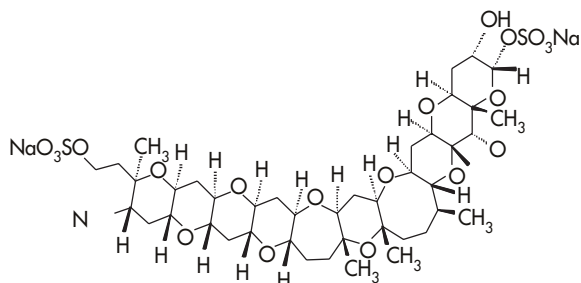


Figura 8.4c. Estructura de los grupos R₂ de las yessotoxinas.

de sulfato, y además carece de carbonos carbonilo.

La yessotoxina fue aislada por vez primera en 1987, (Murata *et al.*, 1987), y mediante técnicas de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se configuró su estructura planar y se le asignó la fórmula molecular C₅₅H₈₀O₂₁S₂Na₂.

Posteriormente se confirmó su estructura mediante el empleo de la técnica de bombardeo de átomo rápido (FAB) en experimentos MS/MS en modo negativo, como método complementario a la RMN (Naoki *et al.*, 1993). Se confirmó que la yessotoxina es un compuesto lipofílico, con un esqueleto éter policíclico y una cadena lateral insaturada.

3. Toxicología

Existe una serie de datos en relación a la exposición de moluscos de consumo a niveles de yessotoxina en el medio, se han identificado los organismos fitoplanctónicos responsables de su producción y se ha estudiado la distribución de las toxinas en unas pocas áreas de producción de bivalvos. Sin embargo, es necesario un mejor conocimiento del nivel de contaminación en otras áreas y una información detallada sobre organismos tóxicos y proliferación espacio-temporal de estos (especialmente profundidad en la columna de agua).

Debido a la falta de datos, los niveles de tolerancia actualmente adoptados para estas toxinas no se han deducido a partir de estudios toxicológicos robustos, que debería determinar la relación entre la magnitud de la exposición, el nivel

de efectos adversos no observables (NOAEL) y el nivel de mínimo efecto adverso observable (LOAEL).

Las YTX presentan una estructura química muy singular y parecen ser únicas en su modo de acción. Por ello son consideradas como herramientas particularmente interesantes para probar fenómenos biológicos y farmacológicos (como en el caso del OA actuando como inhibidor de la proteína fosfatasa) (Haystead *et al.*, 1989).

Se ha demostrado que la yessotoxina es diez veces menos tóxica tras administración oral que tras inyección intraperitoneal, e incluso a dosis de hasta 10 mg/kg (la más alta jamás empleada) la yessotoxina no provocó la muerte de los ratones (Aune *et al.*, 2002).

Recientemente se estudiaron los niveles de toxicidad aguda tanto de YTX como de sus análogos en comparación con la del OA, que es la principal toxina diarreica. Estos estudios han mostrado valores muy variables en cuanto a letalidad tras inyección intraperitoneal (i.p.), mientras que no se han presentado ningún tipo de efectos letales tras la administración oral. Se ha demostrado que la yessotoxina y sus derivados son menos tóxicos que el ácido okadaico tras tratamientos tanto orales como tras inyección intraperitoneal a dosis que representarían cien veces la posible cantidad ingerida por un ser humano diariamente (Tubaro *et al.*, 2003). Así, la potencia letal observada en este estudio se encuentra entre los valores observados por Terao (Terao *et al.*, 1990), y Ogino (Ogino *et al.*, 1997), con valores para la LD₅₀, de entre 89 y 286 µg/kg, y los obtenidos por Aune (Aune *et al.*, 2002), con LD₅₀ comprendidos entre los 750 y los 1.000 µg/kg. Estas discrepancias se deben seguramente a la variabilidad de las condiciones experimentales entre los distintos laboratorios o los diferentes tipos, edad o sexo de los ratones de los que se disponía. Los síntomas que presentan los ratones tras ser infectados con YTX son los típicos de las neurotoxinas, caracterizados por supervivencia corta además de convulsiones y movimientos bruscos antes de la muerte. Por otro lado, se ha observado que tratamientos

orales a ratones con YTX (1 y 2 mg/kg) y sus derivados (1 mg/kg) no causan ninguna muerte o signos de toxicidad, a excepción de algunas alteraciones estructurales en los miocardiocitos adyacentes a los capilares (Tubaro *et al.*, 2003).

Se supone que la toxicidad de la yessotoxina tiene relación con la presencia de los grupos sulfato presentes en el extremo de su esqueleto hidrofóbico, que confieren a la molécula diferente afinidad por las membranas lipídicas. Además, es posible que la elevada polaridad en las cadenas laterales de los derivados 45-OH-YTX y 45, 46, 47-trinorYTX tenga relación con su baja toxicidad, debido a una menor afinidad por las membranas lipídicas (Satake *et al.*, 1996). Por la misma razón la adriatoxina es menos tóxica que la yessotoxina, debido a la presencia de tres grupos sulfato en aquella (Ciminiello *et al.*, 1998). En la Tabla 8.1 se presenta un esquema del tema tratado en este apartado.

En resumen, aunque existen razones para creer que la presencia de las YTX es mucho menos dañina que la del OA y la DTX-1, deberían considerarse otros datos toxicológicos, como la degradación celular, el efecto letal en ratones juveniles tras la administración oral y lesiones cardíacas severas tras inyección intraperitoneal.

En cuanto a las posibles aplicaciones farmacológicas, debido a la similitud entre las toxinas producidas por dinoflagelados y algunos antibióticos de *Actynomyces*, se comprobaron las propiedades inhibitoras del crecimiento de hongos, levaduras y bacterias de YTX y dsYTX. La toxicidad de la yessotoxina (al igual que en el caso de otras toxinas con múltiples grupos éter) resulta ser débil. Por el contrario, la desulfatación de la yessotoxina potencia su actividad antibiótica frente a los hongos y reduce la mortalidad en ratones (Nagai *et al.*, 1990).

Posteriormente se confirmó la incapacidad de la YTX y dsYTX para inhibir el crecimiento bacteriano, mientras que sí mostraron cierta habilidad ante levaduras y hongos, siendo la yessotoxina menos potente que la dsYTX (Ogino *et al.*, 1997).

Tabla 8.1. Efecto letal en ratones y principales efectos patológicos de YTX.

Toxina	Efecto letal en ratones (µg/kg b.w. i.p.)	Efecto patológico y actividad biológica
YTX	100 [Murata <i>et al.</i> , 1987] 286 [Terao <i>et al.</i> , 1990a] 80-100 [Ogino <i>et al.</i> , 1997] 512 [Tubaro <i>et al.</i> , 2003]	Cardiotóxica [Terao <i>et al.</i> , 1990a] Inhibición del crecimiento en hongos y levaduras [Ogino <i>et al.</i> , 1997] Foco hemorrágico en el miocardio (caso aislado) [Tubaro <i>et al.</i> , 2003]
45-OH-YTX	500 [Satake <i>et al.</i> , 1996]	
45, 46, 47-trinorYTX	220 [Satake <i>et al.</i> , 1996]	
HomoYTX	100 [Satake <i>et al.</i> , 1997b] 444 [Tubaro <i>et al.</i> , 2003]	
45-OH-homoYTX	500 [Satake <i>et al.</i> , 1997b]	
dsYTX	301 [Terao <i>et al.</i> , 1990a]	Toxicidad en hígado y páncreas [Terao <i>et al.</i> , 1990a] Fungicida [Nagai <i>et al.</i> , 1990] Ictiotoxicidad e inhibición de crecimiento de hongos y levaduras [Ogino <i>et al.</i> , 1997]

Todos estos hallazgos hacen creer que determinadas modificaciones inducidas en moléculas como la YTX y otros compuestos, pueden resultar en aplicaciones beneficiosas al mismo tiempo que su toxicidad se ve reducida. Además confirman a las toxinas producidas por dinoflagelados como una fuente prometedora de nuevos y potentes antibióticos (Nagai *et al.*, 1990).

4. Métodos de análisis

Actualmente, el bioensayo con ratones es la herramienta básica para la monitorización de YTX y sus análogos, a pesar de los inconvenientes que presenta. Existen numerosas dificultades a la hora de desarrollar, validar y difundir metodologías analíticas alternativas a este bioensayo debido, por ejemplo, a la escasez de buenas fuentes naturales de estándares analíticos, que ha impedido la producción y comercialización de material de referencia para muchas toxinas, incluida YTX y sus análogos.

Otras dificultades a la hora de desarrollar métodos alternativos es la continua identificación de nuevos análogos, los cambios en las estructuras originales de las toxinas debido a biotransformaciones en tejido animal, la complejidad y variabilidad del material biológico

marino, la disponibilidad, en muchos casos, de solo una pequeña cantidad de muestras para las determinaciones analíticas, y la frecuente coexistencia de distintas toxinas en la misma muestra.

Sin embargo, se han propuesto una serie de métodos químicos y bioquímicos empleados como herramientas analíticas específicas y sensibles para la determinación de las YTX en moluscos y en muestras de fitoplancton. Estas son empleadas tanto en investigación como en programas de monitorización.

En cuanto al bioensayo con ratones, aunque el método es capaz de detectar YTX, la posible presencia de toxinas PSP y la elevada concentración de ácidos grasos (que son inofensivos para los humanos por vía oral pero letales para los ratones por vía intraperitoneal), pueden interferir dando lugar a falsos positivos (Hamano *et al.*, 1985). Para evitar esto se han propuesto varias modificaciones (Marcaillou-Le Baut, 1990; Draisci *et al.*, 1998).

Sin embargo, y como ya se ha explicado, el bioensayo es mucho menos sensible, selectivo y preciso que los métodos analíticos instrumentales, y presenta una gran variabilidad de resultados. Por ello hay una necesidad de sustituirlo por técnicas analíticas, tanto por razones éticas como de precisión.

En cuanto a ensayos bioquímicos, la YTX, ha mostrado una débil inhibición de la PP2A (Ogino *et al.*, 1997). De hecho, la concentración de YTX necesaria para reducir la actividad enzimática en un 50% (IC50) resultó ser cuatro órdenes de magnitud mayor que la hallada para el OA (Tubaro *et al.*, 1996).

La detección inmunológica mediante ensayos ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assays) es capaz de detectar todos los análogos de la YTX que la UE actualmente regula en muestras de moluscos (45-OH-YTX, homo-YTX, 45-OH-homoYTX), y los formatos más sensibles resultan tener un límite de cuantificación de entre 20 pg/mL (Briggs *et al.*, 2002) y 70 pg/mL (Samdal *et al.*, 2002), que está por debajo del nivel máximo recomendado, que es 1 mg/kg.

Sin embargo, los resultados obtenidos mediante ensayos ELISA y HPLC-EMS presentan muchas discrepancias (Miles *et al.*, 2002). Además, muchos laboratorios han concluido que el método ELISA no siempre proporciona resultados cuantitativamente fiables, ya que, debido a las reacciones cruzadas, se subestima el contenido de toxina.

En lo que se refiere a ensayos de citotoxicidad, en un experimento realizado por Aune (Aune *et al.*, 1991), se observaron los efectos a nivel morfológico que una serie de biotoxinas marinas (OA, DTX-1, PTX-1 y YTX) provocaron sobre hepatocitos de ratas. El ensayo fue propuesto como método para diferenciar entre toxinas diarreicas y no diarreicas. Sin embargo existen muchas desventajas a la hora de trabajar con este método, ya que es lento y proporciona resultados confusos en el caso de muestras mixtas, por lo que es mejor complementarlo con algún método químico.

Por otro lado, los métodos químicos instrumentales son la alternativa y/o el complemento más prometedor a los ensayos biológicos para el control y monitorización de todos los grupos de toxinas acuáticas. Esto podrá suceder si combinados o solos pueden detectar al menos los análogos regulados (en el caso de las YTX: YTX, 45-OH-YTX, homoYTX, 45-OH-homoYTX en

la UE), no son menos efectivos que los métodos biológicos y su implementación supone un nivel equivalente de protección de la salud pública.

Las yessotoxinas carecen de un cromóforo fuerte, muy útil en la absorción UV sensible. Sin embargo, la presencia de yessotoxina se puede monitorizar empleando esta técnica, con una longitud de onda de absorción máxima a 230 nm (Murata *et al.*, 1987; Satake *et al.*, 1997c).

La yessotoxina y sus análogos no presentan una fluorescencia natural, por lo que han de ser modificados químicamente para su detección. Así, se ha propuesto un método de detección fluorimétrica en moluscos mediante HPLC, en el que la molécula de YTX es derivatizada empleando el reactivo 4-[2-(6, 7-dimetoxi-4-metil-3-oxo-3, 4-dihidroquinoxalil) etil]1, 2, 4-triazolina-3, 5-dieno (DMEQ-TAD) (Yasumoto y Takizawa, 1997; Tubaro *et al.*, 1997; Ramstad *et al.*, 2001). Este método demuestra linealidad, carencia de interferencias y el límite de detección se estima en 1 ng de yessotoxina inyectada, que supone una sensibilidad 2.000 veces mayor a la conseguida con el bioensayo. Así, el método HPLC-FID es recomendado para la detección de yessotoxina ya que provee mejor información sobre la toxicidad en moluscos que el bioensayo con ratones.

En cuanto a la técnica HPLC-(ESI) MS se empleó para la determinación del peso molecular de diferentes análogos de YTX: 45-OH-YTX, 45, 46, 47-trinorYTX (Satake *et al.*, 1996), homoYTX y 45-OH-homoYTX (Satake *et al.*, 1997b) aislados a partir de muestras contaminadas de moluscos. También se empleó esta técnica para la confirmación de la presencia de YTX en muestras de fitoplancton (Satake *et al.*, 1997c).

El primer método para la identificación directa de YTX en muestras de moluscos empleando HPLC-MS y HPLC-MS-MS con SRM (*selected reaction monitoring*) (Draisci *et al.*, 1998b) hace uso de una fuente de ionización a presión atmosférica (API) e interfase ionspray. El límite de detección resulta ser 4.000 veces menor que en el bioensayo, y la sensibilidad es similar a la obtenida en el método fluorimétrico

(HPLC-FID). El método es específico, sensible y rápido para la determinación de YTX tanto en moluscos como en fitoplancton, y acabó con la ambigüedad de los falsos negativos tras el bioensayo con ratones (Draisci *et al.*, 1998b; Draisci *et al.*, 1999b).

Posteriormente se desarrolló un método que permitía el análisis simultáneo en muestras de diez toxinas relacionadas con eventos DSP (OA, DTX1, palAO, palDTX1, PTX1, PTX2, PTX2SA, PTX6, YTX y 45-OH-YTX) de *Patinopecten yessoensis* mediante HPLC-MS con fuente de ionización a presión atmosférica (API) e interfase ionspray (ESI) y un analizador de masas de triple cuadrupolo. La separación cromatográfica de todas las toxinas se consiguió mediante una combinación de distintas columnas y fases móviles. El límite de detección estuvo entre 40 y 80 ng/g de tejido (Goto *et al.*, 2001; Ciminiello *et al.*, 2002).

Recientemente se ha propuesto un nuevo método de análisis de YTX y 45-OH-YTX en moluscos empleando HPLC-MS³, haciendo uso de ESI como fuente de ionización en modo negativo y un analizador de masas de trampa de iones (Fernández Amandi *et al.*, 2002). El límite de detección fue 30 pg de YTX en columna, equivalentes a 3 ng/g en tejido de molusco. Se puede concluir que aunque una validación total de los métodos HPLC-MS está todavía dificultada por la carencia de estándares, representan una alternativa prometedora y efectiva al bioensayo para el análisis de YTX y DSP en muestras biológicas tanto en programas de monitorización como de investigación. Esta técnica ha sido propuesta como idónea para desarrollar un método de determinación universal de toxinas lipofílicas (Quilliam *et al.*, 2001).

Intoxicación amnésica (ASP)

Fue descubierta por vez primera en Prince Edward Island (Canadá) en 1987, después de un episodio serio de intoxicaciones por mariscos

(Quilliam *et al.*, 1989). El máximo responsable de la intoxicación amnésica es el ácido domoico (AD), que fue inicialmente aislado de la microalga *Chondria armata* por investigadores japoneses estudiando propiedades insecticidas de extractos de algas (Takemoto *et al.*, 1958).

El ácido domoico fue el responsable de la intoxicación en el episodio canadiense (Wright *et al.*, 1989). La toxina estaba presente a niveles tan altos como 1.000 mg/g de tejido y es el primer dato que existe sobre la presencia de ácido domoico como una toxina de mariscos (Wright *et al.*, 1995). Los síntomas, observados en las víctimas durante 24 horas, fueron neurotóxicos (pérdida de memoria, confusión, desorientación) y gastrointestinales (diarrea, vómitos), pero también se apreció una aguda pérdida de memoria. De este tipo de síntomas surgió el nombre ASP (*amnesic shellfish poisoning*).

1. Organismos productores

La fuente de AD en el incidente canadiense fue la diatomea *Pseudonitzschia pungens* f. *multiseriis* (Subba Rao *et al.*, 1988). Hasta este incidente se creía que las ficotoxinas solo procedían de dinoflagelados y las diatomeas no se consideraban como posibles fuentes de dichas toxinas. Otras especies pertenecientes al género *Pseudonitzschia* son *P. pseudodelicatissima* y *P. australis*. Este último fue el organismo responsable de las muertes de pelícanos y cormoranes en la Bahía de Monterrey, California (Fritz *et al.*, 1992), después de la ingestión de anchoas que contenían ácido domoico en concentraciones tan altas como 100 mg/g. Además, el AD se ha detectado en muestras de moluscos procedentes de Francia (Amzil *et al.*, 2001), Portugal (Vale *et al.*, 2001), Japón (Kawatzu *et al.*, 2000), Irlanda (Furey *et al.*, 2001) y Escocia (Hess *et al.*, 2001).

2. Propiedades químicas

El ácido domoico es un compuesto de origen natural, análogo del ácido glutámico, aislado del fitoplancton marino. La estructura química del ácido domoico y sus isómeros se muestra en

la Figura 8.5. El ácido domoico parece ser el compuesto predominante tanto en el plancton como en los mariscos contaminados. Algunos de sus isómeros como el ácido isodomoico A, C, D, o las domoilactonas A y B parecen no haber sido encontradas todavía en extractos del plancton o en tejidos de mariscos contaminados. El ácido domoico es un compuesto cristalino soluble en agua con propiedades típicas de aminoácido y su estructura es claramente dependiente del pH, pudiendo dar lugar a cinco formas protonadas.

3. Toxicología

Los efectos tóxicos del ácido domoico se establecieron tras estudios llevados a cabo utilizando ratas o monos. Tras la inyección intraperitoneal en ratones, esta toxina induce una sintomatología peculiar conocida como *scratching syndrome*. Los animales se rascan los hombros con las extremidades posteriores, le siguen convulsiones y a menudo la muerte. También se informó de efectos sutiles tales como hipoactividad,

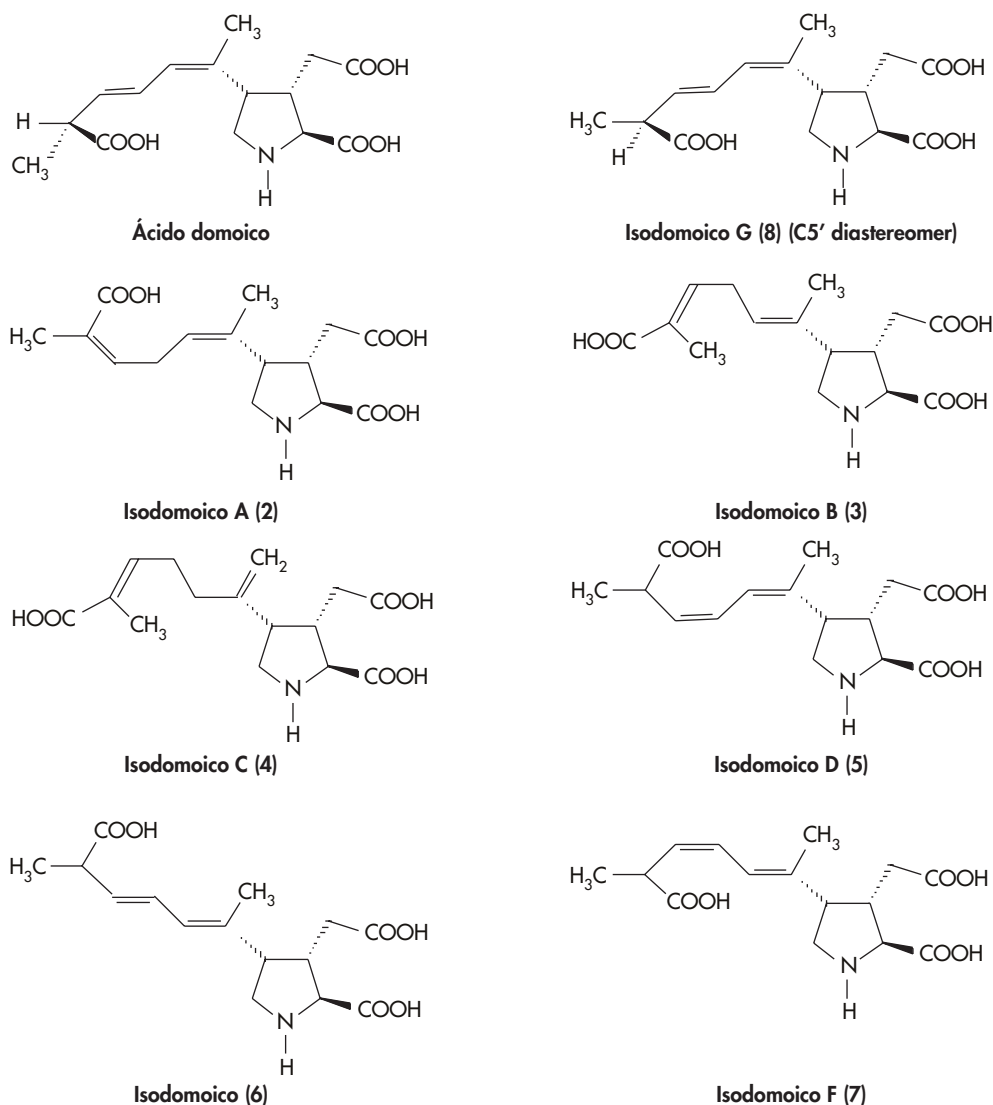


Figura 8.5. Estructura de las toxinas amnésicas.

rigidez, temblores, etc. (Tasker *et al.*, 1991). De los efectos tóxicos en humanos se tuvo conocimiento con posterioridad al incidente canadiense, cuando 107 personas tuvieron que ser hospitalizadas; 14 de ellas presentaron síntomas neurológicos severos y cuatro de las personas de edad avanzada intoxicadas murieron en un periodo de 11 a 24 días. En sus cerebros se detectaron daños severos, fundamentalmente en la región del hipocampo (Todd *et al.*, 1993). Los síntomas humanos fueron relacionados fundamentalmente con trastornos gastrointestinales (diarrea, vómitos), pero también se observaron síntomas neurológicos, siendo la pérdida de memoria temporal uno de los síntomas más característicos asociados con este tipo de intoxicación. La farmacocinética y el mecanismo de acción del ácido domoico muestran que tras la exposición oral, y como ocurre con la mayoría de las toxinas, se excretan en heces tanto de ratas como de ratones (Iverson *et al.*, 1990). En el torrente sanguíneo el ácido domoico es purificado muy fácilmente en los riñones (Suzuki *et al.*, 1993).

El AD es estructuralmente similar al ácido glutámico, ácido kaínico y ácido aspártico, todos aminoácidos conocidos por las lesiones cerebrales que provocan debido a su excitotoxicidad (Hess *et al.*, 2001). Sin embargo, se sabe que el ácido domoico es un neuroexcitador de dos a tres veces más potente que el ácido kaínico y aproximadamente cien veces más potente que el glutamato.

Una serie de estudios iniciales sugirieron que la neurotoxicidad del ácido domoico era resultado de su actuación sobre receptores del ácido kaínico en el cerebro (Larm *et al.*, 1997). Sin embargo, investigaciones más recientes han demostrado que el ácido domoico provoca síntomas neurotóxicos debido a una sobrecarga e inhibición de los iones calcio (Nijjar *et al.*, 2000), y se le ha relacionado con el incremento de liberación de glutamato en el cerebro (Ross *et al.*, 2000; Quintela *et al.*, 2000).

Después del incidente canadiense el nivel de ácido domoico estipulado como límite de seguridad fue de 20 mg/g de tejido de marisco

(Iverson *et al.*, 1994). Dicho nivel ha sido adoptado por la mayoría de los países como límite legal. El límite de acción legal del ácido domoico en vísceras de cangrejos ha sido recientemente modificado y establecido en 80 mg/g. De los datos obtenidos en el incidente canadiense se estima que la concentración de ácido domoico en los mariscos estaba en el rango de 300-1.000 mg/g y los individuos intoxicados podrían haber ingerido entre 1-2 mg/kg de la toxina.

Así, el consumo de 250 g de carne de mejillón con el máximo nivel de tolerancia corresponderá a la ingestión de 0,1 mg AD /kg peso de adulto.

Los grados de acumulación del ácido domoico en los mariscos y su velocidad de eliminación varían entre las diferentes especies y entre órganos diferentes. En la mayoría de los mariscos el AD se acumula en los órganos digestivos.

4. Métodos de análisis

El AD puede ser detectado mediante el bioensayo para PSP siempre y cuando el tiempo de observación sea de más de cuatro horas. La toxina es detectada en los ratones por una sintomatología característica, el *síndrome de scratching* ya mencionado. El éxito de dicho ensayo biológico en el incidente canadiense fue en parte debido a los niveles elevados de toxinas presentes en los mariscos contaminados (300-1.000 mg/g tejido). Sin embargo la sensibilidad del bioensayo es inadecuada para el límite de acción de 20 mg/g tejido establecido como límite de control. Los síntomas en ratones, tales como el *scratching* fueron observados en extractos conteniendo >40mg/g.

Se han desarrollado diversas alternativas para el análisis de toxinas ASP. El primer método químico desarrollado fue la cromatografía de líquido en fase inversa con detección UV del compuesto no derivatizado a un máximo de absorción de 242 nm (Quilliam *et al.*, 1989a)

Desde entonces se desarrollaron numerosas alternativas utilizando diversos procedimientos de extracción o de detección, incluyendo el uso de reactivos de derivatización distintos (Pocklington

et al., 1990; James *et al.*, 2000) permitiendo obtener niveles de detección de 1 µg/g o incluso más bajos.

La electroforesis capilar, una técnica analítica muy prometedora, ha sido investigada también y aplicada al análisis de ácido domoico (Nguyen *et al.*, 1990; Zhao *et al.*, 1997; Piñeiro *et al.*, 1999). Las técnicas GC-MS y HPLC-MS (Furey *et al.*, 2001; Piñeiro *et al.*, 2001) fueron propuestas también para la determinación de dichos compuestos. Así, la técnica de GC-MS es aplicable a concentraciones de ácido domoico en mariscos contaminados en el rango de 1-500 mg/g. Sin embargo, la reacción de derivatización es necesaria para convertir los componentes ASP en sus derivados N-trifluoroacetyl-O-silyl requiriéndose un *clean-up* intensivo para facilitar la derivatización (Pleasance *et al.*, 1990). La técnica HPLC combinada con ión spray MS ha resultado muy útil para la confirmación del ácido domoico en mariscos (Quilliam *et al.*, 1989b).

Entre los ensayos bioquímicos, además del radioinmunoensayo (Lawrence *et al.*, 1994) se han desarrollado diversos ensayos ELISA (Garthwaite *et al.*, 1998; Kawatzu *et al.*, 1999; Kawatzu *et al.*, 2000) altamente sensibles, recomendables para ensayos de rutina.

Entre todas las alternativas analíticas para el control de ASP, la más recomendable es la técnica de HPLC-UV, utilizada con fines de control en la mayoría de los organismos oficiales para prevenir incidentes de ASP (Lawrence *et al.*, 1989; Lawrence *et al.*, 1991; Quilliam *et al.*, 1989a; AOAC, 1991). Este método es recomendable para detectar niveles de contaminación superiores a 20 mg/g, sin embargo ciertas interferencias comúnmente presentes en matrices tan complejas pueden causar falsos positivos en extractos crudos. Este es el caso del triptófano y alguno de sus derivados presentes a menudo en tejidos de mariscos, eluyendo próximos al AD o a alguno de sus isómeros, siendo necesario un *clean-up* eficaz para eliminar las citadas interferencias y consecuentemente obtener un control seguro de los citados compuestos tóxicos. A tal fin se han desarrollado métodos de *clean-up* efectivos mediante extracción en fase sólida

(SPE) utilizando C18 o intercambio aniónico como fases estacionarias. No obstante, dichos procedimientos han mostrado una gran variabilidad, por lo que todavía son necesarias estrategias de preparación de muestra alternativas que permitan paliar las citadas carencias. Por todo ello, el uso de técnicas confirmatorias, tales como la espectrometría de masas, son muy recomendables para asegurar la presencia o ausencia de ASP en alimentos marinos.

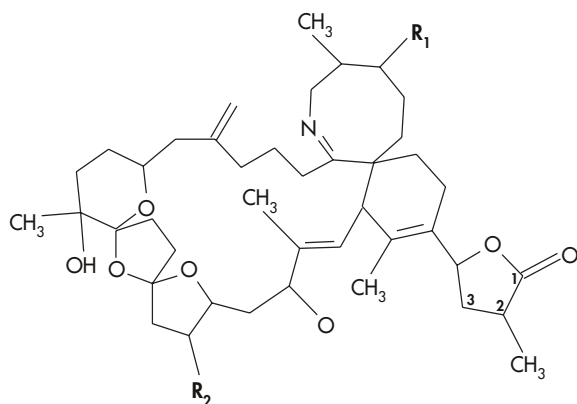
Toxinas emergentes

Gracias al desarrollo de nuevas técnicas analíticas se han descubierto nuevos grupos de biotoxinas marinas, incluyendo las espirolidas, pro-centrolidas, gymnodiminas, pinnatoxinas, azaspirácidos (AZP).

1. Espirolidas

Este grupo de toxinas se descubrió tras demostrarse la toxicidad que presentaban muestras de moluscos de consumo cultivados en Nueva Escocia (Canadá). Ya en un principio se sospechó que las espirolidas eran de origen fitoplanctónico debido a su elevada concentración en las glándulas digestivas de estos moluscos y a su aparición estacional. Más tarde se demostró que el dinoflagelado *Alexandrium ostenfeldii* es la principal fuente de estas toxinas ya que, tras la recolección de muestras de plancton en la región del sureste de Nueva Escocia, fueron detectadas en el análisis mediante HPLC-MS de sus células una vez aisladas y cultivadas (Cembella *et al.*, 2000).

Cuatro de estas toxinas, las espirolidas A, B, C y D, que se muestran en la Figura 8.6a han sido aisladas a partir de muestras de mejillones y vieiras (*Placopecten magellanicus*) y su estructura ha sido elucidada (Hu *et al.*, 1995). Son moléculas macrocíclicas polares que poseen un sistema con un grupo espiro unido a un éter tricíclico. Además, contienen un grupo con imina cíclica de siete miembros. Así, el nombre espi-



Toxina	Sitio 2 - 3	R ₁	R ₂
Espirolida A	Doble enlace	H	CH ₃
Espirolida B	Enlace sencillo	H	CH ₃
Espirolida C	Doble enlace	CH ₃	CH ₃
Espirolida D	Enlace sencillo	CH ₃	CH ₃
1,3-dimetil-espirolida C	Doble enlace	CH ₃	H

Figura 8.6a. Estructura general de las espirolidas tóxicas.

rolidas proviene de su estructura característica. Durante los procedimientos de aislamiento de los cuatro análogos de espirolida anteriormente citados, se descubrieron dos nuevos compuestos menores, las espirolidas E y F, que también fueron aisladas y elucidadas estructuralmente. Estos fueron caracterizados como derivados de la hidrólisis de las keto aminas de las toxinas principales y se demostró su inactividad en el bioensayo con ratones. Recientemente, las espirolidas A y C, y un análogo de la espirolida C, la 1,3-dimetil-C, fueron estructuralmente elucidadas tras su extracción a partir de muestras de vieiras y fitoplancton recogidas en una zona dedicada a la acuicultura en Nueva Escocia y a partir de cultivos del dinoflagelado *Alexandrium ostenfeldii* (Hu *et al.*, 2001).

Su actividad farmacológica no está muy definida todavía, pero existen suficientes evidencias como para afirmar que afectan a los canales de Ca en las células. Aunque el grupo imina cíclica es poco frecuente en biotoxinas marinas, se han

encontrado similares grupos en proocentrolidas (Torigoe *et al.*, 1988; Hu *et al.*, 1996a), gymnodiminas (Seki *et al.*, 1995) y pinnatoxinas (Uemura *et al.*, 1995). Además, las espirolidas inactivas E y F no poseen este grupo por lo que se ha sugerido que dicho grupo es el responsable de la actividad farmacológica de estas toxinas (Hu *et al.*, 1996b).

2. Proocentrolidas

En 1984 se observó un hecho inusual: durante la extracción de toxinas DSP de muestras del dinoflagelado *Prorocentrum maculosum* (formalmente *P. concavum*), se inyectaron en ratones las fracciones solubles en éter y butanol. Las toxinas (DSP) contenidas en la fracción éter causaron la muerte de los ratones en un espacio de horas, mientras que las toxinas solubles en butanol (polares) la causaron en cuestión de minutos.

Un año más tarde, las células de la especie fitoplanctónica *Prorocentrum lima* fueron aisladas y cultivadas, y sometidas a un procedimiento de extracción de toxinas DSP. La fracción butanólica se aisló, de manera que la estructura de la proocentrolida, que se muestra en la Figura 8.6b, fue determinada por primera vez (Torigoe *et al.*, 1988).

En 1996, una nueva toxina, la proocentrolida B (Figura 8.6b), se aisló y elucidó estructuralmente también a partir de células de *Prorocentrum maculosum*, provocando una toxicidad muy rápida tras ser inyectada en ratones (Hu *et al.*, 1996a).

Se ha comprobado que este grupo de toxinas no son inhibidores de la proteína fosfatasa, pero sus propiedades farmacológicas y toxicológicas todavía aún no han sido establecidas. Contienen una imina cíclica (al igual que las espirolidas, gymnodiminas y pinnatoxinas), y esta característica común determina su similar actividad farmacológica, siendo todas ellas muy tóxicas en ratones.

Sin embargo, no hay que olvidar que las proocentrolidas no han sido detectadas todavía en muestras de moluscos, por lo que han de ser consideradas como una amenaza potencial.

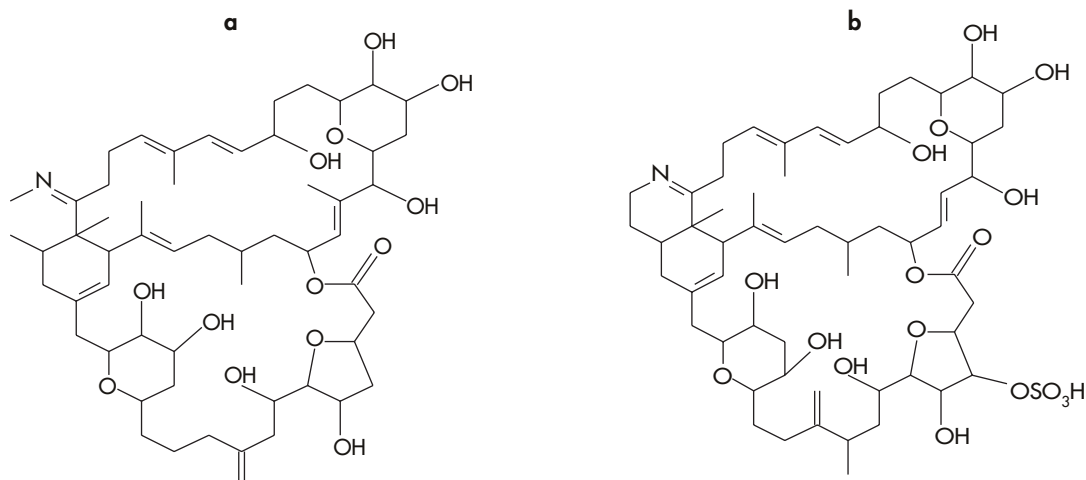


Figura 8.6b. Estructura de proocentrolida (a) y proocentrolida (b).

3. Gymnodiminas

En 1994 se detectaron signos de toxicidad en muestras de ostras de la especie *Tiostrea chilensis* procedentes del Estrecho de Foveaux (Nueva Zelanda), pero los análisis no revelaron la presencia de ninguna toxina conocida hasta esa fecha (MacKenzie *et al.*, 1995). Tras su extracción, estas muestras se sometieron a distintas etapas de purificación hasta el total aislamiento de la toxina que contenían, monitorizando las fracciones mediante cromatografía con detector con haz de diodos y bioensayo con ratones. Durante el mismo periodo que sucedió la intoxicación, se produjeron afloramientos del dinoflagelado *Gymnodinium cf. mikimotoi*, por lo que se deci-

dió cultivarlo, para finalmente descubrir que era el responsable de la producción de la toxina denominada gymnodimina (Seki *et al.*, 1995).

Tras la elucidación estructural de este compuesto mediante RMN, se comprobó que posee un anillo de 16 átomos de carbono y una imina cíclica (Seki *et al.*, 1995), por lo que guarda cierta similitud con las pinnatoxinas y proocentrolidas. Posteriormente, la configuración absoluta de la toxina (Figura 8.6c) se estableció mediante análisis estructural con rayos X (Stewart *et al.*, 1997).

Recientemente, se ha descubierto un nuevo análogo, la gymnodimina B, aislada a partir de un cultivo de *Gymnodinium spp.*, y cuya estructura ya ha sido elucidada (Figura 8.6c) (Miles *et al.*, 2000).

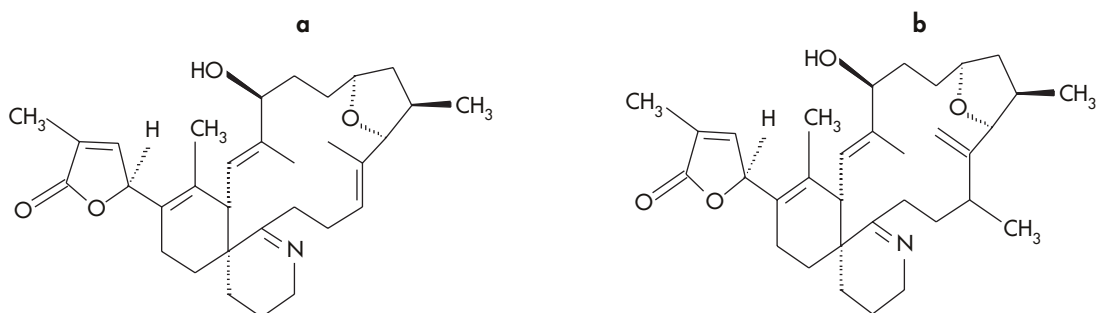


Figura 8.6c. Estructura de gymnodimina (a) y gymnodimina (b).

En cuanto a su toxicidad, las gymnodiminas pueden resultar ictiotóxicas a bajas concentraciones (250-500 ppb), y la dosis letal mínima tras la inyección en ratones ha sido establecida en 450 µg/kg.

4. Pinnatoxinas

En Japón se han producido numerosos fenómenos de intoxicación tras el consumo de moluscos del género *Pinna*; el primero de ellos se dio en 1975, cuando cerca de 1.500 personas consumieron ejemplos del bivalvo *Pinna pectinata* en mal estado. En China se dieron casos similares en los años 1980 y 1989 tras el consumo de la especie *Pinna attenuata*, pero la toxina responsable de estos fenómenos no se aisló hasta 1995 a partir de muestras de *Pinna muricata* (Chou *et al.*, 1996a). La estructura de la pinnatoxina A posee un macrociclo con múltiples grupos éter y una imina cíclica (Figura 8.6d), por lo que es similar a las procentrolidas, gymnodiminas y espirolidas. Se han descubierto los análogos pinnatoxina B, C y D, pero solamente la estructura de la pinnatoxina D ha sido elucidada (Figura 8.6d) (Chou *et al.*, 1996b, Suthers *et al.*, 1998).

En cuanto a su toxicidad, se ha comprobado que extractos de la glándula digestiva de ejemplares de *P. muricata*, *P. attenuata*, *P. atropurea* y *P. pectinata* contaminadas causan la

muerte durante el bioensayo con ratones, herramienta principal en la monitorización de esta toxina, en cuestión de minutos, aunque su origen biológico aún no ha sido determinado. Además, estudios preliminares demostraron que la pinnatoxina activa el canal del ión calcio y que los síntomas que provoca en seres humanos son típicamente neurotóxicos, induciendo diarrea, parálisis y convulsiones.

5. Azaspirácidos (AZP)

En 1995 varias personas sufrieron problemas gastrointestinales en los Países Bajos tras el consumo de mejillones (*Mytilus edulis*) cultivados en Killary Harbour (Irlanda). A pesar de que el programa de monitorización de toxinas DSP no detectó niveles altos de estas, los síntomas que los intoxicados presentaban son los típicos provocados por las toxinas DSP: náuseas, diarrea, vómitos y calambres en el estómago. Análisis realizados posteriormente a las muestras de bivalvos mostraron niveles muy bajos de AO y DTX-2 (Satake *et al.*, 1998a).

Posteriormente se procedió al aislamiento y elucidación estructural de la toxina responsable de este episodio, que en aquel momento fue denominada killarytoxin-3 (KTX-3) (Ito *et al.*, 1998). La investigación sobre su estructura determinó que este compuesto posee un anillo

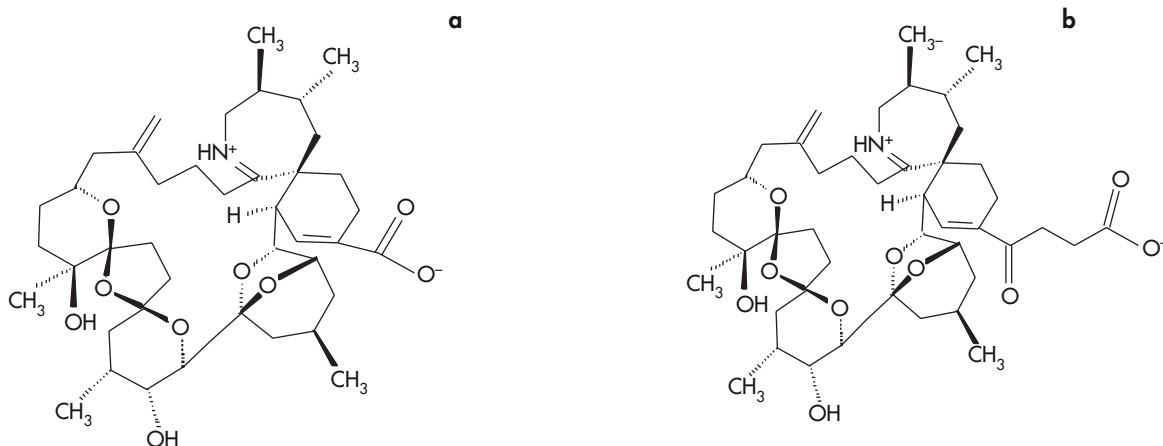
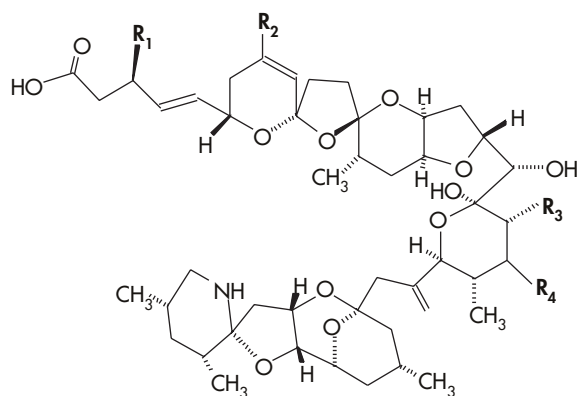


Figura 8.6d. Estructura de pinnatoxina A (a) y pinnatoxina D (b).

espiro triple, un anillo azospiro único a un 2,9-dioxabicyclo (3.3.1) nonano y un ácido carboxílico terminal (Figura 8.6e), por lo que el nombre de esta toxina se cambió por azaspirácido-1 (AZA-1) (Satake *et al.*, 1998b).

Un segundo incidente tóxico se dio en 1997 en la Isla de Arranmore (Irlanda), cuando doce personas se intoxicaron tras el consumo de mejillones cultivados en la zona. La toxicidad persistió en las muestras de moluscos durante unos ocho meses, lo que permitió aislar e identificar dos nuevos análogos de azaspirácidos: AZA-2 y AZA-3 (Figura 8.6e), ambos presentes en concentraciones superiores a AZA-1. Tras la determinación estructural de estos dos nuevos análogos, se comprobó que AZA-2 es un 8-metilazaspirácido, y que AZA-3 es un 22-dimetilazaspirácido (Ofuji *et al.*, 1999).



Nombre	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
AZA1	H	H	CH ₃	H
AZA2	H	CH ₃	CH ₃	H
AZA3	H	H	H	H
AZA4	OH	H	H	H
AZA5	H	H	H	OH
AZA6	CH ₃	H	H	H
AZA7	H	CH ₃	OH	H
AZA8	H	CH ₃	H	OH
AZA9	CH ₃	H	OH	H
AZA10	CH ₃	H	H	OH

Figura 8.6e. Estructura de los diez análogos de azaspirácidos descubiertos hasta la fecha.

Recientemente se han identificado nuevos análogos: AZA-4 y AZA-5 son los 3-hidroxi y 23-hidroxi análogos respectivamente de AZA-3 (Ofuji *et al.*, 2001). Además, AZA-6 es isómero de AZA-1 (Furey *et al.*, 2002; James *et al.*, 2003) y AZA-7, AZA-8, AZA-9 y AZA-10 son derivados hidroxilados de AZA-1 (Moroney *et al.*, 2002). Se cree que los análogos hidroxilados son productos de la bioconversión de los bivalvos, ya que no se han detectado en muestras de fitoplancton.

Este síndrome tóxico se ha identificado además en moluscos cultivados en otros países del norte de Europa, como Inglaterra y Noruega (James *et al.*, 2002a) así como en España y Francia (Braña Magdalena *et al.*, 2003).

En cuanto a la toxicidad de estos compuestos, se ha comprobado que la dosis letal mínima para AZA-1 es 0,2 µg/g tras administración intraperitoneal (i.p.) en ratones, mientras que para AZA-2 y AZA-3 es menor: 0,14 µg/g (Ito *et al.*, 2000). También se observó que los ratones muestran síntomas típicamente neurotóxicos, diferentes a los provocados por las toxinas diarreicas, como son parálisis progresiva, respiración dificultosa, lentitud de movimientos y espasmos (Satake *et al.*, 1998a). En otro estudio se analizaron los cambios morfológicos sufridos en distintos órganos de ratones y se detectaron múltiples daños en la lámina propia del intestino delgado, glándula del timo y bazo, además de generar depósitos grasos en el hígado (Ito *et al.*, 2000). Recientemente se han estudiado los efectos crónicos de la administración no letal de azaspirácidos a ratones (Ito *et al.*, 2002), donde la recuperación de órganos dañados fue muy lenta y los cambios morfológicos en el intestino delgado y el estómago no habían sanado tras un periodo de tres meses.

Sin embargo, es necesario que la toxicidad de los azaspirácidos se estudie con mayor profundidad tanto para confirmar la acción de AZA-1 como promotor de tumores como para determinar los efectos patológicos provocados por los otros análogos.

El bioensayo con ratones es el método de análisis típico para la monitorización de toxinas

DSP en la mayoría de países europeos, pero en el caso de los azaspirácidos los resultados no son satisfactorios; se han obtenido resultados positivos en muestras con un elevado contenido tóxico, pero en otros casos se han dado por buenas mercancías que luego han causado intoxicaciones humanas en diferentes países europeos (James *et al.*, 2000a). Este fracaso del bioensayo con ratones se debe principalmente al inusual patrón de distribución de estas toxinas en los tejidos del mejillón (James *et al.*, 2002b), ya que los azaspirácidos se distribuyen por todos los órganos, mientras que en el bioensayo se toma solamente el hepatopáncreas, donde se acumulan las toxinas diarreas.

En cuanto al origen biológico de los azaspirácidos, se supuso desde un principio que eran de origen dinoflagelado por su estructura oxigenada (Ofuji *et al.*, 1999; Yasumoto *et al.*, 2000). Finalmente, se ha demostrado que el productor de los azaspirácidos es la especie *Protoperidinium crassipes* (James *et al.*, 2003) muy común en las comunidades fitoplanctónicas de aguas templadas.

En cuanto a los métodos de análisis desarrollados para la detección y cuantificación de los azaspirácidos, cabe decir que el primero en ser propuesto empleaba la técnica HPLC-MS/MS (Draisci *et al.*, 2000) para la determinación de AZA-1. Otros métodos propuestos emplean HPLC-MS para la determinación de AZA-1, AZA-2 y AZA-3 (Ofuji *et al.*, 2000; Furey *et al.*, 2002). Posteriormente se han desarrollado métodos para el análisis simultáneo de AZA-1, AZA-2, AZA-3, AZA-4 y AZA-5 empleando HPLC-MS/MS (Lehane *et al.*, 2002) y recientemente se ha propuesto un método HPLC-MS³ para la determinación de los diez azaspirácidos, incluyendo los análogos hidroxilados en moluscos (Lehane *et al.*, 2004).

También se ha desarrollado un ensayo de citotoxicidad para la detección y diferenciación entre toxinas DSP y AZP (Flanagan *et al.*, 2000; Flanagan *et al.*, 2001). Sin embargo, el método parece no ser tan selectivo como en un principio se pensó, por lo que el ensayo de citotoxicidad no es sustituto, por el momento y hasta que no

se realice una investigación más completa, del análisis mediante HPLC-MS, además de ser mucho más lento (Flanagan *et al.*, 2001).

Conclusiones

En conclusión, podemos decir que gracias al desarrollo de nuevas técnicas y métodos analíticos, se ha descubierto un buen número de biotoxinas marinas. La mayoría de estas toxinas están presentes en el medio marino de una manera natural, pudiendo provocar problemas de calidad y seguridad en los alimentos de origen marino, y, en consecuencia y a bajos niveles, a la salud de las personas consumidoras de éstos.

La búsqueda de técnicas analíticas sensibles es necesaria para un control de riesgos adecuado. Además es importante la realización de estudios toxicológicos para un mejor entendimiento de los mecanismos de acción de estos compuestos. Sin embargo, la carencia de estándares y materiales de referencia dificulta obviamente avanzar en esta área. Por otro lado, el interés en el estudio de estas sustancias está aumentando considerablemente debido a su enorme impacto socioeconómico. En la actualidad diferentes equipos de investigación en todo el mundo están trabajando en el desarrollo de nuevos métodos analíticos para su detección y cuantificación, que poco a poco resultará en un mayor conocimiento de los compuestos tóxicos involucrados en diferentes episodios nocivos, y por tanto en una reducción de los riesgos para la salud de los consumidores.

Bibliografía

- Acres J, Gray J (1978). Paralytic shellfish poisoning. *CMA Journal* 119: 1195-1197.
- AOAC. Official Methods of Analysis (1990). 15th edition, AOAC Int., Arlington, VA, section 959.08, p.881.

- AOAC Official Methods of Analysis (1991). Association of Official Analytical Chemists, Secs. pp. 26.
- Amzil Z, Pouchus YF, Le Boterff J, Roussakis C, Verbist JF, Marcaillou-Lebaut C, Masselin P (1992). Short-time cytotoxicity of mussel extracts: A new bioassay for okadaic acid detection. *Toxicon* 30: 1419-1425.
- Amzil Z, Fresnel J, Le Gal D, Billard C (2001). Domoic acid accumulation in French shellfish in relation to toxic species of pseudo-nitzschia multiseriis and P. pseudodelicatissima. *Toxicon* 39: 1245-1251.
- Aune T (1989). Toxicity of marine and freshwater algal biotoxins towards freshly prepared hepatocytes. En: Natori S, Hashimoto K, Ueno Y. (eds.). *Mycotoxins and Phycotoxins '88*, Elsevier, Amsterdam, pp. 461-468.
- Aune T, Yndestad M (1993). Diarrhetic shellfish poisoning. EN: Falconer IR (ed.). *Algal toxins in seafood and drinking water*. Academic Press Limited, London, pp. 87-104.
- Aune T, Yasumoto T, Ramstad H, Landsverk T (2002). Comparison between oral and intraperitoneal toxicity of yessotoxin towards mice. *Toxicon* 40: 77-82.
- Balech E (1985). The genus *Alexandrium* or *Gonyaulax* of the *Tamarensis* group. En: Anderson DM, White AW, Baden DG (eds.). *Toxic dinoflagellates*, pp 33-38.
- Bates HA, Rapoport H (1975). Chemical assay for saxitoxin, the paralytic shellfish poison. *J Agric Food Chem.* 23: 237-239.
- Bouaicha N, Hennion MC, Sandra P (1997). Determination of okadaic acid by micellar electrokinetic chromatography with ultraviolet detection. *Toxicon* 35: 273-281.
- Braña Magdalena A, Lehane M, Krys S, Fernández ML, Furey A, James KJ (2003). The first identification of azaspiracids in shellfish from France and Spain. *Toxicon* 42: 105-108.
- Briggs LR, Miles CO, Garthwaite I, Ross KM, Towers NR, Samdal I *et al.* (2002). *Immunoassays for analysis yessotoxins*. HAB X, Sant Pete Beach, Florida, pp. 37.
- Cembella AD, Lewis NI, Quilliam MA (2000). The marine dinoflagellate *Alexandrium osterfeldii* (Dinophyceae) as the causative organism of spirolide shellfish toxins. *Phycologia* 39: 67-74.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Fattorusso D, Forino M, Magno S, Poletti R (2002). Direct detection of yessotoxine and its analogues by liquid chromatography coupled with electrospray ion trap mass spectrometry. *J Chromatogr A* 968: 61-69.
- Chin JD, Quilliam MA, Freymy JM, Mohapatra SK, Sikorska M (1995). Screening for okadaic acid by immunoassay. *J AOAC Int.* 78: 508-513.
- Chou T, Kamo O, Uemura D (1996). Relative stereochemistry of pinnatoxin A, a potent shellfish poison from *Pinna muricata*. *Tetrahedron Lett.* 37: 4023-4026.
- Chou T, Haino T, Kuramoto M, Uemura D (1996). Isolation and structure of pinnatoxin D, a new shellfish poison from the Okinawan bivalve *Pinna muricata*. *Tetrahedron Lett.* 3: 4027-4030.
- Croci L, Cozzi L, Stacchini A, De Medici D, Toti L (1997). A rapid tissue culture assay for the detection of okadaic acid and related compounds in mussels. *Toxicon* 35: 223-230.
- Daiguji M, Ramstad H, Aune T, Naoki H, Yasumoto T (1998). Structure and fluorometric HPLC determination of 1-sesulfoyessotoxin, a new yessotoxin analog isolated from mussels from Norway. *Nat Toxins* 6: 235-239.
- Draisci R, Giannetti L, Lucentini L, Marchiafave C, James KJ, Bishop AG *et al.* (1998). Isolation of a new okadaic acid analogue from phytoplankton implicated on diarrhetic shellfish poisoning. *J Chromatogr A* 798: 137-145.
- Draisci R, Giannetti L, Lucentini L, Ferretti E, Palleschi L, Marchiafava C (1998). Direct identification of yessotoxin in shellfish by LC-MS and tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 12: 1291-1296.
- Draisci R, Palleschi L, Giannetti L, Lucentini L, James KJ, Bishop AG *et al.* (1999). New approach to the direct detection of known and new diarrhetic shellfish toxins in mussels and phytoplankton by liquid chromatography/mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 847:213-221.
- Draisci R, Palleschi L, Marchiafava C, Poletti R, Milandri A, Ceredi A *et al.* (1999). High levels of yessotoxin in mussels and presence of yessotoxin and homoyessotoxin in dinoflagellates of the Adriatic Sea. *Toxicon* 37: 1187-1193.
- Draisci R, Palleschi L, Ferretti E, Furey A, James KJ, Satake M *et al.* (2000). Development of a liquid chromatography - tandem mass spectrometry method for the identification of azaspiracids in shellfish. *J Chromatogr A*, 871: 13-21.
- Flanagan AF, Callanan KR, Donlon J, Palmer R, Forde A (2001). A cytotoxicity assay for the

- detection and differentiation of two families of shellfish toxins. *Toxicon* 39: 1021-1027.
- Fritz L, Quilliam MA, Wright JLC, Beale AM, Work TM (1992). An outbreak of domoic acid and poisoning attributed to the pennate diatom *Pseudo-nitzschia australis*. *J Phycol* 28: 439-442.
- Fujiki H, Suganuma M (1999). Unique features of the okadaic acid activity class of tumour promoters. *J Cancer Res Clin Oncol* 125: 150-155.
- Furey A, Lehane M, Gillman M, Fernández-Puente P, James KJ (2001). Determination of domoic acid in shellfish by liquid chromatography with electrospray ionization and multiple tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 938: 167-174.
- Furey A, Braña Magdalena A, Lehane M, Moroney C, James KJ, Satake M, Yasumoto T (2002). Determination of azaspiracids in shellfish using liquid chromatography/tandem electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom* 16: 238-242.
- Gago-Martínez A, Rodríguez-Vázquez JA, Quilliam MA, Thibault P (1996). Simultaneous occurrence of diarrhetic and paralytic shellfish poisoning toxins in Spanish mussels in 1993. *Nat Toxins* 4: 72-79.
- Garthwaite I, Ross KM, Miles CO, Hanse RP, Foster D, Wilkins AL, Towers NR (1998). Polyclonal antibodies to domoic acid, and their use in immunoassays for domoic acid in sea water and shellfish. *Nat Toxins* 6: 93-104.
- Goto H, Igarashi T, Yamamoto M, Yasuda M, Sekiguchi R, Watai M *et al.* (2001). Quantitative determination of marine toxins associated with diarrhetic shellfish poisoning by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 907: 181-189.
- Hall S, Strichartz G, Moczydlowski E, Ravindran A, Reichardt PB (1990). The saxitoxins: Sources, chemistry, and pharmacology. En: Hall S, Strichartz G (eds.). *Marine Toxins: Origin, structure and molecular pharmacology*, American Chemical Society Symposium Series, Washington D.C., pp. 29-65.
- Hamano Y, Kinoshita Y, Yasumoto T (1985). Suckling mice assay for diarrhetic shellfish toxins. En: Anderson DM, White AW, Baden DG (eds.). *Toxic dinoflagellates*. New York: Elsevier, pp. 383-388.
- Haystead FAJ, Sim ATR, Carling D, Honnor RC, Tsukitani Y, Cohen P *et al.* (1989). Effects of the tumor promoter Okadaic Acid on intracellular protein phosphorylation and metabolism. *Nature* 337: 78-81.
- Hess P, Gallacher S, Bates LA, Brown N, Quilliam MA (2001). Determination and confirmation of the amnesic shellfish poisoning toxin, domoic acid, in shellfish from Scotland by liquid chromatography and mass spectrometry. *J AOAC Int* 84: 1657-1667.
- Hu T, Marr J, DeFreitas ASW, Quilliam MA, Walter JA, Wright JLC *et al.* (1992). New diol esters isolated from cultures of the dinoflagellates. *Prorocentrum lima* and *Prorocentrum concavum*. *J Nat Prod* 55: 1631-1637
- Hu T, Curtis JM, Oshima Y, Quilliam MA, Watson-Wright WM, Wright JL (1995). Spirolides B and D, two novel macrocycles isolated from the digestive glands of shellfish. *J Chem Soc Chem Commun* 2159-2161.
- Hu T, deFreitas ASW, Curtis JM, Oshima Y, Walter JA, Wright JLC (1996). Isolation and structure of Prorocentrolide B, a fast-acting toxin from *Prorocentrum maculosum*. *J Nat Prod* 59: 1010-1014.
- Hu T, Curtis JM, Walter JA, Wright JLC (1996). Characterization of biologically inactive spirolides E and F: Identification of the spirolide pharmacophore. *Tetrahedron Lett* 37: 7671-7674.
- Hu T, Burton IW, Cembella AD, Curtis JM, Quilliam MA, Walter JA, Wright JLC (2001). Characterisation of spirolides A, C, and 13-desmethyl C, new marine toxins isolated from toxic plankton and contaminated shellfish. *J Nat Prod* 64: 308-312.
- Ito E, Terao K, McMahon T, Silke J, Yasumoto T (1998). En: Ruguera B, Blanco J, Fernández ML, Wyatt T (eds.). *Harmful Algae*. Xunta de Galicia y IOC of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 588-589.
- Ito E, Satake M, Ofuji K, Higashi M, Harigaya K, McMahon T *et al.* (2002). Chronic effects in mice caused by oral administration of sublethal doses of azaspiracid, a new marine toxin isolated from mussels. *Toxicon* 40: 193-203.
- Iverson F, Turelove J, Tryphonas L, Nera E (1994). Toxicology and seafood toxins: domoic acid. *Nat Toxins* 2: 334-339.
- James KJ, Bishop A, Draisci R, Palleschi L, Marchiafava C, Ferretti E *et al.* (1999). Liquid chromatographic methods for the isolation and identification of new pectenotoxin-2 analogues from marine phytoplankton and shellfish. *J Chromatogr A*, 844: 53-65.

- James KJ, Bishop AR, Healy BM, Roden C, Sherlock IR, Twohig M, Draisci R, Giannetti C, Lucentini L (1999). Efficient isolation of the rare diarrhoeic shellfish toxin, dinophysistoxin-2, from marine phytoplankton. *Toxicon* 37: 343-357.
- James KJ, Gillman M, Lehane M, Gago-Martinez A (2000). New fluorimetric method of liquid chromatography for the determination of the neurotoxin domoic acid in seafood and marine phytoplankton. *J Chromatography A*, 871: 1-6.
- James KJ, Furey A, Lehane M, Ramstad H, Aune T, Hovgaard P *et al.* (2002). First evidence of an extensive northern european distribution of azaspiracid poisoning (AZP) toxins in shellfish. *Toxicon* 40: 909-915.
- James KJ, Furey A, Lehane M, Moroney C, Fernández Puente P, Satake M *et al.* (2002). Azaspiracid shellfish poisoning: unusual toxin dynamics in shellfish and the increased risk of acute human intoxications. *Food Addit Contam* 19: 555-561.
- James KJ, Díaz Sierra M, Furey A, Lehane M, Braña Magdalena A (2003). Ubiquitous «benign» alga emerges as the cause of shellfish contamination responsible for the human toxic syndrome, azaspiracid poisoning. *Toxicon* 41: 277.
- Jellet JF, Roberts RL, Laycock M, Quilliam M, Barrett RE (2002). Detection of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins in shellfish tissue using MIST Alert™, a new rapid test, in parallel with the regulatory AOAC (R) mouse bioassay. *Toxicon* 40: 1407-1425.
- Jung JH, Sim CJ, Lee CO (1995). Cytotoxic compounds from a two-sponge association. *J Nat Prod* 58: 1722-1726.
- Kao CY, Nagasawa J, Spiegelstein MY, Cha YN (1971). *J Pharmacol Exp Ther* 178: 110-121.
- Kao CY (1993). Paralytic shellfish poisoning. En: Falconer, IR (ed.). *Algal toxins in seafood and drinking water*. Academic Press Limited, London, pp. 75-86.
- Kat M (1979). The occurrence of *Prorocentrum* species and coincidental gastrointestinal illness of mussel consumers. En: Taylor D, Seliger HH (eds.). *Toxic dinoflagellate blooms*, Elsevier, North-Holland, Amsterdam, pp. 215-220.
- Kawatsu K, Hamano Y, Noguchi T (1999). Production and characterisation of a monoclonal antibody against domoic acid and its application to enzyme immunoassay. *Toxicon* 37: 1579-1589.
- Kawatsu K, Hamano Y (2000). Determination of Domoic acid in Japanese mussels by enzyme immunoassay. *J AOAC Int* 83: 1384-1386.
- Kumagai M, Yanagi T, Murata M, Yasumoto T, Kat M, Lassus P *et al.* (1986). *Agric Biol Chem* 50: 2853-2857.
- Larm JA, Beart PM, Cheung NS (1997). Neurotoxin domoic acid produces cytotoxicity via kainate- and ampa-sensitive receptors in cultured cortical neurones. *Neurochem Int* 31: 677-682.
- Lawrence JF, Charbonneau CF, Menard C, Quilliam MA, Sim PG (1989). Liquid chromatographic determination of domoic acid in shellfish products using the AOAC paralytic shellfish poison extraction procedure. *J Chromatogr* 462: 349-356.
- Lawrence JF, Charbonneau CF, Menard C (1991). Liquid Chromatographic determination of domoic acid in mussels, using AOAC paralytic shellfish poison extraction procedure: collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem* 74: 68-72.
- Lawrence JF, Cleroux C, Truelove LF (1994). Comparison of high-performance liquid chromatography with radioimmunoassay for the determination of domoic acid in biological samples. *J Chromatogr* 662: 173-177.
- Lawrence JF, Menard C, Cleroux Ch (1995). Evaluation of prechromatographic oxidation for liquid chromatographic determination of paralytic shellfish poisons in shellfish. *J AOAC International* 78: 514-520.
- Lee JS, Yanagi T, Kenma R, Yasumoto T (1987). Fluorometric determination of diarrhetic shellfish toxins by High Performance Liquid Chromatography *Agric Biol Chem* 51: 877-891.
- Lehane M, Fidalgo MJ, Braña A, Ruppen I, Díaz M, Hamilton B *et al.* (2004). Liquid chromatography-multiple mass spectrometry for the determination of ten azaspiracids, including hydroxyl analogues in shellfish. *J Chromatogr* 1024: 63-70.
- Louzao MC, Vieytes MR, Baptista de Sousa JM, Leira F, Botana LM (2001). A fluorimetric method based on changes in membrane potential for screening paralytic shellfish toxins in mussels. *Anal Biochem* 289: 246-250.
- Louzao MC, Vieytes MR, Cabada AG, Baptista de Sousa JM, Leira F, Botana LM (2003). A Fluorimetric microplate assay for detection and quantitation of toxins causing paralytic shellfish poisoning. *Chem Res Toxicology* 16: 433-438.

- MacKenzie L, Rhodes L, Till D, Chang FK, Kaspar H, Haywood A *et al.* (1995). A *Gymnodinium* sp. bloom and the contamination of shellfish with lipid soluble toxins in New Zealand, 1993, En: Lassus PEA (eds.). *Harmful marine algal blooms*, Intercept Ltd, Francia, pp. 795-800.
- Manger R, Leja L, Lee S, Hungerford JM, Kirkpatrick MA, Yasumoto T *et al.* (2003). Detection of paralytic shellfish poison by rapid cell bioassay: antagonism of voltage-gated sodium channel active toxins in vitro. *J AOAC International* 86: 540-543.
- Marcaillou-Lebaut C, Amzil Z, Vernoux JP, Pouchus YF, Bohec M, Simon JF (1994). Studies on the detection of okadaic acid in mussels: Preliminary comparison of bioassays. *Nat Toxins* 2: 312-317.
- Miles CO, Wilkins AL, Stirling DJ, MacKenize AL (2000). New analogue of gymnodimine from a *Gymnodinium* species. *J Agric Food Chem* 48: 1373-1376.
- Miles CO, Aasen J, Dahl E, Samdal I, Aune T, Briggs LR *et al.* (2002). Yessotoxin in Norwegian blue mussel caused by *Protoceratium reticulatum*, Proceedings of Xth International Conference on Harmful Algae Bloom, Florida.
- Moroney C, Lehane M, Braña Magdalena A, Furey A, James KJ (2002). Comparison of solid-phase extraction methods for the determination of azaspiracids in shellfish by liquid chromatography electrospray Mass Spectrometry. *J Chromatogr A*, 963: 353.
- Morton SL, Tindall DR (1996). Determination of okadaic acid content of dinoflagellate cells: A comparison of the HPLC-fluorescent method and two monoclonal antibody elisa test kits. *Toxicon* 34: 947-954.
- Murata M, Shimatani M, Sugitani H, Oshima Y, Yasumoto T (1982). Isolation and structural elucidation of the causative toxin of the diarrhetic shellfish poisoning. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 48: 549-552.
- Murata M, Sano M, Iwashita T, Naoki H, Yasumoto T (1986). The structure of pectenotoxin-3, a new constituent of diarrhetic shellfish toxins. *Agric Biol Chem* 50: 2693-2695.
- Murata M, Kumagi M, Lee JS, Yasumoto T (1987). Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning. *Tetrahedron Letters* 28: 5869-5872.
- Nagai H, Satake M, Yasumoto T (1990). Antimicrobial activities of polyether compounds of dinoflagellate origins. *J App Phycol* 2: 305-308.
- Naoki H, Yasumoto T (1993). Negative-ion fast-atom bombardment tandem mass spectrometry for the structural study of polyether compounds: structural verification of yessotoxin. *Rapid Commun Mass Spectrom* 7:179-182.
- Negri A, Stirling D, Quilliam M, Blackburn S, Bolch C, Burton I *et al.* (2003). Three novel hydroxy-benzoate saxitoxina analogues isolated from the dinoflagellate *gymnodinium catenatum*. *Chem Res Toxicol* 16: 1029-1033.
- Nijjar MS, Nijjar SS (2000). Domoic acid-induced neurodegeneration resulting in memory loss is mediated by Ca^{2+} overload and inhibition of Ca^{2+} + calmodulin-stimulated adenylate cyclase in rat brain (Review). *Int J Molecular Med* 6: 377-389.
- Norte M, Padilla A, Fernández JJ, Souto ML (1994). *Tetrahedron* 50: 9175-9180.
- Nguyen AL, Luong JH, Masson C (1990). Capillary Electrophoresis for detection and quantitation of domoic acid in mussels. *Anal Lett* 23: 1621-1634.
- Ofuji K, Satake M, McMahan T, Silke J, James KJ, Naoki H *et al.* (1999). Two analogs of azaspiracid isolated from mussels, *Mytilus edulis*, involved in human intoxications in Ireland. *Nat Toxins* 7: 99-102.
- Ofuji K, Satake M, Oshima Y, McMahan T, James KJ, Yasumoto T (2000). A sensitive and specific determination method for azaspiracids by liquid chromatography mass spectrometry. *Nat Toxins* 8: 1-4.
- Ofuji K, Satake M, McMahan T, James KJ, Naoki H, Oshima Y *et al.* (2001). Structures of azaspiracid analogs, azaspiracid-4 and azaspiracid-5, causative toxins of azaspiracid poisoning in Europe. *Biosci Biotechnol Biochem* 65: 740-742.
- Ogino H, Yasumoto T (1997). Toxicologic evaluation of yessotoxin. *Nat Toxins* 5: 255-259.
- Oshima Y, Sugino T, Yasumoto T (1989). Latest advances in HPLC analysis of paralytic shellfish toxins. En: Natori S, Hashimoto K, Ueno Y (eds.) *Mycotoxins and Phycotoxins*, Elsevier, Amsterdam, pp. 319-326.
- Piñeiro N, Leao Martins JM, Gago-Martínez A, Rodríguez-Vázquez JA (1999). Capillary electrophoresis with diode array detection: an alternative analytical method for paralytic and amnesic shellfish toxins. *J Chromatogr A*, 847: 223-232.

- Piñeiro N, Vaquero E, Leao Martins JM, Gago-Martínez A, Rodríguez-Vázquez JA (2001). Optimization of conditions for the liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometric analysis of amnesic shellfish poisoning toxins. *Chromatographia* 53: 231-235.
- Pleasant S, Xie M, Leblanc Y, Quilliam MA (1990). Analysis of domoic acid and related compounds by mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry as N-trifluoro acetyl-O-silyl derivatives. *Biomed Environ Mass Spectrom* 19: 420-427.
- Pocklington R, Milley JE, Bates SS, Bird CJ, DeFreitas ASW, Quilliam MA (1990). Trace determination of domoic acid in seawater and phytoplankton by liquid chromatography of the fluorenyl-methoxycarbonyl (Fmoc) derivative. *Int J Environ Analyt Chem* 38: 351-368.
- Prakash A, Medcof JC, Tennant AD (1971). Paralytic shellfish poisoning in eastern Canada. *Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada* 177: 1-871.
- Quilliam MA, Sim PG, McCulloch AW, McInnes AG (1989a). High Performance Liquid Chromatography of domoic acid, a marine neurotoxin, with application to shellfish and plankton. *Int J Environ Analyt Chem* 36: 139-154.
- Quilliam MA, Thompson BA, Scott GJ, Siu KWM (1989b). Ion spray mass spectrometry of marine neurotoxins. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 3: 145-150.
- Quilliam M (1998). Liquid chromatography-mass spectrometry: a universal method for analysis of toxins. En: Reguera B., Blanco J., Fernandez M. L., Wyatt T. (eds.). *Harmful Algae*, Xunta de Galicia y Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 509-514.
- Quilliam MA, Gago Martínez A, Rodríguez-Vázquez JA (1998). Improved method for preparation and use of 9-Anthryldiazomethane for derivatization of hydroxy carboxylic acids: Application to diarrhetic shellfish poisoning toxins. *J Chromatogr* 807: 229-239.
- Quilliam MA, Wright JL (1989). Amnesic shellfish poisoning mystery. *Anal Chem* 6: 1058a-1060a.
- Quintela BA, Durán R, Alfonso M (2000). Mediation of ionotropic glutamate receptors in domoic acid-induced striatal dopamine release in rats. *Eur J Pharm* 401: 173-177.
- Ramstad H, Larsen S, Aune T (2001). Repeatability and validity of a fluorimetric HPLC method in the quantification of yessotoxin in blue mussels (*Mytilus edulis*) related to the mouse bioassay. *Toxicon* 39: 1393-1397.
- Ross IA, Johnson W, Sapienza PP, Kim CS (2000). Effects of the seafood toxin domoic acid on glutamate uptake by rat astrocytes. *Food Chem Toxicol* 38: 1005-1011.
- Samdal IA, Naustvoll LJ, Miles CO, Olseng C, Briggs L, Rhodes LL (2002). *Analysis of picked algal cells using ELISA, HAB X*, Sant Pete Beach, Florida, pp. 250.
- Sasaki K, Wright JL, Yasumoto T (1998). Identification and characterization of Pectenotoxin (PTX) 4 and PTX7 as spiroketal stereoisomers of two previously reported pectenotoxins. *J Org Chem* 63: 2475-2480.
- Satake MTK, Kadowaki Y, Yasumoto T (1996). Relative configuration of yessotoxin and isolation of two new analogs from toxic scallop. *Tetrahedron Lett* 37: 5955-5958.
- Satake M, Tubaro A, Lee JS, Yasumoto T (1997). Two new analogues of yessotoxin, homoyessotoxin and 45-hydroxyhomoyessotoxin, isolated from mussels of the Adriatic Sea. *Nat Toxins* 5: 107-111.
- Satake M, MacKenzie L, Yasumoto T (1997). Identification of *Protoceratium reticulatum* as the biogenetic origin of yessotoxin. *Nat Toxins* 5: 164-167.
- Satake M, Ofuji K, James KJ, Furey A, Yasumoto T (1998). En: Reguera B, Blanco J, Fernández ML, Wyatt T (eds.). *Harmful Algae*, Xunta de Galicia y Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 468-469.
- Satake M, Ofuji K, Naoki H, James KJ, Furey A, McMahon T *et al.* (1998). Azaspiracid, a new marine toxin having a unique spiro ring assemblies, isolated from Irish mussels, *Mytilus edulis*. *J Am Chem Soc* 120: 9967-9968.
- Seki T, Satake M, MacKenize L, Kaspar HF, Yasumoto T (1995). Gymnodimine, a new marine toxin of unprecedented structure isolated from New Zealand oysters and the dinoflagellate, *Gymnodinium* sp. *Tetrahedron Lett* 36: 7093-7096.
- Stewart M, Blunt JW, Munro MHG, Robinson WT, Hannah DJ (1997). The absolute stereochemistry of the New Zealand shellfish toxin gymnodimine. *Tetrahedron Lett* 36: 4889-4890.

- Subba Rao DV, Quilliam MA, Pocklington R (1988). Domoic acid- a neurotoxic amino acid produced by the marine diatom *Nitzschia pungens* in culture. *Can J Fish Aquat Sci* 45: 2076-2079.
- Suthers BD, Jacobs MF, Kitching W (1998). Synthesis and NMR profiling of dioxabicyclo[3.2.1]octanes related to pinnatoxin D. Confirmation of the relative stereochemistry about the rings E and F. *Tetrahedron Lett* 39: 2621-2624.
- Suzuki CAM, Hierlihy SL (1993). Renal clearance of domoic acid in the rat. *Food Chem Toxicol* 31: 710-716.
- Takemoto Daigo (1958). Constituents of *Chondria Armata*. *Chem Pharma Bull* 6: 578-580.
- Takemoto T (1978). Isolation and structural identification of naturally occurring excitatory amino acids. *Kainic acid as a tool in neurobiology*. En: McGeer EG, Olney JW, McGeer PL (eds.). Raven Press, New York, pp 1-15.
- Tasker RAR, Connell BJ, Strain SM (1991). Pharmacology of systematically administered domoic acid in mice. *Can J Physiol Pharmacol* 69: 378-382.
- Terao K, Ito E, Yanagi T, Yasumoto T (1986). Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning. I. ultrastructural changes in the small intestine and liver of suckling mice induced by dinophysistoxin-1 and pectenotoxin-1. *Toxicon* 24: 1141-1151.
- Terao K, Oarada M, Murata M, Yasumoto T (1990). Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning-5. The effects in mice of yessotoxin isolated from *Patinopecten yessoensis* and of a desulfated derivative. *Toxicon* 28: 1095-1104.
- Todd ECD (1993). Domoic acid and amnesic shellfish poisoning - a review. *J Food Protection* 56: 69-83.
- Torigoe K, Murata M, Yasumoto T, Iwashita T (1988). Prorocentrolide, a toxic nitrogenous macrocycle from a marine dinoflagellate, *Prorocentrum lima*. *J Am Chem Soc* 110: 7876-7877.
- Tubaro A, Sidari L, Della Loggia R, Yasumoto T (1997). Occurrence of Yessotoxin-like toxins in phytoplankton and mussels from northern Adriatic sea, Proceedings of the VII International Conference of Harmful Algae, Vigo, Spain, pp. 470-472.
- Tubaro A, Carbonatto M, Altinie, G, Vita F, Melato MSM, Yasumoto T. (2003) Oral and intraperitoneal acute toxicity studies of yessotoxin and homoyessotoxins in mice. *Toxicon* 41: 783-792.
- Uemura D, Chou T, Haino T, Nagatsu A, Fukuzawa S, Zheng S *et al.* (1995). Pinnatoxin A: A toxic amphoteric macrocycle from the okinawan bivalve *Pinna muricata*. *J Am Chem Soc* 117: 1155-1156.
- Vale P, Sampayo MAM (2001). Domoic acid in Portuguese shellfish and fish. *Toxicon* 39: 893-904.
- Velez P, Sierralta J, Alcayaga C, Fonseca M, Loyola H, Johns DC *et al.* (2001). A functional assay for paralytic shellfish toxins that uses recombinant sodium channels. *Toxicon* 39: 929-935.
- Vieytes MR, Fontal OI, Leira F, Baptista de Sousa JMV, Botana LM (1997). A fluorescent microplate assay for diarrhetic shellfish toxins. *Anal Biochem* 248: 258-264.
- Wright JLC, Quilliam MA (1995). Methods for domoic acid, the amnesic shellfish poisons. En: Hallegraef GM, Anderson DM, Cembella AD (eds.). *Manual on Harmful Marine Microalgae*. IOC Manuals and Guides No.33.UNESCO.
- Yasumoto T, Oshima Y, Yamaguchi M (1978). *Bull Jpn Soc Sci Fish* 44: 1249-1255.
- Yasumoto T, Oshima Y, Sugawara W, Fukuyo Y, Oguri H, Igarashi T *et al.* (1980). Identification of *Dinophysis fortii* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning. *Bull Japan Soc Science Fisheries* 46: 1405-1411.
- Yasumoto T, Murata M, Oshima Y, Sano M, Matsumoto GK, Clardy J (1985). *Tetrahedron* 41: 1019-1025.
- Yasumoto T, Murata M, Lee JS, Torigoe K (1989). Polyether toxins produced by dinoflagellates, En: Natori S, Hashimoto K, Ueno T (eds.), *Mycotoxins and phycotoxins '88*. Amsterdam: Elsevier, pp. 375-382.
- Yasumoto T, Takizawa A (1997). Fluorometric measurement of yessotoxins in shellfish by high-pressure liquid chromatography. *Biosci Biotech Biochem* 61: 1775-1777.
- Yasumoto T (2000). Historic considerations regarding food safety. En: Botana LM (eds.). *Seafood and freshwater toxins. Pharmacology, physiology, and detection*. Marcel Dekk (New York), pp. 1-17.
- Zhao JY, Thibault P, Quilliam MA (1997). Analysis of domoic acid and isomers in seafood by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 18: 268-276.

Isabel M.^a Moreno, Ángeles Jos, Silvia Pichardo, Guillermo Repetto, Ana M.^a Cameán

Introducción a las cianobacterias. Cianobacterias potencialmente tóxicas. Cianotoxinas. Microcistinas en el medio ambiente. Fuentes de exposición. Las cianobacterias como complemento alimentario. Acumulación de microcistinas en alimentos. Efectos tóxicos. Mecanismo de acción. Bibliografía.

Introducción a las cianobacterias

Las cianobacterias o algas cianofíceas (algas verdes-azuladas) son protofitas pigmentadas que contienen alrededor de unos 150 géneros y unas 2.000 especies. Son las procariotas fototróficas más diversas y extendidas, permitiendo las diferencias en su organización celular con respecto a otras algas un tratamiento taxonómico independiente de las mismas (Skulberg *et al.*, 1993).

Debido a su capacidad de realizar fotosíntesis aerobia (utilizando oxígeno) y a su morfología, que se corresponde con la de un alga, el tratamiento de las cianofíceas puede seguir las reglas del Código de Nomenclatura Botánica (1972). Sin embargo, las características propias de las bacterias que poseen estas algas verde-azuladas, también permitiría una clasificación basándose en el Código de Nomenclatura de las Bacterias (1975).

Su facilidad de crecimiento favorece su aparición tanto en el suelo como en el medio acuático, preferentemente en aguas dulces con pH alcalinos o neutros y temperaturas entre 15 y 30 °C. Requieren alta concentración de nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo.

Las floraciones de estas algas se distribuyen ampliamente en las aguas superficiales, y la aparición de las mismas en determinadas condiciones ambientales (Carmichael, 1994) es ubicua, de forma que se reconoce a escala mundial que en la mayoría de los países se presentan estos crecimientos anormales (Sivonen, 1996; Fastner *et al.*, 1999; Mankiewicz *et al.*, 2001).

Las cianobacterias han sido objeto de atención en el campo de la biotecnología, ya que pueden emplearse como suplementos en la alimentación debido a que algunas especies presentan un alto contenido en proteínas, vitaminas y pigmentos (Falch *et al.*, 1995).

Sin embargo, algunas especies de cianobacterias producen potentes toxinas, capaces de originar efectos agudos y crónicos en el hombre y

animales, considerándose tóxicas más del 50% de estas floraciones (Roset *et al.*, 2001).

Cianobacterias potencialmente tóxicas

Las cianobacterias presentan una importante diversidad de formas. Difieren en su morfología, estructura y funciones, y en su respuesta a los estímulos medioambientales, (Skulberg *et al.*, 1993).

La forma y el tamaño celular juegan un importante papel en su clasificación. Las cianobacterias unicelulares tienen formas esféricas, ovoides o cilíndricas y se reproducen por fisión binaria. Pueden aparecer en forma de células aisladas o agregadas en colonias irregulares. La morfología de la colonia variará con los factores de crecimiento medioambientales.

La filamentosas es típica de un cierto número de cianobacterias y sus repetidas divisiones celulares dan lugar a una estructura multicelular llamada *tricoma* siendo frecuente las variaciones en la morfología del mismo: recto, espiralado, etc. (Figura 9.1). Otras características especiales incluyen: una diferenciación de ciertas células en *heterocistos*, estructuras fijadoras de nitrógeno, y en *acinetos*, estructuras donde almacenan sustancias de reserva (Figura 9.2).

Existen alrededor de unas 40 especies toxigénicas identificadas y los géneros mayormente implicados en floraciones tóxicas son: *Ana-*

baena, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Oscillatoria* (Carpenter y Carmichael, 1995; Holte *et al.*, 1998).

Estudios de campo y trabajos de laboratorio con cultivos de cianobacterias han revelado que existen especies con variedades productoras de toxinas y variedades no productoras, considerándose las toxinas como metabolitos secundarios (Carmichael, 1992).

La presencia de especies toxigénicas se produce comúnmente entre el plancton de las aguas fluviales, aunque se ha comprobado la existencia de algunas cianobacterias planctónicas marinas (Codd, 1998).

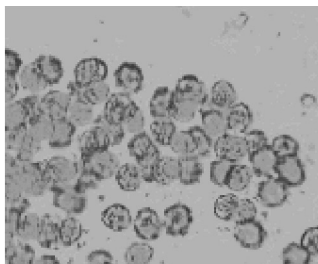
Cianotoxinas

Se han aislado y caracterizado diversas toxinas producidas por cianobacterias, cuyos efectos tóxicos principales son: neurotóxicos, hepatotóxicos y dermatotóxicos (estos últimos producidos por cianobacterias marinas) (Sivonen, 1998).

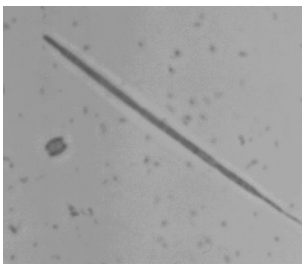
Las toxinas producidas por las cianobacterias pueden clasificarse de la siguiente manera:

— Hepatotoxinas: afectan principalmente al hígado. Son de estructura peptídica, diferenciándose los siguientes tipos:

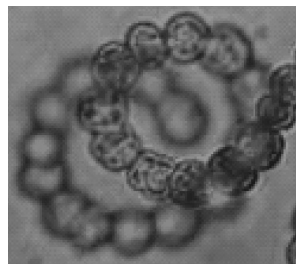
- *Microcistinas (MC)*: se conocen más de 70 variantes, dependiendo de los aminoácidos que constituyan su estructura (Fastner



Microcystis aeruginosa

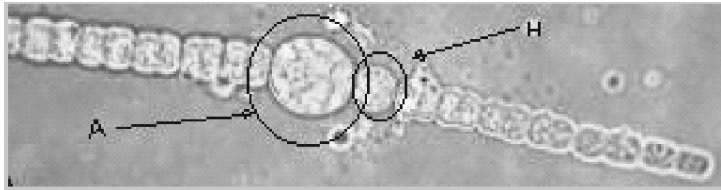


Aphanizomenon issatchenkoi



Anabaena circinalis

Figura 9.1. Morfología de cianobacterias: unicelular y filamentosas (recta y espiralada).



A: Acineto

H: Heterocisto

Figura 9.2. Heterocistos y acinetos de un tricoma.

et al., 2002). Son heptapéptidos cíclicos que contienen aminoácidos D y L. Se caracterizan por sus dos aminoácidos D, llamados N-metil-dihidroalanina (Mdha) y ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6 dienoico (ADDA). Los L-aminoácidos de las posiciones 2 y 4 son variables y son los que diferencian unas MC de otras (Figura 9.3) (Carmichael, 1992). En la posición 2 los L-aminoácidos más comunes son, leucina (L), arginina (R) y tirosina (Y). En la posición 4 el aminoácido más frecuente es arginina (R), seguida de alanina (A), leucina (L), tirosina (Y), homoarginina (Har), etc. (Sivonen, 1998). Dichos aminoácidos en las posiciones 2 y 4 se identifican con un sufijo de dos letras; por ejemplo MC-LR contiene leucina (L) en la posición 2 y arginina (R) en la posición 4. Las toxinas más frecuentes en

aguas naturales y de las que existen más estudios toxicológicos son MC-LR, MC-RR y MC-YR.

- *Nodularinas*: la mayor variación estructural de estas hepatotoxinas ha sido encontrada en la especie *Nodularia spumigena*. Su estructura es pentapeptídica cíclica (Carmichael, 1992).
- *Cilindrospermopsinas*: son alcaloides de la guanidina, producida por *Cylindrospermopsis raciborskii* (Sivonen, 1996) y actúan como inhibidores de la síntesis de proteínas. Además de afectar al hígado, también ejercen su acción en el riñón, pulmón, glándulas adrenales e intestino. Existen diversas variantes de esta toxina (Codd *et al.*, 1999a). El citocromo P-450 interviene en su metabolismo dando lugar a metabolitos más potentes que la toxina original (Carmichael, 1997).

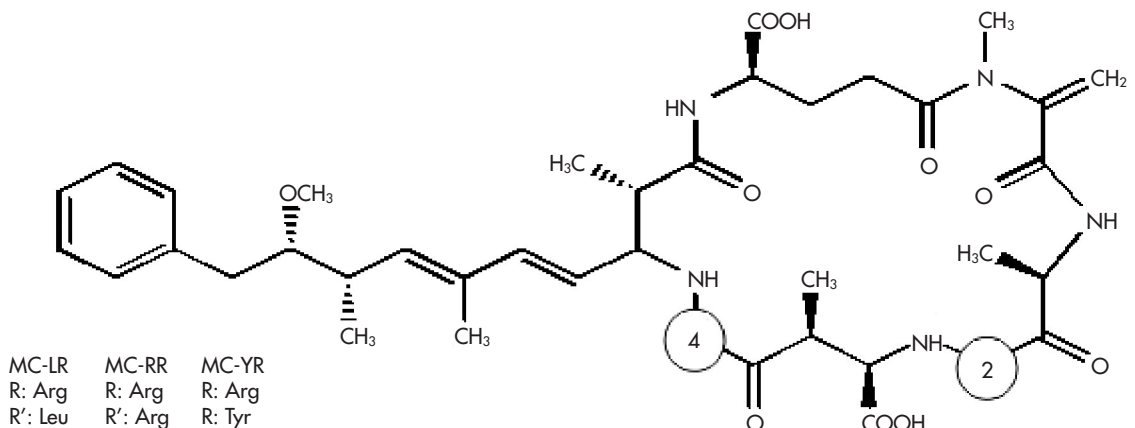


Figura 9.3. Estructura general de las MC.

— Neurotoxinas: bloquean la neurotransmisión y causan la muerte por una rápida parálisis respiratoria (Sivonen, 1998). Son de estructura alcaloide, diferenciándose varios tipos:

- *anatoxina-a*: específica de cianobacterias.
- *homoanatoxina-a*: forma metilada de la anterior. Ambas son agonistas colinérgicos nicotínicos postsinápticos y agentes bloqueantes neuromusculares.
- *anatoxina-a (s)*: es guanidina-éster metil fosfato y actúa como inhibidora de colinesterasas, específica de cianobacterias. La *s* de su nombre es debida a la hipersalivación que produce en mamíferos.
- *saxitoxina*: producida por algas marinas y algunas cepas de *Aphanizomenon flos-aquae*.
- *neosaxitoxina*: también producida por algas marinas. Estas dos últimas actúan bloqueando los canales de sodio (Carmichael, 1994; Codd *et al.*, 1999a).

— Lipopolisacáridos (LPS): las cianobacterias contienen endotoxinas lipopolisacáridicas en su envoltura celular. Los LPS procedentes de cianobacterias han sido menos estudiados que los producidos por bacterias heterotróficas, ya que tienen bajos niveles de toxicidad. Los LPS de *Microcystis*, en comparación con los de *Salmonella*, son 10 veces menos tóxicos. La exposición a LPS procedentes de cianobacterias aisladas o cultivadas ha causado una reducción en las actividades del glutatión soluble y micro-sómico en el pez cebra (Best *et al.*, 2002). Además, la exposición a LPS de cianobacterias ingeridos a través del agua de bebida, ha provocado, mediante la producción de angiotensina II (AII), un aumento del consumo de agua por parte de los peces expuestos, lo que parece aumentar la tasa de exposición a otras cianotoxinas e incluso a otros contaminantes presentes en las aguas, como plaguicidas. Es necesario llevar a cabo nuevas investigaciones para determinar el mecanismo de acción de estos LPS y los posibles efectos de estas endotoxinas en otras especies acuáticas y terrestres (Best *et al.*, 2003).

Microcistinas en el medio ambiente

A pesar de que en Europa se han detectado floraciones de cianobacterias en numerosos países (Codd *et al.*, 1999a; Pomati *et al.* 2000; Blom *et al.*, 2001), los estudios acerca de la toxicidad de las floraciones en la región Mediterránea no son muy abundantes, a excepción de las llevadas a cabo en Portugal, Francia, Marruecos (Oudra *et al.*, 2001) y España (Moreno *et al.*, 2003a; Moreno *et al.*, 2004a).

Los primeros casos de floraciones tóxicas se detectaron a partir de los animales afectados tras el consumo de aguas contaminadas y se estima que la implicación de estas microalgas en la producción de intoxicaciones es superior a la esperada inicialmente (Sivonen y Jones, 1999).

Las floraciones productoras de hepatotoxinas son más frecuentes a escala mundial que las de neurotoxinas. Estas pueden presentarse como resultado del aumento de la eutrofización, generalmente de naturaleza antropogénica, de los ecosistemas acuáticos (Mankiewicz *et al.*, 2001). Esto es cada vez más frecuente, principalmente en algunas regiones donde el crecimiento de la actividad agrícola e industrial ha sufrido un rápido aumento, unido a que estos procesos no han estado seguidos por un desarrollo adecuado de los tratamientos de aguas residuales (Azevedo *et al.*, 2002). Algunos autores sugieren que es posible que todas las reservas de agua a escala mundial puedan tener cianobacterias en un momento dado (Sivonen, 1996; Fastner *et al.*, 1999; Mankiewicz *et al.*, 2001).

1. Distribución de las toxinas en las reservas de agua dulce

Las floraciones de cianobacterias se están convirtiendo en un importante problema en la calidad del agua en muchos países del mundo (Park y Watanabe, 1996) debido a la producción de hepatotoxinas y neurotoxinas que las convierten en un riesgo para la salud, tanto para humanos

como para diversas especies animales (Premazzi *et al.*, 1993; Falconer *et al.*, 1994; Pouria *et al.*, 1998; Jochimsen *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 1999; Chorus *et al.*, 2000) tras ingestión de las células intactas de cianobacterias o bien de MC extracelulares (Yu, 1989; Penaloza *et al.*, 1990; Andersen *et al.*, 1993; Carmichael y Falconer, 1993; Rodger *et al.*, 2003; Jochimsen *et al.*, 1998; Zimba *et al.*, 2001) ya que estas son liberadas al agua tras la ruptura celular (Li *et al.*, 2003).

La población de cianobacterias puede estar dominada por una única especie o estar compuesta por varias, algunas de las cuales pueden ser no tóxicas. Incluso en una floración constituida por una única especie, pueden existir variedades tóxicas y no tóxicas; también puede ser que una de las variedades sea mucho más tóxica que las otras, siendo necesario el aislamiento en cultivo de las variedades de cianobacterias para confirmar su toxicidad (Sivonen y Jones, 1999).

La producción de MC por las especies *Microcystis viridis* y *Microcystis aeruginosa* está descrita en todo el mundo. Se ha observado una fuerte correlación estadística entre la abundancia de *M. aeruginosa* y la concentración de MC-LR, por lo que la presencia de dicha alga puede emplearse como indicador de la presencia potencial de MC-LR en las muestras analizadas (Kotak *et al.*, 1994).

Otras especies como *Anabaena sp.*, *Oscillatoria agardhii*, *Oscillatoria rubescens* y *Nostoc* se han descrito como productoras de MC localmente (Sivonen y Jones, 1999).

Las concentraciones de MC-LR intracelulares son usualmente superiores a las encontradas disueltas en agua (Kotak *et al.*, 1994). Los niveles de MC extracelulares se ven afectados por la propia descomposición de las algas, que se produce bajo condiciones aeróbicas y en oscuridad; tras la ruptura de las células se produce una liberación de toxinas al agua, aumentando de forma considerable los niveles extracelulares de estas (Tsuji *et al.*, 1996). Se ha comprobado que estas toxinas permanecen frecuentemente en los suministros de agua de consumo público, suponiendo un grave riesgo para la salud humana (Li *et al.*, 2003) ya que pueden causar efectos tóxicos tanto agudos como crónicos.

En función de los distintos estudios toxicológicos existentes hasta ahora se han establecido diversos límites de seguridad para MC en aguas. La OMS ha adoptado (WHO, 1998) un valor guía provisional de 1,0 µg/L de MC-LR en aguas de bebida, comprendiendo tanto las MC intra como las extracelulares, cuando la exposición sea a corto plazo. Se propuso asimismo un nivel de seguridad en aguas de 0,1 µg/L de MC cuando la exposición sea a largo plazo. Incluso, Ueno *et al.* proponen un valor guía de seguridad en aguas, para exposiciones a largo plazo, de tan solo 0,01 µg/L de MC basándose en la posible correlación entre la incidencia de cáncer primario hepático en algunas zonas de China y la presencia de MC en ríos, lagos, etc. (Ueno *et al.*, 1996).

En la mayoría de los países europeos, los organismos responsables del abastecimiento de agua potable y las agencias de medio ambiente han incluido planes de vigilancia y control de cianobacterias y sus toxinas, con el objeto de asegurar la calidad del suministro de las aguas potables y evitar intoxicaciones. En algunos países como Gran Bretaña, cuentan con legislación y métodos normalizados; en España la legislación referente a los niveles de MC en aguas, viene recogida en el Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. En él se establece el límite de 1 µg/L de MC-LR en dichas aguas, siendo obligatoria la determinación de este parámetro cuando existan sospechas de eutrofización en las aguas de captación, teniéndose que realizar la determinación de MC a la salida de la Estación de Tratamiento de Agua Potable (ETAP), o en el depósito de cabecera. Este Real Decreto traspone al ordenamiento jurídico español la Directiva 98/83/CE (de 3 de noviembre de 1998) la cual, sin embargo, no hace referencia a los niveles de MC.

2. Factores que influyen en la formación de las floraciones

Es necesario el estudio de la influencia de diversos factores ambientales para poder llegar a prevenir la aparición de las floraciones (Mur *et al.*, 1999).

Las reservas de agua tienen sus propias poblaciones de cianobacterias en cualquier estación del año. La duración de las floraciones de las cianobacterias depende de las condiciones climáticas de la región. En zonas templadas la presencia de cianobacterias es más frecuente al final del verano y principios del otoño y suelen permanecer de 2 a 4 meses. En regiones más mediterráneas o con climas subtropicales, las floraciones empiezan antes y persisten más tiempo. La predominancia de una u otra floración depende no solo del clima, sino también de las condiciones geoquímicas específicas del medio acuático (Sivonen y Jones, 1999).

La descomposición de las floraciones se produce como resultado de la disminución de la intensidad de luz y la desestabilización de la columna de agua; posteriormente las toxinas son liberadas al agua y entran en contacto con cualquier organismo asociado a las mismas. La concentración de toxinas extracelulares medidas al final de las floraciones es muy inferior ($< 4 \mu\text{g/L}$) a la concentración intracelular de estas toxinas (Park *et al.*, 1998).

La producción de toxinas parece variar según las estaciones del año, probablemente debido a la propia variabilidad de los factores iniciadores y controladores de dicha producción. Los niveles más altos de MC se observan durante los periodos de mitad de verano, cuando las radiaciones de luz son más fuertes y las columnas de agua son más estables, favoreciéndose en estas condiciones la producción de las toxinas. Aún así, los máximos de concentración de MC no siempre coinciden con una elevada biomasa de cianobacterias. La toxicidad por unidad de peso seco varía tanto semanal como anualmente, por lo que se cree que a veces hay factores aún desconocidos que controlan la producción de toxinas (Chistoffersen, 1996). Las condiciones ambientales pueden inducir cambios en la toxicidad o en la concentración de toxinas, lo que supone generalmente un factor multiplicativo de tres o cuatro (Sivonen y Jones, 1999).

3. Efectividad de diversos procedimientos de tratamientos de agua

El control de las cianobacterias y la liberación de MC al agua de consumo son del máximo interés y objeto de continuos estudios, debido al peligro que estas constituyen para la salud humana.

El primer paso de control lo constituiría la prevención de la eutrofización; la siguiente etapa sería la inclusión de técnicas de ingeniería que fueran capaces de alterar las condiciones hidrofisiológicas del agua para así disminuir el crecimiento de las cianobacterias. El paso final en la resolución del problema de las cianobacterias y sus toxinas es el tratamiento de las aguas.

Las técnicas más inmediatas para el control de la calidad del agua son la filtración y el tratamiento con alguicidas, utilizados como medida de emergencia en el control de las cianobacterias, para así garantizar la salud pública (Hrudey, *et al.*, 1999; Hoeger *et al.*, 2004).

La inhibición del crecimiento de *Microcystis aeruginosa* o la destrucción de sus toxinas producidas se puede llevar a cabo por una serie de tratamientos sobre el agua potable: irradiación ultravioleta, carbón activo, tratamiento con alguicidas, membranas de filtración, ósmosis reversa, filtros domésticos, sulfato de cobre, cloruro férrico, cloro, permanganato, peróxido de hidrógeno, ozono y oxidación fotocatalítica utilizando TiO_2 (Moreno *et al.*, 2003b).

Se considera que los tratamientos que emplean carbón activo o la ozonización son los más efectivos en la destrucción de MC (Lambert *et al.*, 1996; Lawton y Robertson, 1999).

Fuentes de exposición

Las cianobacterias representan un peligro para las poblaciones que están expuestas a ellas a través del agua de bebida y de alimentos contaminados. Se han producido brotes de hepatoenteritis a través del agua de bebida procedente de

depósitos tratados con cloro en los que se ha inducido, de forma natural o mediante la adición de cobre, la lisis de la célula y la liberación de las toxinas (Pietsch *et al.*, 2001).

La exposición a aguas contaminadas con MC mientras se realizan actividades recreativas, ha llegado a producir desde hepatoenteritis y neumonía hasta irritaciones cutáneas y gastroenteritis (Beausse *et al.*, 2003).

Se han dado casos letales de pacientes sometidos a diálisis, debido a que el agua utilizada para el tratamiento procedía de un depósito contaminado por cianobacterias (Carmichael *et al.*, 2001; Azevedo *et al.*, 2002).

La identificación del peligro por MC, ha sido ampliamente estudiada en las aguas recreacionales y de bebida. Estas y otras fuentes de exposición se resumen en la Tabla 9.1.

Tabla 9.1. Vías de exposición a las MC (Codd, 1988).

Vía de exposición	Exposición/actividad	Ejemplo	Referencias
Agua de bebida	Ingestión accidental de floraciones en agua sin tratar. Ingestión de células de cianobacterias o MC libres en aguas sin tratar o tratadas ineficazmente.	1992-1994, Haymen y Fusui, China: personas que bebían de determinados pozos y acequias contaminados con MC tenían una incidencia mayor de carcinoma hepático que el resto de personas que bebían de otras fuentes de agua no contaminadas. EE UU y Australia: se han producido casos de intoxicación aguda y efectos crónicos en personas que consumieron agua del suministro municipal después de haber sido tratada con sulfato de cobre, lo que produjo la lisis de las cianobacterias y la liberación masiva de las toxinas.	Harada <i>et al.</i> , 1996 Ueno <i>et al.</i> , 1996 Carmichael, 1996
Piel y mucosas	Contacto directo con floraciones o MC libres en actividades recreativas, de trabajo, baño o ducha.	Uno de los primeros casos que se conocen sobre la implicación de las cianobacterias en las reacciones alérgicas humanas se desarrolló con síntomas de asma, fiebre del heno, irritación de la piel y oídos y conjuntivitis, en personas que practicaban el baño en un lago en el que existían floraciones de cianobacterias. El contacto con altos niveles de cianobacterias mientras se realizan actividades acuáticas constituye un alto riesgo para el hombre.	Bell y Codd, 1994 Carmichael, 1996
Hemodiálisis	Contacto con MC durante el tratamiento con hemodiálisis.	1996, Caruaru, Brasil: 116 de 130 pacientes de un centro de diálisis sufrieron una serie de síntomas asociados a su tratamiento de diálisis tales como náuseas y vómitos; de estos, 26 murieron debido a un fallo hepático agudo.	Jochimsen <i>et al.</i> , 1998
Inhalación	En la ducha, en prácticas de trabajo y deportes acuáticos.	Es una ruta minoritaria que se produce principalmente a través de la práctica de duchas con aguas contaminadas. Estudios realizados en animales de laboratorio han confirmado que los efectos por esta vía son similares a los observados por vía i.p.	Carmichael, 1996 Bell y Codd, 1994.
Alimentos contaminados	Pescados y moluscos contaminados. Plantas (legumbres y hortalizas) en las que se acumulan las MC debido a irrigaciones con aguas contaminadas.	Los peces se ven afectados por la presencia de MC en su medio acuático. La lechuga salada (<i>Lactuca sativa</i>) retiene MC tras ser regada con agua contaminada con cianobacterias, por irrigación en spray durante su crecimiento. La MC-LR inhibe la fotosíntesis del haba francesa (<i>Phaseolus vulgaris</i>) cuando se irrigan en spray con agua contaminada con dicha toxina.	Bury <i>et al.</i> , 1995 Codd <i>et al.</i> , 1999 Toshihiko <i>et al.</i> , 1996

Las cianobacterias como complemento alimentario

A lo largo de la historia las algas han sido fuente de alimentación y de tratamiento para ciertas enfermedades. Actualmente, diversas microalgas verde azuladas como las cianobacterias, se están empleando en Estados Unidos, Canadá y Europa como suplementos alimentarios, aditivos farmacéuticos e incluso como alimento animal y humano (Gilroy *et al.*, 2000; Chamorro *et al.*, 2002).

El género de cianobacteria más habitualmente empleado para estos fines ha sido *Spirulina*, destacando las especies *S. platensis* y *S. maxima* (Chernova *et al.*, 2002; Kanlayakrit *et al.*, 2003). Se consumen como fuente de proteínas, carbohidratos y microelementos, además de complemento energético (Gilroy *et al.*, 2000; Chernova *et al.*, 2002). Otro género empleado con el mismo fin y que tuvo mucho auge a partir de los años 80 fue *Aphanizomenon*, concretamente, *A. flos-aquae*. Uno de los problemas del empleo de esta especie como suplemento alimentario es la coexistencia con la especie de cianobacteria tóxica *M. aeruginosa*, pudiendo contaminarse con MC (Carmichael *et al.*, 2000).

Estudios realizados en productos comercializados (píldoras, cápsulas, polvos), constituidos por *Aphanizomenon* y *Spirulina*, revelaron la existencia de estas toxinas en cantidades variables entre 0,5 y 35 µg/g MC (Lawrence *et al.*, 2001), superando el límite establecido por la División de Salud de Oregón de 1 µg/g de MC en productos alimentarios que contengan cianobacterias (Gilroy *et al.*, 2000).

Estos complementos alimentarios obtenidos a partir de microalgas verde azuladas pueden estar contaminados por otras especies potencialmente tóxicas, distintas a *M. aeruginosa*, productoras también de otro tipo de cianotoxinas, como son las anatoxinas. Este hecho se comprobó realizando un estudio de algunos suplementos alimentarios en cuya composición predominaban las cianobacterias, detectándose homoanatoxi-

na-a y anatoxina-a junto con sus productos de degradación (Draisici *et al.*, 2001). Estos resultados apuntan hacia el posible peligro para la salud humana asociado al consumo de este tipo de suplementos alimentarios.

Acumulación de microcistinas en alimentos

Existe un interés creciente por conocer la contaminación de productos agrícolas y alimentos de origen animal con toxinas producidas por cianobacterias. A pesar del amplio número de estudios realizados en relación a los efectos tóxicos producidos a corto y a largo plazo por estas toxinas, los trabajos realizados relativos al consumo crónico de productos agrícolas contaminados con las mismas son escasos (Orr *et al.*, 2003). Tanto en alimentos de origen vegetal como animal, se ha comprobado la retención y acumulación de MC, constituyendo por tanto, un peligro potencial para la salud humana.

1. Acumulación de MC en haba francesa (*Phaseolus vulgaris*) tras riego por aspersión

La práctica de utilizar el agua de lagos y ríos para el riego de cultivos agrícolas es muy común, pero a veces estas aguas pueden estar contaminadas con floraciones de cianobacterias, las cuales en una alta proporción son capaces de producir MC, que tras ser liberadas por lisis celular se pueden transferir a las plantas sometidas a este riego.

En un estudio realizado por Abe *et al.*, (1996) se observó la influencia del riego con agua contaminada a distintas concentraciones de MC-LR, sobre el crecimiento del haba francesa, comprobándose que a las concentraciones más bajas (10 µg/L) se producía una inhibición de la capacidad fotosintética de *Phaseolus vulgaris*, mientras que a concentraciones más elevadas (20µg/L) los daños eran irreversibles.

Con este estudio se llegó a la conclusión de que el peligro que representan las MC para la salud humana y animal era manifiesto y que se debían llevar a cabo estudios más precisos de acumulación de estas toxinas en alimentos regados por aspersión.

2. Acumulación de MC en la lechuga (*Lactuca Sativa*) tras riego por aspersión

Siguiendo los estudios de la posible acumulación de las MC en cultivos regados por aspersión con aguas contaminadas con cianobacterias, Codd *et al.*, (1999b) observaron los efectos producidos en lechugas regadas con aguas que contenían colonias de *M. aeruginosa* productoras de MC detectadas al microscopio en diferentes zonas (parte externa, media e interna de la lechuga). Mediante inmunoensayo se comprobó que en las hojas internas se producía la mayor acumulación de toxinas. Se concluyó, asimismo, que son necesarias más investigaciones en este campo para poder tomar medidas preventivas para el uso racional de este tipo de aguas en el riego de cultivos agrícolas y en el consumo humano de dichos cultivos.

3. Acumulación de MC en diferentes tejidos de plantas

Se estudiaron asimismo los efectos tóxicos producidos por exposición a MC-RR en plantas superiores (*Lemna minor*), por Weiss *et al.*, (2000) comprobándose que concentraciones superiores a 3 mg/L de esta toxina producían malformaciones en la planta, disminución del 16% de su capacidad fotosintética y del 50% del contenido de carotenoides.

Para confirmar los resultados obtenidos por estos y otros investigadores, McElhiney *et al.*, (2001), estudiaron los efectos inhibidores del crecimiento y la toxicidad acumulada en los tejidos de tres especies diferentes de plantas, la patata (*Solanum tuberosum*), semillas de la mostaza (*Synapis alba*) y en el haba francesa (*Phaseolus vulgaris*).

Las conclusiones que obtuvieron, fueron las siguientes:

- MC-LR inhibió el crecimiento de la patata a una concentración de 0,005µg/cm³.
- MC-LR, -RR y -LF inhibieron el crecimiento de las semillas de mostaza con valores de inhibición del crecimiento medio (GI₅₀) de 1,9; 1,6 y 7,7 µg/mL, respectivamente.
- El crecimiento del haba francesa se inhibió en un 30% en presencia de MC-LR.
- En todos los tejidos de estas plantas fueron detectadas estas toxinas, lo cual tiene importantes implicaciones, por su posible transferencia a través de la cadena alimentaria.

4. Acumulación de MC en colza (*Brassica napus L.*) y en arroz (*Oryza sativa L.*)

En un estudio llevado a cabo por Chen *et al.*, (2004) se confirmaron los resultados obtenidos por otros autores, observándose inhibición del crecimiento y del desarrollo de estas dos plantas (arroz y colza), siendo más pronunciada esta inhibición en la colza. Además, detectaron un aumento del estrés oxidativo a través de la determinación de las actividades enzimáticas superóxido dismutasa y peroxidasa.

Las MC fueron detectadas por técnica de ELISA en los extractos de las semillas de ambas plantas, ratificando los posibles riesgos para la salud derivados del consumo de plantas expuestas a MC por las aguas de riego.

5. Contaminación de leche de ganado alimentado con aguas contaminadas con MC.

Se analizó el contenido en MC de la leche proporcionada por ganado expuesto a estas toxinas, a través del agua de bebida. Considerando que el ganado bebía entre 70 y 80 L de agua al día, contaminada con 1×10^5 células/mL de la especie tóxica *M. aeruginosa*, se llegó a la conclu-

sión de que los niveles detectados en la leche eran tres veces inferiores a la concentración considerada como problemática para este alimento (0,86 µg/L) la cual se calcula, según la OMS, teniendo en cuenta la ingesta diaria tolerable de MC y el consumo diario de leche *per capita* (Orr *et al.*, 2001).

En un estudio posterior se comprobó que los niveles de MC en leches procedentes de ganado expuesto a MC eran tan pequeños (< 0,2 µg/L), que después de la digestión gastrointestinal se puede producir la degradación o bien una modificación sustancial de estas cianotoxinas, como para poder justificar su baja toxicidad (Feitz *et al.* 2002). En relación con las posibles alteraciones que puedan sufrir tras el proceso de digestión gastrointestinal, hemos comprobado (Moreno *et al.*, 2004b) que en ensayos de digestión *in vitro*, diferentes MC como MC-LR, MC-RR y MC-YR pueden sufrir procesos de degradación fundamentalmente gástrica, en un porcentaje que oscila entre 30-64%, siendo MC-RR la toxina más sensible. Este hecho explicaría en parte la diferente toxicidad de las MC cuando se administran por vía oral o vía intraperitoneal en diversas especies animales. Esto repercute en la dosis real del compuesto tóxico que llega al órgano diana, y consecuentemente, en el riesgo derivado de la exposición humana a este tipo de compuestos por vía oral, tras consumo de aguas y alimentos contaminados.

6. Contaminación de los tejidos de ganado y animales acuáticos

Los humanos pueden estar expuestos también a estas toxinas a través del consumo de músculo de animales (ganado, peces y moluscos) que hayan estado en contacto con aguas contaminadas por cianobacterias tóxicas.

Uno de los primeros estudios que trataba de estimar la acumulación de MC en tejidos de peces y mejillones fue llevado a cabo por Watanabe *et al.*, (1997). Los mejillones (*Unio douglasiae* y *Anodonta woodiana*) y peces (*Cyprinus carpio*, *Carassius carassius* y *Hypomeisius transpacificus*) estudiados procedían de un

lago en el que eran habituales las floraciones masivas de *Microcystis*. Los autores trataron de relacionar la aparición de estas floraciones potencialmente tóxicas con la presencia de toxinas en los tejidos y órganos de los peces y mejillones expuestos. La identificación de las toxinas se hizo mediante cromatografía líquida asociada a un detector de masas Frit FAB. Se detectó la presencia de MC-LR y MC-RR en los mejillones ensayados, aunque no se lograron identificar en los tejidos de los peces estudiados.

A lo largo de los años los métodos de extracción e identificación han ido mejorando y los estudios de acumulación de toxinas en peces han ido progresando, con el objeto de poder determinar pequeñas concentraciones de estas toxinas y evaluar el riesgo tóxico de su consumo (Lawrence y Menard, 2001). Así, en posteriores estudios, como el llevado a cabo por Magalhães *et al.*, (2001) se llegó a la conclusión de que las MC se pueden acumular en los tejidos de peces que posteriormente pueden ser utilizados para consumo humano. Se realizó un estudio durante tres años y se demostró la bioacumulación de las MC en músculos y diversos órganos de *Tilapia rendalli*, incluso en periodos donde la densidad de cianobacterias en agua era muy baja. Los niveles encontrados fueron muy cercanos al límite recomendado para el consumo humano (0,04 µg/kg).

Otra posibilidad de exposición humana a las MC resulta del consumo de ganado intoxicado y en esta dirección Orr *et al.*, (2003) estudiaron en ganado vacuno su acumulación tras la administración de *Microcystis aeruginosa* a través del agua de bebida durante 28 días. Mediante la técnica de ELISA, se detectaron concentraciones de 0,92 µg MC equivalente/g en hígado, mientras que en sangre no se detectaron niveles de toxinas, al menos superiores al límite de detección de esta técnica. Se concluyó que el consumo por parte del hombre de ganado vacuno que haya estado expuesto a concentraciones aproximadas de 1×10^5 células por mL de *Microcystis aeruginosa*, a través del agua de bebida, no entraña riesgo para la salud humana según las directrices de la OMS.

Efectos tóxicos

Los síntomas asociados a las intoxicaciones producidas por MC por contacto o ingestión de las mismas son: gastroenteritis, irritación de la piel, episodios alérgicos, dolores musculares y daño renal y hepático. Estos incidentes se producen tras una única exposición o un periodo muy corto de contacto a las toxinas (Carmichael *et al.*, 2001; Bothaa *et al.*, 2004).

La consecuencia fundamental tras una exposición repetida a MC durante un periodo largo de tiempo es que pueden conducir a la aparición de cáncer primario de hígado (Codd, 1998; Codd *et al.*, 1999a).

1. Efectos agudos

Debido al rechazo del público a beber agua contaminada con cianobacterias por el mal olor y sabor producidos por estas, no se han llegado a producir grandes fatalidades como resultado de la exposición a las MC, a excepción de las intoxicaciones fatales ocurridas en 1996 en el centro de diálisis de Caruaru, Brasil, en el que murieron 76 pacientes debido a la contaminación por

MC del agua utilizada para la diálisis (Jochimsen *et al.*, 1998; Pouria *et al.*, 1998; Carmichael *et al.*, 2001; Azevedo *et al.*, 2002).

Los síntomas principales que presentan las personas que han estado en contacto con las toxinas son: irritaciones de la piel y de los ojos, episodios alérgicos, fatiga, mareos y gastroenteritis agudas (Carmichael, 1996; Carmichael *et al.*, 2001).

En la siguiente tabla (Tabla 9.2), resumimos estos efectos.

2. Efectos crónicos

Uno de los peligros potenciales de las MC para la salud humana es su actividad promotora de tumores tras el contacto con la piel durante el baño o tras una exposición prolongada a niveles subcrónicos y crónicos de estas toxinas en el agua de bebida y posibles alimentos contaminados tras ser regados por aspersión (Bell y Codd, 1994).

Se ha estudiado la posible relación entre la exposición crónica a estas toxinas mediante el agua de bebida y una mayor incidencia de cáncer hepático en humanos (Fujiki *et al.*, 1996). Diferentes estudios han demostrado que la dis-

Tabla 9.2. Efectos tóxicos agudos por exposición a microcistinas.

Lugar de acción	Síntomas y efectos	Referencias
Piel, ojos, oídos y boca	Síntomas: irritación ocular, de oídos y de la piel, con descamación, erupciones y aparición de ampollas en la piel y en la boca.	Bell y Codd, 1994 Carmichael, 1996
Hígado	Hepatoenteritis con hepatomegalia y dolor abdominal. Elevados niveles de enzimas hepáticas en suero.	Bell y Codd, 1994 Carmichael, 1996 Falconer, 1999
Riñón	Daño en el riñón, acompañado de pérdida de electrolitos, glucosa, cetonas y sangre en la orina. Deshidratación.	Falconer, 1999
Tracto digestivo	Gastroenteritis con dolor abdominal, diarrea, vómitos y náuseas.	Jochimsen <i>et al.</i> , 1998 Bell y Codd, 1994 Carmichael, 1996
Tracto respiratorio	Dolor de garganta, tos seca, neumonía atípica.	Carmichael, 1996
Otros lugares de acción	Reacciones alérgicas con síntomas de asma y fiebre del heno. Incremento de los niveles de Ig E. Dolor de cabeza, mareos y letargo.	Bell y Codd, 1994 Carmichael, 1996

tribución de carcinoma hepatocelular varía geográficamente, de forma que se ha constatado que en las aguas superficiales del sur de China, donde las floraciones de cianobacterias son muy abundantes, la incidencia del hepatocarcinoma ha sido mayor (Kuiper-Goodman *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2003). Estudios realizados en Haimen y Fusui (China), áreas endémicas de cáncer primario de hígado (PLC), cuyos índices de mortalidad entre 1981 y 1984 fueron de 100,13; 91,00 y 4,28 por 100.000 habitantes, los cuales se abastecían de agua de río, pozos o manantiales, han demostrado que las MC constituyen un factor de riesgo en la alta incidencia de PLC en China (Ueno *et al.*, 1996). Estudios similares de monitorización de MC, llevados a cabo en la misma zona durante los años 1992-1994, confirmaron el hecho de que los habitantes de estas ciudades que bebían aguas contaminadas tenían un índice de mortalidad por PLC mayor que los que se abastecían de aguas no contaminadas (Harada *et al.*, 1996).

Con el reconocimiento de las MC como promotoras de PLC en China, se iniciaron programas de construcción de embalses con la finalidad de conseguir que el 80% de la población de las zonas afectadas cambiaran su fuente de abastecimiento de agua por la de estos embalses no contaminados, comprobándose que tras la inclusión de esta medida la incidencia de PLC ha decaído considerablemente (Falconer *et al.*, 1999).

A pesar de estos hechos, las MC no han sido clasificadas aún por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC).

2.1. Carcinogénesis

En conexión con el apartado anterior, el mecanismo de inducción de esta carcinogénesis por parte de las MC puede ser el siguiente:

Algunos compuestos químicos pueden iniciar procesos cancerígenos (normalmente dañando el ADN); otros tipos de compuestos, sin embargo, son capaces de promover la aparición de cáncer una vez que los iniciadores han actuado. Las MC han sido investigadas por su capacidad

promotora tumoral (Kuiper-Goodman *et al.*, 1999), comparándose su estructura y mecanismo de acción con la del ácido okadaico, una toxina obtenida de los dinoflagelados marinos, con una potente actividad promotora de tumores. La estructura molecular de las MC es similar a la cavidad flexible de dicho ácido, siendo ambos tipos de toxinas hepatotóxicas. Las MC inhiben la unión del ácido okadaico a su receptor, sugiriéndose que la toxicidad de las MC puede ser inducida por un mecanismo similar al del ácido, mostrando actividades bioquímicas similares. Además, las MC penetran fácilmente en los cultivos primarios de hepatocitos, donde hay una retención a largo plazo de las toxinas, de la misma forma que el ácido okadaico y como él inhiben las fosfatasa de proteína 1 y 2A (PP-1 y PP-2A) (Bell y Codd, 1994) (Fujuki *et al.*, 1996). Las fosfatasa de proteínas PP-1 y PP-2A tienen una importante función reguladora, ya que mantienen la homeostasis en las células, de forma que su inhibición permite un aumento en la fosforilación de proteínas (Fujuki *et al.*, 1996) (Kuiper-Goodman *et al.*, 1999). En las células hepáticas, los filamentos intermedios del citoesqueleto, al estar hiperfosforilados, provocan disrupción celular (Kuiper-Goodman *et al.*, 1999) y cambios en su morfología (Fujuki *et al.*, 1996). Por todo ello se piensa que los pasos en la promoción tumoral de las MC son similares a los del ácido okadaico (Bell y Codd, 1994); (Fujuki *et al.*, 1996). El mecanismo de acción por el que se produce esta promoción tumoral se detalla en el Apartado 1 de Mecanismos (inhibición de las fosfatasa de proteínas).

2.2. Mutagénesis y teratogénesis

Dentro de los efectos que se producen a largo plazo por la exposición repetida a las MC, son de particular interés su capacidad mutagénica y teratogénica.

En estudios realizados administrando MC purificadas o extractos de algas por vía oral en ratas durante 6 meses se observó un incremento de las aberraciones de la metafase de los cromosomas.

La administración vía i.p. de extractos de algas a ratas preñadas, produjo un incremento en la muerte de los fetos, presentando estos hemorragias internas y teratogenicidad media.

Tras la administración por vía oral de extractos de algas en el agua de bebida a ratones, no se observaron efectos sobre la fertilidad, mortalidad del embrión o teratogenicidad. Sin embargo, los hígados de los ratones intoxicados presentaron daños dosis-dependientes (Falconer *et al.*, 1988).

Otros estudios revelaron que tras la administración por vía oral de distintas dosis de MC-LR en ratones preñados, solo a la dosis más elevada (20 µg/kg) se observó toxicidad materna y muerte, produciéndose un retraso en el peso del feto y una osificación del esqueleto, aunque no se produjeron efectos letales en los fetos (Kuiper-Goodman *et al.*, 1999).

Mecanismo de acción

La mayoría de los estudios existentes de toxicidad aguda con MC revelan que son toxinas primariamente hepatotóxicas en mamíferos y peces, encontrándose cambios en la estructura celular y alteraciones bioquímicas séricas, indi-

cadoras del daño hepático (Fawell *et al.*, 1999; Fischer *et al.*, 2000). Estas toxinas son captadas fundamentalmente por un transportador específico de sales biliares localizado en el hepatocito (Runnegar *et al.*, 1995). Se acepta que a nivel subcelular son inhibidores específicos de las fosfatasa de proteínas tipo 1 (PP1) y tipo 2A (PP2A), las cuales regulan multitud de procesos biológicos. Esta inhibición causa un aumento en la fosforilación de las proteínas celulares que activa la cascada de las caspasas, desencadenándose el proceso de apoptosis con la consecuente muerte celular (Figura 9.4) (Yoshida *et al.*, 1997; Hooser *et al.*, 2000).

Las células diana de las MC son fundamentalmente hepatocitos y macrófagos. Los estudios del mecanismo de absorción celular de las MC por diferentes células, como eritrocitos humanos, células de hepatocarcinoma humano Hep G2, líneas celulares de neuroblastoma humano SH-SY5Y, fibroblastos de ratón (3T3) y hepatocitos aislados de rata, utilizando dihidromicrocistinas radiomarcadas, revelan que se produce una captación específica de estas solo en los hepatocitos, siendo la absorción despreciable en los otros tipos celulares. Este mecanismo de entrada explicaría la especificidad hepática de las MC (Kaya, 1996).

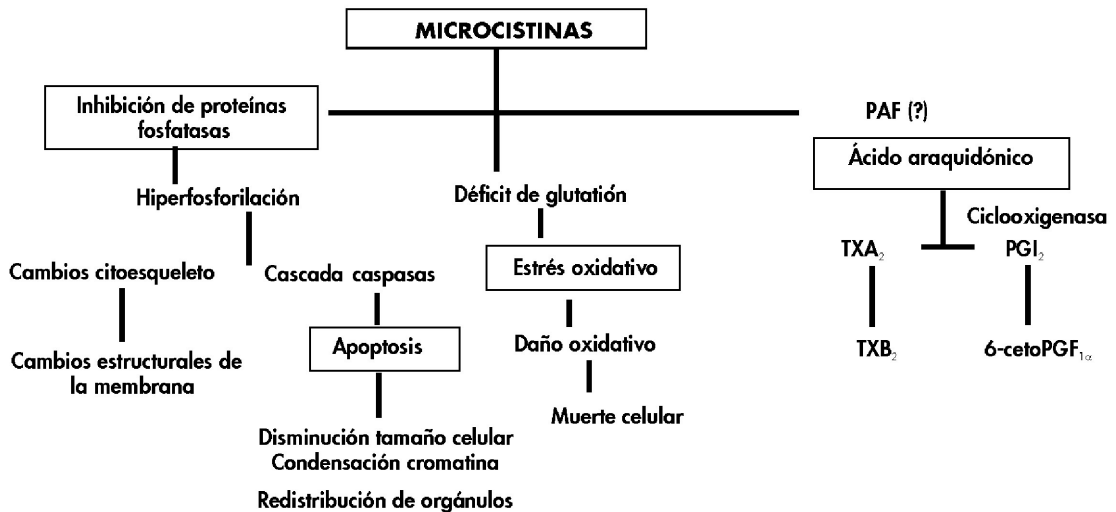


Figura 9.4. Mecanismos de acción tóxica de las MC.

1. Inhibición de fosfatasa de proteínas

Los niveles de proteínas fosforiladas dependen de las actividades relativas de las proteínas quinasas y de las fosfatasa de proteínas.

Las MC son potentes inhibidores de las fosfatasa de proteínas: la MC-LR inhibe de forma altamente específica las fosfatasa de proteínas tipo 1 (PP1) y tipo 2-A (PP2A) (MacKintosh *et al.*, 1990).

Se considera que la interacción con las fosfatasa de proteínas ocurre en dos etapas:

- En una primera etapa existe una unión rápida reversible que conduce a una inhibición nanomolar de la actividad catalítica,
- Y en una segunda, que tarda un periodo de horas en producirse, se establece un enlace covalente entre el residuo de N-Metil-dehidroalanina (Mdha) de las MC y las posiciones nucleofílicas de las enzimas, llegando a una inactivación irreversible pueden detectar dichas uniones covalentes *in vitro* e *in vivo* (Craig *et al.*, 1996; Runnegar *et al.*, 1995; Williams *et al.*, 1997).

Esta inhibición rompe el equilibrio entre enzimas, observándose un aumento de la fosforilación de proteínas (Carmichael, 1992, 1994). Se cree que, a consecuencia de los cambios en la fosforilación de proteínas, pueden ocurrir los siguientes efectos:

- Reorganización del citoesqueleto (afecta a la organización de los microfilamentos, filamentos intermedios y microtúbulos) tanto en hepatocitos, como en otras líneas celulares, tales como células renales y fibroblastos. Los efectos observados son similares para los tres tipos de células fundamentalmente estudiadas: los microfilamentos de actina son igual de resistentes para los tres. En fibroblastos y algunos hepatocitos se afectan antes los filamentos intermedios, como vicentina y citoqueratina, que los microtúbulos; sin embargo, la mayoría de los hepatocitos sufren una alteración de la estructura de los microtúbulos

primero, posteriormente se afectan los filamentos intermedios, y por último los microfilamentos, por lo que se considera que hay dos sitios de fosforilación que provocan alteraciones en el citoesqueleto (Wickstrom *et al.*, 1995). Los cambios en los microfilamentos incluyen una agregación inicial de la actina (Carmichael, 1997).

- La división celular deja de estar regulada, lo que conduce a la proliferación de la actividad tumoral. Esto se debe a que las fosfatasa de proteínas juegan un papel regulador importante en el mantenimiento de la homeostasis de las células, de forma que su inhibición puede conducir a una hiperfosforilación de proteínas diana, tales como las proteínas supresoras de tumores. Esta modificación post transduccional puede dar lugar a una proliferación celular, transformación celular y desarrollo de tumores. Las implicaciones de dicha inhibición de fosfatasa de proteínas en humanos, por exposición crónica a bajos niveles de MC, aún no se conocen (Kuiper-Goodman *et al.*, 1999).

2. Estimulación del metabolismo del ácido araquidónico

Es muy posible que la cascada del ácido araquidónico esté relacionada con la patología tóxica de la MC-LR en animales.

La MC-LR produce una reducción significativa de la absorción y un aumento de la liberación de ácido araquidónico. Este es un factor muy importante en su mecanismo de toxicidad, que puede provocar cambios en la estructura de la membrana celular y alteraciones en el transporte y metabolismo de los ácidos grasos (Naseem *et al.*, 1991).

En los hepatocitos, las MC estimulan el metabolismo del ácido araquidónico por la vía de la ciclooxigenasa. A su vez, reaccionan con compuestos como el glutatión, que contiene un grupo tiol. Pueden reaccionar con el grupo tiol de la coenzima A (CoA) y/o inhibiendo la actividad de las enzimas acetil-CoA-acetiltransferasa y acetil-CoA-sintetasa, bloqueándose la

reabsorción del ácido araquidónico libre y produciéndose un aumento de la síntesis de prostaglandinas.

La liberación del ácido araquidónico por parte de la membrana celular varía según el tipo de célula y el donador del residuo ácido. Normalmente, el donador es la fosfatidilcolina, aunque hay otros fosfolípidos que también son importantes en el metabolismo de este ácido. La ruptura del fosfatidilinositol conlleva la liberación de ácido araquidónico, y en el caso de la formación de prostaglandinas por la acción de las MC, es este en parte el que actúa como donador (Naseem *et al.*, 1991).

La síntesis y liberación de prostaciclina (6-cetoF_{1α}) y tromboxano B₂ (TXB₂) es estimulada por las MC, no así la liberación de prostaglandinas F_{2α} o E₂. El TXB₂ deriva del TXA₂, el cual es inestable y uno de los más fuertes mediadores de la agregación plaquetaria. La 6-ketoF_{1α} deriva de la prostaglandina I₂, la cual actúa como inhibidor de la agregación de plaquetas. La formación de TXB₂ demuestra la formación de TXA₂ y por tanto la posibilidad de coagulación de la sangre en el hígado (Kaya, 1996).

3. Apoptosis

En conexión con el Apartado 1 de Mecanismos, se considera que el principal mecanismo de toxicidad de las MC es la potente inhibición de las PP-1 y -2A, las cuales regulan multitud de procesos biológicos, dando lugar a una fosforilación de proteínas celulares y activando la cascada de las caspasas, resultando en una muerte celular de los hepatocitos por apoptosis (Yoshida *et al.*, 1997; Yoshida *et al.*, 1998; Hooser, 2000). El grado de hiperfosforilación de los elementos del citoesqueleto, como citoqueratina 8 y 18, puede determinar si la muerte celular ocurre por necrosis o por apoptosis. A la inversa, la inducción de apoptosis por MC puede conducir a la hiperfosforilación de otras proteínas citoplasmáticas (p53, Bcl-2, etc.) que inducen más directamente esta forma de muerte celular (McDermott *et al.*, 1998).

Los cambios morfológicos y bioquímicos típicos de la apoptosis en hepatocitos de rata

son: redistribución de los orgánulos, condensación de la cromatina y disminución del tamaño de la célula (a los 30 minutos de la administración de MC).

4. Estrés oxidativo

Se está estudiando asimismo el papel que puede jugar el estrés oxidativo como mecanismo de toxicidad de estas toxinas. Las MC producen déficit de glutatión reducido (GSH); por otro lado, actúan sobre la cadena de transporte electrónico (CTE) de la membrana mitocondrial dando lugar a un aumento de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) y alterando los niveles normales de permeabilidad transmembrana de la mitocondria (MPT). Todo esto provoca un aumento del estrés oxidativo (Ding y Ong, 2003).

Son escasos los estudios realizados sobre cómo afecta la exposición de MC a la producción de las ERO y a las defensas antioxidantes, exponiendo algunos de ellos a continuación.

En concreto, cuando se han tratado cultivos primarios de hepatocitos con extractos de MC se ha observado un aumento de ERO (Ding *et al.*, 1998), principalmente peróxido de hidrógeno y radical superóxido (Ding *et al.*, 2001), posiblemente derivados de las alteraciones producidas por la oxidación de lípidos (Towner *et al.*, 2002) aunque el mecanismo exacto por el que se forman no está claro y deberían realizarse más investigaciones al respecto. Además, se han observado cambios en el potencial de membrana mitocondrial (Ding *et al.*, 1998). Está bien documentado que las ERO pueden afectar a la organización de los principales elementos estructurales del citoesqueleto como son los microtúbulos, los microfilamentos y los filamentos intermedios debido a su capacidad para oxidar las proteínas del citoesqueleto o alterar el balance intracelular de tioles (Milzani *et al.*, 1997; Fiorentini *et al.*, 1999; Van Gorp *et al.*, 1999).

Algunos autores han determinado las actividades de diversas enzimas implicadas en los mecanismos oxidativos mediante estudios *in vitro*, observándose en hepatocitos tanto de

peces como de ratas un claro aumento de las actividades catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa (Li *et al.*, 2003); por otro lado, en estudios realizados en ratas, tanto *in vitro*, con hepatocitos, como en estudios crónicos *in vivo* se ha observado un incremento en la peroxidación lipídica después de la exposición a MC (Guzman y Solter, 1999; Ding *et al.*, 1998). Nuestro equipo de investigación ha demostrado que la administración a ratas de 100 µg/kg de MC-LR por vía intraperitoneal produce una alteración de diversas enzimas biomarcadoras de estrés oxidativo y un aumento de la peroxidación lipídica en mucosa intestinal, riñón, hígado y suero de los animales (Moreno *et al.*, 2002; Moreno *et al.*, 2003c; Moreno *et al.*, 2003d). Estos mismos efectos también se han puesto de manifiesto en hígado, riñón y branquias de peces expuestos a floraciones de MC por vía oral, siendo el hígado el órgano más afectado. Este estudio reveló además una afectación de los biomarcadores de estrés oxidativo dependiente del tiempo de exposición y una mayor toxicidad derivada de las toxinas libres que de las células intactas de MC (Jos *et al.*, 2004).

Como conclusión, son necesarias nuevas investigaciones que nos permitan valorar el riesgo tóxico derivado de la exposición a MC a través del consumo de alimentos vegetales y animales, potencialmente contaminados por estas toxinas, habida cuenta de los importantes efectos tóxicos derivados de la acción de las mismas.

Bibliografía

- Abe T, Lawson T, Weyers J, Codd GA (1996). Microcystin-LR inhibits photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* primary leaves: implications for current spray irrigation practice. *New Phytol* 133: 651-658.
- Andersen RJ, Luu HA, Chen DZX, Holmes CFB, Kent ML, LeBlanc M, *et al.* (1993). Chemical and biological evidence links microcystins to salmon netpen liver disease. *Toxicon* 31: 1315-1323.
- Azevedo SMFO, Carmichael WW, Jochimsen EM, Rinehart KL, Lau S, Shaw GR, *et al.* (2002). Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. *Toxicology* 181-182: 441-446.
- Beausse J, Letort M, de Roubin MR (2003). Environmental analysis of hepatotoxins: Time of flight mass spectrometry coupled with liquid chromatography. Anjou Recherche, Veolia Water, Saint Maurice, Fr. *J Europeen d'Hydrologie* 34: 211-220.
- Bell J. y Codd GA (1994). Cyanobacterial toxins and Human Health. *Rev Med Microbiol* 5: 256-264.
- Best JH, Pflugmacher S, Wiegand C, Eddy FB, Metcalf JS, Codd GA (2002). Effects of enteric bacterial and cyanobacterial lipopolysaccharides, and of microcystin-LR, on glutathione S-transferase activities in zebra fish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 60: 223-231.
- Best JH, Eddy FB, Codd GA (2003). Effects of Microcystis cells, cell extracts and lipopolysaccharide on drinking and liver function in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. *Aquatic Toxicology* 64: 419-426.
- Blom JF, Robinso JA, Jüttner F (2001). High grazer toxicity of [D-Asp³, (E)-Dhb⁷] microcystin-RR of *Planktothrix rubescens* as compared to different microcystins. *Toxicon* 39: 1923-1932.
- Bothaa N, Gehringer MM, Downing TG, van de Venter M, Shephard EG (2004). The role of microcystin-LR in the induction of apoptosis and oxidative stress in CaCo2 cells. *Toxicon* 43: 85-92.
- Carmichael WW (1992). Cyanobacteria secondary metabolites—the cyanotoxins. *J App Bacteriol* 72: 445-459.
- Carmichael WW, Falconer IR (1993). Diseases related to freshwater blue green algal toxins, and control measures. En: Falconer IR (ed.). *Algal toxins in seafood and drinking water*, Academic Press. London. 187-209.
- Carmichael WW (1994). The toxins of cyanobacteria. *Scientific American* 270: 78-86.
- Carmichael WW (1996). Cyanobacterial toxins. IOC Manuals and Guides No30.
- Carmichael WW (1997). The cyanotoxins. *Advances in Botanical Research* 27: 211-256.
- Carmichael WW, Drapeau C, Anderson DM (2000). Harvesting of *Aphanizomenon flos-aquae* Ralfs ex Born. & Flas. Var. *flos-aquae* (Cyanobacteria) from Klamath Lake for human dietary use. *J Appl Phycology* 12: 585-595.

- Carmichael WW, Azevedo MFO, An JS, Molica RJR, Jochimsen EM, Lau S, Rinehart KL, Shaw GR, Eaglesham GK (2001). Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environ Health Perspectives* 109: 663-668.
- Carpenter EJ y Carmichael WW (1995). Taxonomy of Cyanobacteria. *IOC Manuals and Guides* N.º 30.
- Chamorro G, Salazar M, Lima-Araujo KG, Santos CP, Caballos G, Castillo LF (2002). Update on the pharmacology of *Spirulina* (*Arthrospira*), an unconventional food. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 52: 232-240.
- Chen J, Song L, Dai J, Gan N, Liu Z (2004). Effects of microcystins on the growth and the activity of superoxide dismutase and peroxidase of rape (*Brassica napus* L.) and rice (*Oryza sativa* L.). *Toxicon* 43: 393-400.
- Chernova NI, Lyamin MYA., Kiseleva SV (2002). Use of Spirulina in food products. *Pishchevaya Promyshlennost* 2: 80-82.
- Chistoffersen K (1996). Effect of Microcystin on Growth of Single Species and on Mixed Natural Populations of Heterotrophic Nanoflagellates. *Natural Toxins* 4: 215-220.
- Chorus I, Falconer IR, Salas HJ, Bartram J (2000). Health Risk Caused by Freshwater Cyanobacteria in Recreational Waters. *J Toxicol Environ Health B* 3: 323-347.
- Codd GA (1998). Cyanobacterial blooms and toxins in fresh-brackish and marine waters. En: Reguera B, Blanco J, Fernández ML, Wyatt T. (eds.) *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. Vigo. 13-17.
- Codd GA, Ward CJ, Beattie KA, Bell SG (1999a). Widening Perceptions of the Occurrence and Significance of Cyanobacterial Toxins. En: Peschek GA, Löffelhardt W, Schmetterer G (eds.). *The Phototrophic Prokaryotes*. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York. 623-632.
- Codd GA, Metcalf JS, Beattie KA (1999b). Retention of *Microcystis aeruginosa* and microcystins by salad lettuce (*Lactuca sativa*) after spray irrigation with water containing cyanobacteria. *Toxicon* 37: 1181-1185.
- Craig M, Luu HA, McCready T, Williams DE, Andersen RJ, Holms CFB (1996). Molecular mechanisms underlying the interaction of motu-poriun and microcystins with type-1 and 2A protein phosphatases. *Biochem Cell Biol* 74: 569-578.
- Ding WX, Shen HM, Zhu HG, Ong CN (1998). Studies on oxidative damage induced by cyanobacteria extract in primary cultured rat hepatocytes. *Environ Res Section A* 78: 12-18.
- Ding WX, Shen HM, Ong CN (2001). Pivotal Role of Mitochondrial Ca₂⁺ in Microcystin-induced Mitochondrial Permeability Transition in Rat Hepatocytes. *Biochem Bioph Res Comm* 285: 1155-1161.
- Ding WX, Ong CN (2003). Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity. *FEMS Microbiol Letters* 220: 1-7.
- Draisci R, Ferretti E, Palleschi L, Marchiafava C (2001). Identification of anatoxins in blue-green algae food supplements using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives Contaminants* 18: 523-531.
- Falch BS, König GM, Wright AD, Sticher O, Angerhofer CK, Pezzuto JM *et al.* (1995). Biological activities of cyanobacteria: evaluation of extracts and pure compounds. *Planta Med* 61: 321-328.
- Falconer IR, Smith J, Jackson AR, Jones J y Runnegar MT (1988). Oral toxicity of a bloom of the cyanobacterium *M. aeruginosa* administered to mice over periods up to 1 year. *J of Toxicol Environ Health* 24: 291-305.
- Falconer IR, Burch MD, Steffensen DA, Choice M, Coverdale OR (1994). Toxicity of the blue-green alga (Cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* in drinking water to growing pigs, as an animal model for human injury and risk assessment. *Environ Toxicol Water Quality* 9: 131-139.
- Falconer I, Bartram J, Chorus I, Kuiper-Goodman T, Utliken H, Burch M, Codd GA (1999). Safe levels and safe practices. En: Chorus I & Bartram J (eds.). *Toxic cyanobacteria in water*. E & FN Spon. New York, 155-178.
- Fastner J, Codd GA, Metcalf JS, Woitke P, Wiedner C, Utliken H (2002). An International intercomparison exercise for the determination of purified microcystin-LR and microcystins in cyanobacterial field material. *Anal Biochem Chem* 374: 437-444.
- Fastner J, Neumann U, Wirsing B, Weckesser J, Wiedner C, Nixdorf B *et al.* (1999). Microcystins (Hepatotoxic Heptapeptide) in German Fresh Water Bodies. *Environmental Toxicology* 14: 13-22.

- Fawell JK, Mitchell RE, Everett DJ, Hill R (1999). The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: I Microcystin-LR. *Human Experim Toxicol* 18: 162-167.
- Feitz AJ, Lukondeh T, Moffitt MC, Burns BP, Naidoo D, Vedova JD *et al.* (2002). Absence of detectable levels of the cyanobacterial toxin (microcystin-LR) carry-over into milk. *Toxicon* 40: 1173-1180.
- Fiorentini C, Falzano L, Rivabene R, Fabri A, Malorni W (1999). Acetylcysteine protects epithelial cells against the oxidative imbalance due to *Clostridium difficile* toxins. *FEBS Letters* 453: 124-128.
- Fisher WJ, Dietrich DR (2000). Pathological and biochemical characterization of Microcystin-induced hepatopancreas and kidney damage in carp (*Cyprinus carpio*). *Toxicol Appl Pharmacol* 164: 73-81.
- Fujiki H, Sueoka E, Suganuma M (1996). Carcinogenesis of Microcystin. En: Watanabe MF, Harada K, Carmichael WW, Fujiki H (eds.). *Toxic microcystins*. C.R.C. Press. Boca Raton. 203-232.
- Gilroy DJ, Kauffman KW, Hall RA, Huang X, Chu FS (2000). Assessing potential health risks from microcystin toxins in blue-green algae dietary supplements. *Environ Health Perspectives* 108: 435-439.
- Guzman RE, Solter PF (1999). Hepatic Oxidative Stress Following Prolonged Sublethal Microcystin-LR Exposure. *Toxicol Pathol* 27: 582-588.
- Harada K, Oshikata M, Uchida H, Suzuki M, Kondo F, Sato K *et al.* (1996). Detection and identification of microcystins in the drinking water of Haimen City, China. *Natural Toxins* 4: 277-283.
- Hoeger SJ, Shawb G, Hitzfeld BC, Dietrich DR (2004). Occurrence and elimination of cyanobacterial toxins in two Australian drinking water treatment plants. *Toxicon* 43: 639-649.
- Holte HR, Eriksen S, Skulberg O, Aas P (1998). The effect of water soluble cyanotoxin(s) produced by two species of *Anabaena* on the release of acetylcholine from the peripheral cholinergic nervous system of the rat airway. *Environ Toxicol Pharmacol* 5: 51-59.
- Hooser SB (2000). Fulminant Hepatocyte Apoptosis In Vivo Following Microcystin-LR Administration to Rats. *Toxicol Pathology* 28: 726-733.
- Hrudey S, Burch M, Drikas M, Gregory R (1999). Remedial measures. En: Chorus I y Bartram J (eds.). *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. E & FN Spon. New York. 276-312.
- Jochimsen EM, Carmichael WW, An J, Cardo DM, Cookson ST, Holmes CEM, Antunes BC, Liho DAM, Lyra TM, Barreto VST, Azevedo SMFO, Jarvis WR (1998). Liver Failure and Death After Exposure to Microcystins at a Hemodialysis Center in Brazil. *New Engl J of Med* 338: 873-878.
- Jos A, Pichardo S, Prieto AI, Repetto G, Vázquez CM, Moreno I *et al.* (2005). Microcystins induce oxidative stress in Tilapia (*Oreochromis sp.*). *Aquatic Toxicology* 72: 261-271.
- Kanlayakrit W, Soontornwat K (2003). Use of Spirulina in rice noodle production to increase nutritive value. Proceedings of 41st Kasetsart University Annual Conference, 193-200.
- Kaya K (1996). Toxicology of microcystins. En: Watanabe MF, Harada K, Carmichael WW, Fujiki H (eds.). *Toxic microcystins*. CRC Press. Boca Raton. 175-202.
- Kotak BG, Souleh S, Fritz DL, Prepas EE, Hrudey SE, Coppock RW (1996). Hepatic and renal pathology of intraperitoneally administered microcystin-LR in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicon* 34: 517-525.
- Kuiper-Goodman T, Falconer I, y Fitzgerald J (1999). Human health aspects. En: Chorus I, Bartram J (eds.). *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. E & F.N. Spon. New York. 113-153.
- Lambert TW., Holmes CFB y Hrudey SE (1996). Adsorption of Microcystin-LR by activated carbon and removal in full scale water treatment. *Water Res* 30: 1411-1422.
- Lawrence JF, Menard C (2001). Determination of microcystins in blue-green algae, fish and water using liquid chromatography with ultraviolet detection after sample clean-up employing immunoaffinity chromatography. *J Chromatography A* 922: 111-117.
- Lawrence JF, Niedzwiedek B, Menard C, Lau BP, Lewis D, Kuiper-Goodman T *et al.* (2001). Comparison of liquid chromatography/mass spectrometry, ELISA, and phosphatase assay for the determination of microcystins in blue-green algae products. *J AOAC Intern* 84: 1035-1044.

- Lawton LA, Robertson PKJ (1999). Physicochemical treatment methods for the removal of microcystins (cyanobacterial hepatotoxins) from potable waters. *Chem Society Rev* 28: 217-224.
- Li X, Liu Y, Song L, Liu J (2003). Responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to the toxicity of microcystin-LR. *Toxicon* 42: 85-89.
- Magalhaes VF, Soares RM, Azevedo SM (2001). Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. *Toxicon* 39: 1077-1085.
- Mankiewicz J, Tarczyska M, Fladmark KE, Doskeland SO, Walter Z, Zalewski M (2001). Apoptotic effect of cyanobacterial extract on rat hepatocytes and human lymphocytes. *Environmental Toxicology* 16: 225-233.
- McDermott C. M., Nho C. W., Howard W., Holton B. (1998) The cyanobacterial toxin, microcystin-LR, can induce apoptosis in a variety of cell types. *Toxicon* 36: 1981-1996.
- McElhiney J, Lawton LA, Leifert C (2001). Investigations into the inhibitory effects of microcystins on plant growth, and the toxicity of plant tissues following exposure. *Toxicon* 39: 1411-1420.
- MacKintosh C, Beattie KA, Klumpp S, Cohen P, Codd GA (1990). Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Lett.* 264: 187-192.
- Milzani A, DalleDone I, Colombo R (1997). Prolonged oxidative stress on actin. *Arch Biochem Biophys* 339: 267-274.
- Moreno IM, Castellano M, Gómez L, Mate A, Vázquez CM, Cameán AM (2002). Influence of Microcystin-LR on the enzymatic activity in rat liver and intestine. Xth International Conference on harmful algae, St. Pete Beach, Florida, book of abstract 204.
- Moreno I, Cameán A, Tavares MJ, Pereira P, Franca S (2003a). Toxicity of cyanobacteria isolated from the Guadiana river. *Aquatic Ecosystem Health Management*, 6: 409-415.
- Moreno I, Cameán A (2003b). Efectividad de diversos tratamientos de agua en el control de floraciones de cianobacterias y liberación de sus toxinas (microcistinas). *Tecnología del Agua* 240: 40-46.
- Moreno IM, Pichardo S, Gómez L, Mate A, Vázquez CM, Cameán AM (2003c). Alteraciones oxidativas hepáticas, renales y séricas inducidas por microcistina-LR. *Revista de Toxicología* 20: 139.
- Moreno IM, Mate A, Repetto G, Vázquez CM, y Cameán AM (2003d). Influence of acute exposure to Microcystin-LR on the activity of membrane enzymes in rat intestinal mucosa. *Journal of Physiol Biochem* 59, 293-299.
- Moreno I, Pereira P, Franca S, Cameán, A (2004a). Toxic cyanobacteria strains isolated from blooms in the Guadiana river (Southwest of Spain). *Biological Res* 37: 405-417.
- Moreno IM, Maraver J, Aguete E, Leao M, Gago-Martínez A, Cameán A (2004b). Decomposition of microcystin-LR, microcystin-RR and microcystin-YR in water samples submitted to *in vitro* dissolution tests. *J Agricul Food Chem* 52: 5933-5938.
- Mur LR, Skulberg OM, Utkilen H (1999). Cyanobacteria in the Environment. En: Chorus I Bartram J (eds.). *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. E & FN Spon. New York. 15-40.
- Naseem SM, Mereish KA, Solow R, Hines HB (1991). Microcystin-induced activation of prostaglandin synthesis and phospholipid metabolism in rat hepatocytes. *Toxicology in vitro* 5: 341-345.
- Orr PT, Jones GJ, Hunter RA, Berger K, de Paoli DA, Orr CLA (2001). Ingestion of toxic *Microcystis aeruginosa* by dairy cattle and the implications for microcystin contamination of milk. *Toxicon* 39: 1847-1854.
- Orr PT, Jones GT, Hunter RA, Berger K (2003). Exposure of beef cattle to sub-clinical doses of *Microcystis aeruginosa*: toxin bioaccumulation, physiological effects and human health risk assessment. *Toxicon* 41: 613-620.
- Oudra B, Loudiki M, Sbiyyaa B, Martins R, Vasconcelos V, Namikoshi N (2001). Isolation, characterization and quantification of microcystins (heptapeptides hepatotoxins) in *Microcystis aeruginosa* dominated bloom of LallacTakerkoust lake-reservoir (Morocco). *Toxicon* 39: 1375-1381.
- Park H, Iwami C, Watanabe MF, Harada K, Okino T, Hayashi H (1998). Temporal variabilities of the concentrations of intra- and extracellular microcystin and toxic *Microcystis* species in a hypertrophic lake, Lake Suwa, Japan (1991-1994). *Environmental Toxicology and Water Quality* 13: 61-72.

- Park H, Watanabe MF (1996). Toxic microcystis in eutrophic lakes. En: Watanabe MF, Harada KH, Carmichael WW, Fujiki H. *Toxic microcystis*. CRC Press. Boca Raton. 57-77.
- Penalzoa R, Rojas M, Vila I, Zambrano F (1990). Toxicity of a soluble peptide from *Microcystis aeruginosa* to zooplankton and fish. *Freshwater Biology* 24: 133-240.
- Pietsch J, Bornmann K, Fichtner S, Schmidt W (2001). Algae metabolites in drinking water. Relevance, analysis, and removal during the treatment process. *Vom Wasser*, 96: 117-130.
- Pomati F, Sacchi S, Rossetti C, Giovannardi S, Onodera H, Oshima Y, Neilan BA (2000). The freshwater cyanobacterium *Planktothrix sp.* FP1: Molecular identification and detection of paralytic shellfish poisoning toxins. *J Phycolgy* 36: 553-562.
- Pouria S, De Andrade A, Barbosa J, Cavalcanti RL, Barreto VTS, Ward CJ *et al.* (1998). Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *Lancet* 352: 21-26.
- Premazzi G, Volterra L (1993). *Microphite toxins. A manual for toxin detection, environmental monitoring and therapies to counteract intoxications*, Luxemburg 137.
- Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. BOE n.º 45.
- Rodger HD, Turnbull T, Edwards C, Codd GA (2003). Cyanobacterial (blue-green algal) bloom associated pathology in brown trout, *Salmo trutta* L., in Loch Leven, Scotland. *J Fish Disease* 17: 177-181.
- Roset J, Aguayo S, Muñoz MJ (2001). Detección de cianobacterias y sus toxinas. Una revisión. *Revista de Toxicología* 18: 65-71.
- Runnegar M, Berdt N, Kong SM, Lee EYC, Zhang L. (1995) In vivo and in vitro binding of microcystin to protein phosphatases 1 and 2A. *Biochem. Biophys Res Commun* 216: 162-169.
- Singh DP, Tyagi MB, Kumar A (1999). Cyanobacterial toxins. Cyanobacterial and algal metabolism and environmental biotechnology 61-72.
- Sivonen K (1996). Cyanobacterial toxins and toxin production. *Phycologia* 35: 12-24.
- Sivonen K (1998). Toxins produced by cyanobacteria. mmycotoxins and phycotoxins-developments in Chemistry, *Toxicology and Food Safety*, 547-567.
- Sivonen K, Jones G (1999). Cyanobacterial Toxins. En: Chorus I., Bartram J (eds.). *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. E & F. N. Spon. New York. 41-111.
- Skulberg OM, Carmichael WW, Codd GA, Skulberg R (1993). Taxonomy of toxic cyanophyceae. En: Falconer IR (eds.). *Algal toxins in seafood and drinking water*. Academic Press. London, 145-164.
- Towner RA, Sturgeon SA, Hore KE (2002). Assessment of in vivo oxidative lipid metabolism following acute Microcystin-LR-induced hepatotoxicity in rats. *Free Radical Research* 36: 63-71.
- Tsuji K, Setsuda S, Watanuki T, Kondo F, Nakazaa H, Suzuki M *et al.* (1996). Microcystin levels during 1992-95 for lakes sagami and Tsukui-Japan. *Natural Toxins* 4: 189-194.
- Ueno Y, Nagata S, Tsutsumi T, Hasegawa A, Watanabe MF, Park HD *et al.* (1996). Detection of Microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis* 17: 1317-1321.
- Van Gorp RM, Broers JL, Reutelingspepper CP, Hornstra G, van Dam-Mieras MC, Heemskerck JW (1999). Peroxide-induced membrane blebbing in endothelial cells associated with glutathione oxidation but not apoptosis. *Am J Physiol* 277: 20-28.
- Watanabe MF, Park HD, Kondo F, Harada KI, Hayashi H, Okino T (1997). Identification and estimation of microcystins in freshwater mussels. *Natural Toxins* 5: 31-35.
- Weiss J, Liebert HP, Braune W (2000). Influence of microcystin-RR on growth and photosynthetic capacity of the duckweed *Lemna minor* L. *J Applied Botany* 74: 100-105.
- Wickstrom ML, Khan SA, Haschek WM, Wyman JK, Eriksson JE, Schaeffer DJ *et al.* (1995). Alterations in microtubules, intermediate filaments, and microfilaments induced by microcystin-LR in cultured cells. *Toxicologic Pathology* 23: 326-337.
- Williams DE, Craig M, Dawe SC, Kent ML, Holmes CFB (1997). Evidence for a covalently bound form of MCLR in salmon liver and dungeness crab larvae. *Chem Res Toxicol* 10: 463-469.
- WHO (1998). *Guidelines for drinking water quality*. World Health Organization. Geneva.
- Yoshida T, Makita Y, Nagata S, Tsutsumi T, Yoshida F, Sekijima M (1997). Acute oral toxicity of

- microcystin-LR, a cyanobacterial hepatotoxin, in mice. *Natural Toxins* 5: 91-95.
- Yoshida T, Makita Y, Tsutsumi T, Nagata S, Tashiro F, Yoshida F (1998). Immunohistochemical localization of microcystin-LR in the liver of mice: A study on the pathogenesis of microcystin-LR-induced hepatotoxicity. *Environ Toxicol Pathol* 26: 411-418.
- Yu SZ (1989). Drinking water and primary liver cancer. En: Tang ZY, Wu MC, Xia SS (eds.). *Primary liver cancer*. China Academic Publishers. New York. 30-37.
- Zhao J, Jiang S, Zhu H (2003). Promoting activity of microcystins on hepatocarcinogenesis in rats induced by extractive of tap water. *Zhongguo Huanjing Kexue*, 23: 16-20.
- Zimba PV, Khoo L, Gaunt P, Carmichael WW, Brittain S (2001). Confirmation of catfish mortality from *Microcystis* toxins. *J Fish Dis* 24: 41-47.

ALIMENTOS CON SUSTANCIAS TÓXICAS DE ORIGEN NATURAL: PLANTAS SUPERIORES ALIMENTICIAS

Adela López de Cerain, Ana Gloria Gil, José Bello

Introducción. Lectinas (fitohemoaglutininas). Glucósidos cianogénicos. Glucosinolatos: compuestos bociógenos. Compuestos fávicos: β -glucósidos de vicia faba. Latirógenos: aminoácidos no proteicos. Otros aminoácidos tóxicos. Glucoalcaloides de las patatas. Alcaloides de pirrolizidina. Fitoestrógenos. Aminas vasopresoras. Sustancias psicoactivas. Compuestos con actividad cancerígena. Bibliografía.

Introducción

Las plantas resultan imprescindibles para la vida animal ya que, gracias a la fotosíntesis, son capaces de convertir el agua y CO_2 en los macronutrientes básicos: hidratos de carbono, proteínas y lípidos. Además, las plantas también sintetizan otros compuestos orgánicos, algunos de los cuales pueden manifestar un efecto tóxico o antinutritivo. Tradicionalmente se ha considerado a este segundo grupo de compuestos como metabolitos secundarios de la planta, por carecer de una función fisiológica conocida. No obstante, hoy día se sabe que muchos de estos metabolitos juegan un papel importante en ciertos aspectos como, por ejemplo en la protección de la planta frente a infecciones fúngicas, bacterianas o víricas, o bien frente a condiciones climáticas adversas de déficit hídrico, exceso de sal, etc. Por esta razón, aunque de muchos de ellos se desconoce aún su fun-

ción, la tendencia actual es evitar la distinción entre metabolito secundario y primario.

El público en general tiene un concepto de la toxicidad de los alimentos vegetales muy simple: considera que algunas plantas son tóxicas y no deben comerse, mientras que las alimenticias carecen por completo de efectos tóxicos. Por otra parte, la sociedad actual exige la ausencia de cualquier traza de contaminación química de origen antropogénico —hay una demanda creciente de productos ecológicos— pero, al mismo tiempo, no se tiene ninguna conciencia del peligro potencial que supone la presencia de compuestos tóxicos de origen natural lo que, desde un punto de vista científico, supone a veces un riesgo más elevado.

Se considera aceptado que los componentes básicos de la dieta (hidratos de carbono, proteínas y grasa), en condiciones normales no ejercen ningún efecto adverso sobre la salud humana. Los potencialmente tóxicos, estudiados de manera aislada, a ciertas dosis tienen un eviden-

te efecto deletéreo que, sin embargo, en las condiciones normales de dieta no se pone de manifiesto por diversas razones. En primer lugar no siempre están presentes en la planta; depende a menudo de su grado de maduración y de las condiciones climáticas y características del suelo. Por otro lado, su concentración en el alimento es a menudo tan baja, que sería necesario un consumo exagerado del mismo durante un tiempo prolongado para alcanzar dosis tóxicas. Además, en ocasiones los efectos adversos solo se ponen de manifiesto en ciertos sujetos que por sus características genéticas o situación general desde el punto de vista nutritivo presentan alguna deficiencia que los hace especialmente susceptibles.

Entre los compuestos naturales con actividad tóxica presentes en los alimentos se distinguen dos grandes grupos: aquellos que tienen un efecto deletéreo y aquellos con un efecto antinutritivo. Estos últimos interfieren en los procesos normales de absorción y metabolismo de los nutrientes y se tratan en otro capítulo de este

libro. Entre los primeros, se pueden distinguir a su vez, las toxinas fúngicas producidas por los hongos superiores y las micotoxinas sintetizadas por hongos filamentosos, que serán tratadas en sendos capítulos, así como otros compuestos con efecto deletéreo, que son objeto de este tema. Por otra parte, las toxinas presentes en plantas utilizadas como remedios medicinales se tratan en otro capítulo. A pesar de ello, es previsible un cierto solapamiento, ya que algunas especies pueden ser utilizadas como alimento y como plantas medicinales (*e.g.* alcaloides de pirrolizidina).

Las sustancias tóxicas presentes en las plantas superiores alimenticias constituye un grupo muy numeroso y muy variado. Algunas clasificaciones se realizan en función de su estructura química o según la presencia de grupos funcionales presentes en su estructura; otras lo hacen según el tipo de efecto ejercido por estas sustancias. Atendiendo a este último criterio, los compuestos comentados en este capítulo aparecen clasificados en la Tabla 10.1.

Tabla 10.1. Clasificación de las sustancias con actividad deletérea presentes en alimentos vegetales.

Efecto tóxico	Estructura química	Familia, género, especie o alimento
Sustancias hemotóxicas		
Lectinas (fitohemoaglutininas)	Proteínas/glicoproteínas	Leguminosas
Compuestos fávicos	β -glucósidos	<i>Vicia faba</i>
Sustancias productoras de HCN	Glucósidos	Leguminosas, rosáceas, gramíneas y otras
Compuestos bociógenos	Glucosinolatos	Crucíferas
Sustancias neurotóxicas		
Latirógenos	Aminoácidos no proteicos	<i>Lathirus</i> spp.
Glucoalcaloides de las patatas	Glucoalcaloides	<i>Solanum</i> spp.
Compuestos con actividad estrogénica	Isoflavonas	Soja
	Cumarinas	Leguminosas
	lactonas del ác. resorcíclico	
Compuestos hepatotóxicos y carcinogénicos	Alcaloides de pirrolizidina	<i>Boraginaceae</i> , <i>Compositae</i> , <i>Leguminoseae</i> y otras
Compuestos con efecto vasopresor	Metil-xantinas	Café, té, cacao
	Aminas (tiramina y otras)	Quesos, chocolate, aguacate, vino, etc
Sustancias psicoactivas	Miristicina	Nuez moscada, pimienta negra
	Carotatoxina	Apio, zanahorias
	Alcaloides (mescalina, dioscorina, psilocibina)	(cactus, batata, la seta <i>Psilocybe mexicana</i>)
	Metil-xantinas	Café, té, cacao
Compuestos cancerígenos		
Cicasina	Glucósido	<i>Cycacedaea</i>
Safrol, estragol	Metilendioxicbenenos	Azafrán, estragón
Quercetina	Flavona	Pieles de los cítricos
	Taninos	Frutas tropicales, café, cacao, té

Lectinas (fitohemoaglutininas)

Las lectinas o fitohemoaglutininas son un grupo de productos naturales que tienen en común el hecho de ser proteínas o glucoproteínas con capacidad para aglutinar los eritrocitos. Su existencia se conoce desde el año 1888, en el que Stillmark aisló de *Ricinus communis* una fracción proteica con capacidad para aglutinar las células sanguíneas, que denominó ricina (Deshpande, 2002). Son numerosas las plantas en las que se han identificado este tipo de compuestos, la mayor parte pertenecientes a la familia de las leguminosas (Liener, 1976).

Estos productos presentan además otras propiedades químicas y biológicas de interés como son, su capacidad para inducir la mitosis, para aglutinar células tumorales o para interactuar con grupos sanguíneos específicos, así como su toxicidad en animales (Sharon y Lis, 1989). Todos estos efectos derivan de la unión de las lectinas a ciertos tipos de azúcares presentes en la superficie celular (Liener, 1976, 1997; Pusztai, 1989; y Sharon y Lis, 1989).

La mayor parte de las lectinas son tetrámeros con un peso molecular situado en el rango entre 100.000 y 150.000 Da. Este tetrámero está constituido por subunidades reactivas frente a los eritrocitos (E) y subunidades reactivas frente a los linfocitos (L) (Felsted *et al.*, 1981b). La mayor parte de las lectinas contienen además hasta un 4-10% de hidratos de carbono. La diferente composición de los polipéptidos del tetrámero confiere a las lectinas variabilidad de propiedades aglutinantes y mitogénicas, especialmente en el género *Phaseolus* (Brown *et al.*, 1982a y b; Felsted *et al.*, 1981 a y b).

No obstante, las lectinas producen síntomas parecidos, de mayor o menor gravedad, entre los que destaca, en primer lugar, una intensa inflamación de la mucosa intestinal, seguida de destrucción de los epitelios, así como edema y hemorragia del tejido linfático (Lindner, 1990).

Se conocen poco las funciones fisiológicas de las lectinas en las plantas en las que son producidas. Se les ha atribuido desde un papel insecticida hasta actividades enzimáticas (Hankins y Shannon, 1978), así como de determinación de la especificidad del huésped en la simbiosis de las leguminosas con bacterias del género *Rhizobium* (Sharon y Lis, 1989).

El hecho de que las lectinas se encuentren tan ampliamente distribuidas entre los vegetales de consumo humano plantea la importante cuestión sobre el posible riesgo para la salud humana. Afortunadamente, la mayor parte de las lectinas se destruyen fácilmente por los métodos culinarios tradicionales. Sin embargo, en determinadas condiciones puede no conseguirse una destoxicación completa, sobre todo si se utilizan semillas molidas o si se aplican procedimientos industriales de comida rápida, ya que las lectinas no se inactivan por el tratamiento con calor seco (Jaffe, 1980).

Por otra parte, el consumo de alubias que no hayan sido convenientemente cocinadas puede ser la causa de ciertos casos de intoxicaciones humanas que se manifiestan inicialmente con trastornos de tipo gastrointestinal. Ello puede darse si se consumen ensaladas con alubias crudas u otro tipo de platos poco cocinados. Por esta razón se recomienda que las alubias se cuezan como mínimo durante 10 minutos.

Por último, debido a su propiedad para unirse de manera específica a los azúcares y otros glucoconjugados, las lectinas tienen diversas aplicaciones en biomedicina (Liener, 1997). Así, por ejemplo, se han utilizado para la detección de receptores de membrana, de células malignas o de grupos sanguíneos, así como para evitar el rechazo en trasplantes de médula ósea (Sharon y Lis, 1989).

Glucósidos cianogénicos

Los glucósidos cianogénicos son compuestos que producen ácido cianhídrico (HCN) por tratamiento ácido o mediante hidrólisis enzimática.

Están presentes tanto en el reino animal como vegetal en donde se encuentran ampliamente distribuidos. Se han identificado en aproximadamente 2.000 especies de plantas superiores pertenecientes a 110 familias distintas de angiospermas, gimnospermas o helechos (Poulton, 1983; Deshpande y Sathe, 1991). Las familias más importantes por su capacidad cianogénica son las siguientes: *Rosaceae* (150 especies), *Leguminosae* (125), *Graminae* (100), *Araceae* (50), *Compositae* (50), *Euphorbiaceae* (50) y *Passifloraceae* (30).

La estructura de algunos glucósidos cianogénicos se presenta en la Figura 10.1; generalmente contienen glucosa pero también se pueden encontrar en ocasiones otros mono o disacáridos. Entre los glucósidos cianogénicos se encuentra la limarina, presente en la lima, la amigdalina, componente de las semillas de las frutas con hueso, como el melocotón o albaricque, y la durrina, sustancia presente en el sorgo (Roberts, 1981). Otros alimentos que contienen glucósidos cianogénicos son la mandioca, la batata, el bambú, el maíz o los frijoles.

Son compuestos relativamente estables a pH neutro. El tratamiento ácido a temperaturas elevadas los hidroliza dando lugar a los diferentes componentes (aldehído o cetona, azúcar y HCN). No obstante, la producción de HCN a partir de estos compuestos es generalmente de tipo enzimático y el proceso se conoce como cianogénesis. En la Figura 10.2 se presenta la hidrólisis de la limarina, que requiere la acción de una beta-glucosidasa y de una hidroxinitrilo-liasa.

Puesto que tanto los glucósidos cianogénicos como las enzimas se encuentran en las plantas, es lógico presuponer que sustratos y enzimas están situados en distintos compartimentos celulares o incluso tisulares, como así se ha comprobado en algunos casos (Kojima *et al.*, 1979). La cianogénesis ocurre generalmente cuando el tejido de una planta cianogénica se aplasta o destruye de alguna manera (Conn, 1979). Esto puede ocurrir durante el proceso de preparación del alimento a partir de la planta (triturado, molienda) y también cuando la planta se ingiere directamente (durante la masticación). En la medida en que se destruyan las enzimas o los sustratos antes de que se produzca la liberación de HCN, el fenómeno cianogénico podrá ser evitado. Estos compuestos se han implicado en diversas enfermedades, sobre todo en países con una alimentación basada en productos vegetales con un alto contenido en glucósidos cianogénicos. Así, en las regiones tropicales se han referido numerosos casos de alteraciones neurológicas y endocrinas debido al consumo de mandioca (*Manihot esculenta*) (Tewe e Yyayi, 1989; Rosling y Tylleskär, 2000), fuente importante de carbohidratos en la dieta de algunas zonas del oeste africano, principalmente en Nigeria. No obstante, puesto que la atención médica en estos países es escasa, probablemente el impacto sobre la salud humana pase bastante desapercibido.

La letalidad del cianuro se debe a su capacidad para inhibir la respiración, ya que es un potente inhibidor de la citocromo oxidasa, enzima de la cadena respiratoria. Además inhibe otras enzimas dependientes de metales como

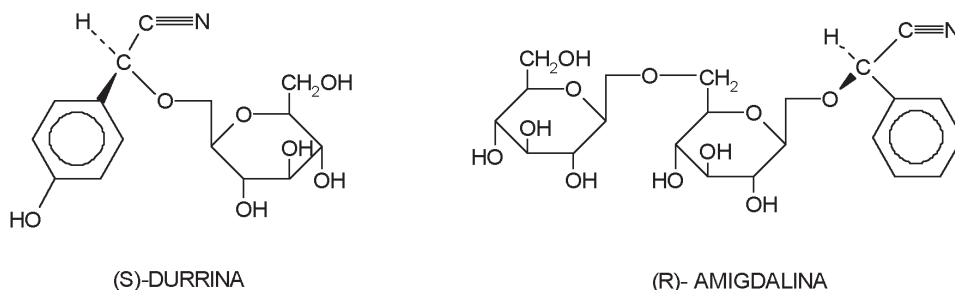


Figura 10.1. Estructura química de algunos glucósidos cianogénicos.

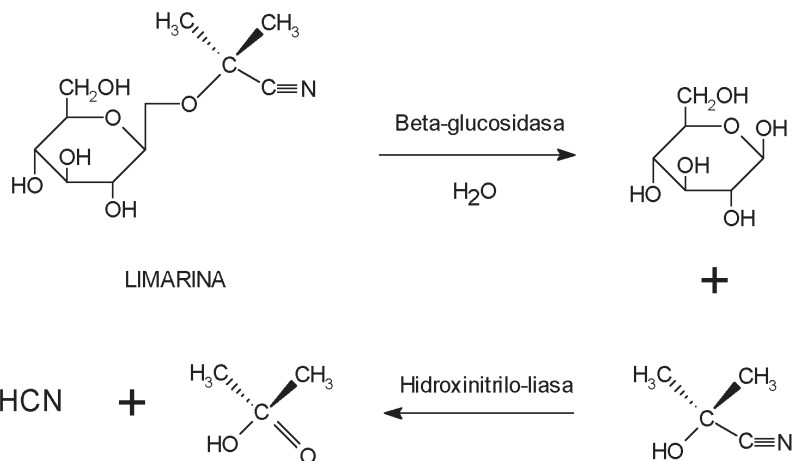


Figura 10.2. Hidrólisis enzimática de la limarina, glucósido cianogénico presente en la lima.

nitrato reductasa, xantino oxidasa (Mb); fosfatasa alcalina, anhidrasa carbónica (Zn); ascorbato oxidasa (Cu); y también otras no dependientes de metales (Deshpande y Sathe, 1991). La dosis letal mínima en la especie humana se estima está entre 0,5 y 3,5 mg/kg peso corporal (equivalente a 30-210 mg para una persona de 60 kg). El HCN se absorbe rápidamente del tracto gastrointestinal y produce síntomas tanto a dosis letales como subletales. A dosis subletales, por la acción de la enzima rodanasa, ampliamente distribuida en los tejidos animales, se puede convertir también en tiocianato, que es un conocido factor desencadenante del bocio.

Glucosinolatos: compuestos bociógenos

Los glucosinolatos son glucósidos con azufre en su estructura molecular que se encuentran exclusivamente en plantas crucíferas, especialmente en las semillas. Están presentes a concentraciones relativamente altas en las familias *Brassicaceae*, *Capparaceae* y *Resedaceae*. Alimentos que contienen este tipo de compuestos son: la berza o col, coles de Bruselas, brócoli, coliflor, nabo, rábanos, mandioca, semillas de colza o semillas de mostaza, con una cantidad

total variable en un rango entre 0,21 y 60 mg/g (Tabla 10.2). Se conocen aproximadamente 80 glucosinolatos de origen natural (Verkerk *et al.*, 1998). La cantidad relativa de glucosinolatos en una determinada especie vegetal depende tanto de factores genéticos, como de determinadas prácticas agronómicas.

La estructura química común de los glucosinolatos se presenta en la Figura 10.3.

En casi todos los casos el azúcar es la D-glucosa y la cadena lateral R puede estar constituida por un grupo alifático saturado o insaturado, un grupo aromático o un heterociclo, normalmente con grupos hidroxilo (que pueden estar glucosilados) y grupos terminales metiltiol y sus análogos oxidados, ésteres y cetonas (Fenwick

Tabla 10.2. Contenido total de glucosinolatos en alimentos de origen vegetal.

Alimento	Glucosinolatos (mg/g)
Berza	0,26-1,56
Coles de Bruselas	0,60-3,90
Coliflor	0,61-1,14
Nabo	0,21-2,27
Rábano	0,42-1,19
Rábano picante	33,2-35,4
Semillas de mostaza	18,0-60,0
Semillas de colza	13,0-42,0

Datos tomados de: Deshpande, 2002

et al., 1989; Verkerk *et al.*, 1998). La cadena lateral es la que determina la naturaleza química de los productos de hidrólisis y, por lo tanto, sus efectos biológicos y potencia. Las propiedades químicas de los glucosinolatos y sus productos de hidrólisis han sido revisados por Rosa *et al.*, (1997).

Las plantas ricas en glucosinolatos tienen efectos adversos sobre la salud y crecimiento de los animales. Así, en algunas especies la presencia en el pienso de semillas de colza disminuye la ingesta de alimento y el crecimiento de los animales, mientras que aumenta el tamaño de su hígado, riñón, glándulas tiroideas y adrenales (Verkerk *et al.*, 1998). En la especie humana se relaciona con una disminución de la función tiroidea y el desarrollo del bocio.

Los glucosinolatos que actúan como probociógenos dan lugar a isotiocianatos, nitrilos y tiocianatos (Figura 10.3). Estos compuestos generalmente se forman por la acción enzimática de las mirosinasas o tioglucosidasas (EC 3.2.3.1). Estas enzimas se localizan en la planta, en compartimentos celulares separados de los glucosinolatos, y se liberan cuando las células vegetales se dañan, al cortar o aplastar los vegetales (Fenwick y Heaney, 1983). El complejo

glucosinolatos-mirosinasa constituye un sistema de defensa de la planta frente a los insectos. Con menor frecuencia, los productos de los glucosinolatos se pueden formar por hidrólisis química o por la acción de enzimas no presentes en la planta, como pueden ser aquellos presentes en la población microbiana intestinal.

Los bociógenos actúan impidiendo la absorción de yodo por la glándula tiroidea y, por consiguiente, reduciendo la síntesis de las hormonas tiroideas triyodotironina y tiroxina. Los bociógenos presentes en la mandioca se consideran responsables de la diferente distribución y severidad del bocio endémico en algunas zonas de África.

Los glucosinolatos tienen también ciertas propiedades beneficiosas, ya que el conocido efecto protector de las plantas crucíferas frente al cáncer se ha atribuido al contenido relativamente alto en glucosinolatos, y en particular a los isotiocianatos que se generan en su hidrólisis enzimática. Estas propiedades anticarcinógeno se han demostrado en roedores con una gran variedad de carcinógenos químicos (Verkerk *et al.*, 1998). También en la especie humana se ha demostrado, en numerosos estudios de casos y controles, que un consumo relativamente eleva-

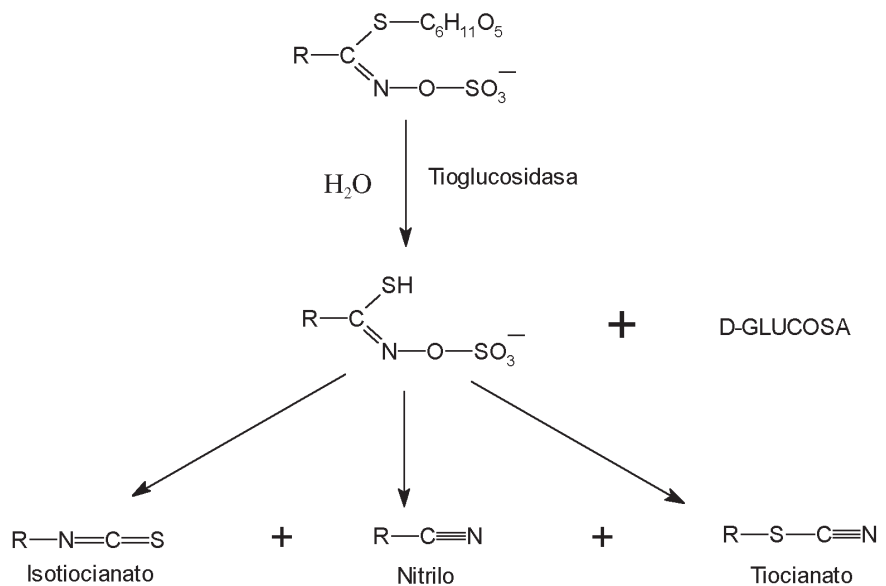


Figura 10.3. Estructura química general de los glucosinolatos e hidrólisis enzimática.

do de vegetales brassica disminuía el riesgo de cáncer de colon (Steinmetz y Potter, 1991). Se relaciona ese efecto anticarcinógeno con la inducción de enzimas de fase II en la mucosa del intestino delgado e hígado, que actuarían en reacciones de destoxicación de carcinógenos (Zhang *et al.*, 1992; Talalay y Zhang, 1996); también se les ha atribuído un papel como supresores del desarrollo tumoral a través de la inducción de la apoptosis o muerte celular programada (Smith *et al.*, 1996).

Compuestos fávicos: β -glucósidos de *Vicia faba*

Se conoce como favismo la crisis hemolítica que sobreviene en algunos individuos después de haber comido semillas de *Vicia faba* (habas). Es una patología propia de la cuenca mediterránea y del oriente medio, conocida ya en el mundo helénico y que fue recogida por primera vez en la literatura médica hacia mediados de la década de los 50 (Chevion *et al.*, 1983). Actualmente se conoce bien su patogénesis por los estudios que se han realizado de tipo genético, bioquímico y epidemiológico.

Los agentes causales de esta enfermedad son dos β -glucósidos, denominados vicina y convicina, cuyas estructuras se presentan en la Figura 10.4. Parece ser que estos glucósidos se encuentran exclusivamente en especies del género *Vicia*, a una concentración en relación al peso seco de 0,75-0,19% en *V. faba* (Pitz *et al.*, 1980). Factores genéticos y ambientales influyen en la concentración de estos compuestos en las semillas de *V. faba*. Los glucósidos se sintetizan en etapas tempranas del desarrollo de la semilla y su concentración disminuye conforme esta madura, por lo que se encuentran niveles más altos en las semillas verdes que en las maduras. Los procesos culinarios tienen poco efecto sobre el contenido de estos glucósidos.

La hidrólisis de estos compuestos por la actividad de las β -glucosidasas de la población bac-

teriana intestinal libera las pirimidinas divicina e isouramilo, que son especies que generan una gran cantidad de radicales libres (Figura 10.4). Se piensa que estos dos compuestos son los responsables de las crisis de favismo, además de causar también otros efectos adversos, como son peroxidación lipídica o alteración del metabolismo de ácidos grasos y mitocondrial (Marquardt, 1989). Los efectos de los radicales libres se pueden contrarrestar mediante compuestos capaces de ceder un hidrógeno, como las vitaminas antioxidantes C y E, o el glutatión (GSH).

Las crisis de favismo ocurren solo en personas deficientes en glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.49), enzima que tiene una gran importancia para el funcionamiento normal de los hematíes, ya que contribuye al mantenimiento de los niveles de GSH. En efecto, la glutatión reductasa regenera el glutatión reducido a partir de dos moléculas de glutatión oxidado en una reacción que requiere NADPH. Como en las células sanguíneas no existe más vía metabólica para la síntesis de NADPH que la de las pentosas-fosfato, la presencia de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa resulta fundamental para mantener unos niveles de GSH suficientes que aseguren la integridad celular de los eritrocitos.

La divicina e isouramilo disminuyen rápidamente los niveles de GSH de los eritrocitos deficientes en glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, causando la hemólisis. Las manifestaciones clínicas son: anemia hemolítica, hemoglobinuria e ictericia, a menudo acompañada de fiebre. Los síntomas aparecen pocas horas después de la ingesta y, en los casos más graves, la muerte puede ocurrir a las 24-48h. La deficiencia en glucosa-6-fosfato deshidrogenasa es una metabolopatía congénita relativamente frecuente en países de la cuenca mediterránea que confiere una mayor susceptibilidad a padecer crisis hemolíticas, no solo por el consumo de habas, sino también por otros compuestos como la primaquina, compuesto antimalaria. El favismo no ocurre en personas sin esa deficiencia y, por lo tanto, no se considera un problema grave.

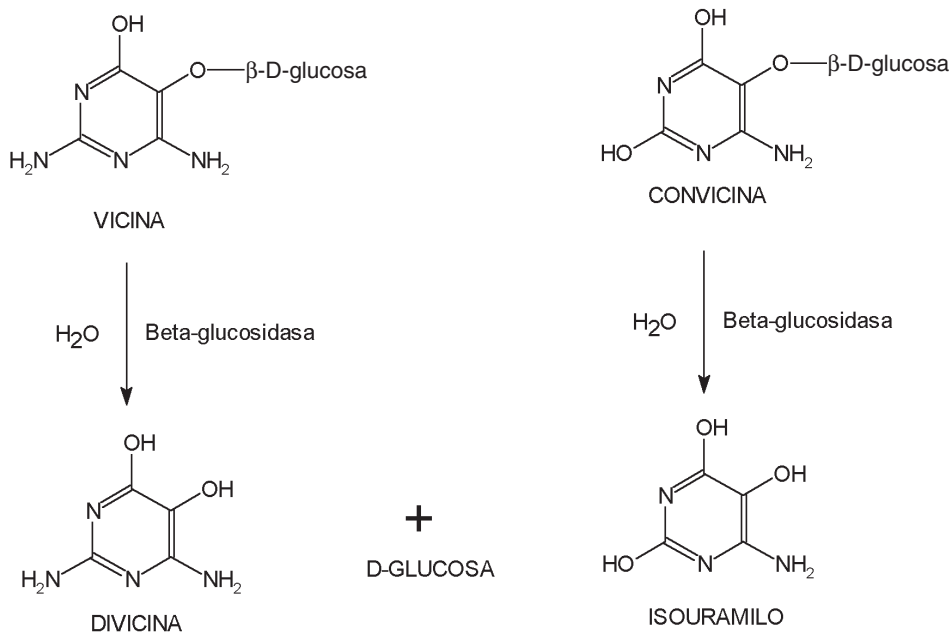


Figura 10.4. Estructura de la vicina y convicina. Hidrólisis enzimática que da lugar a la divicina e isouramilo, respectivamente.

Latirógenos: aminoácidos no proteicos

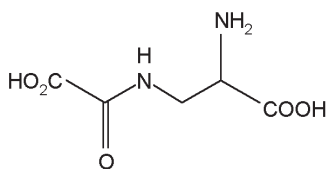
El consumo de algunas especies del género *Lathyrus* produce alteraciones neurológicas caracterizadas por paraparesia espástica, tanto en animales como en la especie humana. Esta enfermedad se llama latirismo y comienza con dolor de espalda y rigidez de las piernas; en fases posteriores se produce debilidad muscular y, en los casos más graves, parálisis de las piernas. Afecta sobre todo a varones entre 20 y 29 años (Concon, 1988).

Es una enfermedad que se conoce desde los tiempos de Hipócrates (Seley, 1975) y que hoy día todavía adquiere el carácter de epidemia en algunas regiones de la India, en épocas de sequía o de inundaciones, cuando otras plantas quedan destruidas y únicamente sobrevive la especie *L. sativus* (Roy y Spencer, 1989).

Se distinguen dos tipos de latirismo: el osteo-latirismo y el neurolatirismo. El primero se

produce en ratas y otros animales de experimentación por la ingesta de semillas de *L. odoratus*, *L. hirsutus* y *L. pusillus*; el segundo se produce en el ser humano por el consumo prolongado de semillas de *L. sativus*.

Se han estudiado diversos compuestos que podrían estar implicados en el desarrollo de estas dos variantes de enfermedad. Parece ser que los trastornos neurológicos propios de la enfermedad humana se deben a la actividad del ácido 3-N-oxalil-L-2,3-diaminopropiónico (ODAP), que es un aminoácido que no forma parte de las proteínas humanas (Figura 10.5). Este compuesto resulta convulsivante en roedores y primates, y en la rata produce diversas alteraciones en células del sistema nervioso (Olney *et al.*, 1976). Debido a su semejanza con el ácido glutámico, el ODAP interfiere también con el sistema específico de transporte de aspartato y glutamato y produce anomalías en la médula espinal. Algunos latirógenos semejantes a este se han identificado en semillas de *Vicia* spp.



Acido 3 -N-oxalil-L-2,3-diaminopropiónico (ODAP)

Figura 10.5. Estructura química del neurolatirógeno presente en semillas de *Lathirus sativa*.

El compuesto β -aminopropionitrilo es responsable del osteolatrismo que aparece en animales de experimentación (DuPuy y Lee, 1954). Este compuesto, sin embargo, y otros osteolatrógenos, no producen efectos tóxicos sobre el sistema nervioso, sino que interfieren con la reacción inicial de formación de puentes cruzados en los tejidos conjuntivos, que tienen como consecuencia un aumento en la solubilidad del colágeno y la aparición de deformidades en los huesos, además de otros efectos (Deshpande, 2002).

Se han sugerido diversos métodos para la eliminación del ODAP de las semillas de *L. sativus* (Mohan *et al.*, 1966). Así, por ejemplo, el tostado de la semilla a 150 °C durante 20 minutos destruye aproximadamente el 85% del ODAP; también se elimina parte del mismo si las semillas se someten a procesos de remojo en agua fría y caliente alternativamente, si bien la eliminación nunca es completa.

Otros aminoácidos tóxicos

Además de los aminoácidos latirógenos, otros aminoácidos están también presentes en la cadena alimentaria ejerciendo su efecto tóxico como antimetabolitos. Hay que tener en cuenta que las plantas sintetizan cientos de aminoácidos, de los cuales tan solo 20 forman parte de las proteínas. Los aminoácidos no proteicos están presentes en muchas familias de plantas pero son muy característicos de las leguminosas.

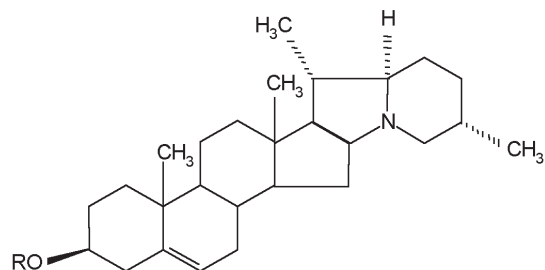
En Sumatra y Java se consumen en abundancia semillas de *Pithecolobium lobatum*, árbol de la familia Leguminosae, que contiene ácido djencólico, semejante a la cisteína. Este aminoácido no proteico es muy poco soluble y si no es metabolizado, cristaliza en los túbulos renales y en la orina. La ingestión de grandes cantidades de este ácido puede producir insuficiencia renal, con aparición de hematuria y cristales aciculares en la orina (Lindner, 1991).

La mayor parte de los que son tóxicos para el ser humano producen síntomas de intoxicación de carácter crónico, lo que sugiere que se produce un efecto acumulativo cuando constituyen parte de la dieta normal durante un periodo prolongado de tiempo. Muchos de estos compuestos, debido a su analogía estructural con los aminoácidos proteicos, ejercen su toxicidad alterando los sistemas enzimáticos.

Glucoalcaloides de las patatas

La solanina es un glucoalcaloide que se descubrió en las patatas en el año 1826 (Cheeke y Shull, 1985). Está constituido por un núcleo alcaloide esteroideo, denominado solanidina, y una cadena lateral de azúcares (Figura 10.6). Posteriormente se descubrió otro glucoalcaloide en la patata o papa, la chaconina, con el mismo núcleo alcaloide y distinta cadena lateral (Figura 10.6). En la actualidad se conocen diversos glucoalcaloides que difieren tanto en el grupo aglucona como en la cadena de azúcares (Deshpande, 2002). En diversas especies de *Solanum*, tanto de patata como de tomate, se sintetiza este tipo de compuestos.

Estos compuestos se encuentran en diferentes partes de la planta de la patata: tubérculos, pieles, brotes y flores. Las partes verdes de la planta (brotes y pieles verdes) presentan las concentraciones más elevadas. Su concentración en los tubérculos depende de la variedad de patata, grado de maduración, factores ambientales y de



Solanidina: R = H
 Solanina: R = Galactosil-glusil-ramnosil
 Chaconina: R = Glucosil-ramnosil-ramnosil

Figura 10.6. Estructura química de la solanina y chaconina, glucoalcaloides presentes en las patatas, y de su forma aglucona, la solanidina.

estrés; también las infecciones bacterianas y fúngicas pueden aumentar su concentración. Por su potencial tóxico se considera que en la planta tienen un papel de defensa de la misma frente a cualquier tipo de agresión.

Los tubérculos se ponen verdes por exposición a la luz durante el crecimiento o después de la cosecha y adquieren esa tonalidad por la clorofila; parece ser que las mismas condiciones ambientales favorecen la síntesis tanto de clorofila como de glucoalcaloides (Jadhav *et al.*, 1981). Por lo tanto, cambios en el contenido en glucoalcaloides de las patatas se pueden producir durante el almacenamiento de las mismas, por la influencia de la luz y de las radiaciones (Friedman y McDonald, 1999).

Este tipo de compuestos presentan actividad anticolinérgica y la intoxicación produce dos tipos de efectos: alteraciones gastrointestinales y del sistema nervioso. Puesto que se absorben relativamente mal por el tracto gastrointestinal, los efectos son más acusados cuando estos compuestos se administran por vía parenteral (Nishie *et al.*, 1971). Por otra parte, los glucósidos son más tóxicos que las correspondientes agluconas.

Los efectos sobre el sistema nervioso se deben a la acumulación de acetilcolina en las terminaciones nerviosas y se manifiestan como temblor, aumento de la salivación, debilidad

muscular, convulsiones, coma. Entre los efectos gastrointestinales se pueden citar inflamación de la mucosa intestinal, hemorragias, dolor abdominal, estreñimiento o diarrea. También se han sugerido efectos teratogénicos (Renwick, 1972). Se han referido casos de intoxicación no solo en la población humana, sino también en animales de granja alimentados con patatas estropeadas o expuestas al sol (Deshpande, 2002).

Los glucoalcaloides de *Solanum* spp. no se destruyen por los procedimientos culinarios habituales (cocción, fritura, asado) (Jadhav *et al.*, 1997; Cheeke y Shull, 1985). La incidencia relativamente baja de intoxicaciones por solanina se debe a tres factores: su mala absorción gastrointestinal, la rápida excreción de sus metabolitos, y su hidrólisis en el intestino, dando lugar a la solanidina, que es menos tóxica.

A pesar de ello, en las nuevas variedades de patata que van surgiendo se determina el nivel de glucoalcaloides, que debe estar siempre por debajo de 20 mg/100 g (Jadhav *et al.*, 1997; Plahk y Sporns, 1997). Concentraciones superiores a 14 mg/100 g dan un sabor amargo y por encima de 20 mg/100 g producen sensación de quemazón en la boca y garganta (Deshpande, 2002).

Alcaloides de pirrolizidina

Los alcaloides de pirrolizidina constituyen un grupo de aproximadamente 200 compuestos distintos. Se encuentran principalmente en las familias *Boraginaceae*, *Compositae* y *Leguminosae*, pero también en *Apocynaceae*, *Ranunculaceae* y *Scrophulariaceae*. Algunas especies contienen un único alcaloide de pirrolizidina pero en muchas otras se encuentran entre cinco y ocho distintos.

La estructura pirrolizidina está constituida por dos ciclos de cinco átomos fusionados que comparten un átomo de nitrógeno y con distintos sustituyentes en las posiciones C-1 y C-7 (Figura 10.7).

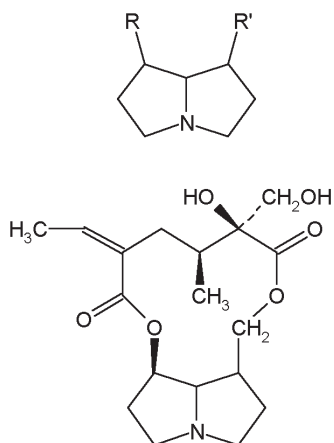


Figura 10.7. Estructura general de los alcaloides de pirrolizidina. Estructura química de la retrorsina.

Se han referido intoxicaciones por alcaloides de pirrolizidinas en animales de granja, que han producido graves pérdidas económicas; también en la especie humana, causada bien por la ingestión de granos inadvertidamente contaminados con semillas que contienen pirrolizidinas, bien por el consumo de té e infusiones herbales con fines medicinales (Stewart y Steenkamp, 2001). Las intoxicaciones a gran escala se han debido fundamentalmente a la contaminación de cereales con semillas de plantas que contienen estos alcaloides (Crews, 1998). El riesgo de este tipo de intoxicación en países pobres es muy alto, ya que en situaciones de hambre y sequía es frecuente el consumo de cereales de baja calidad.

Las ingestas intencionadas se deben sobre todo a la utilización de plantas medicinales, si bien en algunos países como Japón, se toman como vegetales plantas de *Petasites*, *Symphytum* y *Tussilago* spp., que contienen estos alcaloides. En Jamaica, el 70% de la población bebe infusiones hechas con mezclas de hojas de especies silvestres de los géneros *Senecio*, *Crotalaria* y *Heliotropo*. Las intoxicaciones accidentales no son infrecuentes hoy día, debido al éxito creciente en los últimos años de las terapias alternativas, hierbas medicinales e infusiones exóticas.

El metabolismo y toxicidad de estos compuestos se ha estudiado en profundidad y hay

numerosos artículos de revisión (Crews, 1998; Stewart y Steenkamp, 2001). Algunos compuestos son hepatotóxicos y hepatocarcinógenos en animales de experimentación. En el ser humano el consumo de hierbas que contienen alcaloides de pirrolizidina podría estar asociado a una alta incidencia de enfermedad hepática crónica y cáncer hepático en países asiáticos y africanos, especialmente cuando actúan en sinergia con los agentes hepatotóxicos aflatoxina y virus de la hepatitis B (Arseculeratne *et al.*, 1981). Una vez ingeridos, los alcaloides de pirrolizidina experimentan bioactivación en el hígado dando lugar a metabolitos muy reactivos capaces de formar aductos con el ADN, ARN y proteínas. En el hígado la principal manifestación del efecto tóxico es enfermedad veno-oclusiva, trombosis venosa e ictericia. De manera secundaria también se han referido efectos en los pulmones, corazón, riñón, estómago y sistemas nervioso y reproductor (Huxtable, 1989). Los niños parecen ser especialmente vulnerables.

Fitoestrógenos

Los estrógenos son compuestos esteroideos producidos por los mamíferos que sirven para mantener los caracteres sexuales femeninos. El principal estrógeno humano es el 17β -estradiol (Figura 10.8). Los fitoestrógenos son un grupo de compuestos sintetizados por algunas plantas que, aunque carecen de la estructura esteroidea, tienen propiedades similares al 17β -estradiol. En algunos alimentos de origen vegetal el contenido en fitoestrógenos es relativamente alto y, por lo tanto, las implicaciones desde el punto de vista de la salud humana resultan de gran interés (Helferich *et al.*, 2001).

Los compuestos responsables de la actividad estrogénica responden a tres tipos de estructuras: isoflavonas, cumarinas y lactonas del ácido resorcíclico (Figura 10.8). Son isoflavonas la mayoría de los fitoestrógenos que se encuentran en las plantas; las más comunes son: genisteína, genistina, daidzen, biochanina A, formononetina

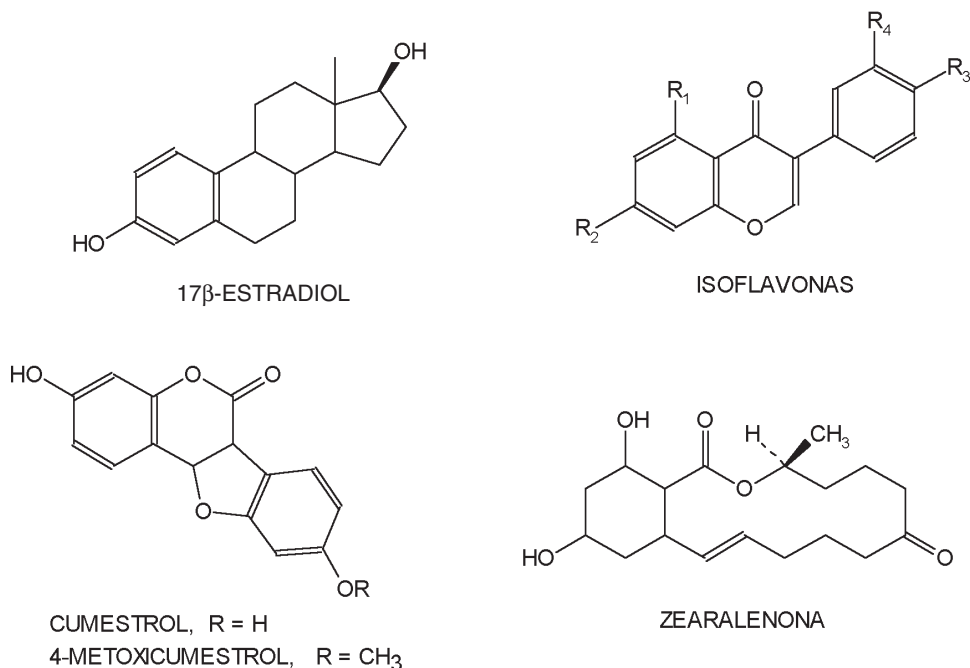


Figura 10.8. Estructura del 17β-estradiol. Estructura de fitoestrógenos: isoflavonas, cumarinas y lactonas del ácido resorcíclico (zearalenona).

y pratenseína; las cumarinas más importantes, cumestrol y 4-metoxicumestrol; zearalenona es una lactona del ácido resorcíclico presente en las plantas que también puede ser sintetizada por varias especies de *Fusarium*, y por lo tanto es también una micotoxina que tiene sus propias vías para introducirse en la cadena alimentaria (de Nijs *et al.*, 1996).

Se ha comparado la afinidad de estas estructuras por los receptores de estrógeno en relación con la del 17β-estradiol. Todos ellos son menos potentes que la hormona natural, siendo el orden relativo de potencia 17β-estradiol > cumestrol > zearalenona > genisteína (Aldridge y Tahourdin, 1998).

Se ha referido actividad estrogénica en frutas, vegetales, cereales y aceites. Así por ejemplo, cerezas, manzanas, zanahorias, ajo, patatas, perejil, trigo, maíz, cebada, aceite de oliva, etc. El contenido en fitoestrógenos de algunos alimentos se presenta en la Tabla 10.3. Las semillas y brotes de soja son una fuente muy rica en

isoflavonas; en general, los alimentos a base de soja constituyen el principal aporte de fitoestrógenos en la dieta humana.

Entre los efectos fisiológicos de los fitoestrógenos se pueden citar hipertrofia de la vagina, útero y glándulas mamarias en las hembras de mamífero e hipertrofia de glándulas accesorias y

Tabla 10.3. Contenido en isoflavonas de distintos alimentos vegetales.

Alimentos	Isoflavonas (µg/g)
Semillas de soja, secas	1.953,0
Harina de soja	1.777,3
Semillas de soja, frescas	181,7
Guisantes, secos	72,6
Alubias blancas, secas	15,6
Garbanzos, secos	15,2
Alubias pintas, secas	10,5
Alubias rojas, secas	3,1
Alubias verdes, frescas	1,5

Datos tomados de: Deshpande, 2002

desarrollo de características secundarias femeninas en los machos de mamífero. El grado de desarrollo de estos signos depende de la cantidad de estrógeno, de la duración de la exposición y de la especie animal. Generalmente estos efectos son transitorios y desaparecen con el cambio de dieta, a menos que los animales hayan sido expuestos a concentraciones muy elevadas de estos compuestos durante periodos de tiempo muy prolongados.

Los estrógenos también se han relacionado con la inducción de cáncer; el riesgo parece estar relacionado tanto con la cantidad de estrógenos presente en la comida como con su propia actividad biológica (Stob, 1983; Quattrucci, 1987; Aldridge y Tahourdin, 1998).

El efecto real de los aportes alimentarios en el caso de los seres humanos no está bien definido. En todo caso, parece poco probable que las dietas normales puedan constituir un peligro, desde el punto de vista del equilibrio hormonal, debido a los bajos niveles que representa su ingesta, por lo reducido de sus concentraciones en los alimentos vegetales.

También se han referido efectos beneficiosos para los fitoestrógenos, principalmente sobre la base de las diferencias observadas en la incidencia de enfermedades crónicas entre la población oriental y la occidental. Están documentados los efectos sobre el colesterol y posiblemente en la

enfermedad coronaria; también se aboga por los efectos beneficiosos de alimentos a base de soja en mujeres postmenopáusicas (Deshpande, 2002). No obstante todos estos aspectos necesitan ser confirmados con más investigación, ya que no se han establecido niveles seguros de consumo de fitoestrógenos (Helferich *et al.*, 2001).

Aminas vasopresoras

Algunos alimentos contienen sustancias que producen alteraciones en la función cardiovascular y que se denominan aminas vasoactivas o vasopresoras por contener en su estructura un radical amino (Figura 10.9). Se encuentran en este grupo la tiramina, dopamina, norepinefrina, triptamina, feniletilamina, histamina. También manifiestan este tipo de efectos las metilxantinas, que se comentarán en el siguiente apartado.

La mayor parte de estos compuestos se metabolizan rápidamente a través de una desaminación oxidativa catalizada por monoamino oxidasa (MAO) y no representan un verdadero riesgo para la salud humana. Ahora bien, sus efectos hay que tenerlos en cuenta en personas tratadas con inhibidores de MAO (iMAO), medicamentos utilizados en la terapia antidepresiva. Así, la

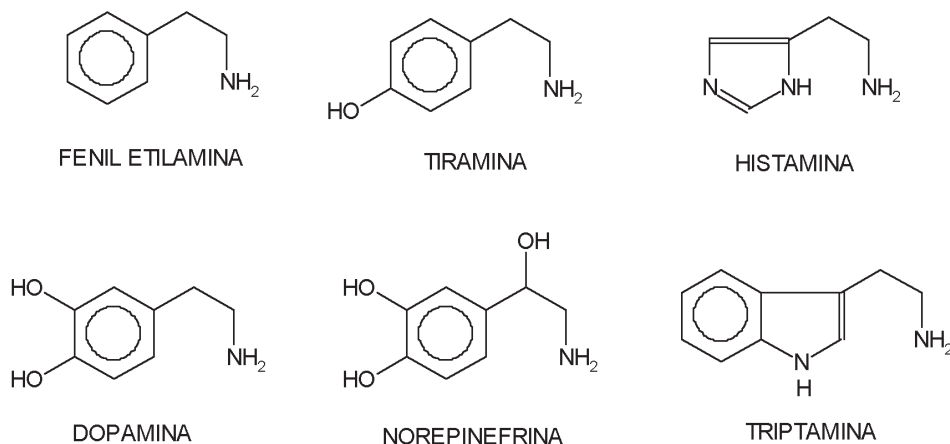


Figura 10.9. Estructura química de algunas aminas vasopresoras presentes en los alimentos.

ingesta de alimentos ricos en tiramina como queso, vinos, aguacate, naranja, plátano o tomate, puede producir dolores intensos de cabeza, hipertensión y, en los casos más severos, hemorragia intracraneal y muerte (Blackwell *et al.*, 1967). No obstante, la prevalencia de la hipertensión en personas medicadas con iMAO después de tomar alimentos que contienen aminas vasopresoras es muy bajo, tan solo del 8,4% (Bethune *et al.*, 1964). También fenil-etilamina, presente en los chocolates, quesos y vinos tintos, puede provocar crisis de migraña (Sandler *et al.*, 1974). Los mecanismos por los cuales estas aminas provocan el dolor de cabeza es desconocido, aunque se relaciona con cambios en el flujo sanguíneo cerebral.

Sustancias psicoactivas

Ciertos compuestos presentes en los alimentos tienen actividad sobre el sistema nervioso central. La mayor parte de ellos son nitrogenados y, en función de su estructura química, se pueden agrupar en feniletilaminas, tropanos, triptaminas y xantinas (Figuras 10.9 a 10.12). Otros no contienen ningún átomo de nitrógeno en su estructura, como por ejemplo la miristicina presente en *Myristica fragans*, el árbol que proporciona la nuez moscada, o la carotatoxina, que se encuentra en el apio y en las zanahorias, y que resulta muy neurotóxica para el ratón (Deshpande, 2002) (Figura 10.10).

La nuez moscada y su pariente, el macís, se han usado mucho en medicina popular con una gran variedad de aplicaciones (reumatismo, cólera, desórdenes digestivos) y también se ha empleado como veneno debido a su efecto depresivo del sistema nervioso central. Las reacciones a la nuez moscada varían mucho, desde falta de efectos a experiencias típicamente alucinógenas (Shibamoto y Bjeldanes, 1993). La miristicina, que constituye aproximadamente el 4% del aceite esencial de la nuez moscada, se ha identificado también en la pimienta negra, perejil, apio, enel-

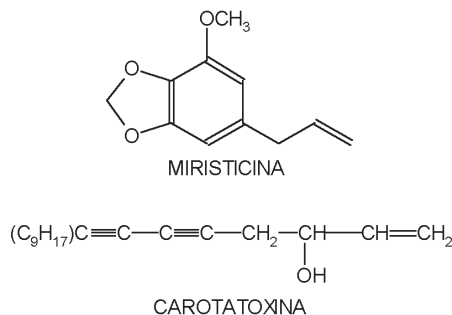


Figura 10.10. Estructura química de la miristicina, presente en la nuez moscada, y la carotatoxina, presente en zanahoria y apio.

do y miembros de la familia de la zanahoria. La miristicina pura no es tan potente como la nuez moscada. Por ello se piensa que, además de la miristicina, otras sustancias serían responsables también de las propiedades psicoactivas de esta especie (Shibamoto y Bjeldanes, 1993).

1. Alcaloides psicoactivos

Entre los alcaloides psicoactivos se pueden citar la mescalina (3,4,5-trimetoxifenil-etilamina), que se encuentra en un cactus de México; la dioscorina, tropano presente en diversas especies de batata, que produce depresión del SNC y convulsiones (Deshpande, 2002) y varias triptaminas, presentes en diversas especies de hongos basidiomicetos, con propiedades alucinógenas (Figura 10.11). Así, por ejemplo, la seta *Psilocybe mexicana* produce una sintomatología semejante a la esquizofrenia, que se atribuye a los alcaloides psilocina y psilocibina; también la *Amanita muscaria* contiene bufotenina, con propiedades alucinógenas.

Entre las xantinas, la cafeína y la teobromina son las más frecuentes en la dieta habitual, mientras que la teofilina es un constituyente dietético minoritario. Todos estos compuestos son derivados metilados de la xantina y difieren exclusivamente en el número y posición de los grupos metilo (Figura 10.12).

La cafeína es la única metilxantina presente en el café; el té contiene cafeína, teobromina y

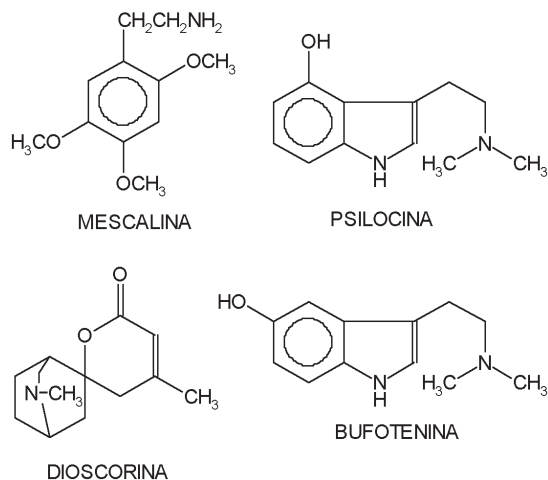
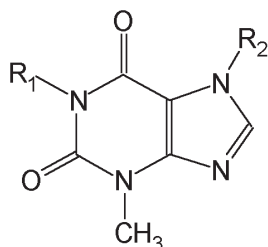


Figura 10.11. Estructura química de algunos alcaloides psicoactivos presentes en productos vegetales.

teofilina, en orden decreciente de concentración; el cacao contiene fundamentalmente teobromina, en menor cantidad cafeína y trazas de teofilina. La cafeína es la única metilxantina añadida a las bebidas. En función de estos datos y de consumo se estima que el mayor aporte de cafeína en la dieta es por bebida de café.

Las metilxantinas son compuestos vasoactivos con efectos sobre el sistema cardiovascular. Producen aumento de la presión sanguínea y del gasto cardíaco, probablemente porque aumenta



CAFEINA: $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{CH}_3$

TEOFILINA: $\text{R}_1 = \text{CH}_3$, $\text{R}_2 = \text{H}$

TEOBROMINA: $\text{R}_1 = \text{H}$, $\text{R}_2 = \text{CH}_3$

Figura 10.12. Estructura química de las metilxantinas presentes en alimentos.

la concentración urinaria de las aminas vasoconstrictoras epinefrina y norepinefrina (por aumento de su liberación) (Atuk *et al.*, 1967); Bellet *et al.*, 1969).

La toxicidad aguda de las metilxantinas se ha estudiado en diversas especies animales. Para la cafeína la DL_{50} oral está en un rango entre 125 y 246 mg/kg; para la teobromina entre 959 y 1350 mg/kg y para la teofilina 332 mg/kg en ratón, lo que las coloca entre las sustancias moderadamente tóxicas (Deshpande, 2002). La muerte se produce por fallo respiratorio después de convulsiones. En la especie humana se han referido casos de muerte por ingestas masivas; la toxicidad se manifiesta por alteraciones de la conciencia, seguido de convulsiones, vómitos y coma.

Los posibles efectos mutagénicos y carcinogénicos del café y té, así como de las metilxantinas, se han estudiado muy ampliamente y existen numerosas revisiones al respecto (IARC, 1991; Mohr *et al.*, 1993). A la vista de los resultados se puede afirmar que estos compuestos no resultan carcinógenos en los animales de experimentación.

Compuestos con actividad cancerígena

1. Cicasina y compuestos afines

La cicasina y otros glucósidos relacionados se encuentran en diversas especies de la familia *Cycadaceae* que habitan en zonas tropicales y subtropicales del Pacífico y Caribe, México, Florida, Japón y sudeste asiático. Son plantas muy resistentes frente a las condiciones climáticas adversas, de tal manera que, por ejemplo, durante la estación de los tifones, cuando otros cultivos se destruyen, constituyen la principal fuente de subsistencia. Se ha encontrado cicasina en *Cycas revoluta* y *C. Circinalis* (Deshpande, 2002).

Este glucósido, cuya estructura se presenta en la Figura 10.13, y otros azoxiglucósidos análogos presentes en *Cicas* spp., solamente manifiestan sus efectos tóxicos cuando se adminis-

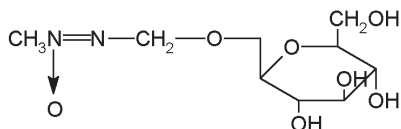


Figura 10.13. Estructura química de la cicasina.

tran por vía oral; por vía parenteral, no resultan tóxicos. Su toxicidad es dependiente de la hidrólisis que se produce en el tracto gastrointestinal que libera la forma aglucona.

La cicasina es capaz de inducir tumores benignos y malignos en hígado, duodeno, colon, recto y riñones en roedores. También se considera como probable carcinógeno humano (Concon, 1988).

Estas toxinas son muy hidrosolubles, por lo que su presencia se puede reducir lavando con agua abundante (Whiting, 1963).

2. Safrol y compuestos afines

El safrol es un compuesto ampliamente distribuido en el reino vegetal (alrededor de 50 especies y variedades pertenecientes a 10 familias) (Figura 10.14). Está presente en muchas especies y aceites esenciales como el del azafrán, el del anís estrellado y el del alcanfor. También se encuentra en la nuez moscada, macís, jengibre silvestre japonés, hojas de laurel de California y aceite de hojas de canela. Se utilizó como agente saborizante en bebidas no alcohólicas y otros alimentos. Sin embargo, se interrumpió su uso al descubrir su actividad hepatocarcinógena en roedores.

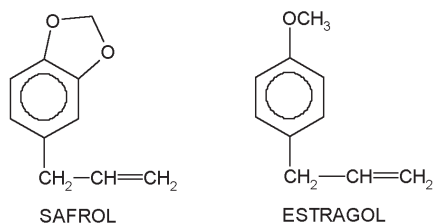


Figura 10.14. Estructura química del safrol y del estragol.

La DL_{50} en rata es de 1.950 mg/kg. Se descubrió que induce tumores hepáticos en rata después de dos años de administración del compuesto a altas dosis: con un 0,5% en la dieta aparecían tumores malignos; con un 0,1% tumores benignos. A pesar de ello, las altas dosis necesarias para que se produzca el efecto carcinógeno sugiere que, en las condiciones dietéticas normales, estos compuestos no representan un riesgo para la salud humana (Deshpande, 2002).

Una sustancia semejante es el estragol, que es un componente del aceite esencial de estragón, producido por *Artemisia dracuncululus*, que se utiliza como aromatizante (Figura 10.14). El estragol produce cáncer hepático en los ratones macho jóvenes (Shibamoto y Bjeldanes, 1993).

Otros metilendioxi-bencenos se encuentran en otras muchas plantas. Así, la miristicina en la nuez moscada, el apiol en perejil y apio; sesamol y análogos en la semilla de sésamo; sin embargo, su actividad como carcinógenos es inferior a la del safrol (Miller, 1983).

3. Polifenoles: flavonoides y taninos

Los *flavonoides* son unos pigmentos ampliamente distribuidos entre los alimentos humanos de origen vegetal. Por su amplia distribución, los efectos de estos compuestos sobre la salud humana se consideran de gran interés. Se estima que en la dieta se ingiere diariamente más de 1 g de flavonoides diversos (Janssen *et al.* 1997).

Desde el punto de vista estructural, son derivados de polihidroxi-2-fenilbenzo-g-pirona, que se pueden encontrar como glucósidos, agluconas o ésteres metílicos, siendo más frecuentes los β -glucósidos. Se dividen en seis grandes grupos: flavonas, flavononas, isoflavonas, antocianidinas, chalconas y auronas.

El grupo de las flavonas es un grupo de pigmentos de color amarillo que se encuentran en los cítricos, generalmente localizados en las vesículas de la piel. Se ha estudiado en profundidad sus posibles efectos mutagénicos. Así, la quercitina (Figura 10.15) es un compuesto mutagénico en el test de Ames que también ha

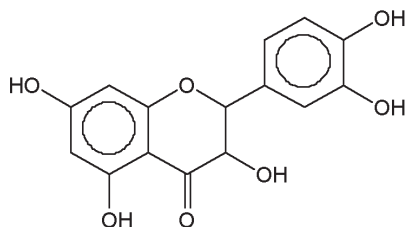


Figura 10.15. Estructura de la quercetina.

resultado carcinogénico en animales de experimentación tras administración oral (Janssen *et al.*, 1997).

Los *taninos* son un grupo heterogéneo de compuestos ampliamente distribuido en el reino vegetal. Se considera que incluyen todos los polifenoles de origen vegetal con un peso molecular superior a 500 Da. En función de su distribución botánica y de su capacidad de degradación, se distinguen dos grandes grupos: los hidrolizables y los condensados. Entre los primeros, los ésteres de glucosa con ácido gálico, digitálico y elágico, como por ejemplo el ácido tánico o simplemente, tanino, que provoca lesión hepática aguda (hígado graso y necrosis hepática). Los taninos condensados son flavonoides: polímeros de antocianidinas. Los primeros son rápidamente hidrolizados por ácidos, bases o ciertos enzimas; los segundos no se degradan por tratamiento ácido sino que tienden a polimerizarse.

Los taninos están presentes en muchas frutas tropicales como mango, dátil o caqui, así como en el café, té y cacao; también están presentes en cereales y leguminosas. Se estima que en una taza de infusión de café puede haber entre 72 y 104 mg de taninos y en una de té entre 431 y 450 mg (Janssen *et al.* 1997). Otra fuente importante de taninos, sobre todo en la forma condensada, son las uvas, zumo de uva y vinos. Las concentraciones más elevadas se encuentran en la piel de los frutos. Se considera que las uvas tienen un contenido medio aproximado de 500 mg por kg y los vinos tintos entre 1 y 4 g por litro de vino. A partir de estos datos se estima, por tanto, que una perso-

na puede ingerir aproximadamente 1 g o más de taninos al día.

Los taninos contienen suficientes grupos hidroxilo fenólicos como para formar puentes estables con las proteínas. Así, se pueden combinar con las proteínas de la piel de tal manera que las hace resistentes a la putrefacción, es decir, convierte las pieles en cueros (Deshpande, 2002). Por otra parte, los efectos adversos de los taninos se atribuyen precisamente a su capacidad para interferir con enzimas digestivos, de tal manera que dietas con un contenido elevado en taninos producen una disminución de peso, una baja capacidad de digestión de proteínas y un aumento en el contenido de nitrógeno en heces. (Deshpande, 2002).

Los taninos se han relacionado también con procesos de carcinogénesis. Algunos estudios epidemiológicos sugieren una posible asociación entre el consumo de productos vegetales con un alto contenido en taninos y una elevada incidencia de cáncer de esófago y boca (Morton, 1970, 1972). No obstante, en los últimos años se han atribuido también propiedades beneficiosas a los taninos, antimutagénicas, anticarcinogénicas (Miyamoto y col., 1997) y de protección frente a las enfermedades vasculares y lesión hepática. El fundamento de estas acciones protectoras estriba en su actividad como moléculas antioxidantes y su capacidad para neutralizar radicales libres.

Bibliografía

- Atuk NO, Blaydes MC, Westervelt JB, Wood JE (1967). Effect of aminophylline on urinary excretion of epinephrine and norepinephrine in man. *Circulation* 35: 745-753.
- Aldridge D, Tahourdin CSM (1998). Natural estrogenic compounds. En: Watson DH. *Natural toxicants in food*. CRC Press, Boca Ratón, Florida. 54-83.
- Arseculeratne SN, Gunatilaka AAL, Panabokke RG (1981). Studies on medicinal plants of Sri Lanka: Occurrence of pyrrolizidine alkaloids and hepa-

- toxic properties in some traditional medicinal herbs. *J Ethnopharmacol* 4: 159-177.
- Bellet S, Roman L, DeCastro O, Kim KE, Kershbaum A (1969). Effect of caffeine ingestion on catecholamine release. *Metabolism* 18: 288-291.
- Bethune HC, Burrell RH, Culpan RH, Ogg GJ (1964). Vascular crises associated with monoamine oxidase inhibitors. *Am J Psychiatry* 121: 245-248.
- Blackwell B, Marley E, Price J, Taylor D (1967). Hypertensive interaction between monoamine oxidase inhibitors and foodstuffs. *Br J Psychiatry* 113: 349-365.
- Brown JWS, Osborn TC, Bliss FA, Hall TC (1982)a. Bean lectins. Part 1. Relationships between agglutinating activity and electrophoretic variation in the lectin-containing G2/albumin seed proteins of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor Appl Genet* 62: 263-271.
- Brown JWS, Osborn TC, Bliss FA, Hall TC (1982)b. Bean lectins. Part 2. Relationships between qualitative lectin variation in *Phaseolus vulgaris* L. *Theor Appl Genet* 62: 361-367.
- Cheeke PR, Shull LR (1985). *Natural toxicants in feeds and poisonous plants*. AVI Publishing, Westport, CT.
- Chevion M, Mager J, Glaser G (1983). Naturally occurring food toxicants: Favism-producing agents. En: Rechcigl M (eds.). *Handbook of naturally occurring food toxicants*. CRC Press, Boca Raton, Florida. 63-79.
- Concon JM (1988). *Food toxicology*. Parts A and B. Marcel Dekker, New York.
- Conn EE (1979). Cyanogenic glycosides. *Int Rev Biochem*. 27: 21-43.
- Crews C (1998). Pyrrolizidine alkaloids. En: Watson DH (eds.). *Natural toxicants in food*. CRC Press, Boca Raton, Florida. 11-28.
- De Nijs M, Rombouts F, Notermans S (1996). Fusarium molds and their mycotoxins. *J Food Safety* 16: 15-58.
- Deshpande SS, Sathe SK (1991). Toxicants in plants. En: Sharma RP, Salunkhe DK (eds.). *Mycotoxins and phytoalexins*. CRC Press, Boca Raton, Florida. 671-730.
- Deshpande SS (2002). Toxicants and antinutrients in plant foods. En: Deshpande SS (ed.). *Handbook of food toxicology*. Marcel Dekker, New York. 321-386.
- DuPuy HP, Lee JG (1954). The isolation of a material capable of producing experimental lathyrism. *J Am Pharm Assoc Sci Ed*. 43: 61-62.
- Felsted RL, Leavitt RD, Chen C, Bachur NR, Dale RMK (1981a). Phytohemagglutinin isolectin subunit composition. *Biochem Biophys Acta* 668: 132-140.
- Felsted RL, Li J, Pokrywka G, Egorin MJ, Spiegel J, Dale RMK (1981b). Comparison of *Phaseolus vulgaris* cultivars on the basis of isolectin differences. *Int J Biochem* 13: 549-557.
- Fenwick GR, Heaney RK (1983). Glucosinolates and their breakdown products in cruciferous crops, foods and feeding stuffs. *Food Chem* 11: 249-271.
- Friedman M, McDonald GM (1999). Post-harvest changes in glycoalkaloid content of potatoes. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 459: 121-143.
- Hankins CN, Shannon LM (1978). The physical and enzymatic properties of a phytohemagglutinin from mung beans. *J Biol Chem* 253: 7791-7797.
- Helferich WG, Allred CD, Young-Hwa J (2001). Dietary estrogens and antiestrogens. En: Helferich W, Winter CK (eds.). *Food toxicology*. CRC Press, Boca Raton, Florida. 37-55.
- Huxtable RJ (1989). Herbal teas and toxins: novel aspects of pyrrolizidine poisoning in the United States. *Perspectives in Biology and Medicine* 24: 1-14.
- Jadhav SJ, Lutz SE, Mazza G, Salunkhe DK (1997). Potato glycoalkaloids: Chemical, analytical and biochemical perspectives. En: Shahidi F (ed.). *Antinutrients and phytochemicals in food*. American Chemical Society, Washington, DC. 94-114.
- Jaffe WG (1980). Hemagglutinins (lectins). En: Liener IE (ed.). *Toxic constituents of plant foodstuffs*. Academic Press, New York. 73-102.
- Janssen MMT, Put HMC, Nout MJR (1997). Natural toxins. En: De Vries (ed.). *J Food Safety and Toxicity*. CRC Press. Boca Raton, 7-37.
- Kojima M, Poulton JE, Thayer SS, Conn EE (1979). Tissue distributions of dhurrin and enzymes involved in its metabolism in leaves of Sorghum bicolor. *Plant Physiol* 63: 1022-1028.
- Liener IE (1976). Legume toxins in relation to protein digestibility: A review. *J Food Sci* 41: 1076-1081.
- Liener IE (1997). Toxicological considerations in the utilization of new protein foods. En: Addler-Nissen J (ed.). *Biochemical aspects of new protein foods*. Pergamon Press, New York. 217-234.
- Lindner E (1990). *Toxicología de los alimentos 2*.^a ed. Editorial Acribia, Zaragoza.
- Marquardt RR (1989). Vicine, convicine and their aglycones, divicine and isouramil. En: Cheeke

- PR (ed.). *Toxicants of plant origin*, Vol. I. CRC Press, Boca Raton, Florida. 161-193.
- Miller EC (1983). Structure-activity studies of the carcinogenicities in the mouse and rat of some naturally occurring and synthetic alkenylbenzene derivatives related to safrole and estragole. *Cancer Res* 43: 1124-1134.
- Miyamoto K, Murayama T, Yoshida T, Hatano T, Okuda T (1997). Anticarcinogenic activities of polyphenols in foods and herbs. En: Shahidi F (eds.). *Antinutrients and phytochemicals in food*. American Chemical Society, Washington, DC. 245-259.
- Mohan VS, Nagarajan V, Gopalan C (1966). Simple practical procedures for the removal of toxic factors in *Lathyrus sativus* (khesari dhal). *Indian J Med Res* 54: 410-414.
- Olney JW, Misra CH, Rhee V (1976). Brain and retinal damage from *Lathyrus*, excitoxin, b-N-oxalyl-L-a,b-diaminopropionic acid. *Nature* 264: 659-661.
- Pitz WJ, Sosulski FW, Hogg LR (1980). Occurrence of vicine and convicine in seeds of some Vicia species and other pulses. *Can Inst Food Sci Technol J* 13: 35-38.
- Plahk LC, Sporns P (1997). Biological activities of potato glycoalkaloids. En: Shadidi F (ed.). *Antinutrients and phytochemicals in Food*. American Chemical Society, Washington, D.C. 115-126.
- Poulton JE (1983). Cyanogenic compounds in plants and their toxic effects. En: Keele RF, Tu AT (ed.). *Handbook of natural toxins*, Vol. 1. Marcel Dekker, New York. 117-139.
- Pusztai A (1989). Lectins. En: Cheeke PR (ed.). *Toxicants of plant origin*, Vol III. CRC Press, Boca Raton, Florida. 29-68.
- Quattrucci E (1987). Hormones in food: Occurrence and hazards. En: Miller K (ed.). *Toxicological aspects of food*. Elsevier, London. 103-138.
- Renwick JH (1972). Hypothesis: anencephaly and spina bifida are usually preventable by avoidance of a specific but unidentified substance present in certain potato tubers. *Br J Prevent Soc Med* 26: 67-88.
- Roberts HR (1981). *Sanidad alimentaria*. Ed. Acirbia, Zaragoza.
- Rosa EAS, Heaney RK, Fenwick GR, Portas CAM (1997). Glucosinolates in crop plants. *Hortic Rev* 19: 99-215.
- Rosling H, Tylleskär T (2000). Cassava. En: Spencer PS, Schaumburg HH (eds.). *Experimental and clinical neurotoxicology 2nd*. Oxford University Press, New York. 338-343.
- Roy DN, Spencer PS (1989). Lathyrogens. En: Cheeke PR (ed.). *Toxicants of plant origin*, Vol. III. CRC Press, Boca Raton, Florida. 169-194.
- Sandler M, Youdim MBH, Hanington E (1974). A phenylethylamine oxidizing defect in migraine. *Nature* 250: 335-337.
- Seley H (1957). Lathyrism. *Rev Can Biol* 16: 1-82.
- Sharon N, Lis H (1989). Lectins as cell recognition molecules. *Science* 246: 227-229.
- Shibamoto T, Bjeldanes LF (1993). *Introducción a la toxicología de los alimentos*. Editorial Acirbia, Zaragoza.
- Smith TK, Musk SRR, Johnson IT (1996). Allyl isothiocyanate selectively kills undifferentiated HT29 cells in vitro and suppresses aberrant crypt foci in the colonic mucosa of rats. *Biochem Soc Trans* 24(3):s381.
- Steinmetz KA, Potter JD (1991). Vegetables, fruit and cancer. I. Epidemiology. *Cancer Cause Control* 2: 325-357.
- Stob M (1983). Naturally occurring food toxicants: estrogens. En: Rechcigl M. *Handbook of Naturally occurring food toxicants*. CRC Press, Boca Raton, Florida. 81-100.
- Stewart MJ, Steenkamp V (2001). Pyrrolizidine poisoning: A neglected area in human toxicology. *Ther Drug Monit* 23 (6): 698-708.
- Talalay P, Zhang Y (1996). Chemoprotection against cancer by isothiocyanates and glucosinolates. *Biochem Soc Trans*. 24: 806-810.
- Tewe OO, Yyayi EA (1989). Cyanogenic glycosides. En: Cheeke PR. *Toxicants of plant origin*. Vol. II. CRC Press, Boca Raton, Florida. 43-69.
- Verkerk R, Dekker M, Jongen WMF (1998). Glucosinolates. En: Watson DH (ed.). *Natural toxicants in food*. CRC Press, Boca Raton, Florida. 29-53.
- Whiting MG (1963). Toxicity of cicads. *Econ Bot* 17: 271-302.
- Zhang Y, Talalay P, Cho CG, Posner GH (1992). A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 2399-2403.

INTOXICACIONES POR PLANTAS MEDICINALES

Juan Carlos Ríos, Enrique París, Guillermo Repetto

Introducción. Definición de plantas medicinales. Toxicidad de las plantas medicinales. Toxicidad por órganos. Factores de riesgo de las plantas medicinales. Toxicidad de algunas plantas medicinales. Manejo de las intoxicaciones por plantas medicinales. Bibliografía.

Introducción

El empleo de las plantas medicinales con fines curativos ha sido documentada en la medicina tradicional asiática a partir del año 3000 a. de C. (Ko, 1991). Según informes de la Organización Mundial de la Salud, cuatro billones de personas en el mundo usan terapias a base de plantas medicinales o derivados de plantas. Existe la creencia popular de que este tipo de sustancias son inocuas para la salud, no existiendo ningún riesgo en su consumo (Hung *et al.* 1998). La FDA (Food and Drug Administration) ha informado de 185 muertes, en un periodo de 5 años, asociadas al consumo de plantas medicinales (Hirshon, 2002). La adquisición de la mayoría de las plantas medicinales en todo el mundo se realiza sin receta, con escasa información para el consumidor y muchas veces sin controles suficientes para garantizar la calidad de los pro-

ductos comercializados. Solo en los últimos años, las plantas medicinales han empezado a tener una regulación más estricta por parte de las autoridades, principalmente por la existencia de informes de toxicidad en la literatura científica (Sanfelix *et al.* 2001). El comercio de las plantas medicinales es ampliamente utilizado por todos los miembros de la Unión Europea. Entre los principales usos terapéuticos de las plantas medicinales se encuentran: el tratamiento de las varices, de la tos, como coadyuvantes de la circulación, contra el dolor muscular, para problemas digestivos, como calmantes, ansiolíticos, laxantes y para tratar afecciones vesiculares, renales y hepáticas. Francia y Alemania dominan el mercado de las plantas medicinales (Silano *et al.* 2004). El parlamento europeo está modificando la Directiva 2001/83/EC por la que se establece el código comunitario sobre medicamentos de uso humano, ya que en esta solo se incluyeron los productos homeopáticos junto a los medicamentos, y no fueron consideradas las

plantas medicinales. En EE UU existe aún muy poca regulación sobre la industria de las plantas medicinales, ya que actualmente estas se pueden vender sin estudios de eficacia o de seguridad. En España se ha dictado la Orden SCO/190/2004, de 28 de enero, por la que se establece la lista de plantas cuya venta al público queda prohibida o restringida por razón de su toxicidad (BOE, 2004).

Definición de plantas medicinales

Las plantas medicinales son productos que contienen exclusivamente como ingredientes activos una o más plantas (completas o fragmentos de plantas en estado seco), o una o más preparaciones a base de plantas (preparaciones obtenidas por tratamientos como extracción, destilación, purificación, fermentación, etc., obteniendo posteriormente extractos, tinturas o aceites esenciales), o mediante la mezcla de una o más plantas en combinación con una o más preparaciones a base de plantas (Hung *et al.* 1998).

Toxicidad de las plantas medicinales

La toxicidad de las plantas medicinales puede variar dependiendo de distintos factores. Las variaciones climáticas y la época del año pueden influir en la composición cuali y cuantitativa de sus principios activos, a la que afecta también de forma significativa la forma de preparación y la parte de la planta utilizada (Wolf, 2003). Si bien es poco probable que las plantas medicinales ocasionen intoxicaciones por sí mismas, la mayoría de las veces estas ocurren por el mal uso que se hace de ellas, la mala identificación o por su contaminación. Se han encontrado, por ejemplo, metales pesados como plomo, mercurio,

arsénico o cobre en altas concentraciones en este tipo de productos (Pearl y Nelson, 1998; Ko, 1999).

Toxicidad por órganos

Toxicidad hepática: Las dos principales manifestaciones de toxicidad hepática producida por plantas medicinales son la hepatitis y la enfermedad venosa oclusiva. La hepatotoxicidad está relacionada con la susceptibilidad individual, la vía de exposición y la cantidad ingerida. Se ha asociado toxicidad hepática a plantas como el chaparral (*Larrea divaricata*) usado como analgésico, antiinflamatorio e inclusive como antídoto para el LSD, camedrío (*Teucrium chamaedrys*), chuca (*Packeria candidissima*), y especies de efedra, entre otras (Bent *et al.* 2003). Los alcaloides pirrolizidínicos se han asociados con la inducción de toxicidad hepática venooclusiva; sin embargo, no todos los tipos de alcaloides pirrolizidínicos presentan esta toxicidad. Podemos destacar la *Crotalaria assamica* o la *Crotalaria sessiliflora*, de la familia de las leguminosas, u otras especies como el *Senecio chrysanthemoides*. Los síntomas de este tipo de intoxicación incluyen hipertensión arterial e hipertrofia ventricular derecha. La asociación de las plantas con la hepatotoxicidad es generalmente incompleta o parcial, los informes al respecto son poco concluyentes y es limitado el conocimiento del que se dispone sobre su mecanismo patológico (Pearl y Nelson, 1998; Hung, 1998; Ko, 1999).

Toxicidad hemática: ciertas plantas contienen de forma natural sustancias anticoagulantes, por lo que pueden ocasionar hemorragias cuando son usadas de forma crónica o junto a otros productos farmacéuticos de similar uso. Se sabe, por ejemplo, que la ingestión de *Dysosma pleianthum*, que contiene podofilotoxinas, ha ocasionado trombocitopenia y leucocitosis (Ellenhorn, 1997; Pearl y Nelson, 1998; Hung, 1998; Ko, 1999).

Toxicidad cardiaca: el acónito (*Acinimum carmichaeli*) es una de las plantas cardiótóxicas más comunes. También todas aquellas que puedan contener glucósidos cardiacos. La presentación clínica típica de su toxicidad incluye náuseas, vómitos, calambres, mareos y palpitaciones. En casos severos también se producen hipotensión y taquiarritmias ventriculares, que se pueden asociar con acidosis e hipocalemia (Pearl y Nelson, 1998; Hung, 1998; Ko, 1999).

Toxicidad gastrointestinal: la mayoría de las plantas originarias de China han sido relacionadas con alteraciones gastrointestinales. Sus efectos generalmente son mínimos, pudiendo existir deshidratación severa por el mal uso de estos productos. También se ha detectado toxicidad gastrointestinal severa cuando se ingieren en gran cantidad plantas que están contaminadas con arsénico (Pearl y Nelson, 1998; Hung, 1998; Ko, 1999; Deng, 2001).

Toxicidad neurológica: las intoxicaciones anticolinérgicas pueden ocurrir por la ingestión de la especie *Datura metel*, usada tradicionalmente en el tratamiento de la bronquitis crónica, el asma y el dolor. Esta especie contiene los alcaloides escopolamina, hiosciamina y/o atropina, responsables de su toxicidad. *Podophyllum hexandrum* puede causar intoxicaciones con vómito y diarrea seguida de una neuropatía con entumecimiento de brazos y piernas y dificultad al caminar. Asimismo, la intoxicación por estricnina debe ser considerada tras la ingesta de plantas que contengan dicho alcaloide, como es el caso de *Strychnos nux vomica* (Pearl y Nelson, 1998; Hung, 1998; Ko, 1999).

Toxicidad renal: se han notificado muchas plantas medicinales como posibles agentes causales de toxicidad renal. Entre las manifestaciones tóxicas renales se encuentran, por ejemplo, la fibrosis intersticial del riñón producida por algunas plantas, cuyo mecanismo se sospecha que es inmunitario. El regaliz, por su contenido en glicirricina, se ha asociado con el síndrome de Fanconi, consistente en un trastorno en la función tubular proximal de los riñones que hace que ciertos compuestos en lugar de ser

reabsorbidos por los riñones en el torrente sanguíneo, sean excretados en la orina. Se piensa que la glicirricina inhibe la bomba sodio-potasio-ATPasa de las células tubulares proximales. Otras alteraciones renales se deben, sin embargo, a contaminación o adulteración de las plantas medicinales (Pearl y Nelson, 1998; Haller, 2002; Bagnis *et al.* 2004).

Factores de riesgo de las plantas medicinales

Contaminantes: la contaminación de las plantas medicinales es una de las grandes preocupaciones de las autoridades sanitarias. La presencia de pesticidas, metales o de adulterantes han ocasionado graves casos de intoxicación. Informes recientes han revelado de hecho la presencia de plomo, mercurio y arsénico en estas plantas (Slifman *et al.* 1998; Pearl y Nelson, 1998; Ko, 1999; Caldas y Machado, 2004; Bagnis *et al.* 2004).

Interacciones con drogas: este es un punto importante a considerar debido a que muchos pacientes consumen concomitantemente plantas con productos farmacéuticos. Las plantas contienen compuestos farmacológicamente activos, los cuales puede interactuar con fármacos, ocasionando interacciones farmacocinéticas y/o farmacodinámicas (Hung *et al.* 1998; Ko, 1999; Caldas y Machado, 2004; Bagnis *et al.* 2004).

VI. Toxicidad de algunas plantas medicinales

1. Poleo (*Mentha pelegium*)

Efectos tóxicos

Los síntomas clínicos asociados con su toxicidad incluyen fallo hepático fulminante, fallo renal agudo, coagulación intravascular diseminada, acidosis metabólica, sangramiento o

hemorragias gastrointestinales. A nivel neurológico se puede observar: confusión, alucinaciones, edema cerebral, temblores, mareos, delirio y encefalopatía. También se pueden presentar periodos alternantes de letargia y agitación, produciéndose a veces una rápida depresión del sistema nervioso central. Se han descrito igualmente casos de aborto en pacientes embarazadas intoxicadas (Ciganda y Laborde, 2003; Yarnell y Spoerke, 2004; DerMarderosian, 2003).

Embarazo

No se debe usar en este periodo.

Lactancia

No se debe usar en este periodo.

Interacciones

Puede interactuar con cualquier agente hepatotóxico. Interacciona con el alcohol, paracetamol, atorvastatina, diclofenaco, fluconazol, ibuprofeno, itraconazol, piroxicam, y ácido valproico.

Rango de toxicidad

Con solo de 10 a 15 mililitros de aceite o esencia de poleo se puede causar la muerte. Se requieren entre 50 y 100 gramos de la planta para producir 1 ml de esencia (Yarnell y Spoerke, 2004; DerMarderosian, 2003).

2. Ginseng (*Panax ginseng*)

Efectos tóxicos

Existen pocas referencias de intoxicación aguda por ginseng, sin embargo, su ingestión crónica sí puede ocasionar serios efectos tóxicos. El 17 % de los pacientes puede presentar hipertensión y un 4 % hipotensión. Se presenta edema en el 10% de los individuos que ingieren de forma periódica este producto. A nivel neurológico se ha descrito insomnio y nerviosismo en el 20% de los pacientes que han consumido esta planta

durante más de 2 años, pudiéndose presentar también excitación del sistema nervioso central con euforia en el 14% de ellos. Vértigo y cefalea son otros síntomas frecuentes. A nivel gastrointestinal, una alta incidencia de diarrea está referida al consumo de más de 3 gramos diarios de ginseng. Igualmente, se ha descrito sangramiento vaginal incluso con la ingestión de 200 miligramos. Erupciones de piel y síndrome de Stevens Johnson son otros de los efectos que se han relacionados con su consumo.

Embarazo

No existe evidencia científica para el uso seguro del ginseng en este periodo.

Lactancia

No existe evidencia científica para el uso seguro del ginseng en este periodo.

Interacciones

Su uso simultáneo con digoxinas ha sido asociado con un incremento de los niveles séricos de esta última. Puede disminuir la efectividad de las warfarinas. Otras drogas que pueden interactuar con el ginseng son: albendazol, hipoglucemiantes, estrógenos, diuréticos, inhibidores de la monoaminooxidasa, nifedipino, antiinflamatorios no esteroideos y analgésicos opioides.

Rango de toxicidad

Se ha informado de casos de depresión con dosis mayores de 15 gramos. La ingestión de aproximadamente 25 gramos se ha asociado a arteritis cerebral, y se ha notificado sangrado vaginal con una ingesta de 200 miligramos (DerMarderosian, 2003; Morgan y Johns, 2000; Piosindex Ginseng, 2004).

3. Ginkgo (*Ginkgo biloba*)

Efectos tóxicos

El *Ginkgo biloba* puede causar vasodilatación arterial y venosa. A nivel neurológico se puede

presentar cefalea, convulsiones (principalmente en niños) y hemorragia subaracnoidea. El *Ginkgo biloba* puede inhibir la agregación plaquetaria y su uso crónico incrementa el tiempo de sangría y la aparición de hemorragia espontánea; el componente causante de la inhibición plaquetaria el ginkgolido B.

Embarazo

Ha sido catalogado en la categoría C de la FDA (Food Drug Administration), esto es, estudios en animales han mostrado un efecto adverso sobre el feto, pero no hay estudios clínicos adecuados en mujeres embarazadas.

Lactancia

No está recomendado su uso durante este periodo.

Interacciones

Puede interactuar con anticonvulsivantes, anticoagulantes, agentes antiplaquetarios, buspirona, diltiazem, insulina, heparina de bajo peso molecular, inhibidores de la monoaminooxidasa, nicardipino, nifedipino, antiinflamatorios no esteroideos, papaverina, diuréticos tiazídicos, inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina y trazodona.

Rango de toxicidad

Dos frutos pueden causar eritema en la boca (DerMarderosian, 2003; Mahdavi y Johns, 2000; Poisindex Ginkgo, 2004).

4. Hierba de San Juan (*Hipericum perforatum*)

Efectos tóxicos

Poca información existe sobre la toxicidad del *Hipericum perforatum*. Sus principales efectos están relacionados con la fototoxicidad, las propiedades inhibitorias sobre la recaptación de la serotonina y por la inhibición de la monoaminooxidasa. Se ha descrito inflamación de piel y mucosas después de la exposición al sol. Se

puede presentar hipertensión con la sobredosis crónica. Se han descrito también depresión del sistema nervioso central, neuropatías asociadas a su consumo y, ocasionalmente, se ha presentado gastritis e incremento en las enzimas hepáticas con hiperbilirrubinemia. Igualmente puede ocasionar rigidez muscular.

Embarazo

Contraindicada en el embarazo.

Lactancia

No existe evidencia de su seguridad en este periodo

Interacciones

Cuatro son los principales grupos de interacciones que presenta el *Hipericum*. El primero, tiene relación con su inhibición de la recaptación de serotonina. El segundo, con la inhibición de la monoaminooxidasa. El tercero, por poseer una acción indirecta simpaticomimética y, por último, su actividad inductora en el citocromo P-450. Así podemos destacar las siguientes interacciones farmacológicas de la hierba de San Juan: amiodarona, acetaminofeno (paracetamol), amitriptilina, anestésicos, anticoagulantes, fármacos antidiabéticos, barbitúricos, benzodiazepinas, betabloqueantes, buspirona, cafeína, bloqueadores de los canales de calcio, carbamazepina, clorzoxazona, clozapina, anticonceptivos, ciclofosfamida, ciclosporina, dextrometorfan, digoxinas, estrógenos, etanol, etoposido, fenfluramina, *Ginkgo biloba*, loperamida, metadona, inhibidores de la monoaminooxidasa, analgésicos opioides, antivirales para el tratamiento del SIDA, paclitaxel, fenitoína, reserpina, inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina, tacrolimus, tamoxifeno, teofilina, trazodona, antidepresivos tricíclicos, alimentos ricos en tiamina y venlafaxina.

Rango de toxicidad

La dosis tóxica es desconocida. Dosis únicas de hasta 3.600 miligramos de *Hipericum* no han

dado lugar a efectos tóxicos (Schwarz y Johns, 2000; DerMarderosian, 2003; Poisindex Hypericum Perforatum, 2004; Yarnell y Spoerke, 2004).

5. Manzanilla (*Matricaria chamomilla*)

Efectos tóxicos

Prácticamente no se han descrito efectos tóxicos, aunque se ha informado de reacciones anafilácticas asociadas a su consumo.

Embarazo

No existe contraindicación en su uso.

Lactancia

Puede ser usado en este periodo.

Interacciones

Sólo se han descrito con los anticoagulantes.

Rango de toxicidad

No existe en la literatura (Johns, 2000; Yarnell y Spoerke, 2004).

6. Valeriana (*Valeriana officinalis*)

Efectos tóxicos

Se ha descrito midriasis, dolor de pecho y taquicardia con la ingesta de *Valeriana*. Hipotensión, fatiga, ataxia, vértigo, cefalea y temblores son síntomas que también pueden presentarse. La estimulación del sistema nervioso central se presenta con la ingesta crónica de valeriana, y delirio puede presentarse como síndrome de abstinencia por la abrupta discontinuación de la ingesta. Se ha descrito hepatitis tóxica en la literatura después de ingesta de entre 3 días a 3 meses de este producto.

Embarazo

No existe evidencia científica para el uso seguro de valeriana en este periodo.

Lactancia

No existe evidencia científica para el uso seguro de valeriana en este periodo.

Interacciones

Puede interactuar con barbitúricos, benzodiazepinas, alcohol, loperamida, agentes hepatotóxicos y analgésicos opioides.

Rango de toxicidad

La ingesta de 20 gramos de valeriana produjo fatiga, dolor abdominal, temblores y dolor de pecho (Givens y Johns, 2000; Poisindex Valerian, 2004; Yarnell y Spoerke, 2004).

7. Cáscara Sagrada (*Rhamus prusiana*)

Efectos tóxicos

Provoca efectos principalmente irritantes, náuseas, vómitos y diarrea. A nivel neurológico puede ocasionar convulsiones musculares y vértigo. Se puede observar proteinuria y oliguria. La orina se puede presentar de color rojo en orinas alcalinas o de color amarillo parduzco en orinas ácidas.

Embarazo

Ha sido catalogado en la categoría C de la FDA (Food Drug Administration).

Lactancia

No se debe usar en este periodo.

Interacciones

Se han descrito interacciones con hierro y digoxina.

Rango de toxicidad

No está descrita, pero se ha informado de muertes por el consumo accidental de bayas (Renner y Johns, 2000; Yarnell y Spoerke, 2004; Poisindex Anthraquinones, 2004).

8. Pasiflora (*Pasiflora incarnata*)

Efectos tóxicos

La información referida a su toxicidad es muy limitada. Altas dosis por periodos largos podrían ocasionar depresión del sistema nervioso central y arritmias cardiacas. Se han descrito bradicardia y cambios electrocardiográficos, incluido prolongación del QTc, así como náuseas y vómitos.

Embarazo

Contraindicada en este periodo.

Lactancia

No existe evidencia científica para el uso seguro de *Pasiflora* en este periodo.

Interacciones

Puede interactuar con benzodiazepinas y barbitúricos.

Rango de toxicidad

Se ha descrito que con 3.500 miligramos de pasiflora se presentan síntomas de toxicidad (Yarnell y Spoerke, 2004; Poisindex Plants pasiflora, 2004).

9. Regaliz (*Glycyrrhiza glabra*)

Efectos tóxicos

Los efectos tóxicos son debidos principalmente a su consumo crónico. Puede producir hipertensión, arritmias e hipocalcemia, y se ha descrito edema pulmonar con la ingestión masiva. La miopatía es común además en las exposiciones crónicas.

Embarazo

No se debe usar en este periodo.

Lactancia

No se debe usar en este periodo.

Interacciones

Puede interactuar con bloqueantes alfa-adrenérgicos, antagonistas de los receptores de la angiotensina II, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, antiarrítmicos, hipoglucemiantes, agentes antiplaquetarios, bloqueantes beta-adrenérgicos, bloqueantes de los canales de calcio, clonidina, anticonceptivos, corticoides, digoxina, diuréticos, estrógenos, guanetidina, insulina, heparinas de bajo peso molecular, minoxidil, inhibidores de la monoaminoxidasa, reserpina y agentes trombolíticos.

Rango de toxicidad

Más de 55 gramos pueden causar toxicidad (Newton y Johns, 2000; Yarnell y Spoerke, 2004; Poisindex Liquorice, 2004).

Manejo de las intoxicaciones por plantas medicinales

Al encontrarnos con un paciente intoxicado o al diagnosticar una intoxicación con plantas medicinales deberemos actuar asegurándonos de mantener con vida al paciente. Lo más IMPORTANTE es tratar al PACIENTE y no al tóxico.

Se debe realizar el control de los signos vitales: (observar, sobre todo, si respira). Establecer la secuencia del ABC de la reanimación, es decir:

- A. Vía aérea permeable. Aspiración de secreciones.
- B. Respiración.
- C. Circulación. Constatar la presencia o ausencia de pulsos. Si están ausentes iniciar de inmediato la reanimación con masaje cardiaco y/o respiración boca a boca.

Si el paciente está consciente y coopera, se debe iniciar la secuencia del tratamiento de la intoxicación.

El tratamiento específico se inicia tratando de identificar la hierba medicinal usada por el paciente así como la existencia de una medicación habitual y de alguna enfermedad preexistente, para posteriormente, planificar la terapia.

Para identificar el tóxico son muy importantes la anamnesis y el examen físico, ya que los análisis de laboratorio generalmente informan tardíamente del origen de la intoxicación. Para orientarse en este sentido es muy útil conocer y manejar los síndromes tóxicos.

El ABC del tratamiento de las intoxicaciones consiste en: (a) evitar la absorción del tóxico, mediante técnicas como el lavado gástrico; (b) favorecer la adsorción del tóxico utilizando el carbón activado; y (c) favorecer la eliminación del tóxico, para lo que, dependiendo del caso, el forzar la diuresis, alcalinizar la orina o la hemodiálisis puede ser útil. Antagonizar el tóxico mediante el uso de antidotos puede estar recomendado. Asimismo, se debe consultar al Centro Toxicológico regional sobre la terapia específica.

En la mayoría de los casos, con cesar la ingesta de las plantas medicinales es suficiente. Las medidas de apoyo a las funciones vitales son capaces de conseguir una evolución favorable en la mayoría de estas intoxicaciones (Ellenhorn, 1997; Paris y Ríos, 2000).

Bibliografía

- Bent S, Tiedt T, Odden M, Shlipak M (2003). The relative safety of ephedra compared with other herbal products. *Rev Ann Internal Medi* 6 (138): 468-472.
- Caldas ED, Machado LL (2004). Cadmium, mercury and lead in medicinal herbs Brazil. *Rev Food Chem Toxicol* 42: 599-603.
- Deng JF (2002). Clinical and laboratory investigations in herbal poisonings. *Rev Toxicology* 181-182: 571-576.
- DerMarderosian A (2003). *Review of natural products, facts and comparisons*. Inc. New York.
- Editorial Staff (2004). Anthraquinones (Management/Treatment Protocol). En: Klasco RK (ed.): POISINDEX® System. Thomson MICROMEDEX, Greenwood Village, Colorado (vol. 121).
- Editorial Staff (2004). Ginkgo biloba (Management/Treatment Protocol). En: Klasco RK (ed.): POISINDEX® System. Thomson MICROMEDEX, Greenwood Village, Colorado (vol. 121).
- Editorial Staff (2004). Ginseng (Management/Treatment Protocol). En: Klasco RK (ed.): POISINDEX® System. Thomson MICROMEDEX, Greenwood Village, Colorado (vol. 121).
- Editorial Staff (2004). Liquorice (Management/Treatment Protocol). En: Klasco RK (ed.): POISINDEX® System. Thomson MICROMEDEX, Greenwood Village, Colorado (vol. 121).
- Editorial Staff (2004). Plants passiflora (Management/Treatment Protocol). En: Klasco RK (ed.): POISINDEX® System. Thomson MICROMEDEX, Greenwood Village, Colorado (vol. 121).
- Editorial Staff (2004). Pennyroyal oil (Management/Treatment Protocol). En: Klasco RK (ed.): POISINDEX® System. Thomson MICROMEDEX, Greenwood Village, Colorado (vol. 121).
- Editorial Staff (2004). Valerian (Management/Treatment Protocol). En: Klasco RK (ed.): POISINDEX® System. Thomson MICROMEDEX, Greenwood Village, Colorado (vol. 121).
- Ellenhorn M (1997). *Ellenhorn's Medical toxicology*, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 2047.
- Givens M, Johns M (2000). Valerian. En: Johns M., *Toxicology and Clinical Pharmacology of Herbal Product*, Humana Press, Totowa, New Jersey, 53-65.
- Haller C (2002). Preparaciones Herbarias. En: Ling L, Clark R, Erickson T, Trestrail J (eds.). *Secretos de la toxicología*, McGraw-Hill Interamericana, México, 275-278.
- Hirshon JM. Plant poisoning, herbs. *Emergency medicine U.S.* (Accesido 2004 Junio, 20). Disponible en URL: <http://www.emedicine.com/emerg/topic449.htm>.
- Hung OL, Lewin NA, Howland MA (1998). Herbal preparations. En: Goldfrank LR, Flomenbaum NE, Lewin NA, Weisman RS, Howland MA, Hoffman RS (eds.). *Toxicologic emergencies*, Appleton & Lange, New York, 1221-1255.
- Isnard C, Deray G, Baumelou A, Le Quintrec M, Vanherweghem J (2004). Herbs and the kidney. *Rev Am J Kidney Dis*, 1: 1-11.

- Johns M (2000). Chamomille. En: Johns M (eds.). *Toxicology and clinical pharmacology of herbal product*, Humana Press, Totowa, New Jersey, 79-83.
- Jones A, Volans G (1999). Recent advances Management of self poisoning. *Rev Clin Rev*, 319: 1414-1417.
- Ko RJ (1999). Causes, epidemiology, and clinical evaluation of suspected herbal poisoning. *Rev Clin Toxicol*, 37: 697-708.
- Mahdavi F, Johns M (2000). Ginkgo biloba. En: Johns M (eds.). *Toxicology and clinical pharmacology of herbal product*, Humana Press, Totowa, New Jersey, 43-51.
- Morgan A, Johns M (2000). Panax Ginseng. En: Johns M (eds.). *Toxicology and clinical pharmacology of herbal product*, Humana Press, Totowa, New Jersey, 141-153.
- Newton M, Johns M (2000). Licorice. En: Johns M (eds.). *Toxicology and clinical pharmacology of herbal product*, Humana Press, Totowa, New Jersey, 223-235.
- ORDEN SCO/190/2004, 28 de enero del Ministerio de Sanidad y consumo sobre la lista de plantas cuya venta al público queda prohibida o restringida por razón de su toxicidad. *BOE* n.º 32/ 2004.
- Paris E, Ríos JC (2001). *Intoxicaciones: Epidemiología, clínica y tratamiento*. Ediciones Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile, pp 302.
- Pearl SW, Nelson LS (1998). Poisoning from herbs and related products. En: Viccellio P (ed.). *Emergency toxicology*, Lippincott – Raven, New York, 1087-1101.
- Renner A, Johns M (2000). Cascada Sagrada. En: Johns M (ed.). *Toxicology and clinical pharmacology of herbal product*, Humana Press, Totowa, New Jersey, 283-287.
- Sanfélix J, Larrea P, Rubio E, Martínez-Mir I (2001). Consumo de plantas medicinales y medicamentos. *Rev Atención Primaria*, 5(28): 311-314.
- Schwarz J, Johns M (2000). St. John's Wort. En: Johns M (ed.). *Toxicology and clinical pharmacology of herbal product*, Humana Press, Totowa, New Jersey, 67-78.
- Shannon M (1999). Alternative medicines toxicology: A review of Selected Agents. *Rev Clin Toxicol*, 37(6): 709-713.
- Silano M, De Vincezi M, De Vincezi A, Silano V (2004). The new European legislation on traditional herbal medicines: main features and perspectives. *Rev Fitoterapia*, 75: 107-116.
- Slifman NR, Obermeyer, WR, Aloï BK *et al.* (1998). Contamination of botanical dietary supplements by Digitalis Lanata. *N Engl J Med* 339, 806-811.
- Tsumura, Akira. Kampo (1991). *How the Japanese updated traditional herbal medicine*. Tokio: Japan Publications; New Cork: Kadansha America, 9-11.
- Woolf A (2003). Herbal remedies and children: Do they work? Are they harmful? *Rev Pediatrics*, 1: 240-246.
- Yarnell E, Spoerke D (2004). Cascara - Alternative Medicine Evaluation. En: Klasco RK (ed). AltMedDex® System. Thomson MICROMEDEX, Greenwood Village, Colorado (vol. 121).
- Yarnell E, Spoerke D (2004). Chamomile - Alternative Medicine Evaluation. In: Klasco RK (ed). AltMedDex® System. Thomson MICROMEDEX, Greenwood Village, Colorado (vol. 121).
- Yarnell E, Spoerke D (2004). Ginkgo Biloba - Alternative Medicine Evaluation. En: Klasco RK (ed). AltMedDex® System. Thomson MICROMEDEX, Greenwood Village, Colorado (vol. 121).
- Yarnell E, Spoerke D (2004). Ginkgo biloba - Alternative Medicine Evaluation. En: Klasco RK (ed). AltMedDex® System. Thomson MICROMEDEX, Greenwood Village, Colorado (vol. 121).
- Yarnell E, Spoerke D (2004). Licorice - Alternative Medicine Evaluation. En: Klasco RK (ed). AltMedDex® System. Thomson MICROMEDEX, Greenwood Village, Colorado (vol. 121).
- Yarnell E, Spoerke D (2004). Panax Ginseng - Alternative Medicine Evaluation. En: Klasco RK (ed). AltMedDex® System. Thomson MICROMEDEX, Greenwood Village, Colorado (vol. 121).
- Yarnell E, Spoerke D (2004). Passionflower - Alternative Medicine Evaluation. En: Klasco RK (ed). AltMedDex® System. Thomson MICROMEDEX, Greenwood Village, Colorado (vol. 121).
- Yarnell E, Spoerke D (2004). Pennyroyal - Alternative Medicine Evaluation. En: Klasco RK (ed). AltMedDex® System. Thomson MICROMEDEX, Greenwood Village, Colorado (vol. 121).
- Yarnell E, Spoerke D (2004). St. John's Wort - Alternative Medicine Evaluation. En: Klasco RK (ed): AltMedDex® System. Thomson MICROMEDEX, Greenwood Village, Colorado (vol. 121).
- Yarnell E, Spoerke D (2004). Valerian - Alternative Medicine Evaluation. En: Klasco RK (ed): AltMedDex® System. Thomson MICROMEDEX, Greenwood Village, Colorado (vol. 121).

M.^a Rosario Moyano Salvago, Ana M.^a Molina López

Introducción. Clasificación de las intoxicaciones por setas. Otras alteraciones producidas por el consumo de setas. Bibliografía.

Introducción

En Europa existen alrededor de 3.000 especies de setas, de las cuales unas 70 son consideradas venenosas y un 5% o 6% son mortales. En nuestro país las intoxicaciones por ingestión accidental por el consumo de estas especies tóxicas son especialmente frecuentes en regiones como Cataluña y el País Vasco, donde existe una tradición popular de acudir al bosque o al campo a recolectar setas. Sin embargo, este fenómeno no es exclusivo de estas zonas, sino que se ha extendido prácticamente a todas las regiones de España. Es a partir de los años 50, pero especialmente en los últimos 20 o 25 años, cuando se convirtió en una moda generalizada el consumo de productos obtenidos de la propia naturaleza, entre los que las setas constituyen un claro ejemplo.

La intoxicación por ingestión de setas es un fenómeno estacional, ya que la mayoría crecen en otoño o a finales de primavera, y suele producirse por la ignorancia y por confusión con las especies comestibles. Se estima que pueden

darse de entre 5 y 10 casos de intoxicaciones por el consumo de setas por millón de habitantes y año en regiones micofílicas, como es el caso de Cataluña y País Vasco.

Clasificación de las intoxicaciones por setas

Las intoxicaciones por el consumo de setas se pueden clasificar por el grupo botánico al que pertenecen, sin embargo, dado que grupos taxonómicamente iguales poseen el mismo tipo de tóxicos, o que en ocasiones en el mismo género se encuentran especies de setas tóxicas con toxinas diferentes, es más útil hacer una clasificación de las intoxicaciones por setas basadas en la intoxicación que producen, y en el tiempo transcurrido entre la ingestión y la aparición de los primeros síntomas (periodo de incubación o de latencia).

Según este último criterio, se pueden clasificar las intoxicaciones por setas en dos grandes

grupos: intoxicaciones con periodo de latencia breve e intoxicaciones con periodos de tolerancia largo o prolongado.

1. Intoxicaciones con periodo de latencia breve

Constituyen la mayoría de las intoxicaciones por setas, y en general son de escasa gravedad. En estas intoxicaciones el intervalo desde la ingestión y la aparición de los primeros síntomas es inferior a 6 horas (Tabla 12.1). Dentro de este grupo incluimos los siguientes síndromes:

Síndrome gastrointestinal

Es provocado por diversas especies fúngicas de diversos géneros: *Lactarius*, *Russula*, *Boletus*, *Tricholoma*, *Entoloma*, *Clitocybe*, *Omphalotus*, *Scleroderma*, *Agaricus*, *Chlorophyllum*, *Hebeloma*, *Nematoloma* y otros.

El efecto irritante sobre el tracto digestivo es debido a diversas sustancias de composición química heterogénea aisladas en algunas de estas especies, entre las que podemos mencionar: Fasciculoles E y F, triterpenos presentes en *Nematoloma fasciculare* (hifoloma de láminas verdes, *bolet de pi*) y *Nematoloma Sublaeteri-*

Tabla 12.1. Intoxicaciones con periodo de latencia breve (< 6 horas).

Tipo de Síndrome	Período de incubación	Setas	Toxinas	Síntomas
Síndrome gastrointestinal	De 1 a 6 horas	<i>Lactarius</i> , <i>Russula</i> , <i>Boletus</i> , <i>Tricholoma</i> , <i>Entoloma</i> , <i>Clitocybe</i> , <i>Omphalotus</i> , <i>Scleroderma</i> , <i>Agaricus</i> , <i>Chlorophyllum</i> , <i>Hebeloma</i> , <i>Hypholoma</i>	Fasciculoles e y f Fasciculoles a y b Hebelosidos a, b y c Sesquiterpenos cíclicos Iludinas y subiludinas Bolesatina Vinilglicina	Náuseas y vómitos. Dolor abdominal y deshidratación
Síndrome neurológico o muscarínico	De 30 minutos a 2 horas	<i>Amanita muscaria</i> <i>Amanita pantherina</i>	Muscarina, panterinina Derivados isoxazólicos (Ácido iboténico, muscimol, ...)	Ataxia, agitación psicomotriz, «borrachera», agresividad, somnolencia, depresión, síntomas digestivos, cierto grado de atropismo
Síndrome alucinógeno	De 30 minutos a 1 hora	<i>Psilocybe</i> , <i>Panaeolus</i> , <i>Stropharia</i> , <i>Conocybe</i> , <i>Inocybe</i> , <i>Copelandia</i> , <i>Pluteus</i>	Derivados del indol (norbaeocystina, baeocystina, psilocina y psilocibina) bufotenina, serotonina, muscarina	Alucinaciones, alteraciones de la conducta, agresividad, pérdida del control, convulsiones, síntomas digestivos, taquicardia, midriasis
Síndrome cardiovascular	De 10 a 30 minutos	<i>Coprinus atramentarius</i> <i>Clitocybe claviceps</i>	Coprina	Náuseas, vómitos, enrojecimiento de la piel, sensación de calor, palpitaciones, sequedad de boca, arritmias, hipotensión arterial
Síndrome hemolítico	De 3 a 4 horas	<i>Amanita rubescens</i> <i>Paxillus involutus</i>	Rubescenslisina	Color oscuro de la orina, vómitos, diarreas, hemoglobinuria, anemia, dolor lumbar, colapso, insuficiencia renal

tum (hifoloma color ladrillo, *bolet de pi rogenic*); Fasciculoles A y B, serquiterpenoides presentes en *Nematoloma fasciculare*; Hebelosidos (A, B y C), glutarilcrustilinoles presentes en especies del género *Hebeloma*; Sesquiterpenos cíclicos, presentes en numerosos *Lactarius*, como el *Lactarius chrisorrheus* (niscallo borde, *rovelló de cabra o esne gorri falsoa*); Iludinas y subiludinas, terpenoides presentes en diversas especies del género *Omphalotus*: *O. olearius* y *O. illudius* (falsos rebozuelos, setas de olivo, *girgoles d'olivera, zapo ziza*). Las más tóxicas son las Iludinas S y M; Bolesatina, glucoproteína tóxica presente en diversos *Boletus*, especialmente *B. Satanás* (Figura 12.1); Vinilglicina, aminoácido insaturado presente en *Entoloma Lividum*.

El cuadro gastroentérico provocado por estas setas suele manifestarse como un síndrome gastrointestinal intenso (lividiano o pardiano) o bien como un síndrome gastrointestinal menos intenso (o resinoidiano).

Síndrome gastrointestinal intenso

Presenta un periodo de incubación corto, de 1 a 3 horas, y se caracteriza por un cuadro diarreico, náuseas, vómitos y dolor abdominal. Todo ello acompañado de una astenia profunda. Como consecuencia se presenta deshidratación, hemoconcentración, hipocloremia, hiponatremia, hipopotasemia y acidosis metabólica. Suele evolucionar favorablemente en uno o dos días. El posible peligro es la deshidratación por vómitos y diarreas, así como el consumo de estas setas junto con otras de periodo de latencia largo.

Síndrome gastrointestinal menos intenso (o resinoidiano)

El periodo de incubación es de 2 a 6 horas. No produce trastornos graves salvo a personas débiles o a niños. Los tóxicos que producen este cuadro resinoidiano se destruyen por ebullición (cuerpos cetónicos o antraquinonas).

El *tratamiento* en ambos casos es sintomático. En general, por la naturaleza de los sínto-

mas, no es precisa la evacuación del tóxico. En los casos más graves hay que combatir la deshidratación.

Síndrome neurológico o muscarínico

Schmiedeberg y Kopp en 1869 aislaron de la *Amanita muscaria* (Figura 12.2) una sustancia tóxica a la que denominaron *muscarina* y se pensó que era la toxina responsable del cuadro clínico que provocaba esta seta.

Sin embargo, se comprobó que la muscarina se hallaba en esta seta en cantidades muy pequeñas (aproximadamente 3 ppm de peso fresco), y por tanto debía contener otros principios activos de los que no era antídoto la atropina, que incluso podría exacerbar los síntomas de la intoxicación por esta seta. En los años 60 estas sustancias fueron aisladas e identificadas y se comprobó que se trataba de derivados isoxazólicos (ácido iboténico, muscimol) principales responsables del cuadro neurológico producido, que se comportaban como falsos neurotransmisores. Además, presenta ciertas sustancias irritantes del tubo digestivo.

Cuadro clínico

Este cuadro neurológico está provocado, fundamentalmente por la *Amanita muscaria* y la *Amanita pantherina*. Las manifestaciones clínicas producidas por el consumo de *Amanita muscaria* inicialmente eran conocidas como «síndrome muscarínico», también como «micocolinérgico o sudoroso», ya que se le achacaba a la muscarina (derivado de amonio cuaternario), tóxico de la *Amanita muscaria*, pero como se ha indicado, la concentración de la muscarina en el citado hongo es relativamente pequeña y no produce un síndrome muscarínico, sino un cuadro clínico diferente debido a otras sustancias.

Podemos afirmar que, en general, la *Amanita muscaria* americana es la más irritante del tubo digestivo, en tanto que las formas europeas presentan mayor actividad psicotrópica. La riqueza en sustancias activas de estas setas varía mucho

dependiendo de diversos factores, como la zona de recolección, el clima, las variedades o subvariedades.

Aunque en general la intoxicación no es grave, se ha descrito una mortalidad de un 2% para la *Amanita muscaria* y un 10% para la *Amanita pantherina*, que en el caso de esta última seta se debe, con toda probabilidad, a que posee toxinas propias no presentes en la *Amanita muscaria*. Concretamente, la panterinina y a una serie de derivados del ácido aminodicarboximetil-tiopropánico, que actúan como agonistas del N-metil-D-aspartico sobre los receptores específicos para esta sustancia.

La sintomatología clínica se caracteriza por un cuadro de delirio atropínico con algunos signos de intoxicación colinérgica. Los primeros signos de la intoxicación aparecen entre los 30 minutos y las 2 horas tras la ingestión, y la duración del cuadro clínico suele ser de unas 12 horas. La intoxicación comienza con náuseas, seguidas o no de vómitos, dolor abdominal y en ocasiones diarrea o estreñimiento. Estos síntomas gastrointestinales pueden ser de intensidad variable, e incluso, pueden no presentarse.

El cuadro neurológico que producen estas setas recuerda a la intoxicación por plantas atropínicas (*Atropa belladonna*, *Datura stramonium*), de ahí su denominación como intoxicación micoatropínica, se caracteriza por midriasis, taquicardia, rubefacción cutánea y un estado delirante con alteraciones visuales y euforia alternando con agresividad, síntomas que recuerdan al etilismo agudo (borracheira). Además, puede presentarse un estado convulsivo con hipertonia muscular y pérdida de conciencia, o por el contrario, hipotonía generalizada y coma.

Otro cuadro que puede aparecer es el de agitación psicomotriz. Normalmente la midriasis está presente en el transcurso del cuadro tóxico.

Tratamiento

Como tratamiento inicial se procederá a eliminar el tóxico mediante eméticos, purgantes salinos y diuresis forzada. Se deberá evitar el lava-

do de estómago por la excitación del paciente y se le repondrán las pérdidas hidroelectrolíticas causadas mediante fluidoterapia. Se procederá al tratamiento antidótico, que vendrá determinado por los síntomas que presente el intoxicado.

Como tratamiento sedante, en caso de delirio y agitación intensa, se llevará a cabo un tratamiento con clorpromacina, fenobarbital o diazepam. Como alternativa a los barbitúricos o benzodiazepínicos, en ocasiones se podrá emplear la fisostigmina a las dosis de 1 a 2 mg por vía intravenosa lenta (en 2 o 3 minutos) en adultos y de 0,2 a 0,5 mg por vía intravenosa lenta en niños. Se pueden administrar dosis repetidas si es necesario, ya que la fisostigmina se metaboliza a los 30-60 minutos. De presentarse tetania, se administrará gluconato cálcico.

A pesar de que en el tratamiento de este síndrome está contraindicada la administración de atropina, de presentarse signos de estimulación colinérgica puede estar indicado su uso.

Síndrome alucinógeno

Se debe al consumo de hongos del género *Psilocybe*, *Panaeolus*, *Stropharia*, *Conocybe*, *Inocybe* (Figura 12.3), *Copelandia*, *Pluteus*, etc. No se produce por ingestión como alimento sino que se ingiere generalmente de forma voluntaria, buscando una sensación de bienestar y delirio. Estos hongos (llamados «hongos mágicos», «hongos psicocibos», «angelitos») han sido utilizados en América Central en ceremonias religiosas, y en la actualidad son cultivados en casa por los propios consumidores, siendo el *Psilocybe cubensis* la especie que más se presta a este tipo de cultivo.

Las toxinas responsables de este efecto alucinógeno son sustancias derivadas del anillo indol, que se denominan norbaeocistina, baeocistina, psilocina y psilocibina, siendo las tres primeras precursoras del éster fosfórico de la hidroxil-4-dimetil-triptamina o psilocibina. Químicamente son semejantes a los alcaloides hidrosolubles del cornezuelo del centeno. Otras sustancias encontradas en estos hongos son: la bufotenina (5-hidroxi-N-dimetiltriptamina) que

se encuentran también en los sapos; la serotonina; la muscarina, etc.

El mecanismo de acción, al igual que la LSD, está relacionado con la estimulación de la actividad simpática y serotoninérgica, pero con menor potencia.

Cuadro clínico

Se dispone de pocas referencias de casos de intoxicación aguda provocadas por estas setas. Los síntomas se presentan en poco más de 30 o 60 minutos tras la ingestión, y los más frecuentes son alucinaciones, alteraciones de la conducta, agresividad, pérdida de control, convulsiones, síntomas digestivos, taquicardia y midriasis.

Tratamiento

Por lo general este tipo de intoxicación no precisa de tratamiento, ya que los síntomas revierten entre las 4 y 10 horas tras la ingestión.

El tratamiento será básicamente sintomático y de soporte. Al igual que en el caso de LSD, se emplearán benzodiazepinas y un agente colinérgico. Es conveniente mantener al paciente libre de estímulos sensoriales (ambiente de semipenumbra, silencioso) y acompañado por una persona que le tranquilice.

Síndrome cardiovascular

También se conoce como «síndrome coprinico o copriniano» por ser el Género *Coprinus* el hongo que con mayor frecuencia provoca la intoxicación. Algunos autores lo denominan intoxicación nitroide, ya que sus síntomas pueden ser semejantes a la acción de los nitritos vasodilatadores.

Este síndrome se asocia al consumo de las setas *Coprinus atramentarius* (seta de tinto, *bolet de femer, urbeltz*) (Figura 12.4) y *Clitocybe claviceps* (clitocibe de pie claviforme). Estos hongos dan lugar a un cuadro parecido al efecto del disulfiram o el antabús (fármaco utilizado en la psicoterapia de deshabitación de personas

alcohólicas) y se produce debido a que interfieren con el metabolismo oxidativo del etanol. Por tanto, este síndrome se presenta solo en el caso de que se haya producido junto con el consumo de estos hongos una ingestión de alcohol y solo se presenta en ciertas personas.

En 1975, Hatfield y Lindberg, aislaron la «coprina» como responsable de este síndrome. Esta sustancia se trata de un derivado de la cicloaminopropanona que interfiere el metabolismo oxidativo del etanol, provocando la acumulación de acetaldehído en el organismo, responsable de todos los síntomas.

Cuadro clínico

Este se produce si la ingestión de estas setas coincide con la ingestión de bebidas alcohólicas en un intervalo comprendido entre 3-4 horas antes, y 2-3 días después de comer las setas.

Los síntomas se presentan entre los 10 y 30 minutos de la ingestión y consisten en náuseas y vómitos, enrojecimiento de la piel, sensación de calor y palpitaciones, sequedad de boca, arritmias e hipotensión arterial grave.

Tratamiento

Además de las medidas sintomáticas y de soporte, el tratamiento consiste en la administración de vitamina C a dosis altas por vía intravenosa por su efecto favorable por su factor «redox».

Parece que el 4-metilpirazol es un eficaz antídoto en esta intoxicación, ya que su acción consiste en evitar la formación de acetaldehído, bloqueando el primer paso oxidativo del etanol.

Se administraría una dosis inicial de 5 mg/kg por vía intravenosa, que de ser necesario podría repetirse a las 6-12 horas.

Síndrome hemolítico

Numerosas especies de hongos contienen hemolisinas termolábiles capaces de provocar ciertos trastornos hemolíticos, en general leves, en caso de que se consuman crudas o poco cocinadas.

Como más representativas podemos mencionar hongos de los géneros *Helvella*, *Sarcosphaera*, *Peziza*, *Morchella* y *Mitrophara*. Se trata en gran medida de especies comestibles, muchas de ellas de gran valor gastronómico, como es el caso de las colmenillas (varias setas del género *Morchella*).

En ciertos casos la hemólisis producida por el consumo de alguna de estas setas es de escasa gravedad, tal es el caso de la *Amanita rubescens*. Esta seta contiene una toxina denominada «rubescenslisina» que produce un cuadro de hemólisis leve. Sin embargo, en ocasiones, algunas setas pueden provocar un cuadro de hemólisis grave, como ocurre con el *Paxillus involutus* (paxilo involuto) (Figura 12.5), cuya ingestión repetida puede ocasionar hemólisis severas e incluso la muerte. La hemólisis obedece a un mecanismo inmunitario de sensibilización a los antígenos del hongo por los depósitos de los complejos antígeno-anticuerpo en la superficie de los hematíes.

Cuadro clínico

Los primeros síntomas aparecen tras un periodo de incubación corto (3-4 horas). En los casos más leves se manifiesta simplemente por un color más oscuro de la orina durante 1 o 2 días. En los casos más graves pueden manifestarse vómitos y diarreas, hemoglobinuria, anemia, dolor lumbar y colapso, y posteriormente insuficiencia renal. En ocasiones se presenta discreta citólisis hepática. Es importante tener en cuenta que el consumo de ciertos lactarios comestibles, como son los del grupo de los niscalos, ocasiona la eliminación por vía renal de pigmentos coloreados que nos pueden alarmar y llegar a pensar que se trata de hongos que producen hemólisis.

Tratamiento

Se debe procurar la evacuación gástrica del tóxico lo antes posible y la restauración de las pérdidas hídricas y electrolíticas. Se aportará abundante líquido (diuresis forzada) para evitar el daño renal.

En las formas graves de hemólisis inmunitaria puede resultar de gran utilidad la exanguinotransfusión y la administración de concentrados de hematíes.

2. Intoxicaciones con periodo de latencia prolongado

En las intoxicaciones provocadas por la ingestión de setas de toxicidad retardada el intervalo desde la ingestión y la aparición de los primeros síntomas es superior a 6 horas, pudiendo llegar en algún caso hasta 10 o 15 días. Son consideradas intoxicaciones de carácter grave, y cuando aparecen las primeras manifestaciones el daño tisular es de consideración, lo que explica su mayor gravedad (Tabla 12.2). Podemos destacar:

Intoxicaciones por setas con hidracinas o síndrome giromitrano

Síndrome producido por la *Gyromitra esculenta* (Figura 12.6) y *Gyromitra gigas* (falsas colmenillas) que liberan metilhidracina al hidrolizarse en el estómago. Estas setas pueden considerarse comestibles si se desecan o se hierven previamente a su consumo y se desecha el agua de la cocción. Esto se debe a la volatilidad e hidrosolubilidad de sus toxinas. Ciertos estudios han puesto de manifiesto en animales una acción cancerígena y mutagénica por metilación del ADN.

Se ha demostrado la presencia de más de diez hidracinas distintas en estas setas involucradas en su toxicidad. La más abundante es la «giromitrina» (metiletilhidracina). Esta se hidroliza en el organismo y se transforma en monometilhidracina, que inhibe todos los procesos metabólicos que tienen como coenzima el fosfato de piridoxal, produciendo graves afecciones multisistémicas.

Cuadro clínico

Los primeros síntomas aparecen a las 6-9 horas tras la ingestión de setas en estado fresco y con-

Tabla 12.2. Intoxicaciones con periodo de latencia prolongada (> 6 horas).

Tipo de síndrome	Periodo de incubación	Setas	Toxinas	Síntomas
Intoxicación por setas con hidracina (síndrome giromitriano)	De 6 a 9 horas	<i>Giromitra esculenta</i> <i>Giromitra giga</i>	Metilhidracina	Náuseas, vómitos, diarreas, arritmias, hipotensión, trastornos de la conciencia, coma, afecciones hepáticas y renales, hemólisis
Intoxicación por setas nefrotóxicas (síndrome orellaniano)	De 2 a 17 días	<i>Cortinarius (leprocybe)</i>	Orellaninas Cortinarinas	Sed intensa, poliuria, insuficiencia renal, malestar, debilidad, dolor lumbar
Intoxicación por setas hepatotóxicas (síndrome faloideo)	De 8 a 24 horas	<i>Amanita phalloides</i> <i>Amanita virosa</i> <i>Amanita verna</i> <i>Lepiota brunneoincarnata</i> <i>Galerina</i>	Amatoxinas o amanitinas Falolisinas Falotoxinas Virotoxinas	Náuseas, vómitos, diarreas, dolor abdominal, deshidratación, afección hepática, ictericia, hepatomegalia, trastornos de la conciencia, coma, megacolon

sisten en náuseas, vómitos y diarreas de escasa intensidad, arritmias, hipotensión, trastornos de la conciencia (incluso el coma), hemólisis y más adelante afecciones hepáticas y renales. A veces, secundariamente, puede aparecer un cuadro de hemólisis.

Tratamiento

Hay que recurrir al lavado gastrointestinal y debe procederse al tratamiento sintomático y de soporte. Es útil la administración de vitamina B₆ (piridoxina) a dosis altas por vía intravenosa. En los casos que la hemólisis sea muy intensa debe protegerse la función renal con la administración de abundantes líquidos.

Intoxicaciones por setas nefrotóxicas o síndrome orellaniano

Causada por especies del género *Cortinarius* (*C. orellanus*, *C. orellanoides*, *C. speciosissimus*, *C. brunneotulvus*, *C. henrici* y *C. esplendeus* en Europa y *C. fluoresceus* en América) (Figura

12.7), concretamente del subgénero *Leprocybe*, hongos generalmente de pequeño tamaño y tonos rojizos o canela. Son escasas en el área mediterránea, sin embargo, abundan en Europa Central y Septentrional (Polonia, Suiza, Finlandia, Escocia y Noruega).

Estos hongos nefrotóxicos contienen dos tipos de toxinas: las orellaninas, del tipo biperidílico (similares al herbicida paraguat) y las cortinarinas, de tipo ciclopeptídico. Es conocido que la toxicidad de estas setas se debe principalmente a las orellaninas, por su marcada acción sobre el riñón.

Cuadro clínico

El síndrome orellaniano se caracteriza por un periodo de incubación largo (2 a 17 días) y por la aparición de sed intensa y poliuria. Se instaura poco a poco una grave insuficiencia renal, que en algunos casos es irreversible. A causa del periodo de latencia tan largo el diagnóstico resulta difícil. Prácticamente no existe fase digestiva

entre los síntomas. A veces se produce malestar general, con debilidad y dolores lumbares.

Tratamiento

No existen antidotos específicos contra las orellaninas. El tratamiento a aplicar será sintomático y de soporte. La plasmoféresis es útil siempre que se realice precozmente. En los casos graves de insuficiencia renal habrá que recurrir a la hemodiálisis e incluso al trasplante renal.

Se han descrito diversos casos de intoxicación con un cuadro nefrotóxico causadas por la ingestión de ciertas especies de setas del género *Amanita*. Tal es el caso de la *Amanita smithiana*, que causa cuadros de intoxicación en Norteamérica, caracterizados por síntomas digestivos y una grave insuficiencia renal. La seta europea *Amanita proxima*, apreciada como comestible en Europa meridional, ha provocado casos de intoxicación en Francia e Italia durante los años 1991 y 1992, que cursaba con una insuficiencia renal grave causando la muerte. Parece que los principios activos responsables de la intoxicación son pequeños péptidos.

Intoxicaciones por setas hepatotóxicas o síndrome faloideo

Este síndrome es el más importante y el más grave de los producidos por el consumo de setas. Supone aproximadamente el 90% del total de los envenenamientos que provocan la muerte en Europa.

Los hongos responsables de este tipo de envenenamiento son *Amanita phalloides* (Figura 12.8), *A. virosa*, *A. verna*, *Lepiota brunneoincarnata* y *Galerina*. La *A. phalloides* constituye el prototipo de seta hepatotóxica.

El cuadro clínico que se produce tras el consumo de estas setas se debe a sus toxinas, fundamentalmente la *amatoxina* o *amanitina*, octapéptido bicíclico que actúa produciendo la muerte celular a través de la inhibición de la síntesis del ácido ribonucleico, mensajero por bloqueo de la enzima específica, la ARN-polimerasa II, a la que se unen para interferir su acción,

fundamentalmente en las células del epitelio intestinal e hígado. Estas toxinas son eliminadas por la bilis, pero son de nuevo reabsorbidas en el intestino, con lo que se establece una circulación enterohepática de consecuencias fatales.

El descubrimiento y caracterización de las toxinas presentes en estas setas causantes de envenenamientos ha ido unido al desarrollo de métodos de análisis e investigación. Kolbert, en 1891, por primera vez intentó aislar las sustancias tóxicas y descubrió un principio hemolítico insoluble al que llamó *falolisina* y al que durante algún tiempo creyó que era el tóxico principal de la *A. phalloides*. Años más tarde, en 1909, descubrió unas toxinas aún más tóxicas.

Lynen (Premio Nobel de Química en 1964) y U. Wieland, en 1936, separaron dos tipos de toxinas: una, de acción rápida, la *faloidina*, y otra lenta, la *amanitina*, aún más tóxica que la anterior.

Luigi Fiume, profesor de Patología en la Facultad de Medicina de la Universidad de Bolonia (Italia), fue quién descubrió en 1955 la inhibición de la ARN-polimerasa II por la ingestión de amanitas y, por consiguiente, la razón de su fuerte poder tóxico.

En la actualidad, y procedentes de estas amanitas, lepiotas y galerinas han sido caracterizadas y aisladas las siguientes toxinas:

- *Falolisinas*: hemolíticas, se destruyen por el calor. Caracterizadas por Faulstian en 1983.
- *Amatoxinas*: toxinas lentas. Son las más activas y forman una familia de 9 miembros diferentes pero con el mismo esqueleto molecular bicíclico.
- *Falotoxinas*: toxinas rápidas. Forman una familia de 7 miembros con un esqueleto molecular bicíclico.
- *Virotoxinas*: presentes en la *A. virosa*. Forman una familia de 6 miembros y poseen un esqueleto molecular monocíclico.

Aunque todas ellas pueden encontrarse en la *A. phalloides* y otras especies, la que en mayor concentración se presenta es la *amatoxina*, que es la verdadera responsable del cuadro clínico.

Desde el comienzo de la intoxicación las toxinas son excretadas a través de los riñones en grandes cantidades e incluso pueden encontrarse en la orina antes de la aparición de los primeros síntomas. Pueden hallarse concentraciones urinarias 100 o 150 veces mayores que las registradas en sangre.

El hígado debe ser considerado como órgano diana de las amatoxinas, ya que estas producen una afección hepatocelular de tal magnitud que, si la cantidad de setas ingeridas es grande y no se aplica el adecuado tratamiento, se producirá una necrosis hepática que puede provocar la muerte del paciente. En estos casos, por el grave trastorno metabólico y biológico, puede producirse además un fallo renal, dándose por tanto, una insuficiencia hepatorenal.

Cuadro clínico

Se diferencian cuatro periodos evolutivos en la intoxicación por *Amanita phalloides*:

1) *Periodo de incubación o latencia*: Periodo tras la ingestión de las setas en el que no se aprecian síntomas. En general, suele ser superior a las 8 o 9 horas, con un máximo de 24 horas, que suele corresponder a los casos más leves.

2) *Fase intestinal o periodo coleriforme*: se produce un cuadro gastroenterocólico grave cuya duración oscila de 12 a 24 horas, y se caracteriza por náuseas, vómitos, dolores abdominales intensos y diarreas coleriformes que pueden ocasionar importantes pérdidas de líquidos y electrolitos, provocando una severa deshidratación, acompañada muchas veces de acidosis metabólica. Como consecuencia de esta, es frecuente la aparición de oliguria. De no corregirse este desequilibrio en este momento puede producirse en pocas horas, debido a una hipovolemia y la perfusión renal consiguientes, una lesión renal. Hay que destacar que en esta fase la bioquímica hepática es normal, no aparecen signos analíticos que revelen un fallo hepático.

En ciertas ocasiones este cuadro se acompaña de una hipoglucemia y aumento de urea y creatinina séricas. Parece que existe una rela-

ción entre la duración de esta fase gastroenterocólica y la gravedad de la intoxicación.

3) *Fase de mejoría aparente*: la duración de esta oscila entre 24-48 horas. Hay una mejoría aparente que se debe al tratamiento sintomático y al aporte de líquidos.

4) *Fase de agresión visceral*: Hacia el tercer o quinto día se presenta un súbito empeoramiento, estableciéndose una fase de afectación visceral con necrosis hepática que desencadena una insuficiencia hepática grave con ictericia, hepatomegalia, empeoramiento del estado general y, en ocasiones, diatesis hemorrágica. La analítica mostrará signos de una intensa afección hepática con citólisis (hiperbilirrubinemia, aumento de las transaminasas, alargamiento del tiempo Quick e hipoglucemia) y acidosis.

Entre el quinto y octavo día posterior a la ingestión, puede iniciarse una recuperación que cursa con un descenso de los valores enzimáticos y una recuperación de la actividad protrombínica. En este caso, a las tres semanas el paciente se recupera totalmente, siempre que no se haya producido insuficiencia hepática grave que desencadene una hepatitis crónica secundaria a la intoxicación.

Por el contrario, puede producirse un agravamiento con un aumento de las enzimas, una disminución brusca de la hepatomegalia y valores bajos persistentes del tiempo de Quick, que indicaría una necrosis hepatocelular masiva. En las formas más graves se puede llegar a una fase terminal con encefalopatía hepática que puede llevar al coma y muerte entre los días 6 y 9.

Algunos pacientes, tras esta fase pueden desarrollar entre los 5 y 15 días, una tubulonefropatía secundaria que, aunque a veces requiere de un tratamiento de hemodiálisis, la mayoría de las veces evoluciona espontáneamente hacia la curación. En raras ocasiones puede desarrollarse un megacolon como complicación en esta intoxicación faloidea. También se han descrito ciertos efectos teratógenos en madres gestantes cuando el consumo de estas setas se produce durante los tres primeros meses de la gestación.



Figura 12.1. *Boletus satanas*.



Figura 12.2. *Amanita muscaria*.



Figura 12.3. *Inocybe georphylla*.



Figura 12.4. *Coprimus atramentarius*.



Figura 12.5. *Paxillus involutus*.



Figura 12.6. *Gyromitra esculenta*.



Figura 12.7. *Cortinarius orellanus*.



Figura 12.8. *Amanita phalloides*.

El diagnóstico de la intoxicación por este tipo de setas debe realizarse precozmente, antes de que aparezca la afección hepática, ya que una vez que aparezcan analíticamente los primeros signos de daño hepático puede ser demasiado tarde para que el tratamiento sea efectivo.

Existe una prueba química sencilla para aplicar sobre las setas o restos sospechosos que pueden contribuir al diagnóstico, aunque no es fiable al 100%: el test de Wieland o Meixner. Se realiza sobre papel de periódico no satinado (que contenga lignina) y se deja caer una gota de jugo de seta sobre una zona desprovista de letras. Una vez seca la mancha, se le añade 1-2 gotas de ácido clorhídrico concentrado. Al cabo de pocos minutos aparecerá una coloración azul turquesa que demuestra la presencia de más de 0,02 mg de amatoxina por mililitro de jugo. Esta prueba se basa en la reacción producida por el hidroxilo del grupo indólico de las amatoxinas y la lignina del papel de periódico, en presencia del ácido clorhídrico.

El diagnóstico definitivo sería la confirmación de la presencia de amatoxina en orina o aspirado digestivo en las primeras 48 horas, que siempre se detectan, incluso en los casos leves. Los métodos analíticos adecuados son radioinmunoanálisis basado en una toxina marcada con yodo radioactivo y cromatografía, especialmente cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) que puede detectar desde 10 ng/ml. Esta sensibilidad es inferior que la de las técnicas de radioinmunoanálisis.

Tratamiento

En numerosos hospitales de Europa se sigue un mismo protocolo de tratamiento en la intoxicación por *Amanita phalloides*. El proceso de decisiones y actuaciones se resumen en el algoritmo propuesto por Piqueras en 1996, que detalla los pasos a seguir (Figura 12.9).

El tratamiento va dirigido a tres objetivos principales:

a) Restablecer el balance hidroelectrolítico.

b) Impedir la absorción de las toxinas y
c) Eliminar las ya absorbidas.

Previamente, es necesario controlar las constantes vitales, la presión venosa central (PVC) y la diuresis. Se establecerá una fluidoterapia intensa y se analizarán los equilibrios hidroelectrolíticos y acidobásicos, los niveles de glucemia, la función hepática y renal, y la hemostasia. A pesar de que se produce una eliminación natural de las toxinas del tubo digestivo debido al cuadro coleriforme que se origina, estas deben eliminarse con la máxima rapidez mediante un lavado intestinal total con gran cantidad de líquido, utilizando una sonda nasogástrica, al que debe adicionarse carbón activo. La sonda será utilizada después para la aspiración continua del tubo digestivo y para administrar periódicamente carbón activo.

La eliminación de las toxinas del organismo debe realizarse mediante dos vías naturales de eliminación: la vía biliar y la vía urinaria. La eliminación vía biliar completará el tratamiento anterior de aspiración continua del tubo digestivo mediante sonda, al unirse al carbón activado las toxinas que proceden de la circulación enterohepática y enteroentérica. La eliminación urinaria se realizará mediante la diuresis forzada neutra, que constituye un método muy eficaz dentro de las 36-48 horas. En los casos graves se recurrirá a la hemoperfusión con carbón activado.

Aunque no existe ninguna sustancia conocida que antagonice el mecanismo de acción de las amatoxinas, es importante instaurar un tratamiento quimioterápico con bencilpenicilina y silibinina, ya que se ha demostrado que compiten con las toxinas por un hipotético receptor membranosos de la célula hepática, y parece que un sistema multiespecífico de transporte de membrana del hepatocito, utilizado para la incorporación de múltiples sustancias, podría ser saturado por dosis altas de fármacos. Por ello se ha comprobado experimentalmente que las cafalosporinas, penicilinas, diversos derivados de vegetales como la silibinina y la aucubina y muchos otros fármacos son eficaces como antidotos.

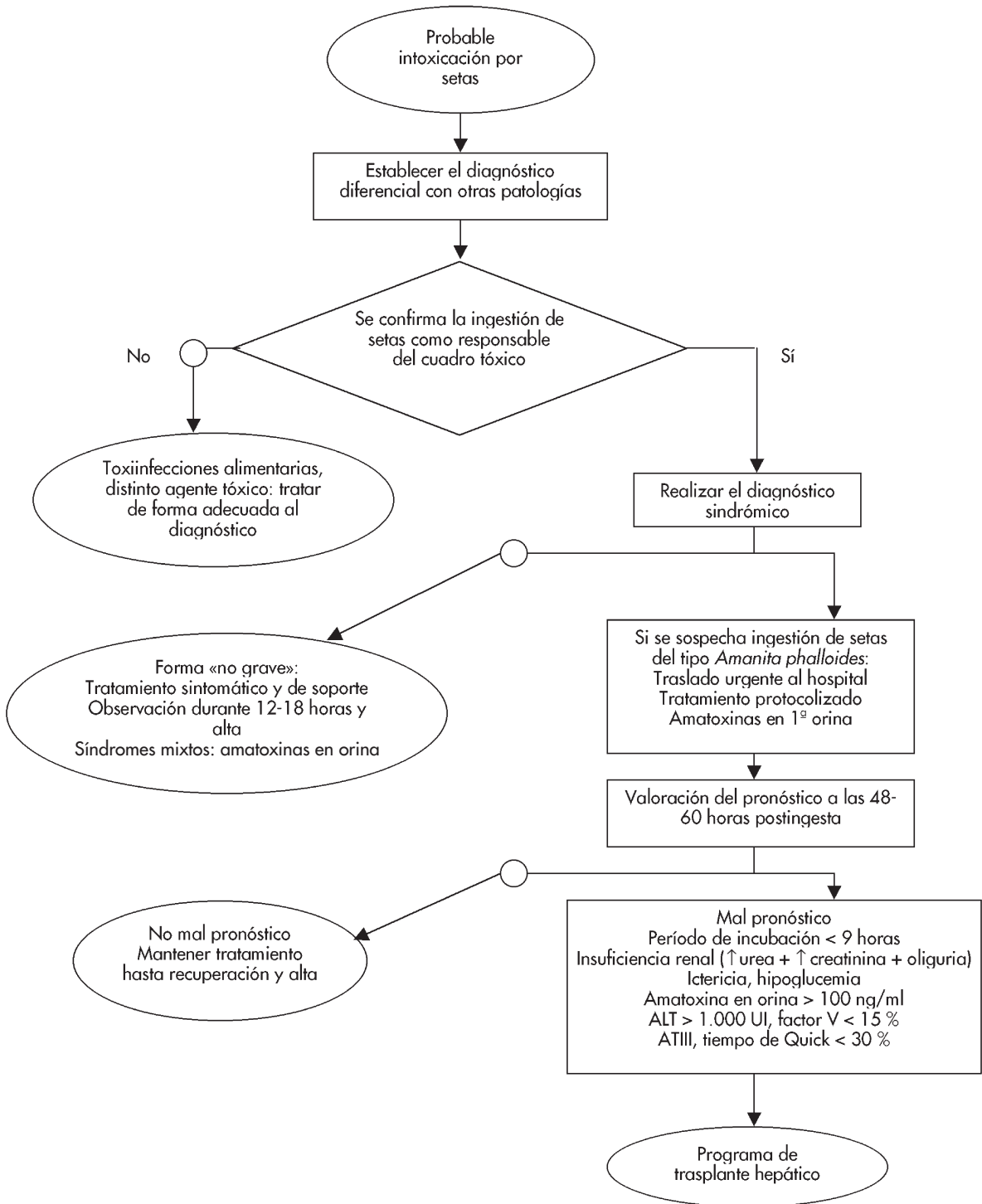


Figura 12.9. Algoritmo de decisiones en el tratamiento de las intoxicaciones por setas propuesto por Piqueras, 1996.

La pauta terapéutica a seguir se puede resumir siguiendo el esquema propuesto por el Doctor Piqueras en 1996, que se puede resumir en los siguientes puntos:

- *Aplicación de una sonda nasogástrica.* Aspiración continua. Se interrumpirá la aspiración cada 3-4 horas para la administración periódica de carbón activado y de purgantes o catárticos conjuntamente (15-30 g de sulfato sódico o magnésico, junto a 30-50 g de carbón activado, diluido todo en 250-300 ml de agua o suero fisiológico).
- *Intensa reposición de líquidos.* Por vía intravenosa con soluciones salinas y glucosadas.
- *Monitorización y seguimiento.* De parámetros analíticos (hemostasia, función renal y hepática, niveles de glucemia), balance hídrico, constantes vitales, presión venosa central y diuresis. Especial interés tienen el tiempo de protrombina, el factor V y la antitrombina III, así como los niveles de glucemia, bilirrubina y transaminasas.
- *Diuresis forzada neutra.* 3-4ml/kg/h de orina durante el primer día.
- *Administración por vía intravenosa,* con la finalidad de bloquear la entrada de toxinas en la célula hepática de:
 - *Silibinina:* de 20 a 50 mg por kg/día en 4 administraciones.
 - *Penicilina G-Na:* 300.000 U/kg/día, distribuidos en dosis cada 4 horas o preferiblemente en perfusión continua.
- *Bicarbonato, CIK, vitamina K, plasma fresco,* etc., de acuerdo con la evolución analítica.
- *Hemoperfusión en carbón activado,* en las primeras horas del ingreso en casos presumiblemente graves. Otros métodos extracorpóreos de eliminación están contraindicados. (Aunque sigue recomendándose la hemoperfusión en publicaciones recientes, los bajos niveles de toxinas en

sangre, aún en casos graves nos llevan a recomendar ese tratamiento con grandes reservas, y sin olvidar que la diuresis forzada y la aspiración digestiva son los métodos más eficaces y más indicados).

- En caso de manifestarse signos de fracaso hepatocelular grave, plantearse la posibilidad de un trasplante hepático. El parámetro más útil para predecir los casos que van a ser subsidiarios de este tratamiento es la determinación seriada del factor V y de la antitrombina III. Se observará un descenso acusado y precoz de los mismos en las formas más graves. Parecido significado tiene el descenso de la actividad global protrombínica (tiempo de Quick o de protrombina).

Otras alteraciones producidas por el consumo de setas

1. Reacciones de intolerancia

Como se ha descrito hasta el momento, la intoxicación por setas se produce por el consumo de aquellas consideradas como no comestibles, sin embargo, a veces las setas que habitualmente son consideradas como comestibles ocasionan un cuadro clínico en el individuo que los consume. Esto habitualmente se produce cuando las setas se recolectan en malas condiciones (tras una helada, por ejemplo), otras veces se trata de ejemplares inmaduros o demasiado viejos que producen cuadros digestivos o cefaleas, y a veces, incluso pueden aparecer ciertos trastornos en personas que comen setas consideradas no tóxicas, recolectadas y preparadas en buenas condiciones. En este último caso podemos hablar de reacciones de intolerancia en ciertos individuos.

Cuadros de alergia

Se trata, por lo general, de reacciones de alergia por contacto o inhalación de esporas. Se produ-

ce en raras ocasiones tras la ingestión de setas y cursa con un cuadro de alergia intestinal, como el descrito por el consumo de *Pleurotus ostreatus*, boletos del subgénero *Suillus*, y de *Tracnolomepsis platyphilla*.

El desarrollo de dermatitis alérgicas de tipo eczematoso por contacto se presenta en ciertos individuos sensibles a determinadas setas por mero contacto con la piel. Este proceso es similar al que se manifiesta con determinadas plantas y se trata de una hipersensibilidad de tipo I mediada por inmunoglobulinas del tipo IgE, que se caracteriza por síntomas cutáneos como eritemas, edemas, urticaria, picor, etc. Las setas implicadas en este cuadro pueden ser setas del género *Suillus* (*S. americanus*, *S. granulatus*, *S. luteus*, *S. grevillei*, *S. neoalbidipes*, etc.) y del género *Agaricus* (*A. campestris* y *A. bispous*). También se han descrito estas dermatitis por contacto por *Paxillus involutus*, *Lactarius dilliciousus*, *Romaria flave* y *Gyromitra esculenta*.

Se han reseñado enfermedades del sistema respiratorio provocado por setas a los que se asocia un mecanismo inmunitario o alérgico. Tal es el caso de la enfermedad respiratoria denominada «pulmón del cultivador de setas» asociada a una hipersensibilidad inmediata de tipo I provocada por inhalación de antígenos fúngicos.

Síndromes acumulativos

Desde hace unos 25 años vienen apareciendo en la literatura científica numerosos artículos relacionados con la presencia de ciertos metales en las setas, (cadmio, plata, mercurio, molibdeno, selenio,...), siendo plomo, cadmio y mercurio los más estudiados. La relación de la existencia del metal en el medio y el que toma el hongo que crece en él es muy variable. Algunas setas lo acumulan en pequeñas concentraciones mientras que otras lo hacen en grandes cantidades.

Por lo general, los hongos manifiestan poca tendencia a acumular plomo, mientras que el cadmio y el mercurio pueden alcanzar altos niveles en las setas. Tal es el caso de las *Psatio-*

tas flavescens, que a menudo contienen más de 50 ppm de cadmio. Parece ser que una fosfoglicoproteína presente en ellos es la responsable de esta acumulación.

Bibliografía

- Barile FA (2004). *Clinical toxicology. Principles and mechanisms*. CRC, LLC, Florida.
- Benjamin DR (1992). Mushroom poisoning in infants and children: the *Amanita pantherina*/ *muscaria* group. *J Toxicol Clin Toxicol* 30:13-22.
- Bonnet MS, Basson PW (2002). The toxicology of *Amanita phalloides*. *Homeopathy* 91:249-254.
- Broussard CN, Aggarwal A, Lacey SR, Post AB, Gramlich T, Henderson JM *et al.* (2001). Mushroom poisoning—from diarrhea to liver transplantation. *Am J Gastroenterol* 96:3195-3198.
- Carod Artal FJ (2003). Neurological syndromes associated with the ingestion of plants and fungi with a toxic component (II). Hallucinogenic fungi and plants, mycotoxins and medicinal herbs. *Rev Neurol* 36:951-960.
- Catalina MV, Nunez O, Ponferrada A, Menchen L, Matilla A, Clemente G *et al.* (2003). Liver failure due to mushroom poisoning: clinical course and new treatment perspectives. *Gastroenterol Hepatol* 26:417-420.
- Ceballos R (1994). Intoxicaciones por setas. Síndromes y constitución química. *Alimentaria* 256:65-80.
- Cooper MR, Johnson AW (1998). *Poisonous plants and fungi in Britain. Animal and human poisoning*. Second edition. The Stationery Office, London.
- Cox A, Folgering HT, van Griensven LJ (1988). Extrinsic allergic alveolitis caused by spores of the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Eur Respir J* 1:466-468.
- Duvic C, Hertig A, Herody M, Dot JM, Didelot F, Giudicelli CP *et al.* (2003). Acute renal failure following ingestion of *Cortinarius orellanus* in 12 patients. Initial presentation and progress over a period of 13 years. *Presse Med* 32:249-253.
- Ejalbert F, Gallion C, Jehl F, Monteil H (1993). Toxin content, phallotoxin and amatoxin composition of *Amanita phalloides* tissues. *Toxicon* 31:803-807.

- Enjalbert F, Rapior S, Nougulier-Soule J, Guillon S, Amouroux N, Cabot C (2002). Treatment of amatoxin poisoning: 20-year retrospective analysis. *J Toxicol Clin Toxicol* 40:715-757.
- Eyer F, Felgenhauer N, Zilker T (2004). The development of a toxic megacolon due to *Amanita phalloides* poisoning. A rare complication. *Dtsch Med Wochenschr* 129:137-140.
- Faybik P, Hetz H, Baker A, Bittermann C, Berlakovich G, Werba A *et al.* (2003). Extracorporeal albumin dialysis in patients with *Amanita phalloides* poisoning. *Liver Int* 23:28-33.
- Fineschi V, Di Paolo M, Centini F (1996). Histological criteria for diagnosis of *amanita phalloides* poisoning. *J Forensic Sci* 41:429-432.
- Himmelmann A, Mang G, Schnorf-Huber S (2001). Lethal ingestion of stores *Amanita phalloides* mushrooms. *Swiss Med Wkly* 131:616-617.
- Jander S, Bischoff J, Woodcock BG (2000). Plasmapheresis in the treatment of *Amanita phalloides* poisoning: II. A review and recommendations. *Ther Apher* 4:308-12.
- Kaneko H, Tomomasa T, Inoue Y, Kunimoto F, Fukusato T, Muraoka S *et al.* (2001). Amatoxin poisoning form ingestion of Japanese *Galerina* mushrooms. *J Toxicol Clin Toxicol* 39:413-416.
- Karlson-Stiber C, Persson H (2003). Cytotoxic fungi-an overview. *Toxicon* 42: 339-349.
- Koppel C (1993). Clinical symptomatology and management of mushroom poisoning. *Toxicon* 31:1513-1540.
- Mateu Sancho J (1994). *Toxicología médica*. Doyma, S.A. Barcelona.
- Michelot D (1992). Poisoning by *Coprinus atramentarius*. *Nat Toxins* 1: 73-80.
- Michelot D, Melendez-Howell LM (2003). *Amanita muscaria*: chemistry, biology, toxicology, and ethnomycology. *Mycol Res* 107:131-146.
- Michelot D, Toth B (1991). Poisoning by *Gyromitra esculenta*—a review. *J Appl Toxicol* 11:235-243.
- Ortega A, Piqueras J, Amate P (1996). *Setas identificación toxicidad gastromicología*. Proyecto Sur S.L. Granada.
- Paydas S, Kocak R, Erturk F, Erken E, Zaksu HS, Gurcay A (1990). Poisoning due to amatoxin-containing *Lepiota* species. *Br J Pract.* 44:450-453.
- Piqueras Carrasco J (1996). *Intoxicaciones por plantas y hongos*. Masson, S.A. Barcelona.
- Puig A, Chumillas C, Camprodon J, de Francisco E, Furio MP, Ferrán G (2001). *Lepiota bruneoincarnata* fatal intoxication. *An Med Interna* 18:481-482.
- Sabeel AI, Kurkus J, Lindholm T (1995). Intensive hemodialysis and hemoperfusion treatment of *Amanita* mushroom poisoning. *Mycopathologia* 131:107-114.
- Saviuc P, Flesch F (2003). Acute higher fungi mushroom poisoning and its treatment. *Presse Med* 32:1427-1435.
- Saviuc P, Garon D, Danel V, Richard JM (2001). *Cortinarius* poisoning. Analysis of cases in the literature. *Nephrologie* 22:167-173.
- Schleufe P, Seidel C (2003). *Amanita* poisoning during pregnancy. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 38:716-718.
- Shiono Y, Matsuzaka R, Wakamatsu H, Muneta K, Murayama T, Ikeda M (2004). Fascicularones A and B from a mycelial culture of *Naematoloma fasciculare*. *Phytochemistry* 65:491-496.
- Splendiani G, Zazzaro D, Di Pietrantonio P, Delfino L (2000). Continuous renal replacement therapy and charcoal plasmapheresis in treatment of *amanita* mushroom poisoning. *Artif Organs* 24:305-308.
- Sticht G, Käferstein H (2000). Detection of psilocin in body fluids. *Forensic Science International* 113: 403-407.
- Timar L, Czeizel AE (1997). Birth weight and congenital anomalies following poisonous mushroom intoxication during pregnancy. *Reprod Toxicol* 11:861-866.
- Vetter J (1998). Toxins of *amanita phalloides*. *Toxicon* Vol. 36:13-24.
- Wornle M, Angstwurm MW, Sitter T (2004). Treatment of intoxication with *Cortinarius speciosissimus* using an antioxidant therapy. *Am J Kidney Dis* 43:3-6.

SUSTANCIAS ANTINUTRITIVAS PRESENTES EN ALIMENTOS

M.ª Lourdes Morales, Ana M.ª Troncoso

Introducción. Inhibidores de enzimas. Antiminerales. Antivitaminas. Antinutrientes polivalentes. Bibliografía.

Introducción

Los alimentos habituales en la dieta poseen una naturaleza compleja y pueden presentar en su composición sustancias con cierta capacidad para disminuir su valor nutritivo. Por ello, estas sustancias reciben el apelativo de antinutrientes o sustancias antinutritivas. Estos términos fueron introducidos por Gontzea y Sutzescu en 1968. En general, estas sustancias están presentes de forma natural en los alimentos, son de distinta naturaleza y su presencia implica que ciertos nutrientes de los mismos no puedan ser utilizados por el organismo humano. Suponen un problema para la salud pública, ya que su consumo continuado puede dar lugar a una patología si no se compensa este déficit con el aporte de un suplemento.

Los antinutrientes pueden definirse, por tanto, como sustancias que por ellas mismas o a través de sus productos metabólicos generados en el organismo, interfieren en la utilización de los alimentos, pudiendo afectar a la salud de los consumidores (Makkar, 1993).

Las sustancias antinutritivas suelen encontrarse en los alimentos (tanto de origen animal como vegetal) en pequeñas cantidades, apareciendo con mayor frecuencia en los de origen vegetal. Generalmente, son compuestos termolábiles y se destruyen por el calor, durante el cocinado de los alimentos. El consumo habitual de alimentos vegetales, crudos, junto a la mayor presencia de sustancias antinutritivas en ellos, hace que los alimentos de origen vegetal tengan mayor protagonismo en este contexto.

Durante la primera mitad del siglo XX, las investigaciones en la ciencia de la Nutrición sirvieron para la identificación de los nutrientes esenciales y el establecimiento de estándares nutricionales principalmente con el objeto de prevenir deficiencias y favorecer el crecimiento, desarrollo y mantenimiento del organismo. En este periodo, en el cual los objetivos se reducían a alcanzar aportes adecuados de los distintos nutrientes, surge el interés sobre las sustancias antinutritivas que obstaculizan dicho fin. Al comparar los datos analíticos referentes a los contenidos en nutrientes con los datos experimentales *in vivo* (mediante modelos animales), se puso de

manifiesto la presencia de sustancias que impedían un aprovechamiento adecuado de los mismos, a las que se les denominó antinutrientes.

En el último tercio del siglo XX, se reconoce el efecto negativo del consumo excesivo de determinados nutrientes que son potenciadores de enfermedades crónicas como la diabetes tipo II, enfermedades cardiovasculares, la hipertensión y el cáncer. Una vez reconocida la importancia de la dieta en la salud aparece el concepto de nutrición óptima, que ha dado lugar al comienzo de la era de los alimentos funcionales en el siglo XXI. Por tanto, en la actualidad, ante la gran oferta de alimentos, disminuye la preocupación por la presencia de antinutrientes. De hecho, a algunos de ellos, según indica Shahidi (1997), se les atribuyen ahora efectos beneficiosos para la salud a bajas concentraciones.

Sin embargo, la presencia potencial de sustancias antinutritivas en los alimentos sigue siendo de vital importancia en los países subdesarrollados, donde la escasez de alimento obliga a que el consumo de los mismos aporte en la medida de lo posible los nutrientes necesarios para un estado de salud adecuado. En dichos países se siguen buscando nuevas fuentes de alimentos que aporten cantidades adecuadas de nutrientes y, por tanto, que presenten el mínimo contenido de antinutrientes o que sean fácilmente inactivados. En este contexto, la biotecnología está jugando un papel crucial.

Las sustancias antinutritivas suelen clasificarse de forma clásica en tres grupos según el nutriente sobre el que actúan:

- Sustancias que afectan o inhiben la utilización de las proteínas.
- Sustancias que impiden que algunas vitaminas sean utilizadas correctamente por el cuerpo humano, llamadas también antivitaminas.
- Sustancias que interfieren en la absorción o asimilación de los minerales.

A estos tres grupos se les puede sumar un cuarto en el que se incluyen aquellos antinutrientes que pueden interferir sobre varios gru-

pos de nutrientes presentando una actividad polivalente. En el desarrollo de este capítulo consideraremos una modificación de la clasificación de Bender (1987) muy similar a la clásica antes señalada. Así se abordan los siguientes apartados: inhibidores enzimáticos, antiminerales, antivitaminas y antinutrientes polivalentes.

Inhibidores de enzimas

La presencia de inhibidores enzimáticos es frecuente en las fuentes de alimentación humana, tanto animales como vegetales, y ejercen diferentes funciones en los organismos que los contienen, bien inhiben los sistemas enzimáticos de sus depredadores (microorganismos o insectos) o bien tienen función reguladora, interviniendo en procesos de almacenamiento. La primera sustancia de este tipo que se identificó fue un inhibidor de tripsina aislado del páncreas de un ternero y que protegía a dicho órgano de sus propias enzimas proteolíticas.

Los compuestos que actúan como inhibidores enzimáticos tienen diferente naturaleza, como los taninos de naturaleza polifenólica, termoestables y con poca especificidad (se ligan a los enzimas e impiden su función); o bien puede tratarse de proteínas que ejercen una inhibición sobre enzimas específica. Desde el punto de vista nutricional, los que mayor interés tienen son los inhibidores de proteasas y de amilasa.

1. Inhibidores de proteasas

Aunque la inhibición de los enzimas proteolíticos se demostró por primera vez en el siglo XIX a partir de extractos de tejidos animales (Fredericq, 1878), es a partir de 1930 cuando se reconoce dicha actividad en material vegetal. Read y Haas (1938) demostraron que un extracto acuoso de harina de soja inhibía la propiedad de la tripsina de licuar gelatina. Posteriormente, Kunit (1945, 1946) aisló por primera vez un

inhibidor de proteasa procedente de la soja. Un año después, Borchers y Ackerson (1947) llevan a cabo un estudio sistemático de inhibidores de proteasas en plantas.

Aunque los inhibidores de proteasas más estudiados han sido los de legumbres, también se han encontrado en otros alimentos tanto de origen animal (clara del huevo, leche, calostro) como vegetal (cereales y tubérculos, principalmente) (Tabla 13.1). La mayoría son proteínas solubles de bajo peso molecular.

El hecho de que los inhibidores de proteasas estén ampliamente distribuidos entre aquellas plantas que son una fuente importante de proteínas ha estimulado la investigación sobre su posible implicación nutricional. El caso de la soja ha recibido especial atención por su extendido consumo, tanto en alimentación animal como humana.

Los inhibidores de proteasas más estudiados han sido los de tripsina, ya que es una enzima digestiva de gran importancia en la digestión de los monogástricos como el ser humano. Además, la mayoría de los inhibidores enzimáticos actúan frente a esta enzima y frente a la quimiotripsina, pero también pueden inhibir otras enzimas como la elastasa, papaína, etc. En muchos casos, en el material vegetal no existe solo un inhibidor, sino una serie de ellos que se diferencian en su especificidad, en su actividad y en su estabilidad térmica (Belitz y Grosch, 1997).

Tabla 13.1. Principales fuentes animales y vegetales de inhibidores de proteasas.

FUENTES ANIMALES	FUENTES VEGETALES
Huevo de gallina	Avena
Leche	Arroz
Calostro	Cacahuete
	Colza
	Garbanzo
	Guisante
Páncreas bovino	Haba
	Judía
	Maíz
	Patata
	Remolacha roja
	Soja

En relación a su efecto como antinutrientes, parecen causar retraso en el crecimiento y un bajo índice de la eficacia proteica (parámetro utilizado para medir la calidad de las proteínas).

El efecto de los inhibidores de la proteólisis sobre el páncreas ha sido objeto de numerosos estudios que ponen en evidencia una hipertrofia de este órgano y un aumento de la actividad proteolítica, mientras que la actividad lipasa y amilasa quedan inalteradas. La hipertrofia pancreática en respuesta a los agentes antitripsínicos es muy variable según las especies animales; el hombre es una especie con respuesta baja. Sin embargo, en ratas y gallinas alimentadas con harina de soja cruda se ha observado hiperplasia reversible del páncreas (Mitjavila, 1990).

Los inhibidores de proteasas pueden producir ciertos efectos fisiológicos en animales, la cuestión es si tienen significancia fisiológica en humanos. Se especula todavía sobre el efecto nutricional en humanos. Muchos autores opinan que parecen causar pocos o nulos efectos deletéreos en nutrición humana.

La actividad inhibidora se determina rutinariamente con enzimas animales comerciales. La estabilidad del inhibidor durante el tránsito por el estómago debe tenerse en cuenta también a la hora de evaluar un efecto potencial. Por ejemplo, el inhibidor Kunitz de la soja es inactivado totalmente por el jugo gástrico humano, mientras que el inhibidor de Bowman-Birk de la misma procedencia no lo es en absoluto. Por otro lado, la especificidad frente a las proteasas varía considerablemente, así el ovomucoide, el ovoinhibidor, ambos de la clara del huevo, y el inhibidor de Kazal del páncreas bovino no presentan efecto frente a las enzimas humanas. El inhibidor de Kunitz de páncreas bovino inhibe la tripsina humana, pero no la quimiotripsina.

Estos inhibidores enzimáticos, debido a su naturaleza proteica, se desnaturalizan térmicamente en la mayoría de los casos, perdiendo su efecto antinutriente. En el caso de las legumbres, una vez inactivados los inhibidores de proteínas tienen interés nutricional al proporcionar los aminoácidos azufrados en los cuales son deficitarias las proteínas de las mismas.

Como la estabilidad térmica de los inhibidores de proteasas es muy variada, es necesario un control constante y cuidadoso de las materias primas y de los productos en la elaboración de alimentos, especialmente si se utilizan materiales y procesos nuevos.

2. Inhibidores de amilasas

En los extractos acuosos de judías blancas, trigo y centeno aparecen proteínas relativamente termoestables con acción inhibitoria de la amilasa pancreática (Kneen y Sandstedt, 1943; Bowman, 1945). Estas enzimas no parecen presentar actividad frente a las amilasas propias, por lo que se les atribuye una función protectora contra insectos. Se han estudiado principalmente en cereales pero se han encontrado además en judías, lentejas, garbanzos, patata y mango (Whitaker y Feeney, 1973; Mitjavila, 1990) pudiendo afectar a las amilasas salivales, pancreáticas, así como a las bacterianas.

Existe controversia respecto al efecto que estos inhibidores de amilasa tienen desde el punto de vista nutricional. La razón probablemente radique en las distintas características que presentan estos inhibidores, dependiendo de la fuente alimenticia de la que procedan. Generalmente estas sustancias de naturaleza proteica son lábiles al calor, además, el efecto de inhibición puede desaparecer al ser destruidos los inhibidores de amilasa por las enzimas proteolíticas del tracto digestivo, por ello parece dudoso que tengan un significado antinutricional. Por otro lado, se ha comprobado que tampoco producen hiperplasia pancreática.

Una disminución en el grado de hidrólisis del almidón debido a la presencia del inhibidor en intestino delgado llevaría lógicamente a una lenta absorción de la glucosa y a posibles cambios metabólicos. Estos efectos han sido observados en ratas y perros al ingerir dietas ricas en almidón junto a inhibidores de amilasas procedentes de trigo. En humanos, se han observado también efectos sobre los niveles de glucosa en sangre, tanto en diabéticos como en

individuos normales (Layer *et al.* 1986; Boivin *et al.* 1987; Kartrom *et al.* 1987; Boivin *et al.* 1989)

En 1975, Marsall y Lauda describieron la purificación y caracterización de un inhibidor no competitivo de α -amilasa pancreática obtenido a partir de judías blancas al que denominaron «Phaseolamin», redescubriéndose la actividad antiamilasa de las alubias más de 20 años después de los trabajos de Bowman.

Como consecuencia de estos trabajos de Marshall y Lauda se patentaron en EE UU más de cien preparados diferentes catalogados todos bajo la denominación de «bloqueadores de almidón» y que se pusieron a la venta para el tratamiento y prevención de la obesidad. La publicidad que acompañó a la puesta en venta de estos productos fue tan atractiva que se contabilizó el consumo de un millón de tabletas diarias de tales productos en 1982 (Campillo *et al.* 1999). Tras estudios rigurosos, (Bo-Linn *et al.* 1982) se demostró que estas tabletas no inhibían la digestión del almidón ni la cantidad de calorías que aportan las comidas ricas en almidón. Parece que la causa de la ineficacia de estos preparados era la baja actividad antiamilásica que poseían. Así, su potencial empleo en el tratamiento de la diabetes y la obesidad requiere continuar con las investigaciones para obtener preparados con suficiente actividad antiamilasa y resistente a las condiciones del sistema digestivo humano.

Antiminerales

En este grupo de sustancias presentes en los alimentos que interfieren en la asimilación de minerales suele darse especial importancia a los agentes bociogénicos, ácido oxálico y también ácido fítico, que aunque es un antinutriente polivalente, ejerce su efecto más importante sobre la asimilación de minerales como el calcio, hierro o zinc.

1. Agentes bociogénicos

1.1. Glucosinolatos

El bocio es una enfermedad producida por un déficit de yodo. El efecto bociogénico se puede asociar a la presencia en la dieta de tioglucósidos como los glucosinolatos. Estos compuestos bociogénicos se encuentran principalmente en plantas crucíferas, y en especial en las del género *Brassica* (Shahidi *et al.* 1997). Los glucosinolatos son metabolitos secundarios de las plantas de la familia de las crucíferas y se encuentran en hortalizas como coliflor, col de Bruselas, brócoli, nabo, lombarda, repollo, berza y en las semillas de la mostaza. La cantidad de glucosinolatos varía de una especie a otra (Tabla 13.2) y dentro de una misma especie podemos encontrar diferentes concentraciones debido a factores genéticos o agronómicos.

Su acción se debe a que interfieren en la disponibilidad del yodo para la glándula tiroidea causando hipertrofia de esta glándula. Esta actividad antitiroidea de algunos alimentos fue descubierta a raíz de las observaciones accidentales sobre el peso del tiroides en conejos sometidos a un régimen rico en hojas de col, así el primer glucosinolato que se aisló fue la sinigrina.

La fórmula general aceptada de este tipo de tioglucósidos se ilustra en la Figura 13.1. Normalmente estos compuestos se encuentran

en las plantas en forma de sales, principalmente de potasio. La estructura química del radical R varía dando lugar a los distintos glucosinolatos: alifáticos (cadena alifática saturada o insaturada), indoles y aromáticos.

Los glucosinolatos se presentan en los alimentos de origen vegetal asociados al sistema enzimático que los hidroliza. Este no se activa hasta que la materia prima húmeda no se rompe y se ponen en contacto enzima y sustrato. Como se observa en el esquema (Figura 13.2), la hidrólisis de los glucosinolatos puede dar lugar a diferentes productos, dependiendo de las condiciones de hidrólisis y del tipo de glucosinolato, es decir, la cadena lateral es la que determina la naturaleza química de los productos de la hidrólisis. Su efecto tóxico depende de la hidrólisis, ya que el mecanismo de acción de los posibles productos es diferente. Así por acción de una tioglucosidasa, la mirosidasa (conjunto formado como mínimo por tres o cuatro enzimas) se pueden liberar tiocianatos, isocianatos o nitrilos. Las bacterias intestinales son capaces también de liberar los principios activos de los tioglucósidos. Los isotiocianatos pueden transformarse en tiooxazolidinas (oxazolidinaciones). Para que esto ocurra parece que es necesaria la presencia de un grupo OH en la posición 2 de la cadena alifática.

Los tiocianatos e isotiocianatos son iones de tamaño similar al yodo y pueden inhibir competitivamente el transporte activo de este a nivel del tiroide y otros tejidos, aumentando la pérdida renal del mismo. En este caso un aporte de yodo puede compensar el déficit, por ello se dice que tiene efecto indirecto. Sin embargo, las tiooxazolidinas poseen un grupo tioamina que

Tabla 13.2. Contenido total de glucosinolatos en algunas hortalizas (Deshpande y Sathe, 1991; Verkerk *et al.* 1998).

HORTALIZAS	CONTENIDO GLUCOSINOLATOS (mg/g)
Calabaza	0.26-1.56
Calabaza china	0.17-1.36
Coles de Bruselas	0.60-3.90
Coliflor	0.61-1.14
Nabo	0.21-2.27
Rábano	0.42-1.19
Rábano picante	33.2-35.4
Mostaza blanca	22.0-52.0
Mostaza negra	18.0-60.0
Colza	13.0-42.0

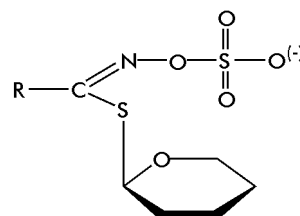


Figura 13.1. Fórmula general de glucosinolatos.

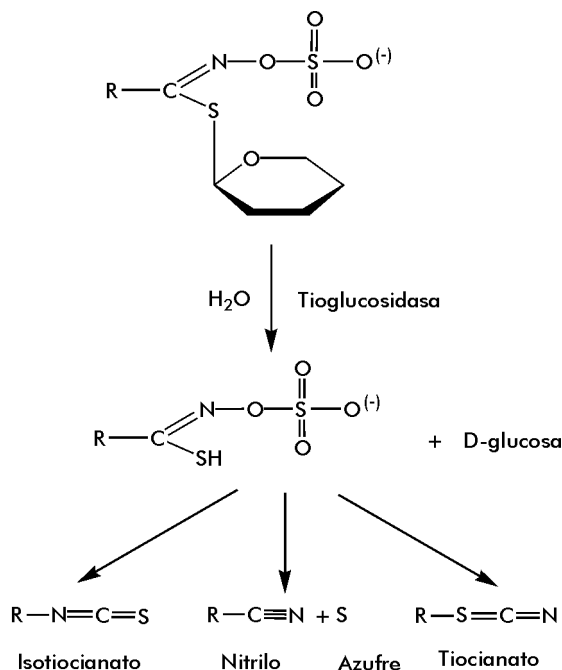


Figura 13.2. Hidrólisis enzimática de glucosinolatos.

interfiere ligeramente en la fijación de yodo por el tiroides. Para restablecer la situación normal la administración de yodo no es efectiva, se debe administrar la hormona; por ello se dice que tienen un efecto directo (Mitjavila, 1990).

En la actualidad la investigación se dirige a los nitrilos, ya que tanto las pruebas *in vitro* como los bioensayos con animales muestran que pueden ser más tóxicos que los isotiocianatos y los tiocianatos respectivos.

Los glucosinolatos pueden tener efectos beneficiosos sobre la salud. El papel protector de las crucíferas frente al cáncer parece deberse a su alto contenido en glucosinolatos (Verkerk *et al.*, 1998; Johnson, 2002). En concreto, a los isotiocianatos originados tras la hidrólisis enzimática. Parece que el mecanismo de acción es el bloqueo por inducción de las enzimas de la fase II en la mucosa del intestino delgado y en el hígado (Zhang *et al.*, 1992; Talalay y Zhang, 1996; Nestle, 1997) y también impiden el desarrollo del cáncer porque induce apoptosis (Smith *et al.*, 1996).

A pesar de estos efectos beneficiosos se recomienda disminuir en lo posible la concentración de estos compuestos, y hasta el momento lo que mejor ha funcionado es la mejora genética hacia la obtención de variedades con bajos contenidos de glucosinolatos.

1.2. Glucósidos cianogénicos

Los glucósidos cianogénicos son importantes tóxicos, ya que en su hidrólisis enzimática (cianogénesis) se libera cianuro. Estos compuestos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Algunas de estas plantas son utilizadas frecuentemente como fuente de alimento por el ser humano, como la judía de lima, la mandioca, las almendras amargas, etc.

Las enzimas responsables de la cianogénesis están presentes en los alimentos que contienen glucósidos cianogénicos pero se encuentran separadas de los mismos, bien en compartimentos diferentes dentro de la misma célula vegetal o bien en otros tejidos (Conn, 1979). Durante la preparación culinaria o la masticación de los alimentos, enzima y sustrato pueden entrar en contacto teniendo lugar la cianogénesis. La acción de las bacterias intestinales también puede dar lugar a la liberación del cianuro.

El cianuro liberado es absorbido en el tracto gastrointestinal y cuando alcanza dosis subletales se convierte en tiocianato en el proceso de detoxificación, este inhibe el transporte activo del yodo al tiroide y produce el bocio (Deshpande, 2002).

2. Ácido oxálico

El ácido oxálico está presente en numerosas plantas en forma libre o en forma de sales de sodio, potasio y calcio, siendo estas últimas insolubles. Así, los efectos nocivos del ácido oxálico se deben a que interfiere en la asimilación del calcio y a que pueden dar lugar a la formación de cálculos renales (Villanúa y Torija, 2001). En la Tabla 13.3 se muestran los contenidos en ácido oxálico de determinadas hortalizas.

Tabla 13.3. Contenidos medios de oxalato y relación oxalato/calcio en alimentos (Gontzea y Sutzescu, 1968; Concon, 1988).

Alimentos	mg Oxalato/100 g alimento	Oxalato/calcio
Ruibarbo	805	8.5
Espinaca	970	4.3
Remolacha	275	5.1
Cacao	700	2.6
Café	100	3.9
Té	1150	1.1

Una cantidad de 2,25 g de ácido oxálico precipita 1 g de calcio, por tanto, el efecto adverso sobre la disponibilidad del calcio de este compuesto viene determinado por la relación oxalato/calcio que contenga el alimento. Así, una relación ácido oxálico/calcio superior a 1 afecta a la disponibilidad del calcio y mayor de 2,25 debe ser considerada descalcificante (Mitjavila, 1990; Deshpande, 2002).

En contraste a lo que ocurre con el calcio, el ácido oxálico no parece interferir en la absorción del zinc (Welch *et al.* 1977).

La toxicidad aguda de los oxalatos en humanos se debe a que se produce gastroenteritis corrosiva, shock, convulsiones, bajada del nivel de calcio en plasma, con el correspondiente aumento de oxalatos y daño renal. Estos episodios de envenenamiento agudo en humanos son raros. Para que ocurra un efecto antinutriente deben darse simultáneamente las circunstancias de alta ingesta de oxalatos con bajos aportes de calcio y vitamina D por un periodo prolongado (Deshpande, 2002).

Parece que los procesos culinarios de remojo y cocción eliminan parte de este compuesto y disminuyen el efecto antinutritivo en los alimentos que los contienen.

Antivitaminas

Las sustancias antivitaminas las definió Somogyi (1973) como compuestos que disminuyen o

anulan el efecto de una vitamina en una vía específica, e indicó que pueden ser análogos estructurales o bien sustancias que modifiquen la estructura de la vitamina, dando origen a la disminución o anulación de sus efectos.

Una antivitamina puede definirse también como cualquier sustancia que interfiere con la síntesis o metabolismo de una vitamina, ya sea por inactivación o destrucción química, por combinación irreversible o bien por inhibición competitiva (Rojas, 1998).

Una definición más reciente incluye, dentro de las antivitaminas, también a aquellos compuestos que incrementan los requerimientos fisiológicos de las mismas (Deshpande, 2002).

Somogyi (1978) propone dividir las antivitaminas en dos grupos: las que son similares estructuralmente y compiten con la vitamina, y las que modifican la estructura de la molécula o forman un complejo con la vitamina, destruyéndola o disminuyendo su efecto.

La mayoría de las antivitaminas aparecen en los alimentos de forma natural. Aunque el efecto dañino de la ingestión de la clara del huevo cruda se conocía desde 1916 no se relacionaba con la biotina, la cual fue descubierta posteriormente. Por ello, la primera antivitamina que se describió fue la antitiamina a mediados de los años treinta. Esta se detectó por primera vez en zorros plateados, a los que se les alimentó con vísceras de carpas o de truchas crudas. Estos animales sufrían lo que se denominó «parálisis de Chastek», presentando anorexia, parálisis, perturbaciones neurológicas y morían a las 12 horas debido a un antagonista de la tiamina presente en la dieta que se les proporcionó (Green, 1937).

1. Antitiamina

Existen varios compuestos con actividad antitiamina. Entre los factores que alteran la estructura de la tiamina (vitamina B₁) algunos son de origen animal, como la tiaminasa I, presente en vísceras y carne de animales acuáticos. La tiaminasa I es una enzima muy activa, que cataliza la descomposición de la vitamina, favoreciendo la sustitución en el anillo tiazólico por una base

o un sulfhidrilo. El producto que resulta es inactivo biológicamente. Esta enzima, por su naturaleza proteica, es termolábil.

Existen otras sustancias, como la tiaminasa II, enzima responsable, por ejemplo, de los síntomas de avitaminosis en los herbívoros alimentados con helechos. Cataliza la hidrólisis de la tiamina en los dos anillos tiamínico y piridínico, inactivándola completamente (Figura 13.3).

El efecto de inactivación de la tiamina se ha descrito en muchas especies de pescado, cangrejos y almejas, así como en frutas y hortalizas como arándanos, grosella, remolacha, coles de Bruselas y calabaza roja.

Existen además otros compuestos que alteran la actividad vitamínica de la tiamina como los taninos, cuyo efecto se ha comprobado por el consumo de té, o los derivados orto-catecol, como el ácido cafeico, el ácido clorogénico y el metilsinapato, entre otros (Deshpande, 2002).

La presencia de estos factores antitiamina pueden dar origen a un grave estado de avitaminosis B₁ con sintomatología nerviosa e incluso la muerte (Villanúa y Torija, 2001).

2. Antibiotina

El descubrimiento de la biotina se debió a las investigaciones que se llevaron a cabo a raíz de la

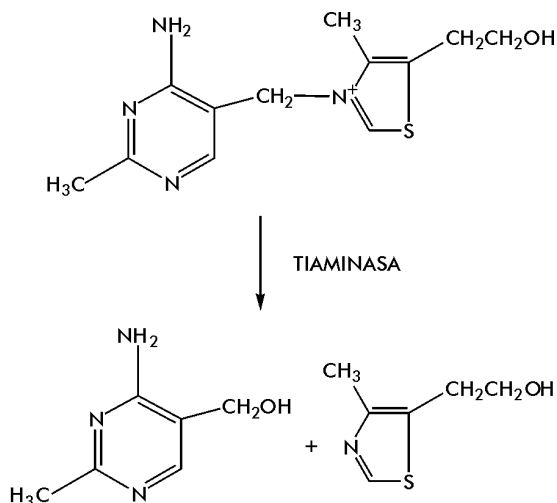


Figura 13.3. Hidrólisis enzimática de la tiamina.

existencia de un factor tóxico presente en la clara del huevo, que provocaba dermatosis en ratas (Mitjavila, 1990). Este factor tóxico es una gluco-proteína, la avidina, que se combina con dos moléculas de biotina e inhibe su absorción y actividad. La avidina se inactiva por ebullición durante varios minutos, por ello el efecto antibiotina se produce sólo por el consumo de huevo crudo.

3. Ácido ascórbico oxidasa

Este enzima oxida el ácido ascórbico libre a ácido dehidroascórbico, y este a dicetogulónico (forma inactiva). Se inactiva rápidamente con temperaturas elevadas y está presente en hortalizas pobres en vitamina C, como calabaza, pepino, melón, col, zanahoria, patata, lechuga, tomate o guisantes, y frutas como plátano o melocotón.

4. Antipiridoxina

Ciertas plantas y hongos superiores contienen sustancias con actividad antipiridoxinasa, como la agaritina y la giromitrina (Concon, 1988). La mayoría son hidrazinas. La agaritina presente en hongos comestibles, así como en el hongo japonés Shiitake, se hidroliza por acción de la gamma-glutamyl-transferasa, dando lugar al agente activo 4-hidroximetilfenilhidrazina. Se piensa que el mecanismo antivitaminasa es debido a una condensación de la hidrazina con el carbonilo del piridoxal y piridoxal fosfato, resultando la formación de una hidrazona inactiva (Deshpande, 2002).

5. Antivitamina A

Se han descrito pocos compuestos antivitaminasa A entre ellos se pueden citar la lipoxidasa y el citral (Liener, 1969).

6. Antivitamina D

Parece que existen unas sustancias presentes en la fracción insaponificable de determinadas hierbas y hojas verdes que inhiben la actividad antirraquítica de la vitamina D. Se atribuye

dicho efecto al β -caroteno presente en las mismas (Concon, 1988).

Antinutrientes polivalentes

1. Lectinas (fitohemaglutininas o hemaglutininas)

La primera descripción de una fitohemaglutinina fue realizada por Stillmark en 1888, quien observó, utilizando semillas de ricino, que algunas proteínas de estas semillas eran capaces de aglutinar la sangre. Las lectinas son glicoproteínas que tienen afinidad específica por determinadas moléculas de azúcares como los carbohidratos complejos que forman parte de las estructuras de las membranas celulares. Estas sustancias se encuentran en una gran variedad de plantas y en diferentes partes de las mismas, pero a pesar del nombre que se les ha atribuido, fitohemaglutininas, también se han aislado en animales (crustáceos, moluscos, peces e incluso mamíferos). Desde el punto de vista alimenticio, las lectinas que presentan mayor interés son las de las legumbres (Makela, 1951). Algunos autores clasifican las lectinas en función de los hidratos de carbono por los que presentan afinidad, entre ellos podemos mencionar manosa, galactosa, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, etc.

El efecto antinutriente de las lectinas no es específico, pudiendo afectar la absorción de diferentes nutrientes. Las lectinas provocan en el intestino una intensa inflamación de la mucosa, seguida de la destrucción del epitelio y edema al reaccionar con las criptas y vellosidades intestinales. Este efecto lo ejercen en diferentes zonas del intestino. Así, dependiendo de la región del mismo por la que tenga afinidad la hemaglutinina, se producirá una deficiencia del nutriente cuya absorción se lleve a cabo en dicha región.

Las lectinas, por su carácter proteico, se desnaturalizan al aplicar calor húmedo, perdiendo su efecto tóxico en los alimentos así cocinados.

2. Taninos

El término tanino engloba a un grupo heterogéneo de polifenoles que aparecen en plantas, con peso molecular alto (500 a 5.000 Da) y que contienen suficientes grupos hidroxilos que permiten una unión estable con proteínas. Estos compuestos son relativamente abundantes en ciertas variedades pigmentadas de cereales y legumbres. Asimismo, en nuestra dieta existen otras fuentes de taninos, como ciertas bebidas entre las que se incluyen la sidra, el té, el cacao o el vino tinto.

De acuerdo a su estructura los taninos fueron clasificados por Freudenberg (1920) en dos grupos: taninos hidrolizables y taninos condensados, estos últimos denominados también prociandinas. En el primer grupo se engloban los galotaninos y los elagitaninos, polímeros de ácido gálico y elágico, respectivamente, esterificados con glucosa y otros azúcares. Estos taninos se hidrolizan por la acción de ácidos, bases o ciertas enzimas.

El efecto antinutricional de los taninos parece estar relacionado con su capacidad para formar complejos con las proteínas, disminuyendo la digestibilidad de las mismas y aumentando los niveles de nitrógeno fecal, observándose experimentalmente una disminución en el crecimiento de los animales de laboratorio (Feeney, 1969; Tamir y Alumot, 1969; Price y Butler, 1980). Los taninos también pueden inhibir a las enzimas digestivas como amilasas y proteasas. Además, tienen capacidad de formar complejos con iones divalentes y trivalentes, disminuyendo la disponibilidad de calcio, hierro y cobre. También pueden actuar como antivitaminas; un ejemplo de dicha acción sería la disminución que producen en las reservas hepáticas de vitamina A (Mitjavila, 1990).

Pero los taninos ejercen asimismo un efecto beneficioso sobre la salud: tienen actividad antioxidante (captadores de radicales libres). Previenen y mejoran enfermedades cardiovasculares, y por último, también parecen ejercer actividad anticancerígena (Miyamoto *et al.*, 1997, Sing *et al.*, 2003).

3. Ácido fítico

El ácido fítico o hexafosfato de inositol fue identificado por primera vez en 1855 (Oatway *et al.*, 2001), es la forma en la que reservan el fósforo ciertos organismos vegetales y, al parecer, se va acumulando en las semillas de algunas especies vegetales durante su maduración (Urbano *et al.*, 2000; Reddy *et al.*, 1982). Está presente principalmente en cereales (83-1439 mg/100 g) y legumbres (82-400 mg/100 g), y supone el 85% del fósforo total para los mismos. También aparece en cantidades apreciables en frutos secos (100-200 mg/100 g) (Concon, 1988; Deshpande y Sathe, 1991).

Su efecto antinutricional está relacionado con la acusada capacidad quelante frente a ciertos iones metálicos di- y trivalentes, siendo especialmente susceptibles cationes como el calcio, magnesio, zinc, hierro y cobre.

La capacidad quelante del ácido fítico está directamente relacionada con el número de grupos fosfatos reactivos que posee (Figura 13.4). La hidrólisis de estos grupos fosfato la lleva a cabo la fitasa, una enzima que está presente en las semillas y que poseen también ciertos microorganismos. La fitasa actúa liberando grupos

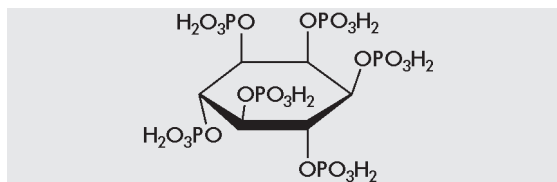


Figura 13.4. Ácido fítico o mioinositol 1,2,3,4,5,6-hexafosfato.

fosfato paso a paso desde el ácido fítico hasta mioinositol dando lugar a los productos intermedios IP₅, IP₄, IP₃, IP₂, IP.

El mecanismo por el cual el ácido fítico reduce la biodisponibilidad de los minerales no está totalmente claro; se sugiere que forma, a pH fisiológico, sales de calcio, hierro y magnesio, insolubles y que no se pueden ni absorber ni utilizar.

Los fitatos, además de complejar iones, interactúan de forma inespecífica con proteínas e hidratos de carbono como el almidón (Figura 13.5). Esta unión altera la solubilidad, funcionalidad, digestión y absorción de estos componentes de los alimentos. Por otro lado, el ácido fítico puede interaccionar con las enzimas digestivas, inhibiendo su función.

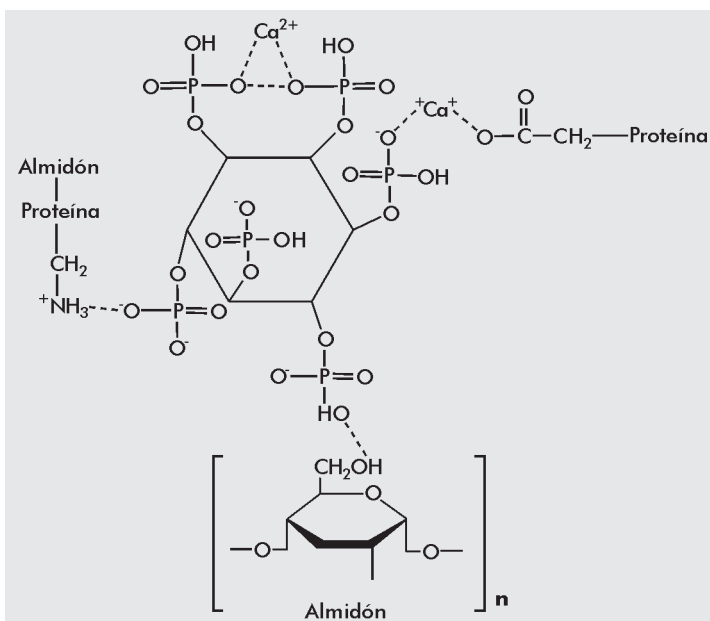


Figura 13.5. Posibles interacciones del ácido fítico con minerales, proteínas y almidón (adaptado de Rickard y Thomson, 1997).

Debido al efecto antinutriente del ácido fítico se ha estudiado la forma de eliminarlo de los alimentos que lo contienen, llegándose a la conclusión de que la germinación o malteado y la fermentación son los procesos que mayor cantidad de ácido fítico eliminan a causa de la actividad de la fitasa (Chitra *et al.* 1996). Durante la germinación o el malteado actúa la fitasa del grano y en la fermentación la fitasa de los microorganismos que la llevan a cabo. Por otro lado, la aplicación de la biotecnología ha permitido obtener plantas con bajos contenidos de ácido fítico.

Hasta hace poco se pensaba que el ácido fítico, al poseer numerosas cargas negativas no era absorbido por el organismo. Sin embargo, se ha comprobado que este compuesto administrado en la dieta es detectado en los fluidos internos (Grases *et al.* 2002).

La unión de metales como el hierro proporcionan al ácido fítico efecto antioxidante; este compuesto previene además la formación de cálculos en el riñón y disminución de colesterol en sangre. En la actualidad el ácido fítico ha alcanzado especial relevancia porque actúa como anticancerígeno, inhibiendo el crecimiento neoplásico de multitud de tipos de cáncer (mama, colon, hígado, etc.) (Fox y Eberl, 2002). El mecanismo por el cual ejerce dicho efecto no se conoce en profundidad. Los compuestos IP₃ e IP₄ tienen un importante papel en la transducción de señales celulares regulando funciones, crecimiento y diferenciación celular. La hipótesis actual defiende que el ácido fítico ejerce su efecto anticancerígeno mediante su transformación en las formas menos fosforiladas antes mencionadas (Vucenik y Shamsuddin, 2003).

Rickard y Thompson (1997) sugieren que el término antinutriente aplicado al ácido fítico está desfasado. Experimentalmente se ha puesto de manifiesto que este compuesto induce apoptosis en las células cancerígenas (Jenab y Thompson, 2000), causa la diferenciación de las células malignas y su reversión a fenotipo normales (Shamsuddin y Yang, 1995; Shamsuddin *et al.* 1997), incrementa la actividad de las células asesinas naturales de sistema inmunitario, además del ya mencionado efecto antioxidante.

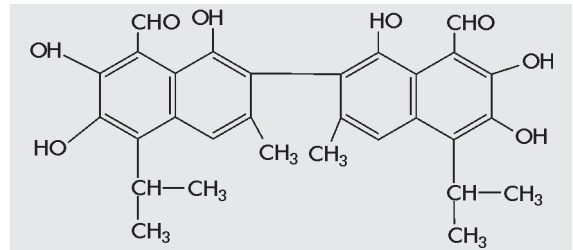


Figura 13.6. Gossipol.

Sin embargo, los niveles en los cuales el ácido fítico ejerce un beneficio para la salud con mínimos efectos adversos sobre el estado nutricional del individuo no han sido establecidos todavía.

4. Gossipol

El gossipol es un compuesto polifenólico (Figura 13.6) que se encuentra en las semillas de algodón. De los productos obtenidos del algodón el más valioso es el aceite, libre de gossipol por su eliminación durante el refinado. La harina de algodón puede contener más del 60% de proteína, lo que la convertiría en un interesante suplemento proteico, tanto para el ser humano como para animales, si no fuera por la presencia del gossipol.

El gossipol interfiere con nutrientes de la dieta como las proteínas o el hierro. Los grupos carbonilo del gossipol reaccionan con el grupo amino de los aminoácidos de las proteínas formando bases de Schiff, reduciendo el valor nutritivo de las mismas. Los aminoácidos más susceptibles a formar copolímeros son la lisina, serina, treonina y metionina, entre otros, viéndose afectados principalmente aminoácidos esenciales (Deshpande, 2002).

Bibliografía

- Belitz HD, Grosch W (1997). *Química de los alimentos*. 2.^a ed. Zaragoza. Ed. Acribia.
 Bender AE (1987). Effects on nutritional balance: Antinutrients. En: Watson DH (ed.) *Natural toxic*

- cants in Food. *Progress and Prospects*. Chichester. VCH. 110-124.
- Boivin M, Zinsmeisters AR, Go VLV, DiMagno EP (1987). Effect of purified amylase inhibitor on carbohydrate metabolism after a mixed meal in healthy human. *Mayo Clin Proc* 62: 249-255.
- Boivin M, Flourier B, Rizza RA, Go VLV, DiMagno EP (1989). Gastrointestinal and metabolic effects of amylase inhibition in diabetics and metabolic effects of amylase inhibition in diabetics. *Gastroenterology* 94: 387-394.
- Bo-Linn GW, Santa Ana CA, Morawski SG, Fordtran JS (1982). Starch blockers their effect on calorie absorption from high starch meal. *N Engl J Med* 307: 1413-1416.
- Borchers R, Ackerson CW (1947). Trypsin inhibitor. IV. Occurrence in seeds of the Leguminosae and other seeds. *Arch Biochem Biophys* 13: 291-293.
- Bowman D (1945). Amylase inhibitor of navy beans. *Science* 102: 358-359.
- Campillo JE, Tormo MA, De Arcos R (1999). Las legumbres: una justa reivindicación en marcha. *Alim Nutri Salud* 6(3): 71-76.
- Concon JM (1988). *Food Toxicology. Part A y B*. New York. Marcel Dekker, Inc.
- Conn EE (1979). Cyanogenic glycosides. *Int Rev Biochem* 27:21-43.
- Chitra U, Singh U, Rao PV (1996). Phytic acid, in vitro protein digestibility, dietary fiber, and minerals of pulse as influenced by processing. *Plant Foods Hum Nutr* 49:307-316.
- Deshpande SS, Sathe SK (1991). Toxicants in plants. En: Sharma RP, Salunkhe DK (eds.) *Mycotoxins and phytoalexins*. Boca Raton. CRC Press. 671-730.
- Deshpande SS (2002). *Handbook of food toxicology*. New York. Marcel Dekker, Inc. 321-386.
- Feeney PP (1969). Inhibitory effects of oak leaf tannins on the hydrolysis of proteins by trypsin. *Phytochemistry* 8: 2119-2123.
- Fox CH, Eberl M (2002). Phytic acid (IP6), novel broad spectrum anti-neoplastic agent: a systematic review. *Complementary Therapies in Medicine* 10: 229-234.
- Fredericq L (1878). Sur la digestion des albuminoids chez quelques invertébrés. *Bull. Acad R Sci Lett Beaux-Arts Belg.* 46: 213-228.
- Freudenberg K (1920). *Die Chemie der Natürlichen Garbstoffe*. Berlin. Springer-Verlag.
- Gontzea I, Sutzescu P (1968). *Natural antinutritive substances in foodstuffs and forages*. Basilea. S. Kager Ed.
- Grasse F, Simonet BM, Vucenik I, Perelló J, Prieto RM, Costa-Bauzá A, et al. (2001). Absorption and excretion of orally administered inositol hexaphosphate (IP₆ or phytate) in humans. *BioFactors* 15: 53-61.
- Green GM (1937). Chastek paralysis. *Minn Wildlife Dis. Invest.* 3:83-95.
- Jenab M, Thompson LU (2000). Phytic acid in wheat bran affects colon morphology, cell differentiation and apoptosis. *Carcinogenesis* 21(8):1547-1552.
- Johnson IT (2002). Glucosinolates: bioavailability and importance to health. *Int J Vitam Nutr Res.* 72:26-31.
- Karlstrom B, Vessby B, Asp NG, Boberg M, Lithell H, Berne C (1987). Effects of leguminous seeds in a mixed diet in non-insulin dependent diabetic patients. *Diabetes Res.* 5: 199-205.
- Kneen E, Sandstedt RM (1943). An amylase inhibitor form from certain cereals. *J Am Chem Sc* 65: 1247-1249.
- Kunit M (1945). Crystallization of a trypsin inhibitors from soy-bean. *Science* 101:668-669.
- Kunit M (1946). Crystalline soybean trypsin inhibitor. *J Gen Physiol* 29: 149-154.
- Layer P, Rizza RA, Zinsmeisters AR, Carlson GL, DiMagno EP (1986). Effect of purified amylase inhibitor on carbohydrate tolerance in normal subjects and patients with diabetes mellitus. *May Clin Proc* 61: 442-447.
- Liener IE (1969). *Toxic constituents of plant foodstuffs*. New York. Academic Press.
- Makela O (1951). Studies in hemagglutinins of leguminosae seeds. *Ann Med Exp Fenn* 35: (Suppl.)11.
- Makkar HPS (1993). Antinutritional factors in foods for livestock. En: Gill M, Owen E, Pollot GE, Lawrence TLJ (eds.) *Animal production in developing countries. Occasional Publication No. 16*. British Society of Animal Production. 69-85.
- Marshall JJ, Lauda CM (1975). Purification and properties of phaseolamin, an inhibitor of amylase, from the kidney bean, *Phaseolus Vulgaris*. *J Biol Chem* 250: 8030-8037.
- Mitjavila S (1990). Sustancias naturales nocivas en los alimentos. En: Derache R (ed.) *Toxicología y seguridad de los alimentos*. Barcelona. Ediciones Omega. 109-132.
- Miyamoto K, Murayama T, Yoshida T, Hatano T, Okuda T (1997). Anticarcinogenic activities of polyphenols in food and herbs. En: Shahidi F

- (ed.) Antinutrients and phytochemicals in food. Washington DC. American Chemical Society. 245-259.
- Nestle M (1997). Broccoli sprouts as inducers of carcinogen-detoxifying enzyme systems: Clinical, dietary, and policy implications. *Proc Natl Acad Sci*. 94:11149-11151.
- Oatway L, Vasanthan T, Helm JM (2001). Phytic acid. *Food Rev Int* 17(4): 419-431.
- Price ML, Butler LG. (1980). *Tannins and nutrition*. Purdue Univ. Agric. Exp. Stn. Bull. No. 272, West Lafayette, IN.
- Read JW, Hass LW (1938). Studies on the baking quality of flour as affected by certain enzyme actions. V Further studies concerning potassium bromate enzyme activity. *Cereal Chem* 15: 59-68.
- Reddy NR, Sathe SK, Salunkke DK (1982). Phytates in legumes and cereals. *Adv Food Res* 28:1-92.
- Rickard SE, Thompson LU (1997). Interaction and biological effects of phytic acid. En: Shahidi F. (ed.) *Antinutrients and phytochemicals in food*. Washington DC. American Chemical Society. 294-312.
- Rojas E (1998). *Vitaminas. Consideraciones bioquímicas, nutricionales y terapéuticas*. Universidad Nacional de Educación a Distancia. Madrid.
- Shahidi F (1997). Beneficial effects and drawbacks of nutrients and phytochemical in foods-An overview. *Antinutrients Phytochemicals in Food* 662: 1-9.
- Shahidi F, Daun JK, De Clercq DR (1997). Glucosinolates in Brassica oilseeds: Processing effects and extraction. *Antinutrients Phytochemicals in Food* 622: 152-170.
- Shamsuddin AM, Yang GY (1995). Inositol hexaphosphate inhibits growth and induces differentiation of PC-3 human prostate cancer cell. *Carcinogenesis* 16(8): 1975-1979.
- Shamsuddin AM, Vucenik I, Cole KE (1997). IP6: a novel anti-cancer agent. *Life Sciences* 61(4):343-354.
- Singh B, Bhat TK, Singh B (2003). Potential therapeutic application of some antinutritional plant secondary metabolites. *J Agric Food Chem* 51(19): 5579-5597.
- Smith TK, Musk SRR, Johnson IT (1996). Allyl isothiocyanate selectively kills undifferentiated HT29 cells in vitro and suppresses aberrant crypt foci in the colonic mucosa of rats. *Biochem Soc Trans* 24(3):s381.
- Somogyi (1973). Antivitamins. En: Comité on Food Protection, Food and Nutrition Board, National Research Council (ed) *Toxicants occurring naturally foods*. Washington DC. National Academy of Sciences.
- Somogyi JC (1978). Natural toxic substance in food. *World Rev Nutr Dietet* 29: 42-78.
- Stillmark J (1888). *Dissertation*. Dorpat University.
- Talalay P, Zhang Y (1996). Chemoprotection against cancer by isothiocyanates and glucosinolates. *Biochem Soc Trans* 24: 806-810.
- Tamir M, Alumot E (1969). Inhibition of digestive enzymes by condensed tannin from green and ripe carobs. *J Sci Food Agric* 20: 199-207.
- Urbano G, López-Jurado M, Aranda P, Vidal-Valverde C, Tenorio E, Porres J (2000). The role of phytic acids in legume: antinutriente or beneficial function? *J Physiol Biochem* 56 (3), 283-294.
- Van Poppel G, Verhoeven DT, Verhagen H, Goldbohm RA (1999). Brassica vegetables and cancer prevention. Epidemiology and mechanisms. *Adv Exp Med Biol* 472:159-168.
- Verkerk R, Dekker M, Jongen WMF (1998). Glucosinolates. En: Watson DH (ed.) *Natural toxicants in food*. Boca Raton. CRC Press. 29-53.
- Villanúa L, Torija E (2001). Componentes no nutritivos de los alimentos. <<http://www.recol.com>> [Consulta: 1-12-2002].
- Vucenik I, Shasuddin AM (2003). Cancer inhibition by inositol hexaphosphate (IP₆) and inositol: from laboratory to clinic. *J Nutr* 133: 3778S-3784S.
- Welch RM, House WA, Van Campen D (1977). Effects of oxalic acid on availability of zinc from spinach leaves and zinc sulfate to rats. *J Nutr* 107: 929-933.
- Whitaker JR, Feeney RE (1973). Enzyme inhibitors in foods. En: *Toxicants occurring naturally in foods*. Washington, D.C. National Academy of Sciences. 288-290.
- Zhang Y, Talalay P, Cho CG, Posner GH (1992). A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: Isolation and elucidation of structure. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 89: 2399-2403.

Ana M.^a Cameán, Encarnación Mellado, Manuel Repetto

Introducción. Intoxicaciones y toxiinfecciones alimentarias de origen bacteriano. Normas de prevención generales. Bibliografía

I. Introducción

Los alimentos pueden ser el vehículo de muchos agentes de distinta naturaleza que pueden o no alterar sus características. Entre estos agentes nos ocuparemos de los contaminantes biológicos que son los más abundantes y variados, pudiendo causar enfermedades gastrointestinales graves. Estas enfermedades se producen al ingerir alimentos que contienen microorganismos viables o las toxinas que se producen cuando estos se multiplican. Generalmente la contaminación por agentes biológicos se origina por la falta de higiene en algún punto de la elaboración o almacenamiento de los alimentos crudos o cocinados.

Comenzaremos por definir una serie de conceptos:

Brote alimentario: incidente por el que dos o más individuos experimentan una enfermedad similar, usualmente con síntomas gastrointesti-

nales, tras ingestión de un alimento común, y que mediante un análisis epidemiológico se implica al alimento como causa.

Intoxicación alimentaria de origen microbiana: es la enfermedad que se origina al consumir alimentos que contienen toxinas previamente generadas por microorganismos.

A veces la preparación del alimento para su consumo destruye los microorganismos, pero la toxina no se ve afectada, se consume y actúa al cabo de unas horas.

Toxiinfección alimentaria microbiana: es la enfermedad que se produce tras ingerir alimentos contaminados por microorganismos que, al desarrollarse en el interior del consumidor, secretan distintas toxinas (Repetto, 1997).

Existe confusión y controversia con estos términos, puesto que se habla de forma general de intoxicaciones alimentarias en la mayoría de los casos en situaciones que estrictamente no son intoxicaciones, sino realmente infecciones, y los trastornos están causados por la multiplicación del microorganismo patógeno en el hospedador, particularmente en el tracto gastrointestinal.

En las infecciones asociadas con los alimentos, estos pueden actuar simplemente como un vehículo para el agente patógeno o bien crear las condiciones para que este se multiplique hasta alcanzar una cantidad suficiente para causar la enfermedad.

De acuerdo con el periodo de incubación y curso clínico, y con fines de aproximación diagnóstica, las intoxicaciones y toxiinfecciones alimentarias pueden clasificarse como se expone en la Tabla 14.1.

Entre las posibles fuentes de exposición a bacterias causantes de las intoxicaciones y toxiinfecciones alimentarias podemos citar:

- Materia fecal y/o orina de animales y humanos infectados.
- Descargas de cavidad nasal, y de garganta de individuos asintomáticos.
- Superficie corporal de manipuladores de alimentos (manos, piernas, etc.).
- Suelos, superficie de aguas, polvo.
- Agua de mar, peces, etc.

Tabla 14.1. Periodo de incubación y ejemplos de intoxicaciones y toxiinfecciones alimentarias.

Grupo A.	Periodo de incubación muy corto (inferior a 2 horas). Duración, menos de un día. Agentes: toxinas en peces, moluscos y hongos (muscarínicos).
Grupo B.	Periodo de incubación corto (2 a 7 horas). Duración, menos de 1 día. Agentes: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> .
Grupo C.	Periodo de incubación intermedio (de 8-14 horas). Duración, menos de 1 día. Agentes: <i>B. cereus</i> , <i>Clostridium perfringens</i> (de 8 a 24 horas) y toxinas de hongos (falotoxinas, amatoxinas, giromitrinas), con curso clínico superior a 1 día.
Grupo D.	Periodo de incubación largo y muy largo (superior a 14 horas). Duración, más de un día. Agentes: <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> (de 1 a 7 días), <i>E. coli</i> , <i>Yersinia</i> , <i>Campylobacter</i> (de 3 a 5 días), <i>Clostridium botulinum</i> (entre 12 y 36 horas).

Intoxicaciones y toxiinfecciones alimentarias de origen bacteriano

Las toxinas bacterianas pueden clasificarse en función de la patología que pueden originar, de forma que las enterotoxinas, son toxinas bacterianas que ejercen un efecto tóxico en el intestino delgado o grueso del hombre; las neurotoxinas actúan fundamentalmente sobre el sistema nervioso, mientras que otros tipos de toxinas tienen actividad hemolítica, citolítica y citotóxica, o inhiben la síntesis de macromoléculas por diferentes mecanismos (Tabla 14.2).

1. Intoxicaciones de origen bacteriano

En la Tabla 14.3 se exponen algunos ejemplos de las intoxicaciones alimentarias de origen bacteriano más características, tipos de alimentos involucrados en los brotes alimentarios y las fuentes de contaminación (Camean y Repetto 1995).

Botulismo

El botulismo, una intoxicación alimentaria producida por las diferentes toxinas de *Clostridium*

Tabla 14.2. Clasificación general de las toxinas bacterianas en función de su patogénesis.

Enterotoxinas	<i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Shigella spp.</i>
Actividad hemolítica	<i>Streptococcus spp.</i> , <i>Staphylococcus spp.</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>B. cereus</i> .
Endotoxinas	Todas las bacterias Gram negativas.
Neurotoxinas	<i>Clostridium botulinum</i> , <i>Clostridium tetani</i> , <i>Shigella dysenteriae</i> .
Actividad citotóxica, citolítica	<i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Streptococcus spp.</i> , <i>S. dysenteriae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>Legionella spp.</i>
Inhibidores directos de la síntesis de macromoléculas	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Yersinia pestis</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>Escherichia coli</i> .

Tabla 14.3. Intoxicaciones con periodo de latencia prolongada (> 6 horas).

	Agente causal	Fuente	Alimentos	Periodo de incubación usual (horas)	Signos y síntomas usual
Botulismo	Toxinas A, B, C ₁ , C ₂ , D, E, F, G de <i>Clostridium botulinum</i>	Suelo, barro, agua y tracto gastrointestinal de animales	Embutidos caseros, conservas caseras de baja acidez: cárnicas, pescado (E), vegetales, frutas, encurtidos. Pescado ahumado	18-36 h	Parálisis
Intoxicación estafilocócica	Enterotoxinas A-E y G-Q de <i>S. aureus</i>	Nariz, garganta, piel, manos, pies de manipuladores	Carnes curadas y crudas, patatas, leche, queso, productos de confitería. Otros alimentos poco cocidos, almacenados, servidos entre 5-55 °C.	1-8 h A veces superior a 18 h	Náuseas y vómitos
Intoxicación <i>B. cereus</i>	Enterotoxina termoestable de <i>B. cereus</i>	Suelo y polvo	Cereales, arroz hervido y frito, sopas, platos vegetales, pudings, salsas y cremas, flanes	1-5 h	Vómitos

botulinum, puede contraerse por consumo de alimentos de consistencia blanda, a veces con propiedades organolépticas anómalas (por desaminación y descarboxilación de aminoácidos y producción de NH₃, H₂S y CO₂), aunque frecuentemente sin presentar tales anomalías. En el botulismo que nos ocupa, el transmitido por alimentos, los microorganismos elaboran la toxina en el alimento que después se ingiere. Los alimentos implicados son fundamentalmente conservas vegetales, caseras o industriales (guisantes, espinacas, espárragos), insuficientemente calentadas, frutas y encurtidos caseros; carnes y productos cárnicos, embutidos; conservas caseras de pescado y mariscos (toxina tipo E); menos frecuentes como fuentes de contaminación son la leche y los productos lácteos. También son objeto de especial interés los alimentos infantiles, y la miel (Deshpande, 2002).

C. botulinum engloba a bacilos Gram positivos, anaerobios, esporulados, acapsulados y móviles al estar dotados de 6-20 flagelos peritricos. Este microorganismo se encuentra en el suelo, con una distribución global, aunque de forma irregular, ya que en las distintas localizaciones geográficas existen solo determinados tipos toxigénicos, y a partir de esta localización

sus esporas se transfieren a la superficie de vegetales. La mayoría de los alimentos pueden ser adecuados para el crecimiento de *C. botulinum*, como lo demuestra el hecho de que se hayan detectado intoxicaciones producidas por el consumo de alimentos muy variados, tales como ajos en aceite y cebollas salteadas. La superficie de las carnes puede contaminarse durante la manipulación de los alimentos (Deshpande, 2002).

Las diferentes cepas de *C. botulinum* se pueden clasificar en cuatro grupos, basándose en su actividad proteolítica y otras características (Tabla 14.4), tales como resistencia al calor y tipo de toxina producida.

El carácter neurotoxigénico de *C. botulinum* se debe a la síntesis de unas proteínas neurotóxicas de un peso molecular aproximado de 150 kDa que se caracterizan fundamentalmente por su gran especificidad neuronal (Schiavo *et al.*, 2000; Turton *et al.*, 2002) y su extraordinaria potencia (Sugiyama, 1980). Estas toxinas constituyen uno de los más potentes venenos biológicos que se conocen, debido fundamentalmente a su letalidad y la severidad de los síntomas. Se distinguen los siguientes tipos de toxinas: A, B, C₁, C₂, D, E, F, y G, siendo la de tipo A la más potente.

Tabla 14.4. Características de los grupos de *Clostridium botulinum*.

Características	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
Tipo de neurotoxina	A, B, F	B, E, F	C, D	G
Asociado con brotes epidémicos humanos	+	+	-	-
Temperatura de crecimiento, (°C)				
Mínima	10	3,3	15	ND
Óptima	35-40	18-25	40	37
Rango de pH para crecimiento	4,6-9,0	5,0-9,0	ND	ND
pH que inhibe crecimiento	4,6	5,0	ND	ND
Concentración de NaCl que inhibe crecimiento (%)	10	5	ND	ND
Mínima a_w para crecimiento	0,94	0,97	ND	ND
Proteolítico	+	-	+/-	+
Resistencia de las esporas al calor (C)	112	80	104	104
D _{100 °C} de esporas (min)	25	< 0,1	0,1-0,9	0,8-1,12
D _{121 °C} de esporas (min)	0,1-0,2	< 0,001	ND	ND

ND, no determinado; +, si; -, no; ±, raro
 Datos recopilados de Deshpande (2002)

Las toxinas botulínicas se sintetizan como una única cadena polipeptídica con escasa actividad (prototoxina o toxina progenitora) que posteriormente sufre una modificación postraducciona, dando lugar a una cadena pesada y una cadena ligera unidas ambas a través de un puente disulfuro. La cadena ligera tiene actividad metaloendopeptidasa y se activa cuando se produce la reducción del puente disulfuro que la une al resto de la molécula. La cadena pesada contiene dos dominios, la sección N-terminal, que es la responsable del proceso de translocación de membrana de la cadena ligera en el citosol de la neurona y el dominio C-terminal, que es responsable de la unión neuroespecífica de la molécula (Schiavo *et al.*, 2000; Turton *et al.*, 2002). Estas toxinas se absorben en las diferentes áreas del tracto alimentario, aunque predominantemente en las zonas superiores del intestino. El mecanismo exacto de absorción no está totalmente dilucidado, pudiéndose producir por endocitosis; su distribución hacia las células dianas tampoco es conocido (Deshpande, 2002).

Los efectos tóxicos de estas moléculas se derivan de su acción inhibitoria de la transmi-

sión del impulso nervioso colinérgico al impedir la liberación en la sinapsis del neurotransmisor acetilcolina, provocando parálisis flácida, que afecta a los nervios autónomos que controlan funciones corporales como la respiración y el latido cardíaco. Por tanto, las toxinas no interfieren en la síntesis de acetilcolina, ni en su degradación por acetilcolinesterasa, sino que parece que la toxina interacciona específicamente con algunos componentes de membrana involucrados en el mecanismo de exocitosis (liberación de acetilcolina de las vesículas) en nervio colinérgico (Lalli *et al.*, 2003) impidiendo la liberación del neurotransmisor. De hecho, la guanidina, que acelera la liberación de acetilcolina, puede aliviar los síntomas de la intoxicación. Los mecanismos de bloqueo de la liberación del neurotransmisor no se conocen con exactitud y actualmente la investigación está encaminada a determinar exactamente los residuos aminoácidos de las neurotoxinas, responsables tanto de la unión de las mismas a componentes específicos de la vesícula sináptica (VAMP, sinaptobrevina, proteína SNAP-25), como de la proteólisis y antigenicidad (Turton *et al.*, 2002).

Los genes que codifican la producción de las neurotoxinas se agrupan en unidades transcripcionales que incluyen tanto los genes que codifican los componentes de la toxina botulínica como otros componentes considerados no tóxicos (East *et al.*, 1994). Se ha determinado que la localización de estos genes cambia dependiendo del serotipo, de tal manera que los genes que codifican los tipos A, B, E y F se localizan en el cromosoma (Dodds y Austin, 1997), aquellos que codifican los tipos C1 y D se localizan en bacteriófagos, mientras que los genes que codifican el tipo G se localizan fundamentalmente en plásmidos (Deshpande, 2002). El control genético de la síntesis de las neurotoxinas es probable que sea ejercido por un fago específico.

El botulismo alimentario puede constituir una enfermedad leve, que incluso no llegue a ser diagnosticada, o por el contrario, puede constituir una enfermedad severa que resulte fatal en solo 24 horas. En este tipo de botulismo, las manifestaciones clínicas suelen aparecer entre las 12 y 36 horas posteriores a la ingestión de alimentos contaminados con la toxina ya formada. En general, el cuadro clínico es más grave si el periodo de incubación es inferior a 24 horas. En el cuadro clínico se distinguen dos periodos: un primer periodo caracterizado por la aparición de laxitud, cefaleas, sequedad de boca, y síntomas gastrointestinales inespecíficos, como vómitos y diarreas, y un segundo periodo caracterizado por la aparición de los síntomas neurológicos característicos del botulismo, como son parálisis flácida, doble visión, midriasis, parestias, calambres en extremidades, respiración irregular, y en casos fatales, la muerte sobreviene por parálisis respiratoria. La tasa de mortalidad ha disminuido gracias a los avances conseguidos en la producción de antisueros, y en los tratamientos de control de los síntomas respiratorios, y se considera que actualmente puede ser del orden del 10% (Deshpande, 2002). La recuperación es usualmente lenta y difícil, persistiendo la parálisis durante 6-8 meses.

Si un lactante ingiere el microorganismo, por ejemplo, en la miel extendida sobre el chupete,

este puede multiplicarse en el intestino y producir la toxina, provocando botulismo infantil. En la forma típica, el primer síntoma es el estreñimiento; posteriormente aparecen los síntomas neurológicos, especialmente dificultad en la alimentación, signos faciales y oculares, debilidad muscular generalizada e hipotonía, e incluso paro respiratorio.

La gran potencia y letalidad de las toxinas requiere que las condiciones de crecimiento y producción sean consideradas con rigor. Al ser el alimento una sustancia heterogénea, distintas porciones del mismo suelen tener diferentes propiedades físico-químicas y biológicas, en las que puede existir o no producción de toxinas.

Para un control y prevención de la contaminación microbiana de los alimentos es esencial conocer los factores o requerimientos necesarios tanto para el crecimiento de los microorganismos como para la producción de toxinas. El control de estos factores es incluso más importante para evitar la intoxicación que el control de los factores que permiten la germinación de las esporas (Miller *et al.*, 1998). Entre estos factores se encuentran la temperatura, acidez, sales, humedad, presencia de otros microorganismos, etc. Todos estos factores se interrelacionan y las condiciones en las que el peligro es mínimo dependen del tipo de alimento y del grado de contaminación (Concon, 1988).

En el caso de *C. botulinum*, algunos de estos factores son:

— *Temperatura*: el rango óptimo de crecimiento de la bacteria oscila entre 30-37 °C a pH 7-7,2. Las toxinas de naturaleza proteica se destruyen fácilmente por calor, de esta forma, el hervido durante 10 minutos es un margen de seguridad adecuado. Sin embargo, las esporas son bastante estables a temperaturas de ebullición a presión atmosférica. La resistencia de las esporas al calor está influida por otros factores, tales como acidez (la máxima resistencia es a pH 6,3-6,9), presencia de sales, antibióticos, actividad del agua (las grasas aumentan la resistencia pues disminuyen la actividad del agua), presencia de hierro, calcio, etc.

— *pH*: la producción de toxinas ocurre en el rango de pH 4,8-8,5. La tolerancia a la acidez depende de la cepa, composición del alimento, tipo de acidulantes empleados, conservantes y tratamientos utilizados. Generalmente se considera que a pH inferiores a 4,6, el crecimiento del microorganismo y la producción de toxinas, no son posibles.

— *Oxígeno*: se trata de un microorganismo anaerobio estricto.

— *Presencia de otros microorganismos*: pueden afectar al crecimiento o actividad de la toxina, debido a que pueden modificar el pH del medio por producción o consumo de ácidos; por producción de enzimas proteolíticas que destruyan la toxina, o bien por la producción de antibióticos.

— Los inhibidores de la producción de esta intoxicación pueden ser de dos tipos:

- Los que inhiben el crecimiento vegetativo: nitritos, diversos antibióticos, productos formados durante el ahumado de los alimentos.
- Los que inhiben la germinación de las esporas: diversos metales como Zn, Cu, Ni, Hg; ácidos grasos insaturados rancios, flavonoides.

La leche y productos lácteos están poco implicados en casos de botulismo por la presencia de lisozima en estos productos, ya que inhibe el crecimiento de *C. botulinum*, y también por la existencia de diversos ácidos grasos rancios o de bajo peso molecular como ácidos propiónico y caproico, que inhiben la germinación de las esporas.

Como medidas preventivas fundamentales en esta intoxicación citaremos:

- Calentamiento y cocinado rápido de los alimentos de baja acidez (pH 4), y posterior almacenamiento a 3° C. La cantidad de calor requerido para inactivar las esporas varía ampliamente, dependiendo fundamentalmente de la composición del alimento (Miller *et al.*, 1998).

- Al utilizar las conservas, se desecharán aquellas que presenten caracteres organolépticos alterados, lo que puede ocurrir en la contaminación con cepas proteolíticas. Para destruir la toxina, los alimentos enlatados caseros se hervirán durante 10 minutos antes del consumo.

Intoxicación estafilocócica

Staphylococcus aureus es un coco Gram positivo, que suele presentar una disposición característica en forma de racimo de uvas. Se trata de un microorganismo poco exigente, que presenta cierta resistencia a los agentes externos, y por este motivo se puede encontrar en el medio ambiente y a menudo formando parte de la microbiota normal de la piel, tracto respiratorio y gastrointestinal del hombre.

Las intoxicaciones alimentarias por *S. aureus* están producidas por enterotoxinas (ES) que constituyen una familia de varios tipos serológicos distintos. Además de las bien estudiadas enterotoxinas designadas de A a E (Bergdoll, 1989), se han descrito recientemente nuevos tipos serológicos y se han designado de G a Q (Omoe *et al.*, 2003). Esta bacteria también produce enzimas como coagulasas, ADNasas, hemolisinas, lipasas, fibrinolisinias, e hialuronidasas, que constituyen también importantes determinantes de patogenicidad. Las enterotoxinas son exotoxinas proteicas (la más común es la A, seguida de la D; la B es menos frecuente) resistentes a enzimas proteolíticas, como tripsina, quimotripsina, papaína, y se caracterizan fundamentalmente por su gran resistencia al calor. Debemos tener en cuenta que la estabilidad térmica depende también del pH, la concentración salina y otros factores ambientales que influyen en el grado de desnaturalización de la proteína (Balaban y Rasooly, 2000) (la toxina B, la más estable, tolera temperaturas de 60 °C a pH 7,3 durante 16 horas, e incluso llega a tolerar temperaturas de 100 °C). Además, las toxinas son resistentes a radiaciones gamma; se requieren dosis superiores a 2,7 rads y 9,7 rads para conseguir una reducción de la toxina tipo B

disuelta en solución tampón y leche, respectivamente (Genigeorgis, 1989).

Todas las ES presentan la misma estructura básica, compuesta por una cadena polipeptídica que contiene un lazo formado por la presencia de un puente disulfuro en el centro de la molécula. Todavía no se conoce con exactitud el significado funcional de este lazo, sin embargo parece ser que contribuye no solo a la estabilización de la estructura molecular, sino que además juega un papel importante en la resistencia a la proteólisis exhibida por estas moléculas (Bergdoll, 1992). El peso molecular de las enterotoxinas se encuentra comprendido entre 27.500-30.000 y son solubles en agua y soluciones salinas.

Estudios realizados con voluntarios humanos han puesto de manifiesto que la ingestión de 0,4 mg de enterotoxina (tipos A, B y C) por kilogramo de peso es suficiente para que aparezcan síntomas de la intoxicación. La dosis mínima se estima que es de 0,05 mg/kg (Bergdoll, 1989)

Las enterotoxinas son los principales responsables de los síntomas de gastroenteritis, aunque su mecanismo de acción a nivel celular y molecular no es todavía bien conocido. La respuesta emética parece ser que se produce por acción de la toxina sobre los receptores eméticos de las zonas inferiores del tracto gastrointestinal, estimulándose el centro del vómito (Miller *et al.*, 1998). En el caso de la respuesta diarreica, todavía se dispone de menor información, debido a que no se ha encontrado estimulación de la adenilato ciclasa en las células dianas. Además, estas toxinas constituyen potentes superantígenos que estimulan la proliferación de células T no específicas, y aunque constituyen dos funciones localizadas en dominios distintos de la proteína, existe una gran correlación entre estas actividades (Harris *et al.*, 1993).

El periodo de incubación de las intoxicaciones estafilocócicas es muy corto. Los primeros síntomas principales se detectan a las 2-3 horas y se caracterizan por la aparición de vómitos, diarreas, salivación, náuseas, dolor abdominal, posturación e hipotensión. La recuperación ocurre normalmente en 1-3 días y raras veces es fatal.

Los alimentos implicados en las intoxicaciones alimentarias por esta bacteria son alimentos calentados, de naturaleza blanda y de baja acidez. Generalmente son carnes y productos cárnicos (jamón, pollo, bacon), pasteles, ensaladas y postres en general, contaminados bien antes o después del cocinado. Una característica común de estos alimentos es que la mayoría de ellos se consumen fríos después de permanecer a temperatura ambiente durante horas.

Hay dos posibilidades que explican la contaminación:

- El alimento calentado se ha contaminado después del cocinado, durante el enfriamiento posterior. *S. aureus* se multiplica rápidamente en los alimentos templados, excretando la toxina a la vez que se multiplica. El posterior calentamiento del alimento puede destruir los microorganismos, pero la toxina es estable. Debido a que esta toxina es inodora e insípida, el alimento no presenta indicios de estar contaminado.
- El alimento puede contener la toxina preformada en los ingredientes, antes del cocinado, y el calor fue insuficiente para destruir la toxina.

La producción de toxinas ocurre generalmente a temperaturas superiores a las requeridas para el crecimiento de la bacteria, oscilando entre 40-45 °C, y en un rango de pH amplio, comprendido entre pH 5-9,6 (pH óptimo 7-8). Por otra parte, la presencia de otros microorganismos afecta al crecimiento de *S. aureus* y a la producción de las toxinas. Además, *S. aureus* no solo resiste la desecación y temperaturas de refrigeración, sino que es capaz de crecer en presencia de altas concentraciones de NaCl (5-7% NaCl), y algunas cepas son capaces de crecer incluso en presencia de 20% de NaCl. Por ello, el jamón es el alimento que más frecuentemente se detecta como fuente de contaminación en estas intoxicaciones.

S. aureus es un microorganismo ubicuo en el medio ambiente, por lo tanto, debido a su gran

diseminación, su eliminación es prácticamente imposible. De esta manera, las medidas de prevención se encaminan a limitar la contaminación y el correspondiente crecimiento del microorganismo en los alimentos. *S. aureus* se encuentra colonizando los orificios nasales, garganta o manos en alrededor del 50% de las personas, constituyendo el propio hombre la fuente de contaminación más importante de los alimentos. Así, cualquier alimento manipulado por humanos durante su cocinado y preparación puede representar un riesgo.

Entre las medidas de prevención se incluyen:

- Una correcta y estricta higiene personal de los manipuladores de alimentos.
- Evitar la preparación de los alimentos en múltiples etapas, grandes cantidades, y con mucho tiempo de antelación al consumo.
- Almacenar los alimentos a temperaturas inferiores a 5 °C para que no se produzca crecimiento de la bacteria.

Intoxicación *B. cereus*

Bacillus cereus es un bacilo Gram positivo, anaerobio facultativo, que forma endosporas. Este microorganismo se encuentra habitualmente en el suelo, en el agua y en el aparato gastrointestinal de los animales y del ser humano, por lo que con frecuencia se encuentra contaminando alimentos, como carnes, leche, fruta, vegetales, especias. Se asocia fundamentalmente a intoxicaciones detectadas en restaurantes chinos, por consumo de arroz frito, o hervido a gran escala. Dado que el calor favorece la germinación de las esporas de esta bacteria, la principal fuente de contaminación son alimentos ya cocinados, que contienen dichas esporas, y que durante un recalentamiento posterior se produce la germinación de las mismas. Afortunadamente se requiere un gran número de microorganismos para producir los síntomas característicos de esta intoxicación.

Este microorganismo puede crecer entre valores de pH de 4,9-9,3, por lo que solo a pH inferiores a 4,4 se puede considerar un alimento

seguro; además, puede tolerar altas concentraciones de NaCl.

La temperatura óptima para la producción de las toxinas se encuentra comprendida entre 32-37 °C y fundamentalmente se producen al final de la fase logarítmica de crecimiento de *B. cereus* (Kramer y Gilbert, 1989).

Existen dos síndromes clínicos diferentes: el síndrome emético y el síndrome diarreico. En el primero, la toxina responsable tiene una estructura circular que consiste en tres repeticiones de 4 amino y/o oxiácidos: (D-O-Leu-D-Ala-L-O-Val-L-Val)₃, con un peso molecular de 1,2 kDa (Tabla 14.5). Esta toxina es termoestable (permanece activa a una temperatura de 121 °C durante 90 minutos), resistente a la proteólisis y estable en medios con valores de pH comprendidos entre pH 2 y 11 (Granum y Lund, 1997).

El mecanismo de acción de esta toxina todavía no se conoce en profundidad, aunque Agata *et al.*, (1995) determinaron que la toxina se une al receptor 5-HT₃ estimulando el nervio vago aferente. De la misma manera, existen estudios que sugieren que esta toxina se forma como resultado de una modificación enzimática del alimento en el que el microorganismo crece, aunque este hecho todavía no se ha confirmado (Granum, 1994; Miller *et al.*, 1998).

La sintomatología de este síndrome aparece tras un periodo de incubación corto, de 1-5 horas, y se caracteriza por la aparición de náuseas y vómitos, similar a *S. aureus*. Suelen estar implicados los cereales y el consumo de arroz hervido o frito en restaurantes chinos.

En el síndrome diarreico, la toxina no suele penetrar con los alimentos, sino que se produce en el intestino delgado por lo que estrictamente no podemos hablar de intoxicación alimentaria. Al menos dos enterotoxinas termolábiles diferentes se han descrito como las responsables de la sintomatología que origina este síndrome diarreico (Lund y Granum, 1996; Granum y Lund, 1997). Estas moléculas tienen un peso molecular aproximado de 40.000 Da y se inactivan por calentamiento a 56 °C durante 5 minutos. Además, se trata de moléculas inestables a pH menores de 4 y mayores de 11 y que son degra-

Tabla 14.5. Propiedades fisicoquímicas y biológicas de la toxina emética de *Bacillus cereus*.

Parámetro	Propiedad o actividad
Peso molecular	1,2 kDa
Estructura	Dodecapéptido circular
Punto isoeléctrico	Molécula no cargada
Antigenicidad	¿No?
Actividad biológica en primates	Emesis
Receptor	5-HT3 (estimulación del nervio vago aferente)
Citotoxicidad	No
Estabilidad térmica	90 min a 121 °C
Estabilidad a distintos pH	Estable a pH 2-11
Efecto proteolítico (tripsina, pepsina)	Ninguno
Producción de la toxina	En alimentos, arroz y leche a 25-32 °C

Datos recopilados de Agata *et al.* (1995), Shinagawa *et al.* (1995) y Deshpande (2002).

dadas por enzimas digestivas, incluyendo pepsina, tripsina y quimiotripsina (Miller *et al.*, 1998). Se ha purificado y caracterizado una enterotoxina termolábil (HBL) de 3 componentes, B, L₁ y L₂ con actividad hemolítica y dermonecrotica que parece constituir un factor de virulencia primario en este síndrome diarreico (Beecher y Wong, 1994; Beecher *et al.*, 1995). Existen además evidencias experimentales que indican que los tres componentes (B, L₁ y L₂) son necesarios para la actividad de la enterotoxina (Beecher *et al.*, 1995). La proteína B es el componente que une HBL a la célula diana y tanto L₁ como L₂ tienen función lítica (Beecher y Macmillan, 1991).

Por otra parte, Lund y Granum (1996) han caracterizado otra enterotoxina integrada también por tres componentes (NHE) que carece de actividad hemolítica. Algunas cepas de *B. cereus* producen ambas enterotoxinas termolábiles, mientras que otras contienen solo genes que

codifican una de las dos (Lund y Granum, 1997).

El periodo de incubación del síndrome diarreico es de 8-16 horas y la sintomatología característica es la aparición de dolores abdominales y diarreas acuosas. Su producción está asociada al consumo de alimentos de naturaleza proteica (carnes), sopas, vegetales, *puddings*, leche y productos lácteos.

La comparación de los dos síndromes anteriormente mencionados se presenta en la Tabla 14.6.

La baja tasa de replicación y el relativo gran número de microorganismos necesarios para producir síntomas (10⁵-10⁷ células) (Granum y Lund, 1997) puede explicar en parte los síntomas de severidad mediana y la escasa prevalencia e incidencia de esta enfermedad; la presencia de *B. cereus* en alimentos no siempre indica patogenicidad, pero el peligro tóxico existe.

Tabla 14.6. Comparación de los síndromes emético y diarreico de *B. cereus*.

Variable	Síndrome diarreico <i>B. cereus</i>	Síndrome emético <i>B. cereus</i>
Periodo de incubación (h)	8-16	1-5
Periodo de enfermedad (h)	12-24	6-24
Diarreas	Extremadamente comunes	Poco comunes
Vómitos	Ocasionales	Extremadamente comunes
Alimentos implicados	Productos cárnicos, sopas, vegetales, postres y salsas	Arroz frito

2. Toxiinfecciones alimentarias

Según la FAO, las toxiinfecciones alimentarias constituyen la segunda causa de morbilidad en la población; pero muchas permanecen sin declarar, quizás por su mediana severidad y recuperación rápida.

Las toxiinfecciones alimentarias están producidas por numerosos microorganismos (Cameán y Repetto, 1995) (en la Tabla 14.7 aparecen los más significativos) en su mayoría de la familia *Enterobacteriaceae*. Los alimentos susceptibles de contaminación son variados, ya que la fuente de agentes causales suele ser el tracto gastrointestinal de individuos reservorios o las heces de animales y humanos infectadas, o aguas contaminadas que, por deficiencias sanitarias, contaminan a los alimentos, como carne fresca procedente de animal entero, pescados, moluscos, pasteles de crema, leche no pasteurizada, etc. De todas formas, se confirma generalmente como grupo más frecuente el formado por huevos y mayonesa (Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Andalucía, 2004).

Los factores que contribuyen a la aparición de los brotes están relacionados con la cadena del frío. En los de origen familiar el más frecuente es la preparación de alimentos con excesiva antelación, conservación a temperatura ambiente o refrigeración insuficiente, mientras que en los de origen público destaca la implicación de manipuladores portadores y la contaminación cruzada (Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Andalucía, 2004).

Entre los agentes responsables de la mayoría de toxiinfecciones se consideran los siguientes géneros bacterianos: género *Salmonella*, género *Shigella*, productor de disentería bacilar, y son cada vez más frecuentes las toxiinfecciones (Campilobacteriosis) producidas por *C. jejuni*, reconocido como problema de salud humana.

La salmonelosis

Es producida por el género *Salmonella*, una bacteria que presenta más de 2200 tipos serológicos diferentes, aunque solo unos 50 son los más comunes. La identidad de cada serotipo

implicado en un brote es de inmenso valor para la determinación epidemiológica de la fuente de infección. Así, *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi* infectan solo al hombre. Entre los serotipos, *Salmonella typhimurium* parece el más frecuente en salmonelosis humana, una enfermedad que continúa siendo un problema sanitario mundial, quizás por ser los animales y el hombre reservorios, y además debido a que muchos de los animales son fuente de alimentos. Afortunadamente no se considera una enfermedad letal o grave, salvo en forma de *fiebres tifoideas*. Se trata fundamentalmente de una enfermedad entérica con síntomas variados, dependiendo del ambiente y susceptibilidad del individuo. La sintomatología puede adquirir tres tipos de manifestaciones:

a) Salmonelosis tifoparatóficas (*S. typhi* y *S. paratyphi* A, B, C). Se incluyen en este grupo las fiebres tifoidea y las paratifoideas. La enfermedad cursa con fiebres altas y prolongadas (dos semanas) y pueden aparecer diarreas. En algunos casos puede existir un estado de inmunidad y el paciente se convierte en un portador crónico, ya que incluso después de la recuperación se detecta *Salmonella* en las heces durante varias semanas.

b) Enteritis salmonelósica (*Salmonella enteritidis*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*). Se trata del cuadro clínico más frecuente, se caracteriza por tener un periodo de incubación de 6-72 horas, frecuentemente de 24-48 horas. Cursa con laxitud, dolor de cabeza, dolor abdominal, vómitos, fiebre y diarreas, por inflamación del intestino delgado. El estado agudo puede durar dos días, y la recuperación, una semana. Se diferencia de la intoxicación alimentaria por enterotoxina estafilocócica, porque el periodo de incubación es mayor, los enfermos presentan fiebre, predomina la diarrea sobre los vómitos, el cuadro es más prolongado y la administración de antibióticos puede modificar el cuadro. Existen variaciones considerables en la gravedad y la duración del cuadro, según factores dependientes del huésped y del tamaño del inóculo. La infección tiende a ser más común,

Tabla 14.7. Principales agentes bacterianos productores de toxiinfecciones.

Agente	Fuente	Alimentos	Periodo de incubación usual	Signos y síntomas
<i>Salmonella spp.</i>	Heces y orina de animales en general y humanas	Carne (pollo), mariscos, pescado ahumado, vegetales crudos, huevos y productos derivados	24-48 h <i>S. typhi</i> : 10-14 días	Disentería Fiebres entéricas
Cepas <i>E. coli</i> enteropatógenas (ECEP)	Heces humanas y alimentos infectados	Carnes y alimentos contaminados por aguas	Aparición lenta	Diarreas acuosas infantiles
Cepas <i>E. coli</i> enterotoxigénicas (ECET)	Heces humanas y alimentos infectados	Carnes y alimentos, contaminados por aguas queso, sustitutos del café, salmón.	24-72 h	Diarreas acuosas
Cepas <i>E. coli</i> enteroinvasivas (ECEI)	Heces humanas y alimentos infectados	Ídem anterior	48-72 h	Disentería
Cepas <i>E. coli</i> enterohemorrágicas (ECEH)	Heces humanas y alimentos infectados	Ídem anterior	24-72 h	Diarreas acuosas y hemorrágicas
<i>Shigella spp</i>	Heces humanas, alimentos, agua	Leche, legumbres, patatas, ensaladas, atún, guisantes	24-72 h	Disentería
<i>Vibrio cholerae</i> (biotipo El Tor)	Heces y vómitos humanos, alimentos, agua	Vegetales crudos, alimentos húmedos, agua	24-72 h	Diarreas acuosas
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Alimentos marinos	Pescados, mariscos	6-96 h	Diarreas acuosas
<i>Clostridium perfringens</i>	Heces de animales y humanas, suelo, polvo, fango	Carnes y aves cocinadas, pescados (C)	8-24 h	Diarreas acuosas
<i>Campylobacter jejuni</i>	Heces humanas y animales	Aguas, leche cruda, huevos, carnes, pollo.	2-10 días	Disentería
<i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Heces animales infectados, alimentos	Cerdo y otras carnes, leche cruda, chocolate	4-7 días	Fiebres entéricas
<i>Enterococcus faecalis</i>	Tracto gastrointestinal de animales y humanos	Queso, leche, chocolate, productos cárnicos, pescado, frutas congeladas	-	Trastornos abdominales, infección urinaria, endocarditis
<i>Brucella abortus</i> , <i>B. suis</i> , <i>B. melitensis</i>	Heces y orina de animales, carnes infectadas	Leche no pasteurizada, carnes	10-20 días	Algias de diversa localización, estreñimiento
<i>Listeria spp.</i>	Tejidos, orina y leche de animales infectados	Leche y productos lácteos, huevos, carne y aves, vegetales crudos	4 días a varias semanas	Meningitis, meningoencefalitis
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (var. <i>bovis</i>)	Descargas fecales, nasales, saliva de animales y humanos. Carnes y productos cárnicos muy contaminados	Leche no pasteurizada y productos lácteos. Carnes y productos cárnicos	4 a 6 semanas	-

Datos recopilados de Concon (1988) y Deshpande (2002).

grave y prolongada en lactantes, ancianos y en personas con patologías previas, que en los adultos sanos.

c) Salmonelosis generalizadas, se trata de una forma septicémica de salmonelosis, la bacteria pasa a sangre y puede llegar a diferentes órganos, produciendo enfermedad sistémica.

La dosis infectiva de estas toxiinfecciones es elevada y varía de 10^6 - 10^9 células, según la virulencia de la cepa. Por ello, en la mayoría de los casos es necesario un periodo de multiplicación en el alimento antes de su consumo para alcanzar la dosis infectiva, lo que ocurre cuando se mantiene el alimento durante cierto tiempo a temperatura ambiente o en condiciones de escasa refrigeración. En casos de mayor susceptibilidad del huésped (hipoclorhidia, gastrectomía, malnutrición, inmunodepresión), se precisa un menor número de microorganismos para iniciar la infección. Al llegar las bacterias al intestino, colonizan principalmente el íleon y el ciego, se adhieren a las células de la mucosa, penetran por un mecanismo semejante a la fagocitosis e invaden el epitelio y la lámina propia, donde se multiplican y producen una reacción inflamatoria, que va seguida de activación de la adenilato ciclasa, con la consiguiente pérdida de agua y electrolitos y producción de diarrea.

Las enterotoxinas que produce *Salmonella* parece ser que pudieran ser responsables de esta hipersecreción de fluidos y electrolitos del epitelio intestinal, que se produce durante el curso de la enfermedad (Khurana *et al.*, 1991; Mehta *et al.*, 1999), aunque la activación de la adenilato ciclasa se produce probablemente por un aumento de la síntesis de prostaglandinas como consecuencia del proceso inflamatorio, ya que la indometacina, que es un inhibidor de las prostaglandinas, bloquea la activación de la adenilato ciclasa y la producción de diarreas.

Virtualmente, todos los tipos de alimentos son susceptibles de infección por el género *Salmonella*, por su amplia presencia en el ambiente (aguas), pero es más frecuente en carnes, aves, huevos y sus productos derivados. La contaminación de la carne puede ocurrir durante

la vida del animal o después de su sacrificio y, frecuentemente, en el despiezado. Los productos más contaminados son los alimentos manipulados, como las carnes preparadas, los productos de pastelería y helados, en los que pueden intervenir diversos ingredientes contaminados en origen (huevos, leche en polvo, cacao) o como consecuencia de su mezcla y manipulación.

La frecuencia de salmonelosis en épocas calurosas tras ingestión de salsa mahonesa doméstica o de hostelería, nos hace suponer como una causa importante el empleo de huevos con cáscara rota o deteriorada, lo que permite la entrada de las bacterias normalmente presentes en el exterior por contaminación de las heces del animal.

Por tanto, la prevención incluiría evitar posibles contaminaciones en los siguientes casos:

1. Producción de los alimentos, evitando aguas contaminadas en vegetales, frutas, evitar pastos contaminados para el ganado, etc.
2. Procesado, empaquetado y preparación del alimento, teniendo en cuenta el punto anterior
3. Otra forma de prevención sería evitar el crecimiento y multiplicación de salmonelas en los alimentos:
 - 3.1. La mayoría de los microorganismos mueren calentando los alimentos a más de 60 °C durante un mínimo de 10 minutos. En el caso de uso de horno microondas, algunos experimentos han mostrado que el tiempo de exposición es crítico. En esta técnica de cocinado, solo cuando se limita la evaporación del agua del alimento por envoltura (películas de plástico) mueren los microorganismos. Ello es debido a que las bacterias son capaces de soportar altas temperaturas, porque la humedad relativa es baja, pero la resistencia al calor disminuye rápidamente conforme aumenta la actividad del agua ($a_w=0,90$).
 - 3.2. Se recomiendan alimentos ácidos (pH inferiores a 4,5). El zumo de limón (pH

- 2,3-2,5) inhibe el crecimiento de los microorganismos.
- 3.3. Como la mayoría no toleran altos contenidos salinos, son más adecuados los alimentos curados, como jamón y embutidos.
 - 3.4. Los alimentos secos no permiten la multiplicación de salmonelas, pero sí una supervivencia mayor y una mayor resistencia al calor que aquellos que tienen un contenido mayor de humedad. Este tipo de alimentos puede dar por tanto una falsa seguridad, sobre todo si se emplean como ingredientes en mezclas complejas, con una humedad suficiente como para promover la multiplicación del microorganismo.
 - 3.5. Evitar que los alimentos no ácidos (aves, carnes) se almacenen durante periodos prolongados a 5 °C.
 - 3.6. Se sugiere, en general, que los productos congelados no permanezcan fuera del congelador más de dos horas; una vez descongelado el alimento debe consumirse en un periodo de 6 horas. Se puede almacenar 2 días a 7 °C, pero el almacenamiento durante tres días o más requiere temperaturas de 4 °C o inferiores.

En definitiva, extremar la higiene alimentaria, incluso cambiando cuchillos, utensilios y zonas de apoyo en el despiece de aves y otros animales, desecho de huevos con cáscara deteriorada, mantenimiento de la cadena del frío, etc.

Escherichia coli

Es el miembro de las enterobacterias que se aísla con mayor frecuencia en la microbiota normal del colon de las personas. Son bacilos Gram negativos, móviles y constituyen una de las causas más importantes de toxiinfecciones alimentarias. Las cepas de *E. coli* presentan una estructura antigénica compleja y serológicamente se diferencian fundamentalmente de acuerdo a tres antígenos de superficie: antígeno somático (O),

capsular (K) y flagelar (H). En la actualidad, se han identificado 174 antígenos O, 56 antígenos H y 80 antígenos K (Deshpande, 2002). Las cepas enteropatógenas de *E. coli* poseen una serie de factores de virulencia de los que carecen las cepas no patógenas, y difieren tanto en sus mecanismos patogénicos como en su epidemiología. Estas cepas enteropatógenas pueden clasificarse en seis grupos (Tabla 14.8) (Nataro y Kaper, 1998):

- *Cepas enteropatógenas (ECEP)*. Estas cepas son las responsables de múltiples casos de diarreas infantiles, fundamentalmente durante los meses de verano en forma de brotes epidémicos, en las salas de pediatría de los hospitales y maternidades, aunque su incidencia es mucho menor en países desarrollados. Los principales síntomas del cuadro clínico son diarreas, malestar general, vómitos, y a menudo fiebre. El cuadro suele ser autolimitado, aunque también puede cursar de forma crónica. El mecanismo patogénico de estas cepas aún no se conoce con certeza, aunque parece ser que ciertos determinantes plasmídicos y cromosómicos capacitan a estas cepas para unirse y dañar a las células intestinales, alterando así la función epitelial. En este proceso, una proteína bacteriana denominada intimina parece desempeñar un papel importante. El resultado de este proceso de adherencia parece ser la alteración de la permeabilidad celular, dando lugar a un aumento de secreción.
- *Cepas enterotoxigénicas (ECET)*. Estas cepas se asocian a tres síndromes clínicos diferentes, desde una diarrea severa, parecida al cólera, diarreas infantiles y una enfermedad moderada, como las denominadas diarreas del viajero.

Los principales factores de virulencia de estas cepas son dos enterotoxinas: una termoestable, denominada TE, muy potente, y otra termolábil, denominada TL.

Se conocen dos tipos de enterotoxina TE: TEa y TEb (Sears y Kaper, 1996; Giannella, 1995). La enterotoxina TEa es una pequeña molécula cíclica

Tabla 14.8. Características de las principales cepas de *E. coli* productoras de toxiinfecciones alimentarias

Grupo patogénico	Factor de virulencia	Mecanismo de acción	Clínica
Cepas <i>E. coli</i> enteropatógenas (ECEP)	Fimbrias, intimina	Adherencia localizada y mediada por intimina	Diarreas agudas y persistentes
Cepas <i>E. coli</i> enterotoxigénicas (ECET)	Factores de colonización, toxina termolábil (TL) y toxina termoestable (TE)	Colonización, adenilato ciclasa, guanilato ciclasa, secreción de HCO_3	Diarreas acuosas y diarreas severas tipo cólera
Cepas <i>E. coli</i> enteroinvasivas (ECEI)	Proteínas de adhesión e invasión. Enterotoxina enteroinvasiva	Invasión celular. Secreción	Disentería aguda
Cepas <i>E. coli</i> enterohemorrágicas (ECEH)	Toxinas similares a la toxina <i>shiga</i> , hemolisina	Inhibición síntesis proteica (subunidad 28S de ARN ribosómico)	Diarreas sanguinolentas. Síndrome urémico hemolítico.
Cepas <i>E. coli</i> enteroagregativas (ECEA)	Adherencia agregativa. Fimbrias. Enterotoxina termoestable	Adherencia agregativa. Guanilato ciclasa (secreción).	Diarreas persistentes. ¿Diarreas agudas?
Cepas <i>E. coli</i> adherentes difusas (ECAD)	Adhesinas fimbrias y no fimbrias	Adherencia difusa	¿Diarreas persistentes?

Datos recopilados de García-Rodríguez y Picazo (1996), Deshpande (2002) y Nataro y Kaper (1998).

ca (18-19 aminoácidos) rica en cisteínas que se forma a partir de una molécula precursora de mayor tamaño (72 aminoácidos). Esta toxina muestra una elevada similitud con el péptido intestinal guanilina. El receptor de membrana de esta enterotoxina es guanilato ciclasa C (GCC) que se encuentra localizado en la membrana apical de las células intestinales. Existen estudios que indican que estos receptores de la toxina TEa se encuentran en mayor cantidad en los enterocitos de niños e individuos jóvenes, en comparación con los adultos. Esta variación en el número de receptores de TEa podría explicar la susceptibilidad más elevada de los niños y animales recién nacidos a la infección por estas cepas de *E. coli*. La activación de GCC produce el desencadenamiento en cascada de una serie de procesos que finalmente dan lugar a un incremento de GMP cíclico, lo cual incrementa la secreción de líquidos (Hirayama, 1995). TEb también se sintetiza a partir de una molécula precursora de mayor tamaño (71 aminoácidos) que después sufre un procesamiento proteolítico, dando lugar a una proteína madura de 48 aminoácidos (Dreyfus *et al.*, 1992). Esta toxina no afecta las concentraciones ni de AMP cíclico ni de GMP cíclico en las células epiteliales intestinales, y por lo tanto no

interfiere en el transporte de iones sodio y cloro. Parece ser que la toxina da lugar a una respuesta celular caracterizada por la secreción de bicarbonato (Peterson y Whipp, 1995).

La toxina TL es termolábil y se conocen dos formas: TL-1 y TL-2 (O'Brien y Homes, 1996). TL-1 tiene un peso molecular de 80.000 y presenta una estructura oligomérica compuesta por una subunidad activa dimérica A y una unidad transportadora pentamérica B. Esta toxina actúa mediante estimulación de la adenilato ciclasa de las células epiteliales de la mucosa intestinal, lo cual produce la acumulación de AMP cíclico, que interfiere en el transporte de iones sodio y cloro por las células epiteliales intestinales (Verma *et al.*, 1994; Hol, 1995). TL-2 es la forma que se asocia principalmente con toxiinfecciones en animales.

Además de las dos enterotoxinas, otro factor de virulencia importante de estas cepas de *E. coli* son las fimbrias con adhesinas MR, específicas de especie (factores de colonización), que facilitan la adherencia. Se han descrito al menos 20 tipos antigenicamente distintos de adhesinas (Gaastra y Svennerholm, 1996). Los receptores intestinales de estos factores de virulencia se encuentran en la superficie celular e incluyen

tanto sialoglicolípidos, tal como G_{M2}, glicolípidos y glicoproteínas.

La mayoría de las cepas enterotoxigénicas producen ambos tipos de toxinas y además presentan fimbrias que facilitan la adherencia.

La forma severa de la enfermedad se puede manifestar abruptamente. El síntoma principal, diarreas, viene acompañado con dolor abdominal y náuseas. En casos severos aparecen vómitos y fiebre. La enfermedad es autolimitante y remite en unos días o semanas. En niños, la deshidratación, fiebre alta, etc., puede llevar a estados más graves, si el paciente no se trata rápidamente.

- *Cepas enteroinvasivas (ECEI)*. Causan una toxiinfección más frecuente en niños de países en desarrollo, que cursa con síntomas similares a los de la disentería causada por *Shigella*, diarrea acuosa con pus, sangre, tenesmo, fiebre alta e hipotensión. El mecanismo que utilizan para producir la enfermedad es similar al de *Shigella*, invaden las células epiteliales del colon, se multiplican dentro de ellas, lo que provoca la muerte de células adyacentes, inflamación, ulceración y hemorragias. Estas cepas no secretan toxina *Shiga*, por lo que no causan el síndrome hemolítico urémico característico de *Shigella*. Los factores de virulencia que determinan esta acción patógena están codificados en un plásmido de alto peso molecular denominado pInv (Harris *et al.*, 1982).
- *Cepas enterohemorrágicas (ECEH)*. Se describieron por primera vez en 1982 cuando se asoció la presencia de cepas de *E. coli* serotipo O157:H7 a la aparición de una epidemia multiestatal de colitis hemorrágica. *E. coli* O:157:H7 difiere metabólicamente de otras cepas de *E. coli*. Así, la mayoría de los aislamientos asociados a este serotipo comparten dos características cruciales para la identificación de las cepas en medio selectivo no fermentan el sorbitol o lo fermentan lentamente y además carecen de la enzima β-glucuronidasa. Este serotipo también se caracteriza por no presentar crecimiento a 44-45 °C, temperatura a la que otros serotipos de *E. coli* crecen fácilmente, aunque pueden tolerar unas condi-

ciones ácidas más extremas (pH 2.5). Posteriormente se han descrito otros serotipos (O111, O26, O103 y O104) como responsables de la misma manifestación clínica (CDC, 1995a, 1995b). Estas cepas también se denominan verocitotoxigénicas, debido a que producen dos tipos de enterotoxina denominadas verotoxina I y II, o SLTI y SLTII homólogas a la toxina *Shiga* de *Shigella dysenteriae* tipo I y responsables de la acción patógena (Konawalchuk *et al.*, 1977; O'Brien *et al.*, 1982).

Las cepas ECEH tienen un plásmido denominado pO157 que parece codificar varios factores implicados en la virulencia de estas cepas, incluyendo una hemolisina, una catalasa, una proteasa, y un sistema de secreción de tipo II (Burland *et al.*, 1998).

La colitis hemorrágica cursa con dolor abdominal, fiebre y diarrea sanguinolenta copiosa. En la mayoría de los casos los síntomas remiten a los 5-10 días, sin embargo, en un 10%-20% de casos la enfermedad pueden derivar al desarrollo de efectos sistémicos, como el síndrome hemolítico urémico (Coia, 1998; Ochoa y Cleary, 2003). En la fisiopatología de este síndrome se implican tanto factores bacterianos (producción de toxina SLTII) como factores dependientes del propio huésped (distribución en los eritrocitos de los receptores para la toxina, formados por globotriosilceramida).

- *Cepas enteroagregativas (ECEA)*. Agrupan una colección heterogénea de cepas de *E. coli* con la característica común de tener la capacidad de adherirse a células HEp-2 formando pequeños agregados en los cultivos celulares (Nataro *et al.*, 1987). Estas cepas de *E. coli* tienen como principales determinantes de patogenicidad una enterotoxina termoestable y al menos dos tipos distintos de factores de adherencia (Nataro *et al.*, 1992). La enterotoxina posee actividad secretora, viene genéticamente codificada y actúa de manera similar a la toxina TEa de las cepas ECET (Menard y Dubreuil, 2002). La enfermedad cursa con fiebre, diarreas y generalmente no se observan vómitos.

- *Cepas adherentes difusas (ECAD)*. Actualmente se reconocen como un grupo independiente de las cepas ECEA, aunque su significado epidemiológico es controvertido y todavía se conoce poco sobre la patogenia de este grupo. Se han asociado a cuadros diarreicos sin sangre en niños con edades comprendidas entre los 2 y 5 años, particularmente en México, Bangladesh y Chile (Baqui *et al.*, 1992; Levine *et al.*, 1993).

Además de estas seis categorías de cepas de *E. coli*, aceptadas como las responsables de las principales toxiinfecciones alimentarias causadas por esta enterobacteria, también se han detectado otras cepas patógenas de *E. coli* como las cepas enteroadherentes (ECDC), asociadas a diarreas del viajero o las cepas de *E. coli* que secretan un nuevo tipo de toxina citoletal (TCD) (Pickett *et al.*, 1994).

El reservorio primario de estas cepas de *E. coli* es el colon de humanos y otros animales, por lo que la materia fecal es la primera fuente de contaminación. La prevención, por tanto, consiste en evitar la contaminación fecal en aguas y alimentos (Ellenhorn, 1997). La leche debe ser pasteurizada para evitar la contaminación fecal con *E. coli* O157:H7 procedente de vacas sanas pero portadoras de la bacteria.

E. coli se ha utilizado como indicador de contaminación fecal. Debemos decir que no todas las cepas de *E. coli* son patógenas, por lo tanto, la detección de esta bacteria en alimentos, aunque puede indicar un peligro potencial de enfermedad, no indica necesariamente que el consumo del mismo produzca enfermedad.

La disentería bacilar

Está producida por *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii*, y *Shigella sonnei* (39 serotipos). El género *Shigella* incluye enterobacterias inmóviles, que no fermentan rápidamente la lactosa ni producen desaminasas. Las especies que integran este género están íntimamente relacionadas con *E. coli*, tanto desde el punto de vista bioquímico como genético y

pueden considerarse patógenos humanos primarios.

Esta enfermedad tiene un periodo de incubación de 1-7 días; generalmente los síntomas comienzan a los 2-3 días, con un curso bifásico. En una primera fase se detecta fiebre, dolor abdominal, diarrea. En casos severos comienza una segunda fase, con anorexia, deposiciones escasas, sangre, tenesmo. Si no se trata, puede durar varias semanas, e incluso ser mortal, porque adicionalmente puede sobrevenir perforación intestinal, convulsiones y encefalopatía, un síndrome hemolítico urémico y neumonía (Ellenhorn, 1997). Los síntomas en niños son más severos y dramáticos, se acompañan de fiebre alta, convulsiones y síntomas neurológicos.

Los mecanismos responsables de la patogenicidad de esta bacteria son su capacidad de adherencia, invasividad y la producción de toxinas. Las sighthelas están provistas de fimbrias que poseen adhesinas proteicas que se fijan a los glúcidos receptores presentes en las células intestinales humanas. Se ha aislado de *S. dysenteriae* tipo I una toxina proteica con acción citotóxica, neurotóxica y enterotóxica denominada verotoxina o verocitotoxina debido a su acción citotóxica sobre las células Vero, o también alternativamente se denomina toxina *Shiga*. Estas toxinas pertenecen a una familia de exotoxinas relacionadas tanto estructural como funcionalmente y caracterizadas por tener una estructura de tipo A/B con una subunidad activa A y cinco subunidades de unión B (Sandvig, 2001). La subunidad A es una N-glucosidasa que actúa sobre el componente de 28S del ARN del complejo ribosómico eucariótico de 60S, originando la inhibición de la síntesis proteica. La subunidad B actúa como mediador de unión de receptores glucolipídicos de las membranas celulares de las células de mamíferos.

Estas toxinas parecen ser responsables de la muerte celular y la necrosis del epitelio del colon que se produce en algunos casos de la enfermedad, y recientemente se han descrito los mecanismos por los cuales estas toxinas inducen apoptosis (Cherla *et al.*, 2003).

Para causar enfermedad, los bacilos ingresan por vía digestiva, y a diferencia de *Salmonella*, la dosis infectiva es muy pequeña (10^1 - 10^2 células); posteriormente las shigelas se adhieren al epitelio mucoso del íleon distal y del colon y lo invaden, penetrando en las células epiteliales intestinales, con la consiguiente producción de toxinas. Estos procesos producen inflamación aguda y úlceras superficiales diseminadas a lo largo de la superficie mucosa, pero rara vez las bacterias atraviesan la pared intestinal para llegar al torrente sanguíneo.

La contaminación de los alimentos puede ser a través de agua contaminada, contenedores, y equipos usados en la preparación de alimentos, a través de su manipulación, etc. Los microorganismos pueden persistir en las heces hasta un mes después de la infección no tratada. El estado portador prolongado no es frecuente, pero puede constituir la fuente de epidemias transmitidas por alimentos. Entre los alimentos susceptibles, hay que destacar las ensaladas de diferentes tipos.

Clostridium perfringens

Es un bacilo Gram positivo, anaerobio, capsulado, esporulado e inmóvil que se encuentra ampliamente distribuido en el ambiente, de gran plasticidad ecológica. No suele aparecer esporulado, ni en productos patológicos ni en cultivos, requiriendo para esporular medios especiales. La cápsula, la carencia de flagelos y la esporulación poco frecuente lo diferencian de otras especies del género.

Constituye el agente etiológico más importante de la gangrena gaseosa. Además, es responsable de otros cuadros clínicos como son: toxiinfecciones alimentarias, enteritis necrosante, celulitis e infecciones inespecíficas. Los determinantes de patogenicidad de esta bacteria son variados, de tal manera que ejerce su acción patógena mediante la producción de varias toxinas citotóxicas, una enterotoxina y varias enzimas extracelulares con actividad biológica (colagenasas, hialuronidasas, etc.). Al menos 8 de las toxinas producidas por este microorganismo son consideradas letales y 4 de ellas, α , β , ϵ

y τ se consideran las más significativas, y se han utilizado para agrupar las cepas en 5 tipos toxigénicos, A, B, C, D y E (Petit *et al.*, 1999). El tipo A es el responsable de la casi totalidad de los cuadros clínicos en el hombre. El tipo C produce ocasionalmente enteritis necrosante.

La enterotoxina es producida por múltiples cepas del tipo A y excepcionalmente por alguna de los tipos C y D. Se trata de una proteína de bajo peso molecular (aproximadamente 35.000 Da) que presenta un punto isoeléctrico de 4,3 (Granum y Stewart, 1993). Esta enterotoxina es termolábil, así, el calentamiento en solución salina a una temperatura de 60 °C durante 5 minutos destruye su actividad biológica. Además, la toxina es muy sensible a pH extremos, aunque es resistente a algunos tratamientos proteolíticos (McDonel, 1986). Se han propuesto diversos mecanismos de acción de esta enterotoxina: una acción colinérgica derivada de la acción lecitinasa, y alternativamente o al mismo tiempo una toxina con acción tipo cólera, activando la secreción de iones cloruro en el lumen, lo que conlleva la retención de iones sodio y secuestro de agua en el intestino; un tercer mecanismo sugiere efectos endoteliales que llevan a una vasodilatación en el intestino y aumento de la permeabilidad (Deshpande, 2002).

El cuadro clínico de toxiinfección alimentaria se produce por ingestión de gran número de bacterias (más de 10^8 células vegetativas) productoras de la enterotoxina. Los síntomas aparecen tras un periodo de incubación de 8 a 24 horas y el cuadro clínico se caracteriza fundamentalmente por la aparición de dolor abdominal y diarreas severas. Cursa sin fiebre, y la enfermedad es de corta duración, con recuperación favorable, salvo en niños y personas debilitadas.

El cuadro clínico de la enteritis necrosante es un cuadro muy infrecuente, aunque grave, que aparece después de un periodo de incubación menor de 24 horas y se caracteriza por dolor abdominal, diarrea, vómitos, e inflamación aguda del intestino delgado con necrosis y gangrena en diversas porciones del mismo (Brynstad y Granum, 2002). Este cuadro clínico se relaciona con dietas hipoproteicas y se

produce fundamentalmente por la ingestión de alimentos contaminados con *C. perfringens* tipo C que libera en el intestino toxina β , de la cual se han descrito 2 tipos, β_1 y β_2 (Gibert *et al.*, 1997). Ambos tipos tienen una acción letal y necrótica, produciendo hemorragia y necrosis. Actualmente la enteritis necrosante está restringida a los indígenas de Papua, Nueva Guinea, que habitualmente ingieren pocas proteínas en su dieta.

Aunque la mayoría de los alimentos pueden contaminarse con este microorganismo, los productos cárnicos, en particular, son los más susceptibles. La contaminación tiene lugar en cualquiera de los eslabones de la cadena alimentaria, que van desde su obtención, procesamiento culinario, conservación y recalentamiento.

La prevención de la toxiinfección por *C. perfringens* no es fácil. Así, asegurar que el microorganismo no contamine el alimento resulta prácticamente imposible, ya que se trata de un microorganismo ubicuo. Especial precaución debe tomarse en el caso de carnes rojas y aves, ya que estos animales actúan como reservorios (tracto intestinal). Además, es la especie del género *Clostridium* que se aísla con mayor frecuencia del hombre como microbiota normal (manos), actuando así el hombre también como reservorio. Por lo tanto, resulta más práctico inhibir la multiplicación del microorganismo en el alimento, y si está presente en gran cantidad, reducirlo hasta niveles seguros. Las esporas de este bacilo resisten el calentamiento de los alimentos y pueden germinar durante el enfriamiento. Se debe tener especial cuidado de no conservar nunca los alimentos ya cocinados a temperatura ambiente. El enfriamiento lento de 50 °C a 25 °C es particularmente peligroso en el caso de esta bacteria, puesto que a esas temperaturas, en unas pocas horas, se puede desarrollar un gran número de células vegetativas productoras de la enterotoxina.

El género *Campylobacter*

Está integrado por bacilos Gram negativos, curvados en espiral, con una o más espiras, o en

forma de "S". Este género contiene algunas especies que pueden producir patologías en el hombre. Los cuadros intestinales son los que más se asocian con las infecciones por estas bacterias y constituyen una de las causas más comunes de diarreas causadas por bacterias. *Campylobacter jejuni* constituye la especie clínicamente más importante en la actualidad para el hombre; es muy frecuente en países con recursos socioeconómicos escasos y se asocia a múltiples casos de diarreas del viajero. La importancia de estos microorganismos ha tardado mucho en reconocerse a causa de los requisitos para su cultivo, diferentes de los de las enterobacterias, por tratarse de bacterias microaerófilas y termófilas que no proliferan en los medios utilizados para aislar *E. coli* o *Salmonella*.

Esta bacteria tiene numerosos reservorios, por lo que el potencial de contaminación de alimentos es enorme; en la mayoría de los brotes están implicados alimentos casi crudos, tales como leche cruda, carne de pollo y cerdo, hamburguesas crudas, etc., así como moluscos bivalvos.

La toxiinfección se establece por ingestión oral de la bacteria que se encuentra contaminando los alimentos, una vez en la luz intestinal, las bacterias se adhieren a la mucosa, posiblemente mediante adhesinas flagelares y se multiplican en porciones distales del intestino delgado y del colon.

La dosis infectiva está condicionada por el alimento o líquido que vehiculiza el microorganismo y por las características fisiológicas del tracto gastrointestinal del individuo. Estos microorganismos son sensibles al bajo pH del estómago. Su ingestión con alimentos líquidos que favorecen un vaciamiento rápido hacia el intestino, o con sustancias con actividad tampón, potencia la capacidad infectiva de estas bacterias.

El establecimiento de la infección entérica por estas bacterias depende de múltiples factores bacterianos, que en primer lugar favorecen la colonización de la mucosa intestinal. Se han descrito dos mecanismos distintos por los que estos microorganismos producen diarrea: mediante la producción de enterotoxinas similares

a la toxina colérica y a través de un mecanismo invasivo semejante al causado por el género *Shigella* (Bereswill y Kist, 2003).

Los síntomas del cuadro clínico producido por esta bacteria aparecen tras un periodo de incubación medio de 3 a 5 días e incluyen diarreas, fiebre (superior a 39 °C), dolor abdominal, dolor de cabeza, náuseas, vómitos, y en un porcentaje significativo se requiere hospitalización. En ocasiones el dolor abdominal (especialmente en sujetos jóvenes) es de tal magnitud que puede simular un cuadro de apendicitis o peritonitis. En adultos, la toxiinfección es clínicamente indistinguible de una shigelosis. En los casos típicos el cuadro clínico es autolimitado y cede a los 3-5 días, aunque puede durar 1-2 semanas. Como complicaciones podemos citar la asociación de *C. jejuni* a desórdenes de tipo inmunitario, como el síndrome de Guillain-Barré, artritis reactiva, síndrome de Reiter y glomerulonefritis aguda (Tsang, 2002).

Normas generales de prevención

Los meses de verano constituyen una época especialmente crítica, porque las altas temperaturas favorecen el desarrollo de microorganismos. Asimismo, en esta época hay una mayor tendencia a comer fuera de casa. Por ello, la Agencia Española de Seguridad Alimentaria (AESA), recomienda la observación de las siguientes normas, basadas en las Reglas de Oro para la preparación higiénica de los alimentos, de la Organización Mundial de la Salud, además de ciertas medidas preventivas que hemos expuesto anteriormente. La adopción de estas sencillas precauciones evitará numerosas enfermedades provocadas por una inadecuada manipulación o conservación de los alimentos (<http://www.aesa.msc.es/aesa/web/AESA.jsp>):

1. *Consumir alimentos que hayan sido tratados o manipulados higiénicamente.* No se

debe consumir leche sin tratamiento térmico (leche cruda). Las carnes, pescados y productos de repostería deben estar refrigerados o congelados. En los establecimientos de restauración es obligatorio el empleo de ovoproductos en la elaboración de mayonesas, salsas, cremas, etc. Si se preparan estos alimentos en casa, se deben consumir inmediatamente, no aprovechar las sobras y mantener la conservación en frío. Si se lavan los huevos antes de utilizarlos, porque estos tienen restos de suciedad, se debe hacer inmediatamente antes de su uso.

2. *Cocinar correctamente los alimentos.* Los alimentos pueden estar contaminados por microorganismos. Si los alimentos se cocinan bien, estos microorganismos pueden ser destruidos por el calor. La temperatura a la que debe someterse el alimento debe ser suficiente para que alcance un mínimo de 70 °C en el centro del producto.

3. *Consumir los alimentos inmediatamente después de ser cocinados.* Es la mejor manera de evitar la proliferación de los gérmenes. No se deben dejar nunca a temperatura ambiente los alimentos ya cocinados.

4. *Un alimento cocinado es un alimento higienizado.* Los alimentos que no puedan ser consumidos inmediatamente o las sobras que se quieran guardar, deben mantenerse bajo la acción del calor, por encima de 60 °C, o del frío, a 7 °C como máximo. Si se consume pescado crudo en casa, debe mantenerse congelado previamente durante varios días.

5. *Calentar suficientemente los alimentos cocinados.* Después de su preparación, se pueden mantener calientes hasta su consumo aquellos alimentos que lo permitan (sopas, purés, guisos...). Los alimentos que no puedan ser sometidos a calor (ensaladas, gazpachos, etc.) deben ser refrigerados inmediatamente. No siempre es posible aprovechar sobras de una comida anterior, antes de hacerlo, deben calentarse a la temperatura máxima.

6. *Evitar el contacto entre los alimentos crudos y los cocinados.* Un alimento cocinado puede volver a contaminarse por contacto con los alimentos crudos o con objetos que anterior-

mente hayan contactado un alimento crudo (cuchillos, tablas, superficies, trapos, etc.). El trapo de cocina o la bayeta puede ser un excelente vehículo de contaminación. Es preferible usar papel de cocina.

7. *Asegurar una correcta higiene de la persona que va a manipular los alimentos y una limpieza adecuada en todas las superficies de la cocina.* La persona que manipule alimentos debe observar unas estrictas prácticas higiénicas. Es imprescindible que tenga las manos siempre limpias. Es muy importante hacer la limpieza de la cocina diariamente, como mínimo. Debe tenerse especial cuidado en almacenar la basura en recipientes lisos, lavables y cerrados y que estos no se encuentren cerca de los alimentos.

8. *Mantener los alimentos fuera del alcance de insectos, roedores y animales de compañía.* No hay que olvidar que los animales pueden ser portadores de microorganismos patógenos y parásitos que originan enfermedades de transmisión alimentaria.

9. *Utilizar exclusivamente agua potable.* El agua potable no es solo imprescindible para beber, sino también para preparar los alimentos. Debe tener exclusivamente estos dos orígenes: aguas emvasadas o aguas de la red pública de distribución en la población. No se debe beber ni usar agua procedente de pozos que no esté potabilizada.

10. *No consumir alimentos percederos que estén expuestos a temperatura ambiente.* En bares, cafeterías, restaurantes, etc., todos los alimentos deben estar protegidos por vitrinas y conservados en condiciones sanitarias adecuadas. Deben estar refrigerados siempre que sea preciso. Estas medidas deben ser exigidas por el consumidor, y cuando se observe que no se cumplen, los alimentos deben ser rechazados.

Bibliografía

AESA, Agencia Española de Seguridad Alimentaria, (<http://www.aesa.msc.es/aesa/web/AESA.jsp>).
 Agata N, Ohta M, Mori M, Isobe M (1995). A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin

- of *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett* 129: 17-20.
- Balaban N, Rasooly A (2000). Staphylococcal enterotoxins. *Int J Food Microbiol* 61: 1-10.
- Baqui AH, Sack RB, Black RE (1992). Enteropathogens associated with acute and persistent diarrhea in Bangladeshi children less than 5 years of age. *J Infect Dis* 166: 792-796.
- Beecher DJ, Macmillan JD (1991). Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infect Immun* 59: 1778-1784.
- Beecher DJ, Schoeni JL, Wong ACL (1995). Enterotoxin activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infect Immun* 63: 4423-4428.
- Beecher DJ, Wong ACL (1994). Improved purification and characterization of hemolysin BL, a haemolytic dermonecrotic vascular permeability factor from *Bacillus cereus*. *Infect Immun* 62: 980-986.
- Bereswill S, Kist M (2003). Recent developments in *Campylobacter* pathogenesis. *Curr Opin Infect Dis* 16: 487-491.
- Bergdoll MS (1989). *Staphylococcus aureus*. En: Doyle M. P (ed.). *Foodborne bacterial pathogens*. Marcel Dekker, New York. pp. 463-523.
- Bergdoll MS (1992). Staphylococcal intoxication in mass feeding. En: Tu A.T. (ed.). *Food poisoning*. Marcel Dekker, New York. pp. 25-47.
- Brynstad S, Granum PE (2002). *Clostridium perfringens* and foodborne infections. *Int J Food Microbiol* 74: 195-202.
- Burland V, Shao Y, Perna NT, Plunkett G, Sofia HJ, Blattner FR (1998). The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. *Nucleic Acids Res* 26: 4196-4204.
- Camean AM, Repetto M (1995). Estado Actual de la Toxicología Alimentaria. En: Repetto M (ed.). *Toxicología avanzada*, Diaz de Santos, Madrid. pp. 205-292.
- CDC (1995a) *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to commercially distributed dry-cured salami-Washington and California, 1994. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR* 44: 157-160.
- CDC (1995b) Surveillance for outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infection-preliminary summary of 1994 data. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR* 44: 501-503.
- Cherla RP, Lee SY, Tesh VL (2003). Shiga toxins and apoptosis. *FEMS Microbiol Lett* 228: 159-166.

- Coia JE (1998). Clinical, microbiological and epidemiological aspects of *Escherichia coli* O157 infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 20: 1-9.
- Concon JM (1988). *Food toxicology. Part A, B*, Marcel Dekker, New York.
- Deshpande SS (2002). *Handbook of food toxicology*. Marcel Dekker, New York.
- Dodds KL, Austin JW (1997). *Clostridium botulinum*. En: Doyle M.P., Beuchat L.R., Montville T.J. (eds.). *Food Microbiology: Fundamental and Frontiers*. ASM Press. Washington. pp. 288-304.
- Dreyfus LA, Urban RG, Whipp SC *et al.* (1992). Purification of the STB enterotoxin of *Escherichia coli* and the role of selected amino acids on its secretion, stability and toxicity. *Mol Microbiol* 6: 2397-2406.
- East AK, Stacey JM, Collins MD (1994). Cloning and sequencing of a hemagglutinin component of the botulinum neurotoxin complex encoded by *Clostridium botulinum* types A and B. *Syst Appl Microbiol* 17: 306-312.
- Ellenhorn MJ (1997). *Ellenhorn's Medical toxicology. Diagnosis and treatment of human poisoning*, 2nd Ed., Williams & Wilkins, Baltimore.
- Gaastra W, Svennerholm AM (1996). Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Trend Microbiol* 4: 444-452.
- García-Rodríguez JA, Picazo JJ (1996). *Microbiología Médica*. Mosby, Madrid.
- Genigeorgis, Jelim CA (1989). Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. *Int J Food Microbiol* 9: 327-360.
- Giannella RA (1995). *Escherichia coli* heat-stable enterotoxins, guanylin, and their receptors: What are they and what do they do? *J Lab Clin Med* 125: 173-181.
- Gibert M, Jolivet-Reynaud C, Popoff MR *et al.* (1997) Beta2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. *Gene* 203: 65-73.
- Granum P E (1994). *Bacillus cereus* and food hygiene. *Norsk Vet Tidsskr* 106: 911-915.
- Granum P E, Lund T (1997). *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Lett* 157: 223-228.
- Granum PE, Stewart GS (1993). Molecular biology of *Clostridium perfringens* enterotoxin. En: Sebald M (ed.). *Genetics and molecular biology of anaerobic bacteria*. Springer-Verlag, New York. pp. 235-247.
- Harris T O, Grossman D, Kappler JW *et al.* (1993) Lack of complete correlation between emetic and T-cell-stimulatory activities of staphylococcal enterotoxins. *Infect Immun* 61: 3175-3183.
- Harris JR, Wachsmuth IK, Davis BR *et al.* (1982) High-molecular-weight plasmid correlates with *Escherichia coli* enteroinvasiveness. *Infect Immun* 37: 1295-1298.
- Hirayama T (1995). Heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*, En: Moss J, Iglewski B, Vaughan M *et al.* (eds.). *Bacterial toxins and virulence factors in disease*. Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 281-296.
- Hol WG, Sixma T K, Merritt EA (1995). Structure and function of *E. coli* heat-labile enterotoxin and cholera toxin B pentamer. En: Moss J, Iglewski B, Vaughan M *et al.* (eds.). *Bacterial toxins and virulence factors in disease*. Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 185-223
- Khurana S, Ganguly NK, Khullar M (1991). Studies on the mechanism of *Salmonella typhimurium* enterotoxin-induced diarrhoea. *Biochim Biophys Acta* 1097: 171-176.
- Konawalchuk J, Speirs JI, Stavric S (1977). Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 18: 775-779.
- Kramer JM, Gilbert RJ (1989). *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. En: Doyle MP (ed.). *Foodborne bacterial pathogens*. Marcel Dekker, New York. pp. 21-70.
- Lalli G, Bohnert S, Deinhardt K *et al.* (2003) The journey of tetanus and botulinum neurotoxins in neurons. *Trends Microbiol* 11: 431-437.
- Levine MM, Ferreccio C, Prado V *et al.* (1993) Epidemiologic studies of *Escherichia coli* diarrheal infections in a low socioeconomic level periurban community in Santiago, Chile. *Am J Epidemiol* 138: 849-869.
- Lund T, Granum PE (1996). Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. *FEMS Microbiol Lett* 14: 151-156.
- Lund T, Granum PE (1997). Comparison of biological effect of the two different enterotoxin complexes isolated from different strains of *Bacillus cereus*. *Microbiology* 143: 3329-3339.
- McDonel JL (1986). Toxins of *Clostridium perfringens* types A, B, C, D and E. En: Dorner F., Drews H. (eds.) *Pharmacology of bacterial toxins*. Pergamon Press, Oxford. pp. 477-517.

- Mehta A, Singh S, Ganguly NK (1999). Effect of *Salmonella typhimurium* enterotoxin (S-LT) on lipid peroxidation and cell viability levels of isolated rat enterocytes. *Mol Cell Biochem* 196: 175-181.
- Menard LP, Dubreuil JD (2002). Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist. *Crit Rev Microbiol* 28: 43-60.
- Miller I, Gray D, Kay H (1998). Bacterial toxins found in foods. En: Watson D. H (ed.). *Natural toxicants in food*. CRC Press, Boca Raton, pp. 105-146.
- Nataro JP, Deng Y, Maneval DR *et al.* (1992). Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to Hep-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. *Infect Immun* 60: 2297-2304.
- Nataro JP, Kaper JB (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11: 142-201.
- Nataro JP, Maher KO, Mackie P *et al.* (1987). Characterization of plasmids encoding the adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 55: 2370-2377.
- O'Brien AD, Homes RK (1996). Protein toxins of *Escherichia coli* and *Salmonella*. En: Neidhardt F. C., Curtiss R., Ingraham *et al.* (eds.). *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, Vol. 2. ASM Press, Washington, D.C. pp. 2788-2802.
- O'Brien AD, LaVeck GD, Thompson MR (1982). Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 146: 763-769.
- Ochoa TJ, Cleary TG (2003). Epidemiology and spectrum of disease of *Escherichia coli* O157. *Curr Opin Infect Dis* 16: 259-263.
- Omoe K, Hu DL, Takahashi-Omoe H *et al.* (2003). Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. *Infect Immun* 71: 6088-6094.
- Peterson JW, Whipp SC (1995). Comparison of the mechanisms of action of cholerae toxin and the heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 63: 1452-1461.
- Petit L, Gibert M, Popoff MR (1999). *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype *Trends Microbiol* 7: 104-110.
- Pickett CL, Cottle DL, Pesci EC (1994). Cloning, sequencing, and expression of the *Escherichia coli* cytolethal distending toxin genes. *Infect Immun* 62: 1046-1051.
- Repetto M (1997). *Toxicología fundamental*. Díaz de Santos, Madrid.
- Sandvig K (2001). Shiga toxins. *Toxicon* 39: 1629-1635.
- Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C (2000). Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol Rev* 80: 717-766.
- Sears CL, Kaper JB (1996). Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol Rev* 60: 167-215.
- Shinagawa K, Konuma H, Sekita H *et al.* (1995). Emesis of rhesus monkeys induced by intragastric administration with Hep-2 vacuolation factor (cereulide) produced by *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett* 130: 87-90.
- Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Andalucía (2004) Informe Semanal Vol 9, N.º 1. Consejería de Salud, Junta de Andalucía.
- Sugiyama H (1980). *Clostridium botulinum* neurotoxin. *Microbiol Rev* 44: 419-448.
- Turton K, Chaddock JA, Acharya KR (2002). Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility. *Trends Biochem Sci* 27: 552-558.
- Tsang RS (2002). The relationship of *Campylobacter jejuni* infection and the development of Guillain-Barre syndrome. *Curr Opin Infect Dis* 15: 221-228.
- Verma M, Majumdar S, Ganguly NK (1994). Effect of *Escherichia coli* enterotoxins on macromolecular absorption. *Gut* 35: 1613-1616.

LA CALIDAD COMO PREVENCIÓN DE LAS INTOXICACIONES ALIMENTARIAS

Jordi Mañes, José Miguel Soriano

Introducción. Prácticas correctas de higiene. Prevención de riesgos. La revisión del concepto de calidad en los últimos años. Trazabilidad. Certificación y acreditación de la calidad. Bibliografía.

Introducción

Las intoxicaciones alimentarias tienen una repercusión importante sobre los costes económicos y sociales en cualquier país, además de un impacto sobre la salud pública. En Estados Unidos (EE UU), las enfermedades causadas por los patógenos alcanzan los 34 billones de dólares anuales en coste médico y pérdida de productividad (Buzby and Roberts, 1997).

Durante el año 2000, 2.1 millones de personas en todo el mundo fallecieron por enfermedades diarreicas, siendo los niños el grupo de población más afectado y un gran número de estos casos se atribuyeron a la contaminación del agua y los alimentos (OMS, 2002). En los EE UU se estima que cada año alrededor de 76 millones de casos son consecuencia de enfermedades de origen alimentario, resultando unas 325.000 personas hospitalizadas y 5.000 defun-

ciones (Mead *et al.*, 1999). En España, se registraron, durante el año 2002, un total de 13.826 casos de intoxicaciones alimentarias según la Agencia Española de Seguridad Alimentaria (AESAs, 2003), siendo las principales causas: las altas temperaturas, que favorecen el crecimiento de gérmenes, la disminución de las precauciones a la hora de cocinar los alimentos o el cambio de hábitos al variar el lugar de residencia durante las vacaciones.

Por todo ello, la calidad se presenta como una herramienta que favorece la seguridad alimentaria del consumidor, puesto que puede prevenir la aparición de intoxicaciones alimentarias. En la Tabla 15.1 se presenta el sistema de la calidad parcial o total aplicado en los servicios de restauración y en la industria agroalimentaria de diferentes países y los resultados obtenidos. La calidad, también denominada salubridad de los alimentos, está basada en dos pilares fundamentales: las prácticas correctas de higiene y la prevención de riesgos.

Tabla 15.1. Aplicación de la calidad en la industria agroalimentaria.

Sistema de calidad implantado	País	Lugar de trabajo	Reducción observada	Referencias
Inspección higiénico-sanitaria	EE UU	Servicios de restauración	Microbiana	Campbell <i>et al.</i> , 1998
Inspección higiénico-sanitaria y formación continuada	Canadá	Restaurantes	Microbiana	Mathias <i>et al.</i> , 1995
Inspección higiénico-sanitaria y análisis microbiológicos	EE UU	Servicios de restauración	Microbiana	Kassa <i>et al.</i> , 2001
Inspección higiénico-sanitaria y análisis microbiológicos	Italia	Cafeterías	Microbiana	Marchini <i>et al.</i> , 1997
Inspección higiénico-sanitaria y APPCC	España	Servicios de restauración	Química, microbiana	Soriano <i>et al.</i> 2002a,b,c
APPCC	Inglaterra	Catering y locales de venta al por menor	Microbiana	Little <i>et al.</i> , 2003
APPCC	Inglaterra	Industria alimentaria	Plaguicidas	Ropkins and Beck, 2002
Buenas prácticas agrícolas	Ecuador	Industria hortícola	Plaguicidas	Hurting <i>et al.</i> , 2003
Buenas prácticas agrícolas	EE UU	Industria alimentaria	Microbiana, micotoxinas, biotoxinas, radionúclidos,	Matyas, 1992
Buenas prácticas de manufactura	Holanda	Industria porcina	Química, Biológica	Bijker and Koolmees, 1988
APPCC	Corea del Sur	Servicio de restauración escolar	Microbiana	Youn and Sneed, 2003
Trazabilidad	Irlanda	Industria avícola	Microbiana, química	Fallon, 2001
Trazabilidad	Noruega	Piscifactorías	Microbiana, química	Hastein <i>et al.</i> , 2001
Trazabilidad	EE UU	Industria láctea	Residuos de antibióticos	Sischo, 1996

APPCC= Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control.

Prácticas correctas de higiene

La Organización Mundial de la Salud estableció un decálogo para la manipulación y preparación higiénica de los alimentos (OMS, 1989) que se encuentra resumido en la Tabla 15.2.

Las prácticas correctas de higiene se refieren a las condiciones mínimas necesarias que deben aplicar y cumplirse en el lugar de trabajo para asegurar la producción de un alimento sano, seguro y de alta calidad. Estas prácticas son las bases para los programas de seguridad y calidad alimentaria (Forsythe, 2002) y son enfocadas a tres áreas principales:

- Personal.
- Edificios e infraestructura.
- Equipos y utensilios.

1. Personal

Todos los individuos que trabajen en las industrias agroalimentarias deben mantener una higiene personal adecuada. Las áreas de actuación en la higiene personal deben estar enfocadas en los siguientes puntos:

- *Manos, uñas, pelo, piel, oídos, nariz y boca.* Los manipuladores de alimentos son fuente de microorganismos implicados en las intoxicaciones alimentarias. El lavado de las manos es fundamental para prevenir las enfermedades de origen alimentario y debe realizarse antes y después de manipular alimentos, del uso del pañuelo, del baño y de la eliminación de residuos orgánicos de la empresa. El lavado de las manos debe realizarse con agua caliente y jabón hasta la formación de espuma, con una fricción media de 20 segundos, con un posterior enjuague y secado con papel toalla (nunca con trapos de cocina ni

Tabla 15.2. Decálogo de la Organización Mundial de la Salud para la preparación higiénica de los alimentos.

1. Lavar siempre las manos antes y después de manipular alimentos y usar el baño.
2. Informar inmediatamente a su superior de cualquier problema de piel, nariz, garganta o intestino.
3. Proteger los cortes y arañazos con protectores impermeables.
4. Indumentaria y aseo impecable y limpio.
5. No fumar ni toser ni estornudar en la zona de trabajo.
6. Limpiar mientras trabaja. Mantenga todo el equipo y las superficies limpias.
7. Manipular alimentos crudos y cocinados en zonas diferentes. Mantenga los alimentos cubiertos, ya sea refrigerados o calientes.
8. Tocar los alimentos lo menos posible.
9. Asegurarse de que la basura se dispone adecuadamente. Mantenga puesta la tapa y lávese las manos después de echarla.
10. Informar a su superior si no puede acatar estas reglas.

toallas). Además, debe usarse regularmente un cepillo para las uñas. En la Tabla 15.3 se expone la presencia de diferentes toxinas procedentes de *Staphylococcus aureus* aisladas de manipuladores portadores sanos. Actualmente se estima que este microorganismo se encuentra en la boca y nariz del 50% de las personas adultas.

• *Indumentaria de trabajo y de protección.* La indumentaria de trabajo debe ser impecable y limpia. El uso de coberturas para el cabello y la barba es obligatoria durante todo el proceso de elaboración de los alimentos, siendo habitualmente aceptadas las gorras, mallas y otros

cobertores de tela indispensables para mantener el pelo fuera del alimento y las manos lejos del pelo. Además, la empresa debe tener protectores como guantes y dedos impermeables, tanto para la manipulación como en situaciones de cortes y raspaduras, en cuyo caso se debe tener la precaución de limpiar bien la herida y cubrirla lo antes posible.

• *Cuidado de la salud.* Si el manipulador tiene heridas o lesiones en las manos, secreciones por nariz, oído y ojos, granos en la cara o manos, náuseas o vómitos, diarrea y/o fiebre, o si se sufre de cualquier enfermedad que pueda causar la contaminación de los alimentos, debe comunicarlo al responsable.

• *Fumar, toser, estornudar, masticar, presencia de joyas, perfumes y/o loción de afeitar.* Fumar o masticar chicles o cualquier otro elemento es un peligro porque el manipulador toca la boca y puede provocar la contaminación biológica de los alimentos, además las colillas y/o las cenizas pueden caer en el alimento y contaminarlo. Los anillos, pendientes, relojes y cualquier otro tipo de joyas son lugares de acúmulo de suciedad y pueden albergar microorganismos, por otra parte los elementos físicos son susceptibles de estar presentes en los alimentos. Los manipuladores tampoco deben llevar ni perfumes ni loción de afeitar, ya que los alimentos, especialmente grasos, retienen fácilmente olores causando su contaminación.

El empleo correcto de unas buenas prácticas de manipulación de alimentos es verificado con continuas inspecciones higiénico-sanitarias.

Tabla 15.3. Enterotoxinas producidas por *Staphylococcus aureus* aisladas de varios manipuladores.

Toxina	Fuente principal	País	Referencia
A, B, C, D, E	Nariz	Nigeria	Adesiyun <i>et al.</i> , 1986
A, B, C, D	Nariz	Kuwait	Al-Bustan <i>et al.</i> , 1996
A, B, C, D, E, A+B, B+C	Nariz	España	Francisco Polledo <i>et al.</i> , 1985
C	Nariz, garganta, uñas	Italia	Pacini <i>et al.</i> , 1995
B, C	Nariz, garganta, manos, uñas	Chile	Soto <i>et al.</i> , 1996
A, B, C	Manos	Kuwait	Udo <i>et al.</i> , 1999

Algunos autores (Campbell *et al.*, 1998; Cotterchio *et al.*, 1998; Mathias *et al.*, 1995) recomiendan inspecciones rutinarias al menos una vez al año y la formación continuada de los trabajadores sobre la manipulación de alimentos que permita garantizar la seguridad de los alimentos consumidos.

2. Edificios e infraestructuras

Los lugares de trabajo deben tener las dimensiones suficientes para realizar higiénicamente las actividades, junto con las medidas protectoras contra los agentes contaminantes de las materias primas y los productos elaborados. El lugar de trabajo debe contar con una ventilación adecuada, correcta iluminación, sea esta natural o artificial y que pueda limpiarse y desinfectarse con facilidad. Las superficies de las paredes, tabiques, techos y suelos deben ser de materiales impermeables y atóxicos, con un correcto dispositivo de evacuación que posea una pendiente suficiente para que los líquidos se dirijan hacia la boca de los desagües. Las ventanas deben ser fáciles de limpiar y construidas de manera que se evite la acumulación de la suciedad, poseyendo además una tela metálica fácilmente extraíble para evitar la entrada de los insectos. El lugar de trabajo debe contar con programas de limpieza y un sistema de lucha contra las plagas basado en las tres D (desinfección, desinsectación y desratización).

3. Equipos y utensilios

Los equipos y útiles de trabajo, tales como mesas de despiece, recipientes, cintas transportadoras, sierras y cuchillos destinados a entrar en contacto directo con las materias primas y los productos, deben estar fabricados con materiales resistentes a la corrosión y fáciles de limpiar y desinfectar. Las superficies de trabajo deben ser de un material que no transmita sustancias tóxicas, olores ni sabores y sea inabsorbente, resistente a la corrosión y capaz de aceptar las repetidas operaciones de limpieza y desinfección. Las superficies deben ser lisas y estar exentas de

hoyos, hendiduras o grietas, no siendo aconsejable la madera como superficie de trabajo porque es un material que no se puede limpiar ni desinfectar adecuadamente.

Prevención de riesgos

1. Peligro y riesgo

Hay dos conceptos importantes en el campo de la calidad; el peligro y el riesgo. Peligro se define como todo aquello que al estar presente en un alimento, bien de forma natural o añadido, puede afectar a la salud del consumidor, produciéndole lesiones, enfermedades o muerte. El riesgo se define como la probabilidad de aparición de un peligro. La herramienta fundamental en la prevención de riesgos es el llamado sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC).

2. Historia

A principios de los años 70, la NASA (*National Aeronautics and Space Administration*), en colaboración con la compañía Pillsbury y los laboratorios del ejército de los EE UU en Natick, desarrollaron un sistema preventivo para producir alimentos seguros para los astronautas (APHA, 1972). Dicho sistema fue bautizado con el nombre de Análisis de Fallos, Modos y Efectos, (*FMEA: Failure, Mode and Effect Analysis*) el cual, antes de establecer los mecanismos de control, observaba en cada etapa de un proceso de elaboración y/o producción del alimento aquellos posibles riesgos, las causas y los efectos probables sobre la salud del consumidor. Este sistema se basaba en controlar los posibles peligros microbiológicos que pudieran originar alguna intoxicación. El éxito inmediato de este sistema provocó que las industrias agroalimentarias lo aplicaran a sus empresas, rebautizándolo con el nombre de sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) (*HACCP: Hazard Analysis and Critical Control*

Point) y ampliando el concepto a la vigilancia no solo de los peligros biológicos, sino también químicos y físicos.

3. Fundamento

En el sistema APPCC se identifican los puntos donde aparecerán los peligros más importantes para la seguridad del alimento (biológicos, físicos o químicos) en las diferentes etapas del procesado (recepción de las materias primas, producción, distribución y uso por el consumidor final) con un objetivo claro: adoptar medidas precisas y evitar que se desencadenen los riesgos de presentación de los peligros. Esta metodología permite, a partir de los fallos, hacer un análisis de las causas que los han motivado y adoptar medidas que permitan reducir o eliminar los riesgos asociados a esos fallos. Asimismo, puede aplicarse a aquellos errores potenciales relativos a la calidad organoléptica del producto, su peso, volumen, vida útil o calidad comercial. El sistema de APPCC se encuentra respaldado por la norma internacional EN 45012 (European Standard, 1998) cuyo objeto es controlar los puntos críticos en el proceso de manipulación de alimentos para asegurar su inocuidad.

4. Metodología previa a la aplicación del sistema APPCC

Formación del equipo APPCC

Debe estar constituido por personas con experiencia y formación adecuada, integrando todas ellas un equipo multidisciplinar capaz de abarcar las tres áreas fundamentales: control de calidad, producción e ingeniería.

Descripción del producto

La descripción completa del producto debe incluir su composición, método de conservación, tratamientos de transformación y conservación, condiciones de envasado, embalado, almacenamiento y distribución, etiquetado y caducidad, criterios biológicos, químicos o físicos

oficiales que pueden aplicarse según la legislación vigente.

Descripción del consumidor

Debe reflejar si va destinado a poblaciones de riesgo; tal como ancianos, enfermos, niños de corta edad, etc.

Elaboración del diagrama de flujo

Se elabora un diagrama de flujo del proceso en el que se detallan todas las etapas del proceso, desde que llegan las materias primas al lugar de trabajo hasta el producto final. Una vez elaborado este diagrama de trabajo se identifican todos los peligros que pudieran surgir en cada punto y describen las medidas preventivas necesarias para su control. En la Figura 15.1 se observa un diagrama de flujo utilizado para la elaboración de tortilla de patatas en un servicio de restauración (Soriano *et al.*, 2002).

Verificación in situ del diagrama de flujo

El equipo multidisciplinar del APPCC debe comprobar en la propia industria el diagrama de flujo con todas las operaciones de procesado y el tiempo de fabricación. Si se observa alguna diferencia con el diagrama de flujo se procederá a su modificación.

5. Principios

Los principios del APPCC están aceptados internacionalmente por varios organismos como son la Comisión del Codex Alimentarius (1993) y por el National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF, 1998). Para llevar a cabo este trabajo se emplean siete principios:

Realizar un análisis de peligros

En primer lugar es importante evaluar la significación de cada peligro identificado, al objeto de establecer con posterioridad los mecanismos de control adecuados. Esta parte se conoce como

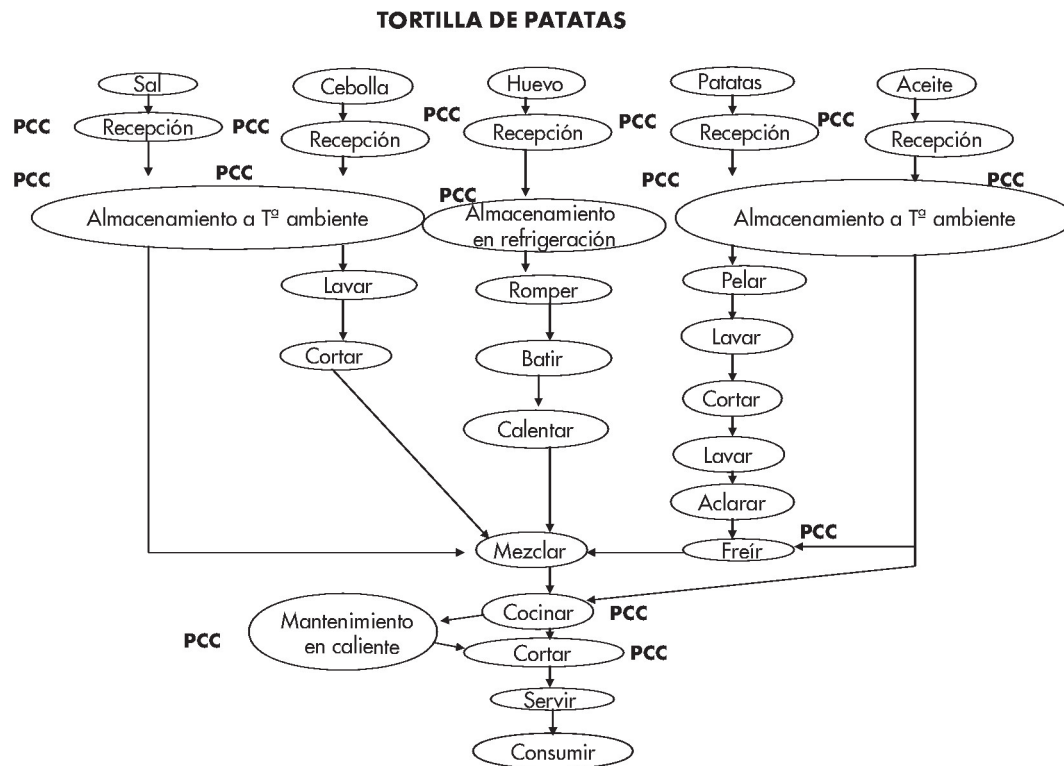


Figura 15.1. Diagrama de flujo de la tortilla de patatas.

evaluación de riesgos y se realiza en base a tres criterios que son definidos por orden de importancia (Berga Monge, 2000):

- Gravedad de riesgo: estado de gravedad que pueda originar sobre la salud del consumidor.
- Frecuencia de aparición: es la probabilidad de que una causa específica conlleve un modo de riesgo.
- Dificultad de detección: probabilidad de que una causa de riesgo no escape a los controles de vigilancia establecidos por la industria alimentaria.

Cada industria debe establecer un sistema de evaluación para cada uno de los criterios indicados, de acuerdo con los productos elaborados, su situación tecnológica y su experiencia. Para realizar la evaluación de riesgos se pueden establecer los criterios que se muestran en la Tabla 15.4,

que presentan varios grados de ponderación necesarios para establecer esta evaluación y permitir adoptar las medidas preventivas.

Identificar los puntos críticos de control

El Punto Crítico de Control (PCC) se define como una etapa, práctica, lugar, procedimiento o proceso en el que se puede aplicar una medida de control, sobre uno o más factores, con el fin de prevenir o eliminar un peligro o reducir la probabilidad de su aparición a un nivel aceptable. La identificación del PCC se puede realizar mediante el empleo del llamado *árbol de decisión* (Figura 15.2); para ello, el equipo multidisciplinar formulará y contestará, tanto para las materias primas como para cada una de las fases o etapas de la elaboración, una serie de preguntas en un orden determinado, para llegar a la conclusión de si ese punto debe ser considerado

Tabla 15.4. Criterios de ponderación de riesgos.

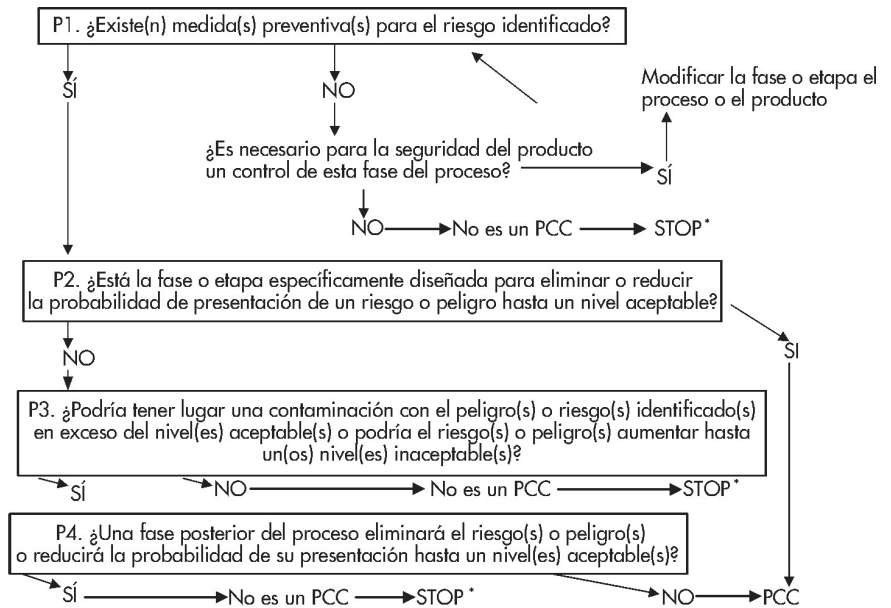
Concepto	Valor
Gravedad del peligro:	
<i>Escasa.</i> No influye en el consumidor. Pasa desapercibido.	1
<i>Baja.</i> Es de carácter leve.	2-3
<i>Moderada.</i> No provoca alteraciones de salud importantes.	4-5-6
<i>Alta.</i> Crea problemas de salud.	7-8
<i>Muy alta.</i> Importantes problemas de salud. Muerte.	9-10
Frecuencia de aparición:	
<i>Remota posibilidad</i> de que ese riesgo aparezca.	1
<i>Poca posibilidad</i> de que ese riesgo aparezca.	2-3
<i>Mediana posibilidad</i> de que ese riesgo aparezca.	4-5
<i>Alta probabilidad</i> de que ese riesgo aparezca.	6-7-8
<i>Muy alta probabilidad</i> de que ese riesgo aparezca.	9-10
Dificultad de detección:	
<i>Remota posibilidad</i> de no ser detectado.	1
<i>Poca posibilidad</i> de no ser detectado.	2-3
<i>Mediana posibilidad</i> de no ser detectado.	4-5
<i>Alta posibilidad</i> de que no ser detectado.	6-7-8
<i>Muy alta posibilidad</i> de no ser detectado.	9-10

como un punto de vigilancia. Posteriormente, los PCC seleccionados son transpuestos al diagrama de flujo tal y como se puede ver en la Figura 15.1.

Establecer los límites críticos en cada PCC

Los límites críticos matizan la diferencia en cada PCC entre productos seguros y peligrosos. El límite crítico debe ser un factor medible y que se pueda vigilar rutinariamente. El equipo multidisciplinar debe conocer los peligros y los mecanismos de control del proceso, además de poseer las fuentes de información donde consultar las posibles acciones correctoras, como pueden ser el uso de datos publicados en la literatura científica, consulta a expertos, datos experimentales y modelos matemáticos, entre otros. Los límites críticos se pueden dividir en límites químicos (por ejemplo; nivel máximo aceptable de micotoxinas o plaguicidas), físicos (por ejemplo, ausencia de material extraño) y biológicos (por ejemplo, límites microbiológicos).

Figura 15.2. Árbol de decisión.



*Continuar con el siguiente riesgo o peligro con el proceso descrito

Establecer los criterios en los controles de vigilancia en cada PCC

Se debe establecer un criterio de vigilancia, junto con la frecuencia y los responsables de cada medida, para mantener los PCC dentro de los límites críticos establecidos. Hay dos sistemas para llevar a cabo estos controles de vigilancia:

- Sistemas fuera de línea (*off-line*): se toman muestras al objeto de medir los límites críticos en otro lugar.
- Sistema en línea (*on-line*): donde los límites críticos son medidos durante el proceso, siendo realizado de manera continua (los datos se registran de forma continuada) o discontinuos (donde las observaciones se llevan a cabo a determinados intervalos de tiempo durante el proceso). El sistema en línea continuo es el más eficaz, ya que permite por un lado la calibración para detectar desviaciones en el proceso y por otro lado puede efectuar modificaciones para evitar que se pierda el control.

Además, es importante establecer la frecuencia de los controles en cada PCC. De acuerdo a los valores obtenidos en la Tabla 15.4 se extrapola a la Tabla 15.5 y se determina si dichos controles deben realizarse de manera continua, diaria o semanal.

Establecer acciones correctoras

Cuando los resultados obtenidos en la vigilancia muestren una desviación fuera de los límites críticos en un PCC, se deben establecer acciones correctoras actuando a dos niveles, mediante:

Tabla 15.5. Establecimiento de frecuencia de controles en función del nivel del riesgo.

Evaluación de la gravedad	Frecuencia de controles
Nota superior a 12	Continua
Nota entre 8 y 12	Diaria
Nota inferior a 8	Semanal

- *Acciones para prevenir desviaciones*: este procedimiento solo puede ser realizado cuando el proceso es un sistema en línea continuo y se desvía hacia el límite crítico y/o lo sobrepasa, ajustando el proceso automáticamente en la mayoría de los casos, y en menor ocasión cuando el proceso es manual. En la mayoría de las ocasiones se realizan ajustes para mantener el control, que afectan la relación temperatura/tiempo, pH, concentración de ingredientes, etc.

- *Acciones para corregir desviaciones*: este procedimiento requiere una actuación rápida, pudiéndose adoptar dos medidas:

- Ajuste del proceso para ponerlo bajo control.
- Toma de medidas con el material elaborado durante el tiempo que existió la desviación. Estas medidas básicamente pueden ser:
 - Destrucción del producto: si el riesgo de peligro es alto.
 - Reutilización: si se puede controlar el peligro mediante el proceso de reciclado, y siempre y cuando no se creen con ello nuevos peligros en el producto secundario.

Después de llevar a cabo una medida correctora y que el PCC esté de nuevo bajo control, es necesario iniciar una revisión del sistema para evitar que vuelva aparecer el fallo.

Establecer un sistema de registro de datos

El sistema debe permitir tener todos los datos registrados y documentados para poder comprobar si los productos elaborados han estado bajo control durante la etapa de producción, si ha existido alguna desviación del límite crítico y esta ha sido corregida de manera adecuada. Este registro de datos deben incluir los PCC, el peligro, el control de vigilancia, los límites críticos, la acción correctora y el responsable de vigilar el proceso. En la Tabla 15.6 se observa el sistema de registro de datos para la elaboración de la tortilla de patatas en el servicio de restauración y donde aparecen reflejados los datos correspondientes a los principios 3,4 y 5 (Soriano *et al.*, 2002b).

Tabla 15.6. Registro de datos del sistema APPCC para los PCC de la tortilla de patatas.

Etapa	Peligro	Control	Límite	Documentación	Acción (cuando el límite se excede)	Persona responsable
1. Recepción	Químico	Proveedores certificados con control de calidad	Límites legislados	Certificados de conformidad para cada lote	Devolución al proveedor	Encargado de recepción
2. Almacenamiento a T. ^o ambiente	Biológico, químico, físico	Conformidad con las especificaciones de las materias primas	Ausencia de material extraño	Revisión del encargado	Eliminar producto	Encargado de almacén
3. Almacenamiento en refrigeración	Biológico	Medir T. ^o	T. ^o del producto $\leq 3^{\circ}\text{C}$	Monitorización continua de la T. ^o	Eliminar el producto. Ajustar la T. ^o y evaluar el riesgo	Encargado de almacén
4. Fritura	Químico	T. ^o /tiempo	$\leq 180^{\circ}\text{C}$ No usar calentamiento intermitente	Revisar T. ^o y tiempo	Investigación de T. ^o /tiempo y evaluar el riesgo	Encargado de cocina
5. Cocinar	Biológico	T. ^o /tiempo	T. ^o $> 80^{\circ}\text{C}$ durante un tiempo de > 10 min.	Revisar T. ^o y tiempo	Ajustar la T. ^o y evaluar el riesgo	Encargado de cocina
6. Cortar	Biológico	Buenas prácticas de manipulación	Usar utensilios limpios. Buena higiene	Observar la manipulación	Modificar procedimientos	Encargado de cocina
7. Mantenimiento en caliente	Biológico	T. ^o /tiempo	T. ^o interna del producto $> 70^{\circ}\text{C}$. Tiempo de exposición < 4 h	Medir la T. ^o	Incrementar la T. ^o	Encargado de cocina

Verificación del sistema APPCC

El sistema APPCC no acaba con su diseño e implantación iniciales; los responsables de la empresa deben de revisar, como mínimo una vez al año, el sistema APPCC y comprobar si funciona de manera adecuada y cumple con los objetivos. Esto conlleva ratificar el diseño programado, o bien modificarlo si se comprueba que los criterios establecidos no funcionan de forma adecuada.

6. Aplicación del sistema APPCC

La aplicación del sistema APPCC permite realizar un autocontrol en los productos elaborados y garantizar la inocuidad alimentaria, tanto a nivel

biológico, químico y físico. A finales de 1999 se desarrolló un completo estudio sobre las ventajas de este sistema para reducir o minimizar los peligros biológicos y químicos en los servicios de restauración (Soriano *et al.*, 2002a, b, c). Por un lado se enfocó a reducir los peligros químicos de los aceites de frituras servidos en estos establecimientos. Los aceites de fritura son reutilizados frecuentemente en los servicios de restauración y su calentamiento origina reacciones termolíticas y oxidativas que dan lugar a la formación de compuestos volátiles y no volátiles. Algunos de estos compuestos son tóxicos potenciales que provocan inhibición enzimática, irritación gastrointestinal y/o mutagénesis. La legislación española establece que los aceites y grasas calentadas no

deben exceder el 25% en compuestos polares (Anónimo, 1989). En este estudio (Soriano *et al.*, 2002b) se detectó la presencia de estos compuestos en 57,9% de las muestras analizadas, sin embargo la aplicación de unas prácticas correctas de higiene y del sistema APPCC demostró una reducción de los compuestos polares en todos los aceites de fritura de los servicios de restauración por debajo del límite máximo establecido por la legislación española (Tabla 15.7).

Además, la aplicación del sistema APPCC en estos establecimientos permitió reducir la presencia de cepas estafilocócicas enterotoxigénicas y sus toxinas en las comidas servidas (Soriano *et al.*, 2002c) y otros microorganismos causantes de toxiinfecciones (Soriano *et al.*, 2002a). De 504 muestras, un 3,8% contenía cepas estafilo-

cócicas enterotoxigénicas, detectándose la presencia de las toxinas A, B, C y D en un 52,6% de las cepas aisladas. Durante siete años, periódicas inspecciones higiénico sanitarias, análisis microbiológicos y toxicológicos y la aplicación del APPCC dieron como resultado que en ninguna de las muestras se aislaron ni cepas enterotoxigénicas ni toxinas estafilocócicas.

La revisión del concepto de calidad en los últimos años

La calidad como prevención de las intoxicaciones alimentarias ha sido un objetivo marcado por los gobiernos para salvaguardar la salud del consumidor, sin embargo las últimas décadas del siglo anterior trajeron una serie de acontecimientos a nivel alimentario que provocaron miles de muertes (EUFIC, 2004). Basta recordar la problemática del aceite de colza desnaturalizado en nuestro país (Gelpi *et al.*, 2002) y la contaminación radioactiva de los alimentos tras el accidente de Chernobil en la década de los 80 (Zamostian *et al.*, 2002). Durante los 90, varios problemas, como la crisis belga por la contaminación de pollos con dioxinas (Van Larebeke *et al.*, 2002), la intoxicación por fungicidas en la fábrica de Coca Cola (Nemery *et al.*, 2002), la peste porcina española (Vandeputte and Chappuis, 1999) y la encefalopatía espongiiforme bovina y su variante en humanos (Smith, 2003), provocaron la alarma entre la población y pusieron en jaque a los gobiernos de los países afectados. Varios comités sobre seguridad alimentaria revisaron los conceptos de calidad para descubrir los posibles errores inherentes en su aplicación y, tras exhaustivos análisis, plantearon que la problemática no estaba ni en la higiene alimentaria ni en el sistema APPCC, sino en establecer un concepto aún más amplio al que se le denominó «trazabilidad o control de calidad total» (*Total Quality Management*), y que está comenzando a implantarse en ciertas industrias agroalimentarias (Fallon, 2001; Hastein *et al.*, 2001; Moe, 1998).

Tabla 15.7. Efecto de la implantación del sistema APPCC sobre los valores de los compuestos polares (%) de varios aceites de fritura en restaurantes.

Establecimiento	Antes del APPCC	Después del APPCC ^a
1	38,3 ± 3,1	21,3 ± 1,5*
2	26,7 ± 1,5	21,0 ± 1,7*
3	14,3 ± 1,5	15,7 ± 1,5
4	31,7 ± 3,1	17,7 ± 1,5*
5	26,7 ± 1,1	23,0 ± 1,0*
6	19,7 ± 1,5	17,7 ± 1,1
7	17,0 ± 1,7	18,0 ± 2,0
8	28,0 ± 2,0	23,0 ± 2,0*
9	33,3 ± 1,5	21,7 ± 1,5*
10	17,7 ± 1,5	15,7 ± 1,5
11	27,7 ± 3,1	21,3 ± 1,5
12	23,7 ± 1,5	15,0 ± 2,0*
13	36,0 ± 2,0	11,7 ± 0,6*
14	21,7 ± 2,1	11,0 ± 1,0*
15	27,7 ± 1,1	15,0 ± 2,0*
16	33,3 ± 0,6	20,0 ± 2,0*
17	29,3 ± 2,5	19,7 ± 2,5*
18	21,3 ± 1,1	17,3 ± 2,5
19	18,0 ± 1,0	11,7 ± 1,5*

^a Valores medios ± desviación estandar, n = 3.

* Diferencia significativa entre los datos antes y después de la implantación del sistema APPCC (p < 0,05, Test de Student).

Trazabilidad

La trazabilidad o rastreabilidad puede definirse como la posibilidad de encontrar y seguir el rastro, a través de todas las etapas de la producción, transformación y distribución, de un alimento, un pienso, un animal destinado a la producción de alimentos o sustancias destinadas a ser incorporadas en los alimentos o piensos o con probabilidad de serlo (Barendsz, 1998; Golowski, 1993; EUFIC, 2004). En noviembre de 2002, se creaba la Agencia Española de Seguridad Alimentaria, como organismo autónomo, adscrito al Ministerio de Sanidad y Consumo, que tenía como uno de los objetivos principales implantar este concepto integral de calidad total bajo el lema: «de la granja/del campo a la mesa», de acuerdo al Artículo 18 del Reglamento 178/2002 de la Unión Europea por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria y se fijan los procedimientos relativos a la seguridad alimentaria, promovido por la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (*European Food Safety Agency, EFSA*). Además, este concepto tiene su apoyo en las normas internacionales ISO 22000 (ISO, 2004) e ISO 15161 (ISO, 2001) que proporcionan una guía sobre sistemas de gestión en la cadena alimentaria. Estas nuevas normas internacionales se complementan, dado que la primera muestra cómo el sistema APPCC se puede integrar en un sistema de gestión de la calidad, mientras que la segunda permite a los elaboradores de alimentos diseñar por sí mismos el sistema de inocuidad de los alimentos. El alcance de la ISO 15161 es mucho más amplio que el de la ISO 22000.

Básicamente, la trazabilidad está formada por tres elementos (Soriano *et al.*, 2003):

1. *Buenas prácticas agrícolas (EurepGap)*: es una herramienta que identifica los principios esenciales de higiene para productos frutícolas frescos en la producción primaria desde el campo hasta la cosecha, reduciendo la contaminación del cultivo que pueda poner en riesgo la

inocuidad del producto en etapas posteriores de la cadena alimentaria.

2. *Buenas prácticas de manufactura*: es una herramienta para la obtención de productos seguros para el consumo humano, que se centran en la higiene y forma de manipulación durante el empaquetamiento, almacenamiento, transporte y su industrialización en caso de así requerirlo.

3. *Sistema de APPCC*. La trazabilidad se está implantando en todos los sectores alimentarios, destacando su introducción en los servicios de restauración (Plichta, 1994), las industrias cárnicas (Fallon, 2001), la piscifactorías (Hastein *et al.*, 2001) y en la fabricación de diversos productos alimenticios (Moe, 1998). Sischo (1996) aplicó la trazabilidad para mejorar la calidad de la leche de vaca, obteniendo una reducción considerable de residuos de antibióticos en todas las muestras analizadas.

Certificación y acreditación de la calidad

Para garantizar la calidad en las industrias agroalimentarias, no basta aplicar la metodología sobre trazabilidad e higiene de los alimentos, sino que la empresa debe conseguir certificarse y acreditarse por organismos competentes. Estos procedimientos garantizan no solo la confianza del consumidor sino que salvaguardan la integridad de la empresa con las directrices legislativas marcadas por las Administraciones Autonómicas y del Estado.

1. Certificación de la calidad

Un organismo competente, independiente e imparcial, verifica que el producto elaborado guarda conformidad con determinadas normas o especificaciones (ISO 9001:2000, EQA-EFQM, TQM). La certificación proporciona a la empresa mejoras de procedimiento, seguridad, económicas y de confianza debido a que mejora su credibilidad técnica, ayudando a la comercia-

lización de sus productos y disminuyendo el número de auditorías por parte de los clientes. Los pasos a seguir por la empresa para la certificación consisten en (MAPA, 2000):

1. Implantación previa del sistema de gestión de calidad (APPCC y/o trazabilidad).
2. Si el sistema funciona correctamente y se ha asegurado su funcionamiento, la empresa recoge información preliminar de los organismos de certificación acreditados por ENAC (Entidad Nacional de Acreditación) para poder certificar la actividad que la empresa está desarrollando y escoge un organismo certificador.
3. La empresa solicitará al organismo seleccionado un cuestionario de evaluación previa que permitirá suministrar información sobre la misma empresa y su actividad. De esta manera la entidad certificadora elaborará un presupuesto y planificará un borrador del proceso realizado con sus productos.
4. La empresa cumplimentará y entregará en un plazo determinado un modelo de solicitud formal, un listado de los documentos requeridos, y el manual de calidad con sus procedimientos.
5. El organismo certificador realizará un estudio de la documentación y un análisis previo para verificar si la empresa cumple las exigencias de la certificación.
6. El organismo certificador nombrará un equipo auditor y planificará todas sus actividades.
7. Se ejecutará la auditoría.
8. Si se observa alguna desviación en los procesos y en el manual de calidad se notificará a la empresa y esta lo corregirá en un plazo determinado.
9. Tras examinar el expediente con las correcciones se elevará la propuesta de concesión/denegación de la certificación a la empresa.
10. Si se concede el certificado, este puede ser utilizado por la empresa, siendo la vigencia de este certificado de tres años

durante los cuales se realizará una auditoría del sistema con carácter anual.

2. Acreditación de la calidad

El organismo certificador es una entidad privada que precisa poseer la acreditación para ejercer su actividad. La acreditación es una declaración formal que otorga un organismo autorizado acerca de la competencia técnica de otra entidad para la realización de una tarea determinada. Este procedimiento permite generar confianza y verificar la competencia técnica, independencia e integridad de las empresas. Los organismos autorizados para otorgar la acreditación son entidades privadas sin ánimo de lucro, constituidas con la finalidad de acreditar en el ámbito estatal a las empresas certificadoras que trabajan en el ámbito de la calidad, así como los organismos de control. En España el único organismo autorizado para acreditar es la ENAC en virtud al R.D. 2200/1995 (Anónimo, 1996; ENAC, 2004). Los pasos a seguir para la acreditación consisten en (MAPA, 2000):

1. La entidad certificadora solicita a ENAC la acreditación sobre uno o varios aspectos concretos, ya que no se puede obtener una acreditación general que permita actuar en todos los sectores.
2. ENAC envía un cuestionario para su cumplimentación y además se solicita la documentación de la entidad solicitante.
3. Cuando la entidad certificadora ha completado toda la información, la devuelve a la ENAC, y esta la revisa para comprobar si es completa, si no fuera así se devolverá para su subsanación y posterior entrega.
4. Cuando toda la documentación es corregida, la ENAC designa un equipo auditor formado por un jefe y un grupo de expertos técnicos y realiza una evaluación en el organismo certificador para comprobar si el solicitante cumple los criterios de acreditación correspondientes.
5. Este equipo detalla los puntos de no conformidad respecto a la acreditación y lo notifica a la empresa solicitante.

6. El organismo certificador que solicita la acreditación realiza las acciones correctoras en un plazo determinado y entrega el informe de evaluación y las acciones correctoras propuestas para que el comité de acreditación decida una denegación o concesión. Si fuera la primera opción, el organismo tiene un nuevo plazo para subsanar los posibles errores. Por otro lado, si se concede, la ENAC otorgará la acreditación para las actividades evaluadas, siendo inscrito en un registro público de empresas acreditadas y se le otorga un certificado de acreditación que posee las siguientes características:

- Se le asigna un código de acreditación.
- Tiene una vigencia de 4 años.
- Se especifica la norma de aplicación correspondiente (por ejemplo, la EN 45012).
- Posee un anexo técnico especificando el objeto de acreditación.

Bibliografía

- Adesiyun AA, Raji I, Yobe V (1986). Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* from anterior nares of dining hall workers. *J Food Protect* 49: 955-957.
- Agencia Española de Seguridad Alimentaria (AESA) (2003). Memoria de actividades del 2002 de la AESA. Disponible en: <http://www.aesa.msc.es/aesa/web/AESA.jsp>
- Al-Bustan MA, Udo EE, Chung TD (1996). Nasal carriage of enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* among restaurant workers in Kuwait city. *Epidemiol Infection* 116: 319-322.
- Anónimo (1989). Orden de 26 de enero de 1989 por la que se aprueba la Norma de Calidad para los Aceites y Grasas Calentados. B.O.E. 31/01/89.
- Anónimo (1996). Real Decreto 2200/95, de 28 de diciembre, por el que se aprueba el reglamento de la infraestructura para la calidad y la seguridad industrial. BOE: 6/02/1996.
- American Public Health Association (APHA) (1972). *Proceedings of the 1971 National Conference on Food Protection*. Washington. DC: US Government Printing Office.
- Berga Monge AM (2000). Evaluación y gestión de riesgos en seguridad alimentaria. *Alimentación, Equipos y Tecnología* 29: 119-124.
- Barendsz AW (1998). Food safety and total quality management. *Food Control* 9: 163-170.
- Bijker PG, Koolmees PA (1988). Hygienic aspects of pig's head meat. 1. Obtaining and processing pigs' heads. *Tijdschr Diergeneeskd* 113:475-483.
- Buzby JC, Roberts T (1997). Economic costs and trade impacts of microbial foodborne illness. *World Health Statistics* 50: 57-66.
- Campbell ME, Gardner CE, Dwyer JJ, Isaacs SM, Krueger PD, Ying JY (1998). Effectiveness of public health interventions in food safety: a systematic review. *Canad J Public Health* 89: 197-202.
- Codex Alimentarius Commission (1993). Codex Guidelines for the Application of the Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) System (1993) 20 Sesión de la Reunión FAO-OMS.
- Cotterchio M, Gun J, Coffill T, Tormey P, Barry MA (1998). Effect of a manager training program on sanitary conditions in restaurants. *Public Health Reports* 113: 353-358.
- ENAC (Entidad Nacional de Acreditación) (2004). La Acreditación. Disponible en: <http://www.enac.es/html/home.html>.
- EUFIC (European Food Information Council) (2004). Food Safety. Disponible en: <http://www.eufic.org/gb/home/home.htm>.
- European Standard (1998). EN 45012 General Requirements for Bodies Operating Assessment and Certification/Registration of Quality Systems (ISO/IEC Guide 62). European Committee for Standardization (CEN)
- Fallon M (2001). Traceability of poultry and poultry products. *Rev Sci Tech* 20:538-546.
- Forsythe SJ (2002). *Higiene de los alimentos, microbiología y HACCP*. Ed. Acribia. Zaragoza.
- Francisco JJ, García ML, Moreno B, Menes I (1985). Importance of food handlers as a source of enterotoxigenic staphylococci. *Zentralblatt fur Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene (B)* 181: 364-373.
- Gelpi E, de la Paz MP, Terracini B, Abaitua I, de la Camara AG, Kilbourne EM, et al. (2002). The Spanish toxic oil syndrome 20 years after its onset: a multidisciplinary review of scientific knowledge. *Environ Health Perspect* 110:457-464.

- Golowski WA (1993). Total quality management and the food industry: why is it important. *Food Technol* 47: 74-79.
- Hastein T, Hill BJ, Berthe F, Lightner DV (2001). Traceability of aquatic animals *Rev Sci Tech* 20:564-583
- Hurtig AK, San Sebastián M, Soto A, Shingre A, Zambrano D, Guerrero W (2003). Pesticide use among farmers in the Amazon basin of Ecuador. *Arch Environ Health* 58:223-228.
- International Organization for Standardization (2004). ISO 22000. Food managements systems. Requirements.
- International Organization for Standardization (2001). ISO 15161. Guidelines on the application of ISO 9001:2000 for the food and drink industry.
- Kassa H, Harrington B, Bisesi M, Khunder S (2001). Comparisons of microbiological evaluations of selected kitchen areas with visual inspections for preventing potential risk of foodborne outbreaks in food service operations. *J Food Prot* 64: 509-513.
- Little CL, Lock D, Barnes J, Mitchell RT (2003). Microbiological quality of food in relation to hazard analysis systems and food hygiene training in UK catering and retail premises. *Commun Dis Public Health*. 6:250-258.
- Marchini R, Vanini GC, Laurenti P (1997). Microbiological quality and inspection results in mass-catering. *Igiene Moderna* 108: 411-426.
- Mathias RG, Sizto R, Hazlewood A, Cocksedge W (1995). The effects of inspection frequency and food handler education on restaurant inspection violations. *Canad J Public Health* 86: 46-50.
- Matyas Z (1992). Epidemiologic aspects of a new approach to monitoring hygienic food handling using the hazard analysis critical control points (HACCP) system. *Cesk Epidemiol Mikrobiol Immunol* 41:291-306.
- Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C *et al.* (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 5:607-625.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) (2000). *Gestión de la calidad en la industria agroalimentaria*. Madrid.
- Moe T (1998). Perspectives on traceability in food manufacture. *Trends Food Sci Tech* 9:211-214
- National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (1998) Hazard analysis and critical control point system. *J Food Prot* 61: 1246-1259.
- Nemery B, Fischler B, Boogaerts M, Lison D, Willems J (2002). The Coca-Cola incident in Belgium, June 1999. *Food Chem Toxicol* 40: 1657-1667.
- Organización Mundial de la Salud (2002). Food safety and foodborne illness. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>
- Organización Mundial de la Salud (OMS) (1989) *Safe food handling. A training guide for managers of food service establishments*. OMS. Ginebra.
- Pacini R, Tofacchi G, Senese GF, Pisani B (1995). Microbiological monitoring of environments for public foodservice 1st: the kitchen. *Industria Aliment.* 34: 604-612.
- Plichta JC (1994). Total quality management in the quick service restaurant industry. *Food Technol* 48: 152-162.
- Ropkins K, Beck AJ (2002). Application of Hazard Analysis Critical Control Points (HACCP) to organic chemical contaminants in food. *Crit Rev Food Sci Nutr* 42:123-149.
- Sischo WM (1996). Quality milk and tests for antibiotic residues. *J Dairy Sci* 79: 1065-1073.
- Smith PG (2003). The epidemics of bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease: current status and future prospects. *Bull World Health Organ* 81:123-130.
- Soriano JM, Ricó H, Moltó JC, Mañes J (2002a). Effect of introduction of HACCP on the microbiological quality of some restaurant meals. *Food Control* 13: 253-261.
- Soriano JM, Moltó JC, Mañes J (2002b). Hazard analysis and critical control points in deep-fat frying. *Eur J Lipid Sci Technol* 104: 174-177.
- Soriano JM, Font G, Rico H, Moltó JC, Mañes J (2002c). Incidence of enterotoxigenic staphylococci and their toxins in foods. *J Food Prot* 65: 857-860.
- Soriano JM, Moltó JC, Mañes J (2003). Food safety practices in vegetables. En: Dris R, Niskanen R, Jain SM (eds.). *Crop management and postharvest hand of horticultural products. Volumen II: Fruits and vegetables*. Plymouth. Science Publishers. 87-104.
- Soto A, Saldias ME, Oviedo P, Fernandez M (1996). Prevalence of *Staphylococcus aureus* among food handlers from metropolitan university in Chile. *Rev Médica de Chile* 124: 1142-1146.

- Udo EE, Al-Bustan MA, Jacob LE, Chung TD (1999). Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci in restaurant workers from Kuwait city may be a potencial cause of food poisoning. *J Med Microbiol* 48: 819-823.
- Unión Europea (2002). Reglamento (CE) n.º 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria [Diario Oficial L 31 de 1.2.2002]. y modificación posterior por el: Reglamento (CE) n.º 1642/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de julio de 2003 [Diario Oficial L 245 de 29.9.2003].
- Van Larebeke N, Covaci A, Schepens P, Hens L (2002). Food contamination with polychlorinated biphenyls and dioxins in Belgium. Effects on the body burden. *J Epidemiol Community Health*. 56:828-830.
- Vandeputte J, Chappuis G (1999). Classical swine fever: the European experience and a guide for infected areas. *Rev Sci Tech* 18:638-647.
- Youn S, Sneed J (2003). Implementation of HACCP and prerequisite programs in school foodservice. *J Am Diet Assoc* 103:55-60.
- Zamostian P, Moysich KB, Mahoney MC, McCarthy P, Bondar A, Noschenko AG, *et al.* (2002). Influence of various factors on individual radiation exposure from the Chernobyl disaster. *Environ Health* 29:4-8.

M.^a Rosa Martínez-Larrañaga, Arturo Anadón

Introducción. Micotoxinas en los alimentos. Aflatoxinas. Ocratoxinas. Tricotecenos. Zearalenona. Fumonisinias. Moniliformina. Alcaloides del cornezuelo de centeno. Patulina. Esterigmatocistina. Prevención y métodos de control de las micotoxinas. Bibliografía.

Introducción

El término de micotoxinas se refiere a una variedad de compuestos altamente tóxicos que son el resultado de un metabolismo secundario de origen fúngico y que son producidos en diferentes sustratos bajo ciertas condiciones climatológicas. En general, los hongos son organismos eucarióticos ubicuos, carentes de clorofila y de sistema vascular. Estos hongos pueden ser saprofitos, cumpliendo un papel fundamental en la naturaleza, que es el de reciclar los nutrientes procedentes de la descomposición de las materias que hay en el suelo, en la vegetación y en el agua, o parasitan las plantas y los animales. La mayoría de las micotoxinas conocidas, hasta ahora, han sido identificadas como metabolitos secundarios de los *Fungi imperfecti*, entre los que cabe destacar particularmente los del género *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps*, *Alternaria*, *Neotyphodium*, *Stachybotrys*,

Myrothecium, *Phoma* y *Diplodia* (Betina, 1989).

El término de metabolito secundario designa a aquellos compuestos que no son indispensables para el desarrollo o crecimiento de los hongos, en contraste con los metabolitos primarios, tales como aminoácidos, ácidos grasos, sacáridos, ácidos nucleícos y proteínas. Aunque generalmente no se acepta a la producción de micotoxinas como un hecho biológicamente beneficioso, las micotoxinas han sido propuestas como compuestos que proveen a los hongos de las siguientes funciones: (1) papel ecológico en la naturaleza, ya que compite con la bacteria por el sustrato, (2) papel regulador en el metabolismo, y (3) papel regulador en la diferenciación o al menos coincidente (Betina, 1989).

Ya que los hongos toxinogénicos son cosmopolitas, las micotoxinas son polulantes ambientales presentes virtualmente en todas las partes del mundo e inducen efectos tóxicos tras inhalación o ingestión. La historia de las intoxicaciones por micotoxinas (micotoxicosis) data de la Edad

Media, cuando fueron frecuentes las epidemias de alucinaciones, delirio, convulsiones y gangrena; en el año 1850 se identificaron a los alcaloides del cornezuelo de centeno (productos secundarios del hongo *Claviceps purpurea*) como agentes causales de enfermedad. Se volvió a tener interés por las micotoxinas cuando a principios del año 1960 en el Reino Unido se produjo la muerte de miles de pavos y patos (enfermedad X del pavo) por contaminación de harina de cacahuete contaminada por micotoxinas, en concreto por aflatoxinas. Hoy en día, se conocen más de 300 micotoxinas, químicamente diferentes, formadas por más de 350 especies de hongos, causantes de diversas enfermedades (micotoxicosis). Las micotoxicosis, en el hombre y en los animales están caracterizadas como enfermedades relacionadas con alimentos contaminados, no contagiosas, no infecciosas, pero sí transferibles, y están asociadas con especies fúngicas.

Teniendo en cuenta la concentración y el tiempo de exposición a una determinada micotoxina y considerando también factores individuales como edad, sexo, dieta o cualquier otra condición general, las micotoxicosis pueden inducir una de las siguientes formas de intoxicación: (1) *micotoxicosis agudas*: se producen cuando se consumen micotoxinas a concentraciones desde moderadas a altas, causando manifestaciones específicas, síndrome de enfermedad aguda incluso la muerte; (2) *micotoxicosis crónicas*: se producen por la ingesta de niveles de toxinas desde moderados a bajos, causando enfermedades crónicas específicas; y (3) *micotoxicosis indirectas*: producidas por la ingesta de muy bajas concentraciones de toxinas causando un aumento de la susceptibilidad a otras infecciones o enfermedades. Los factores que afectan la magnitud de la toxicidad por las micotoxinas para el hombre y los animales se resumirían en las especies fúngicas implicadas, los mecanismos o modos de acción, el metabolismo y los mecanismos de defensa del organismo vivo afectado.

El modo de acción tóxica de las micotoxinas está determinado por su estructura química; dado el amplio rango de estructuras químicas existen-

tes entre las micotoxinas, sus efectos bioquímicos a nivel celular, entre otros, incluyen: interacciones con membranas celulares, interferencia con el metabolismo energético, interacciones con el ADN o moléculas proteicas, inhibición de la replicación del ADN, inhibición de la transcripción, interferencia con el metabolismo de purinas e interacción con receptores hormonales.

Dependiendo del modo de acción celular, las micotoxinas pueden originar en los organismos una serie de efectos biológicos que pueden variar mucho entre las especies fúngicas implicadas productoras de estas micotoxinas. En general, en el hombre y en los animales, los efectos biológicos de la mayoría de las micotoxinas comprenden: hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, actividad inmunosupresora, teratogenicidad, mutagenicidad, carcinogenicidad, estrogenicidad y acción diabética.

En 1993, la Organización Mundial de la Salud y la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (WHO-IARC), evaluaron el potencial carcinógeno de diferentes micotoxinas incluyendo aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos, zearalenona y fumonisinas. En esta evaluación, las aflatoxinas se clasificaron como compuestos carcinógenos para el hombre (Grupo I) mientras que las ocratoxinas y las fumonisinas se clasificaron como posibles carcinógenos (Grupo 2B). Los tricotecenos y la zearalenona no se clasificaron como carcinógenos para el hombre (Grupo 3).

Micotoxinas en los alimentos

En general, los hongos pueden crecer y producir toxinas en un amplio rango de sustratos. Las especies fúngicas toxinogénicas que se encuentran más frecuentemente en los alimentos pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. El contenido en humedad, pH, temperatura y tiempo, son los factores ambientales más críticos que determinan la producción de micotoxinas en un sustrato, así como su subsiguiente prevalencia (Jiménez *et al.*, 1996).

La presencia del hongo toxigenico en un alimento nos está indicando el posible peligro potencial, pero el definitivo diagnóstico solo se puede realizar por la identificación de la toxina específica, ya que (1) la presencia del hongo no nos indica por sí mismo que haya evidencia de producción de toxinas, (2) una determinada toxina puede persistir en el sustrato aunque el hongo que la ha producido no persista mucho tiempo, (3) un determinado hongo pueden ser capaz de producir más de una toxina, y (4) una determinada toxina puede estar producida por hongos de diferentes géneros (Fink-Gremmels, 1999).

La presencia de micotoxinas, o al menos el peligro de una posible contaminación por micotoxinas, se ha evidenciado en los siguientes alimentos:

Productos agrícolas

Los productos agrícolas contaminados, particularmente cereales, nueces, judías y aceite de semillas, son la principal fuente de micotoxinas en la cadena alimentaria. El desarrollo de hongos y la producción de micotoxinas pueden producirse antes, durante y después de la cosecha. Muchas especies de hongos (particularmente *Fusarium*) son parásitos de plantas, que junto con una disminución de la producción de la cosecha, pueden producir micotoxinas en las plantas vivas. En el periodo de la recolección, los productos agrícolas en ciertas condiciones comunes de almacenamiento y transporte, pueden verse dañados e infectados fácilmente por esporas fúngicas toxigénicas (particularmente, *Aspergillus*, *Penicillium* spp.) adaptadas al crecimiento de la planta y producir micotoxinas.

Productos fermentados y alimentos madurados con levaduras

El crecimiento fúngico juega un papel importante en la apariencia, sabor y conservación de los alimentos fermentados, pero hongos toxigénicos y micotoxinas se han detectado en nume-

rosos productos alimenticios fermentados o madurados tradicionalmente con levaduras, tales como quesos, carnes y ciertos alimentos orientales (salsa de soja, misso, tempeh, etc.), hongos producidos con un tipo de flora no selectiva. A diferencia de estas prácticas tradicionales, la tecnología alimentaria moderna se presta al uso de cultivos *starter*, previamente ensayados, para evitar los posibles riesgos para la salud pública debidos a la producción de toxinas indeseables (Fink-Gremmels y Leistner, 1990). Además, hay que señalar que la fermentación fúngica es un proceso industrial ampliamente usado en la producción de antibióticos, biomasa fúngica, ácidos orgánicos, enzimas, vitaminas o compuestos saborizantes, lo que conlleva el lógico riesgo de una contaminación por micotoxinas en estos productos y subproductos (a menudo usados como ingredientes alimenticios) (Betina, 1989).

Alimentos de origen animal

Productos de origen animal, tales como carne, leche o huevos, pueden contener micotoxinas como resultado de que los animales sean alimentados con piensos contaminados con micotoxinas «*carry-over*».

Alimentos estropeados

El crecimiento de hongos y la producción de micotoxinas se originan también en productos terminados conservados o almacenados durante mucho tiempo o en condiciones inapropiadas.

Las micotoxinas exhiben una resistencia variable al procesamiento de los alimentos, tales como limpieza y molienda de cereales, hacedores de pan o pasta, tueste de nueces, producción de aceites vegetales, fermentación alcohólica, cocción y almacenaje de carne y procesado de la leche en la fabricación del queso, mantequilla o yogurt. En general, las micotoxinas son químicamente estables y resistentes, por lo que son capaces de persistir en los productos terminados.

Por último, señalaremos que la presencia de diferentes micotoxinas puede conducir a inte-

raciones con otros compuestos o nutrientes, que pueden ser sinérgicas o antagónicas.

A continuación describiremos las principales micotoxinas que se encuentran en los alimentos haciendo relación a los alimentos implicados, su estructura y propiedades químicas, y su toxicidad.

Aflatoxinas

Las aflatoxinas son el grupo de micotoxinas más estudiado, son producidas por diferentes especies del género *Aspergillus*. En el año 1959 ya se observó la presencia de aflatoxinas contaminando cacahuetses en un barco procedente de Brasil. Estos cacahuetses fueron responsables del brote de la enfermedad-X de los pavos en el Reino Unido, donde fallecieron 10.000 pavipollos por la ingestión de harina de cacahuetses contaminados. La enfermedad se denominó así debido a que su etiología en aquel momento era desconocida. El examen histológico de los pavipollos fallecidos mostró una necrosis aguda celular parenquimatosa hepática y periportal asociada con una proliferación del conducto biliar. Hoy en día se conoce que existen más de 20 derivados de aflatoxinas, aislados a partir de diferentes especies fúngicas.

Las aflatoxinas pueden formarse en productos alimenticios tales como cacahuetses, nueces, semillas de algodón, granos de cereales en general y también en higos. La aparición de alimentos contaminados con aflatoxinas ocurre tanto en países industrializados como en países en vía de desarrollo.

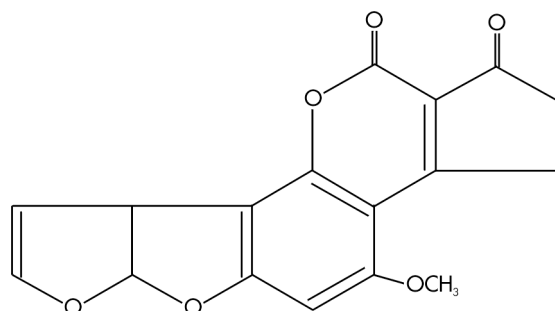
Estructura química

Las aflatoxinas son un grupo de micotoxinas producidas por diferentes especies del género *Aspergillus*, principalmente por el *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*; contienen en su molécula una mitad dihidrofurano o tetrahydrofurano unida a un anillo cumarina. Las aflatoxinas (AF) más importantes son AFB₁, AFB₂, AFG₁,

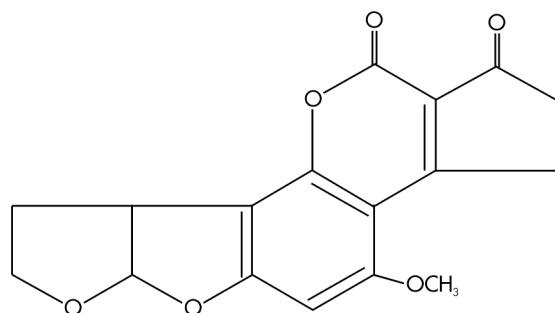
AFG₂, AFM₁, AFM₂. La AFB_{2a} y AFG_{2a} son productos de transformación de la AFB₁ y AFG₁ y son derivados menos tóxicos (Figuras 16.1, 16.2 y 16.3). El *A. flavus* produce AFB₁ y AFB₂, mientras que el *A. parasiticus* produce AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂. Estas aflatoxinas se dividen en dos grupos principales: grupo B (con un anillo ciclopentanona) y grupo G (con un anillo lactona, basado en sus propiedades fluorescentes azul o verde). Las AFM₁ y AFM₂ son metabolitos hidroxilados de la AFB₁ y AFB₂, que se encuentran en particular en la leche de consumo procedente de animales que han ingerido pienso contaminado.

Modo de acción

Entre las aflatoxinas estudiadas, la AFB₁ es la más importante, seguida por AFG₁ > AFB₂ > AFG₂. La AFB₁ es citotóxica y carcinógena, inhibe la síntesis de ADN y ARN (experimentos



Aflatoxina B₁



Aflatoxina B₂

Figura 16.1. Estructura química de la aflatoxina B (AFB₁ y AFB₂).

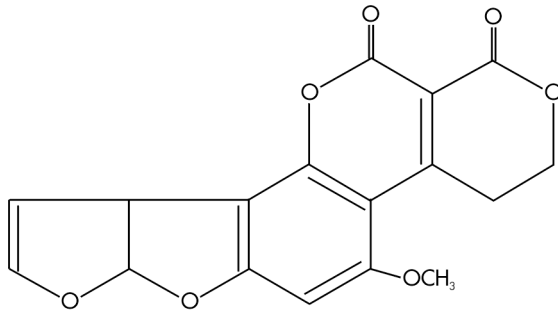
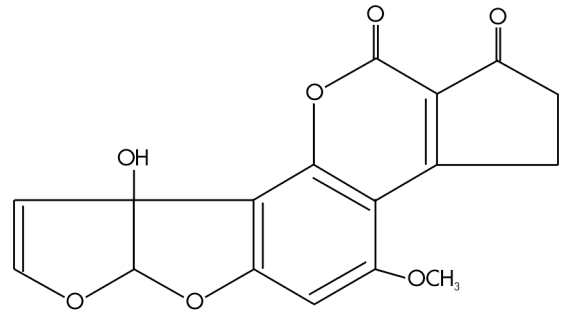
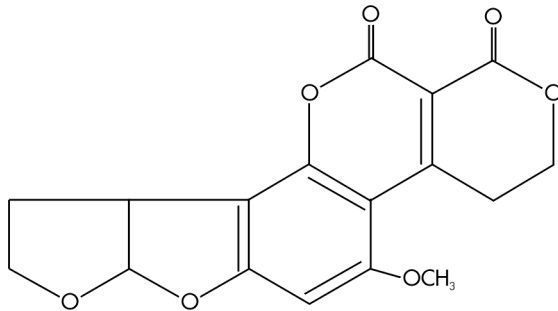
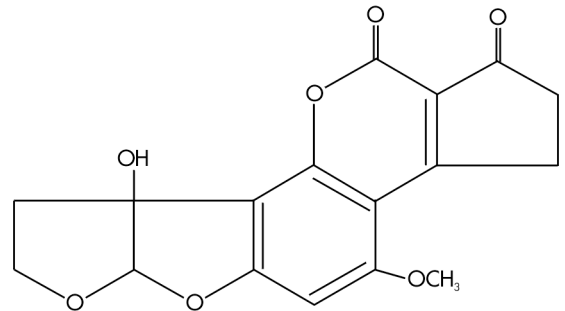
Aflatoxina G₁Aflatoxina M₁Aflatoxina G₂Aflatoxina M₂

Figura 16.2. Estructura química de la aflatoxina G (AFG₁ y AFG₂).

Figura 16.3. Estructura química de la aflatoxina M (AFM₁ y AFM₂).

realizados en ratas tratadas con 5 mg AFB₁/kg de pienso, durante 6 semanas demuestran estos efectos) (Willis *et al.*, 1980). La AFB₁ se bio-transforma al metabolito activo AFB₁-8,9-epóxido, el cual se une covalentemente con el N en posición 7 de la guanina, formando el aducto AFB₁-N⁷-guanina en las células diana, originando mutaciones, transversiones G → T, lesiones en el ADN y subsiguientemente formación de tumores (Eaton y Groopman, 1994). En el hombre, los carcinomas hepatocelulares observados han sido ligados a la transversión G → T en el codon 249 del gen supresor del tumor p-53 (Wang y Groopman, 1999). Este metabolito reactivo epóxido (AFB₁-8,9-epóxido) también puede hidrolizarse a AFB₁-8,9-dihidrodiol, el cual se ioniza para formar una base de Schiff con los grupos amino primarios en las proteínas (Raney *et al.*, 1992). El metabolito AFB₁-8,9-epóxido también se ha asociado en animales con coagu-

lopatía debida a una reducción de la síntesis de vitamina K y otros factores de coagulación. Con respecto a los efectos citotóxicos, la AFB₁ induce peroxidación lipídica, lo que conduce a un daño oxidativo en los hepatocitos (Shen *et al.*, 1995). AFB₁ inhibe la actividad de la fosfodiesterasa nucleótido cíclico, en tejidos tales como cerebro, hígado, corazón y riñón (Bonsi *et al.*, 1999).

Toxicidad

Las aflatoxinas son las micotoxinas más importantes y las toxinas más potentes. Son bien conocidas por su carcinogenicidad y citotoxicidad. En vista de su incidencia y toxicidad, las más importantes son AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂. Entre las aflatoxinas existen variaciones en la magnitud de la toxicidad. Por ejemplo, la AFB₁ es la más tóxica en la aflatoxicosis aguda y cró-

nica mientras que la AFM₁ es tan hepatotóxica aguda como la AFB₁ pero no es carcinogénica (Carnaghan *et al.*, 1963). Estos investigadores señalaron las diferentes potencias relativas de las aflatoxinas y determinaron en patitos valores de DL₅₀ de 0,36, 0,78, 1,70 y 3,44 mg/kg para las aflatoxinas AFB₁, AFG₁, AFB₂ y AFG₂, respectivamente. La magnitud de toxicidad de la AFG₂, AFB₂, y AFG₁ resultó ser de un 10, 20 y 50% de la AFB₁, respectivamente (Cole y Cox, 1981). A pesar de su toxicidad aguda y potencial carcinogénico, la AFM₁ está considerada como un producto de detoxificación (Neal *et al.*, 1998). La AFB₁ ejerce su toxicidad después de producirse una activación metabólica por las monooxigenasas tisulares, originándose el metabolito AFB₁-8,9-epóxido, el cual se une a macromoléculas tales como proteínas y ADN (formación de aductos) causando daño tisular. La AFB₁ es un potente hepatocarcinógeno en el hombre y en los animales (roedores, aves, peces y monos). El cáncer de hígado primario es uno de los cánceres humanos más prevalentes en países en desarrollo. Estudios epidemiológicos en humanos llevados a cabo en los años 70 del siglo XX demostraron estadísticamente que existía una asociación entre el consumo de alimento contaminado con aflatoxinas y la incidencia de carcinoma hepatocelular, detectándose una diferencia de sensibilidad entre la población de Asia y África y la de América del Norte. Recientemente se sugiere que en el cáncer hepático primario existen como condicionantes dos acciones combinadas: los alimentos contaminados con aflatoxinas, y las infecciones por el virus de la hepatitis B y C (Henry *et al.*, 2002).

La exposición aguda a aflatoxinas se ha asociado con epidemias de hepatitis tóxica aguda en áreas geográficas de China y África, con índices de mortalidad entre un 10 y un 60%. Estudios sobre intentos de suicidio por ingesta de aflatoxinas purificadas demostraron que dosis únicas no son tan tóxicas en el hombre como dosis crónicas (Willis *et al.*, 1980).

Los síntomas de toxicidad en una mujer joven con intento de suicidio con aflatoxinas utilizando cantidades de 5,5 mg durante más de 2

días y 35 mg durante más de 2 semanas (6 meses a partir de la dosis inicial) se caracterizaron por sarpullido macular no prurítico y transitorio, náuseas y dolor de cabeza. La mujer se recuperó completamente y no tuvo signos significativos de alteración hepática cuando se examinó 14 años después de este proceso (Willis *et al.*, 1980). Los resultados de este caso y otros en ciertos países sugieren que, para inducir efectos tóxicos agudos y letales, son necesarias dosis subagudas prolongadas en la dieta (Willis *et al.*, 1980; Peraica *et al.*, 1999).

El mayor riesgo de las aflatoxinas para el hombre es su exposición crónica en la dieta, que se relaciona con un gran número de enfermedades, principalmente patentes en países en vías de desarrollo, tales como el síndrome de Reye, cirrosis en niños (principalmente observada en la India), gastritis crónica y la enfermedad de Kwashiorkor o desnutrición proteica (originada por una ingesta inadecuada de proteínas; los primeros síntomas son fatiga, irritabilidad y letargo, seguido de crecimiento inadecuado, pérdida de masa muscular, inflamación generalizada e inmunodepresión) (Adhikari *et al.*, 1994; Sibanda *et al.*, 1997).

Aproximadamente 250.000 muertes anuales son causadas por carcinomas hepatocelulares en China y África subsahariana (Groopman *et al.*, 1992) y son atribuidas a la ingesta diaria de aflatoxinas (1,4 mg) y a una alta incidencia de hepatitis B (Wild *et al.*, 1992).

Debido a las actividades del comercio internacional, la amenaza de las aflatoxinas para el hombre no está solo limitada a los países en vías de desarrollo. En el ámbito de la alimentación animal, materias primas destinadas a la fabricación de piensos pueden estar contaminadas con aflatoxinas, y vía cadena alimentaria, pueden ser un peligro potencial para la salud pública; por ejemplo, la leche y productos lácteos pueden verse contaminados principalmente con AFM₁.

Para las aflatoxinas se aplica el principio de ALARA («as low as reasonable achievable») (WHO/IARC, 1993). La Unión Europea (2001) ha establecido un nivel máximo de

aflatoxinas de 4 mg/kg en productos agrícolas, y en particular para la AFB₁ un nivel máximo de 2 mg/kg. Para la AFM₁ se han propuesto en leche niveles máximos entre un rango de 0,05 y 0,5 mg/kg.

Ocratoxinas

Las ocratoxinas son metabolitos producidos por diferentes especies del género *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Entre las ocratoxinas, la más importante es la ocratoxina A (OTA) que es producida por *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium verrucosum* y *P. viridicatum*.

La contaminación por OTA ha sido observada en productos agrícolas tales como granos de cereales y granos de café verde, productos de carne fermentada y vinos. La producción de OTA en cereales se favorece bajo condiciones de humedad a temperaturas moderadas. En climas templados se ha demostrado a la OTA como un metabolito secundario de las especies *Penicillium* (Smith y Anderson, 1991). La OTA tiene alta incidencia incluso en regiones cuya temperatura es fría ya que *P. verrucosum* crece solo a temperaturas por debajo de 30 °C. La OTA se absorbe a través del tracto gastrointestinal, y pasan a la circulación sistémica, detectándose niveles en sangre y tejidos (las concentraciones más altas se alcanzan en riñón, seguido de hígado, músculo y grasa). La OTA puede afectar al hombre vía cadena alimentaria; un gran número de animales productores de alimentos, especialmente el cerdo se ven implicados por consumo de piensos contaminados. Debido a la alta capacidad para unirse fuertemente a las proteínas plasmáticas, la OTA tiene una semivida plasmática de eliminación larga, con valores en el cerdo de 72-120 horas y en el hombre de 840 horas. También se ha demostrado el paso de la OTA de sangre a leche; se ha detectado OTA en la leche de la mujer, pero apenas se detecta en la leche de vaca; en rumiantes, la OTA sufre degradación por la microflora del rumen (Creppy, 2002).

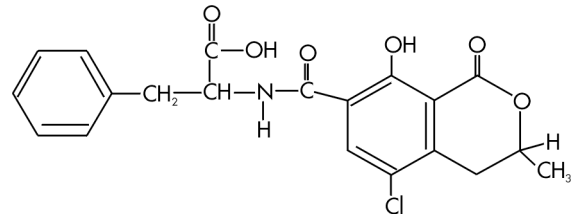


Figura 16.4. Estructura química de la ocratoxina A (OTA).

Estructura química

Las ocratoxinas son derivados 3,4-dihidro metil isocumarina unidos con un enlace amida a un grupo amino de la *L*-β-fenilalanina (estructura fenilalanina-cumarinas) (Figura 16.4).

Modo de acción

El mecanismo de toxicidad de las ocratoxinas se ha atribuido a la mitad lactona de su molécula, estructuralmente análoga a los lugares activos de las enzimas mitocondriales, por lo que es un sustrato que se une competitivamente (Xiao *et al.*, 1996). Estudios sobre el modo de acción de la OTA sobre la respiración celular en mitocondria hepática de rata señalan una inhibición competitiva de las enzimas ATPasa, succinato deshidrogenasa y citocromo C oxidasa, efectos atribuidos a una lesión celular por la formación del radical hidroxilo, vía peroxidación lipídica (Wei *et al.*, 1985). También se ha demostrado en estudios realizados en bazo de rata que la OTA altera la síntesis de proteínas por inhibición competitiva de la enzima fenilalanil-ARNt sintetasa, efecto ligado a la mitad fenilalanina de la molécula de la OTA (Cheeke, 1998). Estudios *in vitro* en células renales humanas y de perro demuestran un efecto inductor de la OTA sobre la caspasa y protein kinasa extracelular, lo que origina una apoptosis (Gekle *et al.*, 2000). Estudios *in vitro* en células uroteliales humanas expuestas a OTA (50-500 nmol/L) demuestran inducción de la síntesis de ADN con las subsiguientes lesiones y reparaciones (Dorrenhaus *et al.*, 2000).

Toxicidad

La bioactivación de la OTA se piensa juega un papel importante en la toxicidad de esta micotoxina, pero el mecanismo exacto no ha sido aún elucidado (WHO/IPCS, 2001).

La OTA es una potente nefrotoxina en aves, peces y mamíferos, origina daño tubular renal y fibrosis.

Existen datos que demuestran que la OTA es teratógena en el ratón, rata, hamster y pollos, y tiene propiedades genotóxicas e inmunosupresoras. La OTA es un carcinógeno potencial para el hombre y ha sido implicada como un agente causal de tumores epiteliales del tracto urinario superior y de una nefropatía progresiva conocida como «nefropatía endémica de los Balcanes» (Krogh, 1978), aparece en áreas de Yugoslavia, Rumanía y Bulgaria. Estudios epidemiológicos en humanos, llevados a cabo en Europa Occidental y Oriental, África del Norte, Canadá y Japón, indican alta incidencia de OTA en sangre, proporcionando evidencia de una exposición regular del hombre a esta toxina; sin embargo, no se han descrito casos de intoxicación aguda en el hombre.

En 1998, para la OTA, la Comisión Europea estableció, para el hombre, una ingesta diaria tolerable (TDI) de 0,005 mg/kg p.c./día; TDI estimado a partir del nivel sin efecto observable (NOEL) obtenido en estudios en animales.

Tricotecenos

Los tricotecenos son compuestos que contienen anillos sesquiterpénicos caracterizados por un núcleo 12,13-epoxi-tricoteceno. Constituyen un grupo de aproximadamente 170 sesquiterpenos, agrupados en 4 tipos, A, B, C y D en función de los grupos funcionales, tienen diferentes constituyentes en las posiciones 3, 4, 7, 8 y 15 de la molécula. Los tricotecenos se producen principalmente por varias especies de *Fusarium*, tales como *F. sporotrichioides*, *F. graminearum*

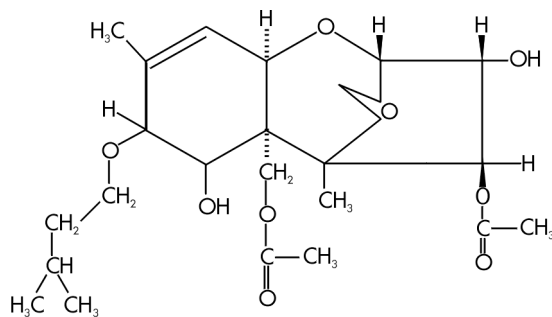


Figura 16.5. Estructura química de la toxina T-2.

(*Gibberella zeae*), *F. poae* y *F. culmorum* y por miembros de otros géneros tales como *Myrothecium*.

Las especies *Fusarium* ocurren principalmente en granos de cereales (maíz, trigo, arroz) en zonas climáticas con temperatura moderada; para su desarrollo necesitan una humedad relativamente alta y una temperatura moderada de 10 a 30 °C. En general, los tricotecenos de los tipos A y B se encuentran ampliamente distribuidos en granos de cereales (trigo, maíz, avena, cebada, centeno y arroz) mientras que los de los tipos C y D raramente se producen en los alimentos.

Estructura y propiedades químicas

Los tricotecenos del tipo A incluyen a la toxina T-2 (Figura 16.5) y su metabolito toxina HT-2, y al diacetoxi escirpenol (DAS) (Figura 16.6); los del tipo B incluyen al deoxinivalenol (DON),

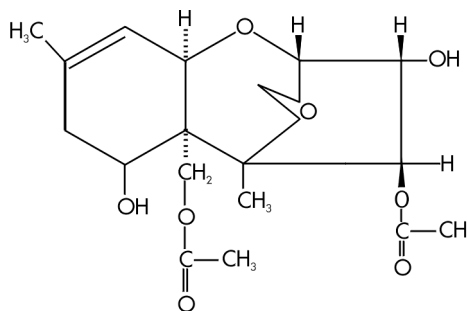


Figura 16.6. Estructura química del diacetoxiescirpenol (DAS).

conocido también como vomitoxina (Figura 16.7), nivalenol y ácido fusárico; y los tipos C y D que incluyen los tricotecenos macrocíclicos.

Las toxinas T-2 y DAS son las más tóxicas siendo solubles en disolventes no polares (como etil acetato de etilo y éter dietílico) mientras que el DON y su compuesto padre nivanelol son solubles en disolventes polares tales como etanol. El DON es un tricoteceno que se suele mostrar resistente a las condiciones de procesado que sufren los alimentos convencionales.

Modo de acción

La citotoxicidad de los tricotecenos se atribuye a su potente inhibición de la síntesis de proteínas, ARN, y ADN, efecto atribuido al 12,13-epoxitricoteceno. Los lugares de actividad en la molécula de los tricotecenos parecen ser la mitad 9-eno y los ésteres formados metabolitamente a partir de los grupos hidroxilo presentes en la molécula. Cuando la molécula del tricoteceno se une a los polisomas y ribosomas activos, el anclaje de los péptidos se altera y las secuencias de iniciación y terminación disminuyen y el ciclo ribosomal se interrumpe (Ueno, 1997). Otros efectos tóxicos de los tricotecenos incluyen alteración de la función y transporte de la membrana, supresión de la respuesta inmunitaria y alteración de la función sanguínea. Por ejemplo, los efectos negativos de la toxina T-2 sobre la función de la membrana celular se explican por alteración del transporte de aminoácidos, nucleótidos, y glucosa y alteración de la actividad del canal Ca-K (Bunner y Morris, 1988). Se ha demostrado que la toxina T-2 inhibe el transporte de electrones en la mitocondria

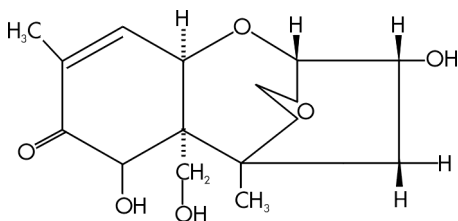


Figura 16.7. Estructura química del deoxinivalenol (DON).

como respuesta de una inhibición de la actividad de la enzima succinato dehidrogenasa. También se ha sugerido como modo de acción de los tricotecenos, en particular de la toxina T-2, la generación de radicales libres durante el metabolismo, vía peroxidación lipídica (Suneja *et al.*, 1989). En relación a la respuesta inmunitaria, existen datos que soportan una inhibición de la proliferación de linfocitos humanos por la toxina T-2, DON y DAS (Johannisson *et al.*, 1999). También, en otro estudio *in vitro* con macrófagos peritoneales murinos, DON y DAS inhiben la actividad fagocítica y microbicida y la producción del anión superóxido (Ayrál *et al.*, 1992). Existen diferentes publicaciones sobre las acciones de los tricotecenos sobre el sistema hemático. Por ejemplo, la toxina T-2 reduce las células formadoras de colonias de macrófagos-granulocitos en médula ósea de ratón; el DON inhibe los progenitores granulo-monocíticos; las toxinas T-2 y DAS inhiben los progenitores de eritroblastos humanos; la toxina T-2 induce apoptosis en tejidos linfoides y hematopoyéticos de ratón. Existen estudios en ratón que señalan al DON como un supresor de la resistencia del hospedador a la *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis* (Creppy, 2002).

Toxicidad

El brote de aleucia tóxica alimenticia (ATA) ocurrido en el hombre en Siberia durante el año 1913 y en el sur de los Urales en el año 1944, por *F. sporitrichoides* y *F. poae*, fueron supuestamente causados por la toxina T-2, la más tóxica de los tricotecenos que ocurren de forma natural (Parent-Massin y Thouvenot, 1995); la ATA se caracteriza por atrofia de la médula ósea, agranulocitosis, angina necrótica, sepsis y muerte. Los tricotecenos del tipo B, como el DON, son menos agresivos pero más estables y probablemente los más importantes en la práctica; los granos de cereales contaminados con DON a niveles entre 3 y 93 mg/kg han sido relacionados con micotoxicosis agudas en Japón, India y China, donde aparecen náuseas, vómitos, trastornos gastrointestinales, vértigos y dolor de

cabeza. Hay que señalar, además, que la exposición crónica a DON puede ser el factor causal de la nefropatía IgA humana (Hinoshita *et al.*, 1997) y ha sido también implicado como factor que contribuye a la etiología del cáncer esofágico en el hombre (Knasmuller *et al.*, 1997). Por último, el DON es una toxina de particular interés en el sector zootécnico, debido a que los cerdos alimentados con DON pueden conducir a pérdidas económicas debido al rechazo del alimento y al vómito (el DON, una vez absorbido, alcanza el área postrema donde activa los receptores dopaminérgicos, originando emesis, de ahí el nombre también de vomitoxina). El DON y ZEN producidos por *Fusarium* se han relacionado con la toxicosis postillosa de los granos en los EE UU, China, Japón y Australia (Sinha y Bhatnagar, 1998), toxicosis caracterizada por náuseas, vómitos y diarrea.

En general, los tricotecenos del tipo A (toxina T-2 y DAS) tienden a ser más tóxicos que los del tipo B, y se conocen como dermatoxinas. En definitiva, existen dos formas de toxicidad por tricotecenos: una forma aguda, caracterizada por signos neurológicos y una forma crónica, caracterizada por signos de necrosis dérmica, leucopenia e inflamación gastrointestinal, y hemorragias.

Los tricotecenos se han definido como neurotóxicos e inmunodepresores (Sugita-Konishi *et al.*, 2001). Tras la ingestión, son rápidamente absorbidos a partir del tracto gastrointestinal y son ampliamente destoxicados en el hígado, la principal biotransformación es una des-epoxidación parcial. De todos modos, los epóxidos que no sufren este metabolismo hepático pueden afectar a las funciones celulares básicas, tales como la síntesis de proteínas y de ADN, y por tanto afectan la replicación celular.

Por otra parte, los tricotecenos se han señalado como potenciales agentes biológicos de guerra. Por ejemplo, la toxina T-2 se ha visto implicada como agente químico de la «lluvia amarilla» usada contra la República de Laos (Paraica *et al.*, 1999). Los síntomas clínicos que preceden a la muerte incluyen vómitos, diarrea, hemorragia, respiración dificultosa, dolor peitoral, ampollas, dolor de cabeza, fatiga y vérti-

gos. Los hallazgos de la autopsia revelaron necrosis de la pared del estómago, del intestino delgado (parte superior), pulmones y riñones. Sin embargo, debe de señalarse que los componentes de la «lluvia amarilla» están aún sujetos a debate; la «lluvia amarilla» pudiera contener otras micotoxinas adicionales, además de la toxina T-2 (Seeley *et al.*, 1985).

Los efectos de la toxina T-2 y los de su metabolito toxina HT-2 no pueden ser diferenciados. La toxicidad de la toxina T-2 podría ser debida, al menos parcialmente, a la toxicidad de su metabolito toxina HT-2, por lo tanto la toxina HT-2 también ha sido incluida en la ingesta diaria tolerable máxima provisional (PMTDI). La PMTDI establecida para la toxina T-2 y para la toxina HT-2, solas o en combinación, es de 60 ng/kg p.c./día. Para el DON, la Comisión Europea (2002) ha establecido una TDI de 1 µg/kg p.c./día.

Zearalenona

La zearalenona (ZEN) es un compuesto fitoestrogénico, micotoxina principalmente originada por diversas especies de *Fusarium* tales como *F. culmorum*, *F. graminearum*, y *F. sporotrichioides*, responsable de los efectos estrogénicos comúnmente encontrados en los animales de granja (Marasas, 1991). Los metabolitos de la ZEN (α -zearalenol y β -zearalenol) son también estrogénicos.

Las condiciones que favorecen la producción de ZEN son similares a las que favorecen la producción de DON (es decir, una humedad relativamente alta y una temperatura moderada). ZEN se detecta ampliamente en granos de cereales, en particular maíz y trigo, así como en semilla de soja. ZEN ha sido detectada en tejidos de animales de consumo.

Estructura química

Tiene estructura de lactona resorcíclica, corresponde con el 6-(10-hidroxi-6-oxo-*trans*-1-unde-

cenil)- β -ácido resorcíclico μ -lactona (Figura 16.8). Está relacionada con el compuesto anabólico zearanol.

Modo de acción

La ZEN es conocida en animales por sus efectos estrogénicos. Se une a los receptores de estrógeno con efectos sobre la transcripción, estrógeno-dependiente, en el núcleo. La afinidad de unión relativa al receptor citoplásmico uterino de la rata para ZEN y derivados en orden decreciente es: α -zearalanol > α -zearalenol > β -zearalanol > ZEN > β -zearalenol (Kuiper-Goodman *et al.*, 1987) Se ha demostrado en tejidos mamarios de rata que la unión de ZEN al receptor origina una inhibición de la unión de hormonas estrogénicas. También hay datos en el hombre que demuestran que la ZEN estimula el crecimiento de células cancerosas en tejidos que contienen receptores estrogénicos (Withanage *et al.*, 2001).

Toxicidad

La ZEN en los alimentos es un poderoso estrógeno y está implicada en diferentes incidentes de cambios precoces que se producen en los niños durante el periodo de la pubertad (Price y Fenwick, 1985). La ZEN tiene propiedades estrogénicas y anabólicas. En animales de laboratorio y en animales domésticos, la ZEN origina alteraciones en el sistema reproductor. En comparación con los roedores, el cerdo (principalmente la hembra prepúber) es la especie de animal doméstico más sensible; tras la ingestión de piensos contaminados con ZEN, las cerdas presentan los siguientes síntomas: tumefacción

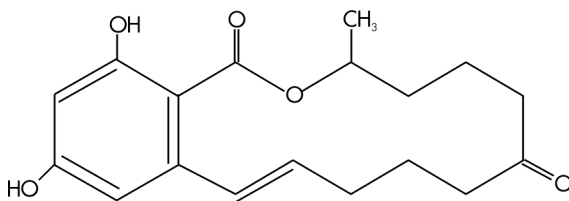


Figura 16.8. Estructura química de la zearalenona (ZEN).

de la vulva y decoloración, aumento del tamaño del útero y de las glándulas mamarias, así como prolapso rectal y en algunos casos prolapso uterino. Los cerdos machos prepúberes muestran un alargamiento del prepucio, y también una disminución de la libido y concentraciones plasmáticas bajas de testosterona con una disminución de la espermatogénesis.

Se han investigado las fases del metabolismo o biotransformación de la ZEN en varias especies animales y en el hombre. En el hombre, en la orina principalmente se observa la presencia de ZEN y de su metabolito α -zearalenol, ambos en forma de glucuro conjugados. En términos de toxicidad, la actividad estrogénica de α -zearalenol es alrededor de unas 10 veces mayor que la de la ZEN.

Para ZEN se ha establecido, por la Comisión Europea (2000), una ingesta diaria tolerable temporal (t-TDI) de 0,2 μ g/kg p.c./día.

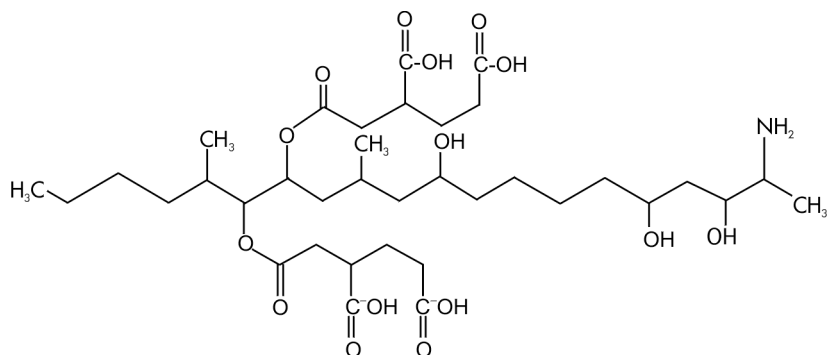
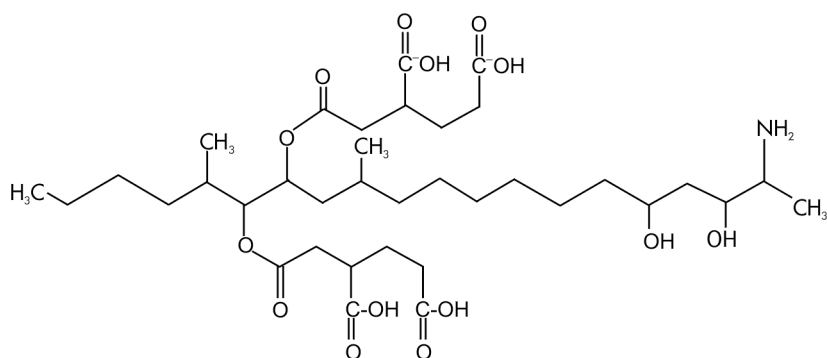
Fumonisinias

Las fumonisinas (principalmente las fumonisinas B₁ y B₂) son metabolitos secundarios sintetizados por *F. moniliforme*, *F. proliferatum* y *F. verticillioides*, entre otros *Fusarium*.

La presencia de fumonisinas se ha demostrado en maíz y otros cereales cultivados en clima tropical y subtropical, y también en alimentos destinados a los animales procedentes de estos lugares.

Estructura química

La fumonisina B₁ (FB₁) y fumonisina B₂ (FB₂) (Figura 16.9) poseen una unidad hidrocarburo de cadena larga, estructura parecida a la de los esfingolípidos, esfingosina y esfinganina, por lo que juega un papel en su toxicidad (Wang *et al.*, 1992). La estructura química de la FB₁ corresponde a un diéster del 2-amino, 12,16 dimetil, pentahidroxi-icosano, donde los grupos hidroxilo de los carbonos en posición 14 y 15 están esterificados con el ácido propano tricarbóxico.

Fumonisin B₁Fumonisin B₂Figura 16.9. Estructura química de la fumonisin B₁ y B₂.

Modo de acción

Las fumonisinas son citotóxicas y carcinogénicas. Los modos de tales acciones, sin embargo, no están completamente elucidados. Se ha demostrado que la micotoxina FB₁, una de las fumonisinas más tóxicas, altera el metabolismo de esfingolípidos por inhibición de la enzima esfingosina *N*-acetiltransferasa (ceramida sintetasa) (Wang *et al.*, 1991). También se ha demostrado que la FB₁ inhibe otras enzimas intracelulares tales como proteína fosfatasa y arginosuccinato sintetasa (Jenkins *et al.*, 2000). Por consiguiente, la FB₁ ejerce su acción citotóxica por inhibición del metabolismo de esfingolípidos, del metabolismo de proteínas y del ciclo de la urea. Con respecto a su acción carcinógena, se ha sugerido que la acumulación de bases de esfingoides, originada por FB₁, puede ser causa de una consecuente altera-

ción de la síntesis de ADN, así como una alteración de la señal celular del AMPc y de la proteína quinasa C, originando finalmente una disrupción del ciclo celular normal. El papel carcinógeno de la FB₁ también puede estar asociado a su efecto inductor de enzimas microsomales hepáticas, principalmente de las subfamilias P4501A y P4502E (Martínez-Larrañaga *et al.*, 1996). Por otra parte, existen datos que también sugieren que la FB₁ puede actuar como un proliferador de peroxisomas; la FB₁ induce la enzima peroxisomal palmitoil CoA oxidasa, la enzima trifuncional peroxisomal *trans*-2-enoil-CoA hidratasa, así como también induce enzimas microsomales hepáticas en particular de la subfamilia P4504A por lo que podría comportarse como un agente carcinógeno epigenético y ser la base de la hepatotoxicidad y hepatocarcinogenicidad de la FB₁, observadas principalmente en

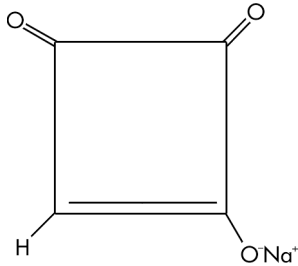


Figura 16.10. Estructura química de la moniliformina.

roedores (Martínez-Larrañaga *et al.*, 1996). En ratas, la FB₁ se absorbe a partir del tracto gastrointestinal, aunque la biodisponibilidad oral es baja, niveles de FB₁ significativos se detectan en plasma; la razón $AUC_{\text{tejido}}/AUC_{\text{plasma}}$ indica que la FB₁ presenta afinidad por distintos tejidos, principalmente hígado y riñón (Martínez-Larrañaga *et al.*, 1999).

Toxicidad

La FB₁ se ha demostrado que causa inmunosupresión, neurotoxicidad, hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, teratogenicidad y carcinogenicidad. La FB₁ ha sido implicada en animales domésticos con la leucoencefalomalacia equina y con el edema pulmonar del cerdo, origina hepatotoxicidad y nefrotoxicidad en roedores y cáncer esofágico en el hombre (cáncer esofágico endémico observado en Asia y África), por lo que es claro que la FB₁ presenta un amplio riesgo para la salud animal y salud pública. La FB₁ también se ha relacionado con un brote en la India de gastroenteritis por consumo de maíz y sorgo enmohecido, conteniendo hasta 64 mg FB₁/kg, con síntomas agudos, dolor abdominal y diarrea.

Se ha establecido por la Comisión Europea (2001) una TDI para las FB₁, FB₂ y FB₃ (solas o en combinación) de 2 µg/kg p.c./día.

Moniliformina

La moniliformina es una micotoxina producida por varias especies de *Fusarium*, principalmen-

te *F. proliferatum* y se encuentra comunmente en los granos de maíz. Puede ser transferida a la siguiente generación de cosechas y sobrevivir durante años en el suelo. Aunque FB₁ y moniliformina, ambas, son producidas por las mismas especies de hongos (*F. proliferatum*) no tienen semejanza estructural (Figuras 16.9 y 16.10). Ambas micotoxinas se han observado en diferentes estudios de la FDA que son ubicuas en el maíz en los EE UU (Price *et al.*, 1993).

Estructura química

La moniliformina, es una sal sódica o potásica del 1-hidroxi-ciclobuteno-3,4-diona) (Figura 16.10).

Modo de acción y toxicidad

La acción citotóxica de la moniliformina se ha atribuido a la inhibición de la enzima piruvato dehidrogenasa (Gathercole *et al.*, 1986). En tejido cardiaco de rata, la moniliformina inhibe enzimas tales como glutatión peroxidasa y glutatión reductasa por lo que se sugiere que puede verse comprometido el metabolismo de radicales libres (Chen *et al.*, 1990). Se ha demostrado que la moniliformina incrementa la permeabilidad cardiaca en ratas jóvenes y patitos, sugiriendo un mecanismo que induce la enfermedad de Keshan en el hombre (Zhang y Li, 1989).

Alcaloides del cornezuelo de centeno

Los alcaloides del cornezuelo de centeno se producen por el *Claviceps purpurea*, que crece en las espigas de los pastos y cereales. Los hongos forman el esclerocio (2 a 4 cm en general de los granos de cornezuelo de centeno), que son un estadio de hibernación. Durante el almacenamiento, el esclerocio puede terminar entre los granos de los cereales.

La formación de alcaloides se favorece especialmente en el centeno antes de almacenarse por

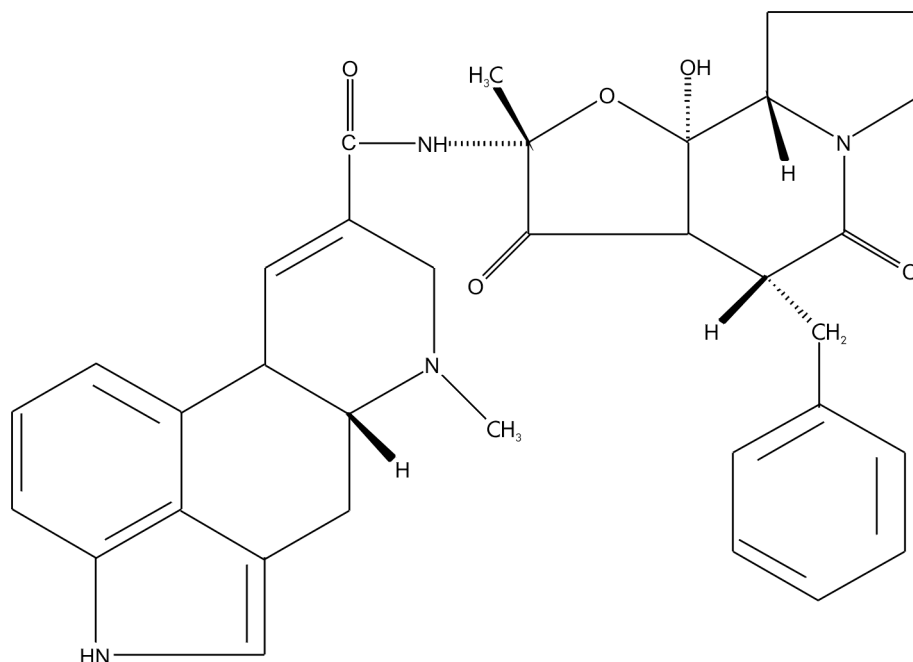


Figura 16.11. Estructura química de la Ergotamina.

una humedad del aire relativamente alta y temperaturas moderadas de 10 a 30 °C. El *Claviceps purpurea* es común en granos pre-almacenados. En consecuencia, se requiere un estricto control de la calidad del grano antes de su molienda.

Estructura química

Los alcaloides del cornezuelo de centeno están estructuralmente relacionados con los fármacos alucinógenos conocidos como el ácido lisérgico dietil amina. La Figura 16.11 ilustra la ergotamina como estructura básica de estos alcaloides. Los más importantes son ergonovina (ergometrina), ergotamina y ergocristina.

Modo de acción

Los alcaloides del cornezuelo de centeno son conocidos por sus efectos sobre receptores del sistema nervioso. El efecto principal de los alcaloides del cornezuelo de centeno es la estimulación de la fibra lisa. Los alcaloides del cornezuelo de centeno se unen a los receptores α -adrenérgicos y promueven la inhibición de los

receptores β -adrenérgicos, lo que origina una vasoconstricción. Los alcaloides del cornezuelo de centeno también se ha demostrado inhiben la secreción de prolactina en el hombre y en los animales; este efecto se atribuye a la estimulación de los receptores dopaminérgicos, los cuales regulan la prolactina. Los alcaloides del cornezuelo de centeno, estructuralmente similares a las aminas biógenas, se ha demostrado también actúan sobre los receptores de aminas biógenas, afectando la neurotransmisión (Cheeke, 1988).

Toxicidad

En el pasado, las intoxicaciones recurrentes causadas por alcaloides del cornezuelo de centeno (ergotismo) se produjeron por el consumo de pan de centeno infectado con *Claviceps purpurea*. Los alcaloides del cornezuelo de centeno producen dos tipos de ergotismo en el hombre y en los animales caracterizados por convulsiones y gangrena. Los síntomas de la forma gangrenosa incluyen intenso hormigueo y sensación de

calor y frío de las extremidades, seguido por gangrena y momificación de las extremidades; el ergotismo gangrenoso se debe a una intensa y larga vasoconstricción periférica (los alcaloides actúan como agonistas α -adrenérgicos sobre las fibras lisas). Los síntomas de la forma convulsiva incluyen alteración gastrointestinal con vómitos, dolor de cabeza, irritación, calambres musculares severos, espasmos, convulsiones y parálisis, y desórdenes psicológicos (Peraica *et al.*, 1999). Se ha informado que la ergonovina incrementa la motilidad uterina, lo que puede causar aborto.

Patulina

La patulina es una micotoxina que está principalmente producida por *Penicillium expansum*, *P. patulinum* y *Byssochlamys nivea*. La patulina aparece en vegetales y frutas (manzana). La patulina es un indicador de una mala práctica de fabricación (uso de materias primas enmohecidas) más que una seria amenaza para la salud humana y animal. Las temperaturas moderadas, el alto contenido de humedad y un pH relativamente bajo son factores que favorecen el crecimiento de estos hongos implicados en la formación de patulina.

Estructura química

La patulina es una γ -lactona cíclica, estable bajo las condiciones de procesado y conservación de los zumos de fruta.

Toxicidad

La patulina causa en animales experimentales hemorragias, formación de edema y dilatación del tracto gastrointestinal. En estudios subcrónicos, se ha observado como principales efectos, hiperemia del epitelio duodenal e insuficiencia renal.

Para la patulina, JECFA (1995) ha establecido una TDI de 0,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c./día.

Esterigmatocistina

La esterigmatocistina es una micotoxina producida por *Aspergillus versicolor* y *A. nidulans*.

La incidencia de esterigmatocistina en los alimentos es probablemente limitada. Sin embargo, la esterigmatocistina aparece ocasionalmente en granos de cereales y en la capa más externa de los quesos duros, cuando han sido colonizados por el hongo *A. versicolor*. La concentración de esterigmatocistina en la capa externa de los quesos contaminados decrece rápidamente desde fuera a dentro. Entre los factores que estimulan el crecimiento fúngico y la producción de la toxina en el queso son la lactosa, la materia grasa y algunos productos de hidrólisis de la materia grasa.

Estructura química

La esterigmatocistina está relacionada estructuralmente con las aflatoxinas (Figuras 16.1, 16.2 y 16.3) y es igualmente estable.

Toxicidad

La esterigmatocistina está considerada como una micotoxina con potencial carcinógeno. Los experimentos con animales, rata y ratón, han demostrado que causa tumores pulmonares y hepáticos. En comparación con las dosis que inducen tumores en las ratas, la esterigmatocistina parece ser un carcinógeno menos potente que la aflatoxina B₁.

Prevención de métodos de control de las micotoxinas

Se han propuesto diferentes alternativas para minimizar los efectos perjudiciales surgidos por la aparición de micotoxinas en los productos agrícolas contaminados por especies fúngicas, que se basan en: (1) prevenir la formación de micotoxinas en productos agrícolas, (2) descon-

taminar los alimentos destinados al hombre y los animales, eliminando o destruyendo las micotoxinas presentes, y (3) interviniendo en el desarrollo de la micotoxicosis, añadiendo sustancias a los productos alimenticios contaminados para reducir la biodisponibilidad oral de micotoxinas o para contrarrestar los efectos tóxicos esperados.

La inhibición fúngica en los productos alimenticios almacenados (semillas) puede conseguirse modificando ciertas condiciones medioambientales de humedad, temperatura, pH y atmósfera. El nivel de humedad puede reducirse antes de su almacenamiento por varios métodos de secado de las semillas (temperaturas altas y bajas de secado, y secado solar, entre otros); medidas eficaces en el almacenamiento de los granos son la fumigación, aireación y enfriamiento, almacenamiento cerrado y las atmósferas controladas, especialmente en países tropicales y subtropicales, donde el daño por los insectos es un problema principal. Los inhibidores fúngicos como ácidos orgánicos (tales como el ácido benzoico, ácido fórmico, ácido propiónico y ácido fumárico) pueden aplicarse también para descender el pH. La conservación de los productos agrícolas a bajas temperaturas, baja humedad, bajo pH y en atmósfera modificada puede contribuir a evitar una invasión fúngica (Betina, 1989).

A escala industrial, existen numerosas estrategias para descontaminar los productos agrícolas, como son los tratamientos físicos que incluyen inactivación térmica, microondas, irradiación con rayos gamma y rayos x, luz ultravioleta, tratamiento con una amplia variedad de sustancias químicas y, más recientemente, tratamiento con ozono generado eléctricamente y procesos de fermentación que han sido ensayados para destruir o inactivar las micotoxinas presentes en los productos agrícolas. Aunque algunos métodos químicos, tales como tratamientos con ion amonio, bisulfito sódico, e hidróxido cálcico, son efectivos para detoxicar la AFB₁, no cumplen con todos los requisitos necesarios, especialmente aquellos concernientes a la seguridad de los productos de reacción y aquellos que salvaguardan todas las características nutri-

cionales de los alimentos tratados. Hasta el momento, los resultados más prometedores se han obtenido con los procesos de fermentación en los que bacterias, levaduras o enzimas fúngicas facilitan la biodegradación y detoxificación de las micotoxinas a temperaturas moderadas (Karlovsy, 1999). La microflora del tracto digestivo de vertebrados e invertebrados se ha demostrado ejerce actividades de detoxificación de micotoxinas tales como AFB₁, OTA y tricotecenos. Se han aislado cultivos puros de microorganismos detoxicantes identificados e incluso algunos genes relevantes se han clonado y expresados en huéspedes heterólogos. No obstante, se necesitan mayores estudios para llegar a ser este hecho una aplicación práctica y económicamente viable.

Por último, en lo referente a intervención de las micotoxicosis se han llevado a cabo diversas estrategias alimenticias para reducir la biodisponibilidad oral de las micotoxinas, principalmente el tratamiento con «adsorbentes de micotoxinas» (arcillas como bentonita, sepiolita y aluminosilicato y otros materiales inertes), o bien el tratamiento con ciertas sustancias para contrarrestar los efectos esperados de las micotoxinas presentes en los alimentos contaminados.

Aunque el control de la contaminación de micotoxinas en los alimentos es lo más común en los países desarrollados, este control no es económicamente factible en muchas partes del mundo. Por ello, la implantación de otras estrategias puede ser una opción aconsejable para reducir el impacto sobre la salud pública derivado de la exposición de micotoxinas, particularmente del cáncer. Las intervenciones que conducen a una «protección química» o «quimioprotección» en la población en general puede ser una medida útil, ya que este tipo de protección está siendo cada vez más aceptada para la prevención del cáncer (Eaton and Gropman, 1994). Muchos datos nos indican que la quimioprotección es extremadamente efectiva en casos de exposición a aflatoxinas en animales de laboratorio. Sustancias químicas como oltipraz o clorofilina son capaces de prevenir la formación

del epóxido AFB₁ y también capaces de inducir enzimas glutatión *S*-transferasas en hepatocitos, como principales vías de detoxificación. Ambos compuestos, oltipraz y clorofilina, han sido implicados en estrategias de quimioprotección en áreas geográficas con carcinoma hepatocelular endémico. Diversos estudios apuntan hacia la capacidad de protección química frente a las micotoxicosis de diversos constituyentes naturales presentes en el café, té, pimienta, uvas, fresas, ajo, cebolla, y extractos de plantas medicinales. En este aspecto, es propio que se realicen ensayos clínicos controlados al objeto de establecer una seguridad en el uso de estos quimioprotectores para la población en general.

También es del todo importante señalar el interés actual en el desarrollo de nuevas sustancias «adsorbentes» de las micotoxinas presentes en los alimentos, como otra estrategia en la prevención de micotoxicosis en el hombre. Una gran cantidad de productos agrícolas con altas concentraciones de micotoxinas son descartados para consumo, pero si se dispusieran de buenos productos adsorbentes de micotoxinas podrían utilizarse en los piensos. Si se forma un complejo «compuesto adsorbente-micotoxina» estable, la absorción de micotoxinas en el tracto gastrointestinal podría reducirse significativamente. Esta es una de las prácticas más recientes y comunes que se usa para reducir las micototoxicosis en los animales de granja y como consecuencia reducir el *carry-over* o la transferencia de las micotoxinas desde los piensos contaminados a los productos alimenticios (carne, leche) derivados de los animales de abasto. Existen datos satisfactorios de la adsorción de aflatoxinas por diferentes sustancias que incluyen arcillas minerales, carbón activo, y resinas sintéticas, entre otras. La adsorción de otras micotoxinas, como ZEN, DON, OTA o FB₁, sin embargo, ha sido menos estudiada. Ciertamente, deben realizarse futuras investigaciones para reducir la biodisponibilidad de micotoxinas a partir del tracto gastrointestinal, bien por adsorción de las micotoxinas, o bien por una degradación enzimática de las micotoxinas. Para este último objetivo se vienen desarrollando estudios

adicionando a los piensos microorganismos vivos destoxicantes o sus enzimas aisladas, si bien en estos estudios no solo debe demostrarse la eficacia del producto sino también detectar cualquier efecto adverso, por ejemplo pérdida de nutrientes.

También sustancias quimioprotectoras pueden ser adicionadas a los piensos para controlar las micotoxicosis. Se ha demostrado la capacidad quimioprotectora de diferentes sustancias naturales (fructosa, vitaminas, provitaminas, carotenoides, clorofila y sus derivados, compuestos fenólicos y selenio) y de diferentes sustancias de síntesis (antioxidantes tales como butil hidroxianisol, butil hidroxitolueno y etoxiquina, piperina, ciproheptadina, sulfuros de alilo, aspartamo) reduciendo la toxicidad de micotoxinas, o bien reduciendo la formación de la toxina y/o mejorando su detoxificación. El aspartamo, un edulcorante que no origina efectos adversos en el hombre y en los animales, se ha propuesto como un agente protector frente a los efectos tóxicos de la OTA (Creppy, 2002).

Bibliografía

- Adhikari M, Ramjee G, Berjak, P (1994). Aflatoxin, kwashiorkor and morbidity. *Natural Toxins* 2(1): 1-3.
- Ayral AM, Dubech N, Le Bars J, Escoula L (1992). *In vitro* effect of diacetoxycirpenol and deoxynivalenol on microbicidal activity of murine peritoneal macrophages. *Mycopathologia* 120: 121-127.
- Betina V (1989). *Mycotoxins: Chemical, biological and environmental aspects. Bioactive molecules*. Vol. 9, Elsevier, Amsterdam.
- Bonsi P, Agusti-Tocco G, Palmery M, Giorgi M (1999). Aflatoxin B₁ is an inhibitor of cyclic nucleotide phosphodiesterase activity. *General Pharmacol* 32: 615-619.
- Bunner DL, Morris ER (1988). Alteration of multiple cell membrane functions in L-6 myoblasts by T-2 toxin: an important mechanism of action. *Toxicol Applied Pharmacol* 92: 113-121.

- Carnaghan RBA, Hartley RD, O'Kelly J (1963). Toxicity and fluorescence properties of the aflatoxins. *Nature* (London) 200: 1101-1102.
- Cheeke PR (1998). *Natural toxicants in feeds, forages, and poisonous plants*. Interstate Publishers, Inc, Daniville, IL.
- Chen LY, Tian XL, Yang B (1990). A study on the inhibition of rat myocardium glutathione peroxidase and glutathione reductase by moniliformin. *Mycopathologia* 110: 119-124.
- Cole RJ, Cox RH (1981). *Handbook of toxic and fungal metabolites*. Academic Press, New York.
- Creppy EE (2002). Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol Letters* 127: 19-28.
- Dorrenhaus A, Fliieger A, Golka K, Schulze H, Albrecht M, Degen GH *et al.* (2000). Induction of unscheduled DNA synthesis in primary human urothelial cells by the mycotoxin ochratoxin A. *Toxicol Sciences* 53: 271-277.
- Eaton DL, Groopman JD (1994). *The toxicology of aflatoxins: Human health veterinary, and agricultura significance*. Academic Press, San Diego, CA.
- Fink-Gremmels J (1999). Mycotoxins: their implications for human and animal health. *Veter Quaterly* 21(4): 115-120.
- Fink-Gremmels J, Leistner L (1990). Toxicological evaluation of moulds. *Food Biotechnol* 4(1): 579-584.
- Gatthercole PS, Thiel PG, Hofmeyr JH (1986). Inhibition of pyruvato dehydrogenase complex by moniliformin. *Biochem J* 233: 719-723.
- Gekle M, Schwerdt G, Freudinger R, Mildenerger S, Wilflingseder D, Pollack V *et al.* (2000). Ochratoxin A induces JNK activation and apoptosis in MDCK cells at nanomolar concentrations. *J Pharmacol Exp Ther* 293: 837-844.
- Groopman JD, Zhu JQ, Donahue PR, Pikul A, Zhang LS, Chen JS *et al.* (1992). Molecular dosimetry of urinary aflatoxin-DNA adducts in people living in Guangxi region, People's Republic of China. *Cancer Res* 52: 45-52.
- Henry SH, Bosh FX, Bowers JC (2002). Aflatoxin, hepatitis and worldwide liver cancer risks. *Adv Exp Med Biol* 504: 229-233.
- Hinoshita F, Suzuki Y, Yokoyama K, Hara S, Yamada A, Ogura Y, Hashimoto H, Tomura S, Marumo F, Ueno Y (1997). Experimental IgA nephropathy induced by a low-dose environmental mycotoxin, nivalenol. *Nephron* 75 (4), 469-478.
- JECFA (1995). Evaluation of certain food additives. *WHO Technical Report Series* (No. 859).
- Jenkins GR, Tolleson WH, Newkirk DK, Roberts DW, Rowland KL, Saheki T *et al.* (2000). Identification of fumonisin B₁ as an inhibitor of argininosuccinate synthetase using fumonisin affinity chromatography and in vitro kinetic studies. *J Biochem Mol Toxicol* 14: 320-328.
- Jiménez M, Manez M, Hernández E (1996). Influence of water activity and temperature on the production of zearalenone in corn by three *Fusarium* species. *Int J Food Microbiology* 29(2/3): 417-421.
- Johannisson A, Bjokhag B, Hansson W, Gadhasson IL, Thuvander A (1999). Effects of four trichothecene mycotoxins on activation marker expression and cell proliferation of human lymphocytes in culture. *Cell Biol Toxicol* 15: 203-215.
- Karlovsky P (1999). Biological detoxification of fungal toxins and its use in plant breeding, feed and food production. *Natural Toxins* 7: 1-13.
- Knasmuller S, Bresgen N, Kassie F, Mersch-Sundermann V, Gelderblom W *et al.* (1997). Genotoxic effects of three *Fusarium* mycotoxins, fumonisin B₁, moniliformin and vomitoxin in bacteria and in primary cultures of rat hepatocytes. *Mutation Res* 391(1-2), 39-48.
- Krogh P (1978). Causal association of mycotoxic nephropathy. *Acta Pathol Microbiol Scand* 269: 1S-28S.
- Kuiper-Goodman T, Scott PM, Watanabe H (1987). Risk assessment of the mycotoxin zearaleone. *Regulatory Toxicol Pharmacol* 7: 253-306.
- Martínez-Larrañaga MR, Anadón M, Díaz MJ, Fernandez R, Sevil B, Fernandez-Cruz ML, *et al.* (1996). Induction of cytochrome P4501A1 and P4504A1 activities and peroxisomal proliferation by Fumonisin B₁. *Toxicol and Applied Pharmacol* 141(1): 185-194.
- Martínez-Larrañaga MR, Anadón A, Díaz MJ, Fernández-Cruz ML, Martínez MA, Frejo MT, *et al.* (1999). Toxicokinetics and oral bioavailability of fumonisin B₁. *Veteri Human Toxicol* 41(6): 357-362.
- Parent-Massin D, Thouvenot D (1995). *In vitro* toxicity of trichothecenes on rat haematipoyectic progenitors. *Food Add Contam* 12 (1): 41-49.
- Peraica M, Radic B, Lucic A, Paulovic (1999). Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bull World Health Org* 77: 754-763.

- Price KR, Fenwick GR (1985). Naturally occurring oestrogens in foods – a review. *Food Add Contam* 2:73-106.
- Price WD, Randall RA, McChesney DG (1993). Naturally occurring toxins in feedstuffs: Center for Veterinary Medicine perspective. *J Animal Sci* 71: 2556-2562.
- Raney KD, Meyer DJ, Ketterer B, Harris TM (1992). Glutathione conjugation of aflatoxin B-1 exo- and endo-epoxides by rat and human glutathione-S-transferases. *Chem Res Toxicol* 5: 470-478.
- Shen HM, Ong CN, Shi CY (1995). Involvement of reactive oxygen species in aflatoxin B₁-induced cell injury in cultured rat hepatocytes. *Toxicol* 99: 115-123.
- Seeley TD, Nowicke JW, Meselson M, Guillemin J, Akatanakul P (1985). *Yellow rain*. *Sci Am* 253: 128-137.
- Sibanda L, Marovatsanga LT, Pestka JJ (1997). Review of mycotoxin work in sub-Saharan Africa. *Food Control* 8(1): 21-29.
- Sinha KK, Bhatnagar D (1998). *Mycotoxins, agriculture and food safety*. Marcel Dekker Publishers, New York.
- Smith JE, Anderson RA (1991). *Mycotoxins and animal foods*. CRC Press, Boca Raton.
- Sugita-Konishi Y, Pestka JJ (2001). Differential up-regulation of TNF- α , IL-6 and LI-8 production by deoxynivalenol (vomitoxin and other 8-ketotrichothecenes in a human macrophage model. *J Toxicol Env Health* 64: 619-636.
- Suneja SK, Wagle DS, Ram GC (1989). Effect of oral administration of T-2 toxin on glutathione shuttle enzymes, microsomal reductases and lipid peroxidation in rat liver. *Toxicon* 27: 995-1001.
- Ueno Y (1977). Mode of action of trichothecenes. *Pure Applied Chem* 49: 1737-1745.
- Xiao H, Srinivasa M, Marquardt RR, Li SI, Vodela JK, Frohlich AA, Kempainen BW (1996). Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone form, and several of its analogs: structure-activity relationship. *Toxicol Applied Pharmacol* 137: 182-192.
- Wang JS, Groopman JD (1999). DNA damage by mycotoxins. *Mutation Res* 424: 167-181.
- Wang E, Norred WP, Bacon CW, Riley RT, Merrill AH (1991). Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *J Biol Chem* 266: 14486-14490.
- Wei YH, Lu CY, Lin TN, Wei RD (1985). Effect of ochratoxin A on rat liver mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation. *Toxicol* 36: 119-130.
- WHO/IARC (1993). *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 56, Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins*, Lyon.
- WHO/IPCS (2001). Safety evaluation of certain mycotoxins in food. *Who Food Add Ser* 47: 419-555.
- Wild CP, Hudson GJ, Sabbioni G, Chapot B, Hall AJ, Wogan GN, et al. (1992). Dietary intake of aflatoxins and the level of albumin-bound aflatoxin in peripheral blood in The Gambia, West Africa. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*.
- Willis RM, Mulvihill JJ, Hoofnagle JH (1980). Attempted suicide with purified aflatoxin. *Lancet* 1: 1198-1199.
- Withanage GS, Murata H, Koyama T, Ishiwata I (2001). Agonist and antagonist effects of zearaleone, an estrogenic mycotoxin, on SKN, HHUA, and HepG2 human cancer cell lines. *Veter Human Toxicol* 43: 6-10.
- Zhang H, Li JL (1989). Study on toxicological mechanism of moniliformin. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 29: 93-100.

RIESGO TÓXICO POR METALES PRESENTES EN ALIMENTOS

Gemma Falcó, Martí Nadal, Juan M. Llobet, José L. Domingo

Introducción. Plomo. Arsénico. Cadmio. Mercurio. Bibliografía.

Introducción

Dado que los metales están ampliamente distribuidos en el medio ambiente, resulta inevitable que diversas concentraciones de estos elementos sean de hecho prácticamente detectables en toda clase de plantas y animales, y por consiguiente en nuestros alimentos. La propia tecnología agrícola, las emisiones industriales, las fuentes geológicas, y ciertos procesos de procesamiento resultan ser los principales contaminantes de los alimentos. Aunque elementos tales como arsénico, cadmio, plomo, mercurio, o vanadio entre otros, no poseen efectos beneficiosos en humanos, y no se conocen mecanismos homeostáticos para ellos, otros metales tales como cobalto, cromo, cobre, hierro, manganeso o zinc son esenciales para el hombre y juegan un papel relevante en diversos procesos bioquímicos. Sin embargo, estos elementos esenciales pueden resultar también tóxicos a niveles elevados.

Es bien conocido que existen notables diferencias tanto en los hábitos de consumo, los cuales suponen un determinado potencial de

ingesta de metales a través de los alimentos, como en las concentraciones ambientales de estos elementos entre diferentes regiones y países. Por ello, disponer de información acerca de los hábitos dietéticos es fundamental a fin de poder evaluar los riesgos de la exposición a cualquier contaminante alimentario, incluidos los metales. En el presente capítulo, se revisan cuatro elementos ampliamente dispersos en el medio ambiente y de toxicidad muy bien conocida: arsénico, plomo, cadmio y mercurio, elementos para los cuales se presenta y discute información reciente sobre la exposición humana, con especial atención a la producida a través de los alimentos.

Nuestra revisión se ha centrado fundamentalmente en los últimos datos publicados en España. Aunque la mayoría corresponden a estudios llevados a cabo en Cataluña, dado que en dichos estudios la mayor parte de alimentos analizados fueron adquiridos aleatoriamente, sin especificar la procedencia u origen de los mismos, los resultados de ingesta de metales serían fácilmente extrapolables a las poblaciones de otras comunidades autónomas, simplemente conjugando los resultados analíticos con los res-

pectivos hábitos dietéticos o de consumo de cada comunidad o región.

Plomo

1. Características del plomo como contaminante ambiental

El plomo, tanto por sus características toxicológicas como por la dispersión en el medio ambiente, ha sido uno de los metales pesados más estudiados desde un punto de vista científico. Se trata de un elemento que se forma de manera natural en la corteza terrestre, aunque las fuentes principales son de tipo antropogénico. Entre ellas, cabría destacar la emisión de plomo por el tráfico rodado. Hasta finales del siglo pasado, el plomo (en la forma de tetraetilo de plomo) era utilizado como aditivo en la gasolina, cuya función era aumentar el octanaje y lubricar diversas partes del motor. Vistas las consecuencias perjudiciales de la emisión de plomo por parte del parque automovilístico, la agencia norteamericana de protección ambiental (U.S. EPA) prohibió finalmente el uso de este tipo de combustible en 1996. Unos años más tarde, y a semejanza de los Estados Unidos, la Unión Europea implantó la Directiva 98/70/CE, prohibiendo la comercialización de gasolina con plomo a partir del 1 de enero de 2000. Sin embargo, España obtuvo una moratoria y no se retiraron del mercado las gasolinas con plomo hasta el 31 de julio de 2001 (BOE, 2000, 2001).

Aparte de la combustión de gasolina con plomo, otras actividades son fuentes medioambientales de contaminación por plomo. Cabría destacar la industria química basada en el uso y producción de compuestos plúmbicos, así como el incorrecto tratamiento de pilas y baterías. Sin embargo, la cantidad de plomo incluida en estos materiales, así como en pinturas y productos cerámicos, ha ido decreciendo a lo largo de los años. Por el contrario, este metal ha sido ampliamente utilizado en varios tipos de muni-

ción, y ha sido tradicionalmente incorporado en armamento militar y equipamiento científico y médico (ATSDR, 1999a).

La concentración de Pb en aire varía entre 10 y 50 ng/m³, en función de la proximidad a focos contaminantes (Departament de Medi Ambient, 2002; Schuhmacher *et al.*, 2002; Fernández-Álvarez *et al.*, 2004). En el medio acuático, se encuentran niveles de entre 10 y 20 µg/l. Recientemente, se ha rebajado el máximo permitido para el agua de consumo humano hasta los 25 µg/l (BOE, 2003). Valores típicos de plomo en suelo de áreas no contaminadas se sitúan entre <10 y 30 µg/g. En zonas adyacentes a carreteras, y en función de la distancia a éstas, los niveles pueden ser mucho mayores (30-2000 µg/g).

Los efectos para la salud derivados de una exposición crónica o aguda al plomo son diversos.

Exposición aguda: puede dar lugar a diferentes problemas gastrointestinales (cólicos, vómitos, estreñimiento, etc.) y neurológicos, así como dificultades en el sistema motor (debilidad y convulsiones). Es frecuente la aparición de encefalopatía aguda (Gordon *et al.*, 2002).

Exposición crónica: su toxicidad repercute principalmente en el sistema nervioso, tanto en adultos como en niños. Una exposición a elevados niveles de plomo puede producir anemia, así como daños irreversibles en el cerebro y los riñones. Este elemento es teratógeno, pudiendo provocar abortos en mujeres embarazadas. Asimismo, puede dañar el sistema reproductor masculino, influyendo en la calidad del esperma.

2. Valores de referencia

La IARC (Internacional Agency for Research on Cancer) cataloga el plomo elemental y el inorgánico en el grupo 2B, es decir, posible agente cancerígeno en humanos (IARC, 1980). Para el plomo orgánico se considera que no hay evidencias suficientes como para catalogarlo como cancerígeno para humanos. La sintomatología de la intoxicación está relacionada con la concentración de este elemento en el organismo. La

concentración de plomo en sangre permite hacer un diagnóstico, de modo que para una población no ocupacionalmente expuesta se considera una concentración inferior a 10 mg/dL como nivel normal, mientras que una concentración superior a 20 mg/dL es considerada como nivel alto (WHO, 1986).

El tratamiento más adecuado para intoxicados por plomo es el uso de agentes quelantes, como el edatato cálcico sódico, y el «succímero» (ácido 2-3-dimercaptosuccínico). También se ha utilizado el 2,3-dimercaptopropanol (BAL) (Gordon *et al.*, 1998, 2002).

3. Concentración de plomo en alimentos

Diversos estudios han demostrado que la disminución de los niveles medioambientales de plomo ha ido directamente correlacionada con un significativo descenso de las concentraciones en los alimentos. En 1997, el Laboratorio de Toxicología y Salud Medioambiental de la Universidad «Rovira i Virgili» en Reus, empezó un estudio plurianual para determinar la afectación que suponía la instalación de la única inci-

neradora de residuos industriales de España sobre la población que vivía en el área cercana a este potencial foco de emisión de sustancias contaminantes. Una parte del estudio consistió en determinar las concentraciones de diversos metales pesados en varios grupos de alimentos consumidos por la población local (Llobet *et al.*, 1998). Los resultados se resumen en la Tabla 17.1.

La aplicación de la directiva europea de prohibición del uso de gasolina con plomo provocó una drástica disminución de los niveles de plomo en el medio ambiente en general, y en los alimentos, en particular. Los grupos alimenticios que mostraron un cambio más espectacular en las concentraciones de este elemento fueron las verduras, mayoritariamente, y cereales, tubérculos y fruta, en menor medida. La característica común que presentan estos alimentos, a excepción de los tubérculos, es la exposición al aire. Teniendo en cuenta que la deposición atmosférica es la vía principal de entrada de plomo a otros compartimentos abióticos (suelo, agua, etc.) y bióticos (plantas, animales, etc.) (ATSDR, 1999a), queda corroborado el cambio de las concentraciones medioambientales de este metal pesado.

Tabla 17.1. Concentración de plomo (en µg/g peso fresco) encontrada en alimentos de diversa procedencia.

	Tarragona 1998 ^a	Tarragona 2003 ^b	Cataluña 2001 ^c	Huelva 2004 ^d
Vegetales	1,154	0,039	0,016	0,0053-0,0188
Legumbres	0,06	0,044	0,008	—
Pan y cereales	0,223	0,03	0,024	0,0128-0,0672
Tubérculos	0,731	0,035	0,026	0,0043
Fruta	0,357	0,013	0,013	0,0231-0,0237
Pescado y marisco	0,107	0,046	0,051	0,0151-0,484
Carne	nd	0,05	0,024	0,0066-0,156
Huevos	nd	0,022	0,015	0,0018-0,0242
Derivados lácticos	nd	0,032	0,023	0,008-0,017
Leche	nd	0,03	0,006	0,0012-0,024
Grasas	—	—	0,030	0,0043-0,018

^a Llobet *et al.* (1998).

^b Bocio *et al.* (2005).

^c Llobet *et al.* (2003).

^d Bordajandi *et al.* (2004).

nd = no detectado.

Recientemente, los mismos investigadores determinaron las concentraciones de un total de 1.048 alimentos, divididos en 11 grupos alimenticios, adquiridos aleatoriamente en el año 2000 en 8 grandes poblaciones de Cataluña (Llobet *et al.*, 2003). Los niveles de plomo fueron del mismo orden a los obtenidos en mercados y supermercados de Tarragona dos años después (Bocio *et al.*, 2005), habiéndose ya observado una clara disminución del impacto de las gasolinas con plomo, tan espectacular en estudios previos.

En 2003, se presentaron los resultados de un exhaustivo estudio epidemiológico en el que participaron 3.300 personas, que permitió actualizar las características de los hábitos dietéticos de los habitantes de Cataluña (Serra-Majem *et al.*, 2003). Partiendo de estos datos, y de la concentración de metales pesados obtenida en el estudio de la Universidad «Rovira i Virgili», se puede establecer la dosis diaria de plomo ingerida por la población. La Figura 17.1 muestra el consumo diario de plomo de hombres y mujeres adultos a través de diferentes tipos de alimentos. El consumo diario de plomo se estableció en 22,39 $\mu\text{g/g}$ para las mujeres, y 25,22 $\mu\text{g/g}$ para los hombres. La máxima contribución del plomo en la alimentación, especialmente significativa en el caso de los hombres, provenía del pan en particular y de los cereales en general.

Bordajandi *et al.* (2004) estudiaron recientemente los niveles de varios contaminantes orgánicos e inorgánicos en muestras alimenticias de Huelva. Respecto al Pb, productos como pan y bollería fueron también los principales responsables de la ingestión de este metal por parte de la población, con casi el 50% de la ingesta global de plomo. A diferencia de lo que sucede en otros metales pesados, pescados y mariscos no son los principales alimentos a través de los cuales la población está más expuesta al plomo. Tal y como se puede ver en la Tabla 17.2, se observaron valores muy similares en el caso de diversos grupos de población en función de la edad.

4. Evaluación del riesgo

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO/WHO) establece una ITSP (Ingesta Tolerable Semanal Provisional) de 25 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal, equivalente a 214 $\mu\text{g/día}$ para una persona de 60 kg de peso (WHO, 1993). Los niveles actuales de consumo dietético de la población antes referida suponen un 11,4 y un 10,1% en el caso de mujeres y hombres adultos, respectivamente. Los porcentajes en función de la edad aparecen en la Tabla 17.2 siendo todos ellos cercanos al 10%.

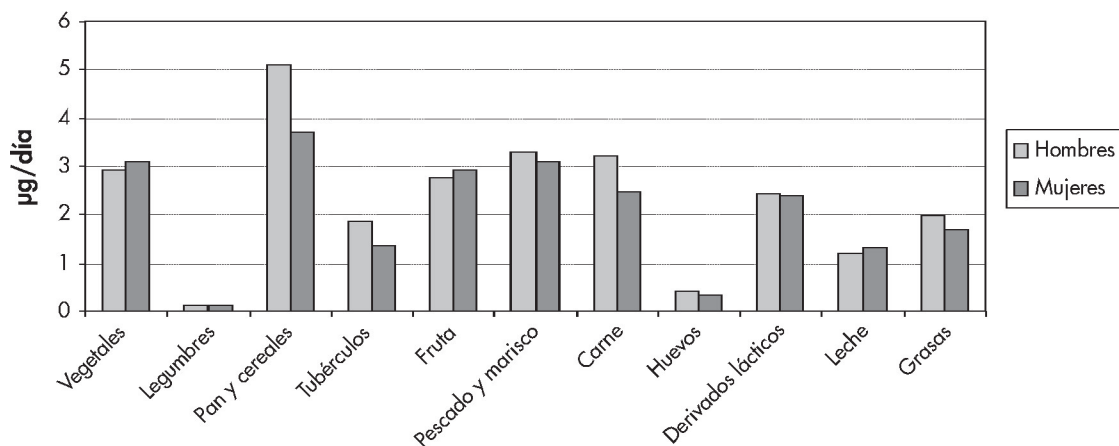


Figura 17.1. Ingesta diaria de plomo (μg) estimada en función del tipo de alimento para hombres y mujeres adultos.

Tabla 17.2. Consumo diario de plomo (en $\mu\text{g/g}$) y porcentaje de ISTP que representa para diferentes grupos de población^a.

	10-17 años	18-24 años	25-44 años	45-64 años	65-75 años
Vegetales	1,96	2,45	2,93	3,67	2,93
Legumbres	0,10	0,09	0,10	0,12	0,12
Pan y cereales	5,93	4,97	4,63	3,72	3,17
Tubérculos	1,84	1,63	1,58	1,61	1,42
Fruta	1,76	1,76	2,52	3,72	3,97
Pescado y marisco	2,15	2,41	2,97	4,04	3,33
Carne	2,83	2,76	3,02	2,57	1,90
Huevos	0,33	0,38	0,36	0,36	0,30
Derivados lácticos	2,76	2,53	2,65	2,07	1,84
Leche	1,53	1,38	1,14	1,17	1,20
Grasas	1,11	1,14	1,14	1,11	0,99
Total	22,30	21,49	23,04	24,16	21,17
%ISTP	11,6	9,7	10,4	10,9	9,4

^a A partir de los datos de Llobet *et al.* (2003) y Serra-Majem *et al.* (2003).

Arsénico

1. Características del arsénico como contaminante ambiental

El arsénico se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza formando diferentes compuestos. Destacan, como más abundantes en el medio

ambiente, las formas inorgánicas como arsenitos, arseniatos y óxidos. También podemos encontrar formas orgánicas, como el metilarsénico o dimetilarsénico, producidas como consecuencia de la biometilación por parte de ciertos microorganismos. El arsénico inorgánico también se puede encontrar en el medio ambiente por actividades antropogénicas, ya que se utiliza como plaguicida, semiconductor, en aleaciones, esmaltes, en la industria del vidrio, química, etc.

Las concentraciones de As en aire en zonas remotas alejadas de zonas urbanas están comprendidas entre 1 y 3 ng/m^3 , mientras que en zonas urbanas alcanzan valores entre 20 y 100 ng/m^3 . Las concentraciones en agua están por debajo de 10 $\mu\text{g/l}$, aunque se pueden encontrar niveles superiores en zonas próximas a depósitos naturales o fuentes antropogénicas de As. Los niveles naturales de As en suelo están entre 1-40 $\mu\text{g/kg}$, aunque pueden ser superiores en algunas zonas, especialmente cerca de depósitos naturales de As o en lugares en los que se aplican pesticidas. Por contaminación de aguas de algunas zonas de Argentina con niveles superiores a 1,4 mg/l de arsénico, se ha descrito una elevada incidencia de sordera y bocio (Sanz y

Tabla 17.3. Ingestas diarias de Pb total (μg) en diferentes regiones y países.

Lugar	Valor	Referencia
Alemania	18	Wilhelm <i>et al.</i> (2003)
Cataluña	28	Llobet <i>et al.</i> (2003)
Dinamarca	18	Larsen <i>et al.</i> (2002)
Francia	52	Leblanc <i>et al.</i> (2000)
Gran Bretaña	26	Ysart <i>et al.</i> (2000)
Gran Bretaña	23	Ysart <i>et al.</i> (1999)
Tarragona	49	Llobet <i>et al.</i> (1998)
País Vasco	34	Urieta <i>et al.</i> (1996)
Nueva Zelanda	33	Vannoort <i>et al.</i> (1995)
USA	15	Gunderson <i>et al.</i> (1995)
Holanda	10-32	Ellen <i>et al.</i> (1990)

Nogué, 1990). Elevados niveles de arsénico en aguas de bebida han sido hallados en zonas de Bangla Desh, 2,5 mg/l, en Vietnam, 3 mg/l, y en Méjico, 0,4 mg/l, lo que provoca una mayor incidencia de cáncer de piel en estas zonas. En el agua de Barcelona los niveles detectados son de 2,5 µg/l. Los niveles máximos permitidos en España son de 10 µg/l (BOE, 2003).

2. Toxicidad del arsénico

A excepción de la población expuesta laboralmente, la vía mayoritaria de exposición a este elemento es la dieta. Cabe destacar que el As orgánico presente en los alimentos es relativamente muy poco tóxico en comparación con la forma inorgánica, presente de forma minoritaria (Kaise *et al.*, 1985). Aunque tiene menor importancia, cabe considerar también la vía inhalatoria y la tópica, como posibles vías de exposición.

La acción tóxica principal del arsénico se debe a su afinidad por los grupos SH, produciéndose uniones entre grupos vecinos de cisteína y glutatión. El resultado es la aparición de una degeneración grasa en diferentes órganos, entre ellos el hígado. El arsénico se absorbe rápidamente tanto por vía pulmonar como digestiva. Seguidamente, es transportado al hígado donde se metaboliza pasando de la forma inorgánica (más tóxica) a la orgánica, eliminable por orina. Otras vías de eliminación son las uñas y el cabello. Aunque en poca proporción, el arsénico se acumula en piel, causando cáncer u otras lesiones. Estudios recientes demuestran que el arsénico puede atravesar la barrera placentaria.

Los efectos tóxicos producidos por arsénico son diferentes dependiendo de si se trata de exposición aguda o crónica.

Exposición aguda: el inicio del cuadro por intoxicación oral aguda varía de minutos a horas, siendo más rápido si el arsénico se encuentra en disolución y si el estómago del individuo está vacío. En la intoxicación aguda cabe diferenciar si esta es por vía digestiva o por vía inhalatoria. Si es digestiva, aparecen dolores gastrointestinales tipo cólico, con diarrea, vómitos y dolor abdominal. Si la intoxicación es grave puede dar

alteraciones cardiovasculares (vasodilatación o depresión miocárdica) o del SNC (delirio, coma o convulsiones). Se puede producir la muerte debido a un fracaso renal. También puede derivar a patologías crónicas como hepatopatía, insuficiencia renal o neuropatía periférica. Si la intoxicación es por vía inhalatoria, se pueden también originar alteraciones gastrointestinales y neurológicas, respiratorias (tos, disnea, etc.) y oculares (conjuntivitis).

Exposición crónica: los síntomas principales de las intoxicaciones crónicas son multisistémicos. Entre ellos destacan astenia, debilidad muscular, cefaleas, neuropatía periférica, edemas, alteraciones dérmicas (debidas al acúmulo en este tejido), alteraciones del sistema gastrointestinal, respiratorias, hepáticas, renales y deterioro del SNC (Hornig *et al.*, 1999; NRC, 2001). Cabe destacar, además, la elevada incidencia de cáncer de pulmón, piel, hígado, riñón, vejiga y ciertas leucemias.

3. Valores de referencia

La IARC considera el arsénico inorgánico como carcinógeno con suficientes evidencias en humanos, incluyéndolo en la categoría 1 (IARC, 1980). La sintomatología de la intoxicación por arsénico está relacionada con la concentración de este elemento en el organismo. En este sentido, y a fin de establecer un diagnóstico, podemos determinar la cantidad de arsénico en orina. Así, se considera:

- Una concentración inferior a 20 mg/ml como normal.
- Una concentración superior a 200 mg/ml como elevada.
- Una concentración superior a 500 mg/ml como nivel tóxico.

El tratamiento de las intoxicaciones también variará dependiendo de si se trata de una intoxicación aguda o crónica. En caso de intoxicación aguda, se realizará un lavado de estómago y tratamiento quelante con 2,3-dimercaptopropanol (BAL) que favorecerá la eliminación del metal.

En caso de intoxicación crónica, el tratamiento será básicamente con quelantes como BAL o D-penicilamina. También se puede utilizar el ácido meso-2-3-dimercatosuccínico («succímero») o el ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfónico (DMPS), que tienen menos contraindicaciones que BAL y formas de administración más cómodas.

4. Concentración de arsénico en alimentos

Todos los estudios de determinación de arsénico en alimentos coinciden en que las mayores concentraciones se detectan en pescados y mariscos. Estos organismos poseen la capacidad de acumular arsénico orgánico procedente del medio ambiente. Entre los resultados de los estudios más recientes realizados en España, cabe destacar los elevados niveles de arsénico encontrados en el cazón (22,0 µg/g peso fresco) en Huelva (Bordajandi *et al.*, 2004) (Tabla 17.4).

Niveles más moderados se encontraron en pescados en estudios llevados a cabo en Cataluña: 4,2 y 2,2 µg/g peso fresco en Tarragona

(Llobet *et al.*, 1998), y Cataluña global (Llobet *et al.*, 2003), respectivamente. Aunque en concentraciones muy inferiores a las mencionadas, también en aceites y grasas, así como en pan y cereales, se detecta presencia de arsénico (Figura 17.2). La concentración de arsénico en vegetales depende de las concentraciones de los suelos, aguas y aire, así como del uso de fertilizantes y pesticidas.

Tomando como base las concentraciones halladas por Llobet *et al.* (2003), y el reciente estudio de dieta en Cataluña (Serra-Majem *et al.*, 2003), la ingesta estimada de arsénico total (orgánico e inorgánico) para hombres adultos es de 165,27 µg/día, y de 152,03 µg/día para las mujeres. Esta pequeña diferencia se debe a un mayor consumo de pescado, grasas y cereales por parte de los hombres. Por estratos de edad, el grupo formado por la población con edades comprendidas entre los 45 y los 64 años, es el que mayor ingesta hace de arsénico total (192,32 µg/día), mientras que en los niños con edades entre los 10 y los 17 años alcanzan los 115,45 µg/día (Tabla 17.5). La diferencia responde a la ingesta de pescado. Mientras que en el primer caso el

Tabla 17.4. Concentración de arsénico (µg/g peso fresco) en alimentos de diversa procedencia.

	Tarragona 1998 ^a	Tarragona 2003 ^b	Cataluña 2001 ^c	Huelva 2004 ^d
Vegetales	nd	nd	0,0015	0,0048-0,0159
Legumbres	nd	nd	0,0015	—
Pan y cereales	0,1	nd	0,0424	nd-0,023
Tubérculos	nd	nd	0,013	0,0153
Fruta	nd	nd	0,0015	0,005-0,007
Pescado y marisco	4,6	4,8	2,21	0,23-22,0
Carne	nd	nd	0,0243	nd-0,062
Huevos	nd	nd	0,015	0,004
Derivados lácticos	nd	nd	0,0225	0,0037-0,016
Leche	nd	nd	0,006	nd-0,005
Grasas	—	—	0,0917	0,0007-0,002

^a Llobet *et al.* (1998)

^b Bocios *et al.* (2005)

^c Llobet *et al.* (2003)

^d Bordajandi *et al.* (2004)

nd: no detectado

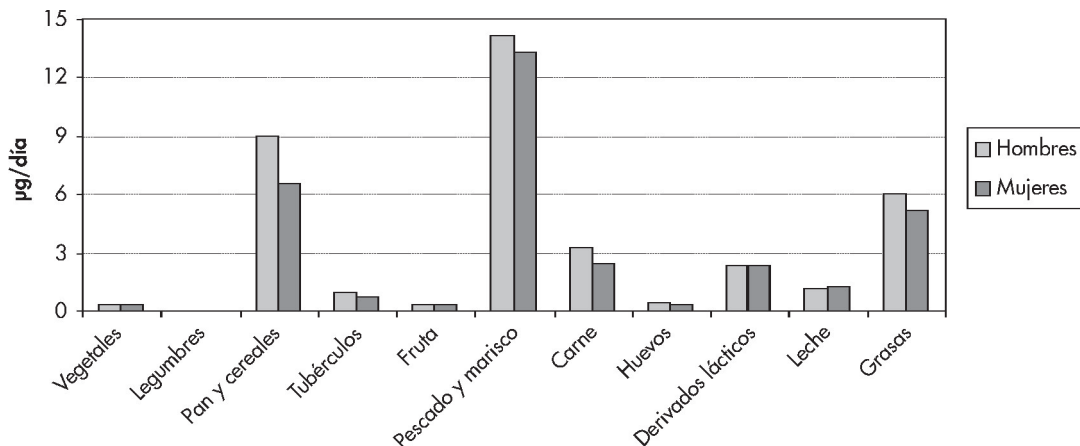


Figura 17.2. Ingesta diaria de arsénico inorgánico (μg) estimada en función del tipo de alimento para hombres y mujeres adultos.

consumo diario de este grupo de alimentos es de 79 g/día, en los jóvenes es de solo 42 g/día.

5. Evaluación del riesgo

La toxicidad del arsénico depende de la forma química en la que está presente. El arsénico orgánico es muy poco tóxico, eliminándose el

80% a los pocos días después de su ingestión. La mayor parte del arsénico presente en pescados y mariscos se encuentra en dicha forma. En numerosos estudios se estima en un 10% la proporción de arsénico inorgánico del total de la concentración de arsénico presente en este grupo de alimentos (Edmonds y Francesconi, 1993; McIntosh *et al.*, 1996). Para el resto de

Tabla 17.5. Consumo diario de arsénico inorgánico (en $\mu\text{g/g}$ peso fresco) y porcentaje de ISTP que representa para diferentes grupos de población^a.

	10-17 años	18-24 años	25-44 años	45-64 años	65-75 años
Vegetales	0,18	0,22	0,27	0,34	0,27
Legumbres	0,19	0,02	0,02	0,02	0,02
Pan y cereales	10,47	8,77	8,18	6,57	5,59
Tubérculos	0,92	0,81	0,79	0,81	0,72
Fruta	0,21	0,21	0,30	0,44	0,47
Pescado y marisco	9,28	10,38	12,82	17,46	14,36
Carne	2,87	2,79	3,06	2,60	1,92
Huevos	0,33	0,37	0,36	0,36	0,30
Derivados lácticos	2,70	2,47	2,59	2,02	1,80
Leche	1,53	1,38	1,14	1,17	1,20
Grasas	3,39	3,48	3,48	3,39	3,02
Total	31,91	30,94	33,02	35,19	29,69
%ISTP	30,4	29,5	31,4	33,5	28,3

^a A partir de los datos de Llobet *et al.* (2003) y Serra-Majem *et al.* (2003).

Tabla 17.6. Ingestas diarias de As total (μg) en diferentes regiones y países.

Lugar	Valor	Referencia
Cataluña	224	Llobet <i>et al.</i> (2003)
Francia	109	Leblanc <i>et al.</i> (2000)
Gran Bretaña	120	Ysart <i>et al.</i> (2000)
Gran Bretaña	65	Ysart <i>et al.</i> (1999)
Tarragona	273	Llobet <i>et al.</i> (1998)
USA	51	MacIntosh <i>et al.</i> (1996)
País Vasco	291	Urieta <i>et al.</i> (1996)
Nueva Zelanda	150	Vannoort <i>et al.</i> (1995)
USA	38	Gunderson <i>et al.</i> (1995)
Japón	182	Mohri <i>et al.</i> (1990)

alimentos la proporción de arsénico inorgánico se puede aproximar al 100%.

La OMS estableció la ISTP (Ingesta Semanal Tolerable Provisional) para arsénico inorgánico en $15 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{semana}$ (WHO, 1993). Así para un hombre de 60 kg de peso corporal, la ingesta estimada representaría el 36% de la ISTP. En los demás grupos de población residente en Cataluña, estaría entre el 28,3 y 33,5% de dicho valor (Tabla 17.5). Estos valores no supondrían, pues, un riesgo para la salud de las personas.

El valor de la potencia carcinogénica del As inorgánico es $1,50 (\text{mg}/\text{kg}/\text{día})^{-1}$ (US EPA, 1996a). De acuerdo a las ingestas anteriormente calculadas, los valores estimados de riesgo para la población de contraer cáncer en el periodo de 70 años de vida son del orden de 10^{-4} . Por lo tanto, siendo valores mayores a 10^{-6} , se estima oportuno tomar en consideración estas ingestas, con el fin de reducir los riesgos carcinogénicos asociados (US EPA, 1996b).

Cadmio

1. Características del cadmio como contaminante ambiental

El cadmio es un elemento que se encuentra en baja proporción en la corteza terrestre. Así, su

presencia en el medio ambiente se debe básicamente a la contaminación antropogénica. Se genera como subproducto al fundir otros metales como zinc, cobre o plomo. El cadmio es un elemento de utilización industrial, ya que es un agente anticorrosivo, forma parte de las baterías alcalinas, y se usa en pigmentos, en pinturas, en soldaduras, así como también como semiconductor y plaguicida.

En el agua de los océanos se encuentran niveles de cadmio menores a $5 \text{ ng}/\text{l}$. Los niveles de cadmio en el aire, según diversos estudios realizados en países europeos son de 1 a $5 \text{ ng}/\text{m}^3$ en zonas rurales, de 5 a $15 \text{ ng}/\text{m}^3$ en zonas urbanas y de 15 a $50 \text{ ng}/\text{m}^3$ en zonas altamente industrializadas (WHO, 1992). Aunque no hay grandes diferencias entre las concentraciones de Cd en el aire interior y exterior de los edificios, si no hay fumadores, estas aumentan notablemente en ambientes cerrados con importantes consumos de tabaco. Cabe destacar que los cigarrillos contienen entre 1 y $2 \mu\text{g}$ de Cd por unidad, y la absorción por esta vía es aproximadamente del 10%.

El cadmio también puede llegar a los vegetales debido al uso de plaguicidas y a las aguas de riego contaminadas. En la carne se acumula mayoritariamente en hígado y riñón, y en el pescado, en el hígado. También se acumula en moluscos como mejillones y ostras. Uno de los episodios más importantes de intoxicación masiva por cadmio fue la enfermedad de Itai-Itai. Se produjo en Japón, a finales de la Segunda Guerra Mundial, por consumo de arroz y aguas contaminadas (Nogawa *et al.*, 1979).

2. Toxicidad del cadmio

El cadmio tiene una absorción intestinal de aproximadamente un 5%, mientras que posee una importante absorción pulmonar. Una vez absorbido, el cadmio es transportado mediante los eritrocitos, unido a la hemoglobina, o por el plasma unido a proteínas plasmáticas, concretamente a metalotioneína. Finalmente es eliminado por orina, heces, cabellos, uñas, o bien se acumula en riñón, hígado y músculo.

Exposición aguda: si la absorción es digestiva, produce alteraciones gastrointestinales como vómitos, diarrea o cólicos, y si es inhalatoria produce irritación de las vías respiratorias con tos, disnea y edema agudo de pulmón.

Exposición crónica: en este caso, las manifestaciones son multisistémicas. Como patología más importante se puede ver afectada la función renal, causando nefropatía cádmica. En el caso de que la absorción sea por inhalación, las alteraciones son respiratorias, como rinitis, bronquitis o enfisema, que pueden derivar en enfermedad obstructiva crónica. En casos avanzados se desarrollan alteraciones óseas. Tras larga exposición ocupacional, el riesgo de desarrollar cáncer de próstata o pulmón es más elevado, como constatan numerosos estudios epidemiológicos (Elghany *et al.*, 1990; Collins *et al.*, 1992).

3. Valores de referencia

El cadmio está clasificado por la IARC en la categoría 1, y por tanto es considerado como producto carcinógeno con suficientes evidencias en humanos (IARC, 1980).

El diagnóstico de la intoxicación se hace mediante la detección de cadmio en orina. Así se establece que

- Concentraciones inferiores a 2 mg/g creatinina son consideradas como niveles normales.
- Concentraciones superiores a 10 mg/g creatinina pueden dar lugar a alteraciones renales.

4. Concentración de cadmio en alimentos

Los alimentos que presentan mayores concentraciones de cadmio son el pescado y los cereales, seguidos de los tubérculos (Tabla 17.7).

Algunos cereales como el arroz o el trigo, poseen la capacidad de captar y acumular cadmio del suelo (Rayment, 1995). En los alimentos de origen animal, los riñones son los que presentan mayores concentraciones de este metal, así como los crustáceos y moluscos que concentran el cadmio del medio.

Tomando como referencia las concentraciones halladas por Llobet *et al.* (2003) y el recien-

Tabla 17.7. Concentración de Cd ($\mu\text{g/g}$ peso fresco) en alimentos de diversa procedencia.

	Tarragona 1998 ^a	Tarragona 2003 ^b	Cataluña 2001 ^c	Huelva 2004 ^d
Vegetales	0,059	0,021	0,005	0,0075-0,016
Legumbres	0,023	nd	0,0005	—
Pan y cereales	0,018	0,022	0,0329	0,0035-0,017
Tubérculos	0,051	0,021	0,0198	0,015
Fruta	nd	nd	0,0009	0,0016-0,0023
Pescado y marisco	0,086	0,049	0,0362	nd-0,159
Carne	nd	nd	0,0063	nd-0,058
Huevos	nd	nd	0,008	0,0006-0,0008
Derivados lácticos	0,023	nd	0,006	nd-0,002
Leche	nd	nd	0,0015	0,0001-0,0007
Grasas	—	—	0,008	nd-0,0002

^a Llobet *et al.* (1998)

^b Ocio *et al.* (2005)

^c Llobet *et al.* (2003)

^d Bordajandi *et al.* (2004)

nd: no detectado

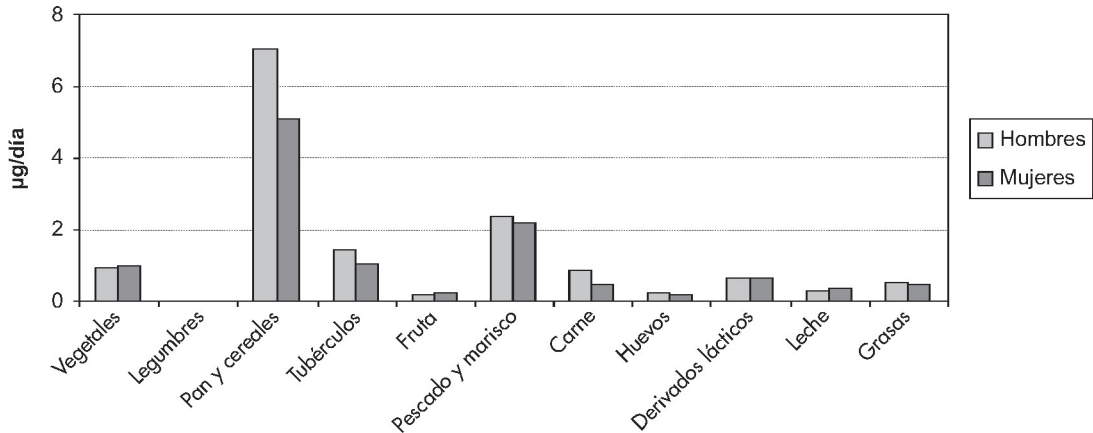


Figura 17.3. Ingesta diaria de cadmio (μg) estimada en función del tipo de alimento para hombres y mujeres adultos.

te estudio de dieta en Cataluña (Serra-Majem *et al.*, 2003), la ingesta estimada de cadmio por la población de dicha comunidad es de 14,36 $\mu\text{g}/\text{día}$ en hombres adultos y de 11,66 $\mu\text{g}/\text{día}$ en mujeres (Figura 17.3). El mayor consumo de cereales por parte de los hombres explica esta pequeña diferencia.

Por estratos de edad, las ingestas de cadmio oscilan entre 10,67 $\mu\text{g}/\text{día}$ para la gente mayor, a

los 14,10 $\mu\text{g}/\text{día}$ en el grupo de edades comprendidas entre los 10 y los 17 años (Tabla 17.8). También en este caso el consumo de cereales es la causa de las diferencias en las ingestas de este metal por los distintos grupos de población.

Estos valores son comparables a la mayoría de los estudios realizados en diferentes regiones y países (Tabla 17.9). La ingesta estimada en Egipto (240 $\mu\text{g}/\text{día}$), pone de manifiesto la rela-

Tabla 17.8. Consumo diario de cadmio (μg) y porcentaje de ISTP que representa para diferentes grupos de población^a.

	10-17 años	18-24 años	25-44 años	45-64 años	65-75 años
Vegetales	0,60	0,75	0,90	1,12	0,90
Legumbres	0,006	0,006	0,006	0,008	0,008
Pan y cereales	8,13	6,81	6,35	5,10	4,34
Tubérculos	1,41	1,25	1,21	1,23	1,09
Fruta	0,13	0,13	0,18	0,26	0,28
Pescado y marisco	1,52	1,70	2,10	2,86	2,35
Carne	0,74	0,72	0,79	0,67	0,50
Huevos	0,18	0,20	0,19	0,19	0,16
Derivados lácticos	0,72	0,66	0,69	0,54	0,48
Leche	0,38	0,34	0,28	0,29	0,30
Grasas	0,29	0,30	0,30	0,29	0,26
Total	14,10	12,87	13,01	12,58	10,68
%ISTP	28,8	26,3	26,5	25,7	21,8

^a A partir de los datos de Llobet *et al.* (2003) y Serra-Majem *et al.* (2003).

Tabla 17.9. Ingestas diarias de Cd (μg) en diferentes regiones y países.

Lugar	Valor	Referencia
Andalucía (Huelva)	7,7	Bordajandi <i>et al.</i> (2004)
Cataluña	16	Llobet <i>et al.</i> (2003)
Dinamarca	16	Larsen <i>et al.</i> (2002)
Francia	17	Leblanc <i>et al.</i> (2000)
Gran Bretaña	12	Ysart <i>et al.</i> (2000)
Gran Bretaña	14	Ysart <i>et al.</i> (1999)
Tarragona	18	Llobet <i>et al.</i> (1998)
Alemania	10-14	Müller <i>et al.</i> (1998)
Egipto	240	Saleh <i>et al.</i> (1998)
País Vasco	11	Urieta <i>et al.</i> (1996)
Nueva Zelanda	28	Vannoort <i>et al.</i> (1995)

ción entre la presencia de metales en los alimentos y la contaminación medioambiental, como es el caso de este país.

5. Evaluación del riesgo

La ingesta tolerable provisional semanal (ISTP) establecida para el cadmio es de $7 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{semana}$ (WHO, 1993). La ingesta estimada en Cataluña para un hombre adulto de 60 kg de peso, alcanza el 29,3% del límite marcado por la OMS, y para la mujer del 23,8%. Por edades, el grupo de gente mayor y el de los jóvenes entre 10 y 17 años representan los valores menor y mayor, respectivamente, respecto a la ISTP (21,8 y 28,8%). Con todo, en ningún caso se supera el límite establecido, considerándose que no existe riesgo por ingesta de Cd a través de la dieta para la salud de la población.

Mercurio

1. Características del mercurio como contaminante ambiental

La incorporación del mercurio en el medio ambiente se da tanto por procesos naturales

como antropogénicos. Entre los primeros, cabe destacar la erosión de rocas y suelo por parte de agentes como la lluvia y el viento, y las erupciones volcánicas. A pesar de ello, la aportación humana de mercurio ha ido *in crescendo* en las últimas décadas, de modo que la concentración ha aumentado entre 3 y 6 veces (ATSDR, 1999b). Las fuentes más importantes de emisión de este elemento al aire son la combustión de combustibles fósiles, la minería y la fundición. Por el contrario, los productos que contribuyen mayoritariamente a la contaminación por mercurio al suelo serían fertilizantes, fungicidas y residuos sólidos urbanos.

El rango típico de concentración de mercurio en el aire es de 5 a $20 \text{ ng}/\text{m}^3$, encontrándose básicamente en su fase vapor. En la fase particulada, los niveles raramente alcanzan $1 \text{ ng}/\text{m}^3$. Por lo que respecta al agua, el mercurio se encuentra en valores inferiores a los $100 \text{ ng}/\text{L}$. El nivel en agua marina se encuentra en $1 \text{ ng}/\text{L}$ (Fowler, 1990). Respecto a la legislación, la OMS indica que la máxima concentración permitida de mercurio en agua de consumo es de $1 \mu\text{g}/\text{L}$ ($1.000 \text{ ng}/\text{L}$). En suelo, la concentración típica de mercurio está entre 0,05 y $0,2 \mu\text{g}/\text{g}$, siendo ligeramente más elevada en zonas industriales.

El mercurio puede encontrarse básicamente en 3 formas: a) elemental, b) inorgánico divalente, y c) orgánico (Tabla 17.10). El mercurio elemental es la forma familiar de este elemento, usado principalmente como indicador en termómetros, cuya principal característica fisicoquímica es la de ser líquido a temperatura ambiente. El mercurio adopta la forma inorgánica cuando se combina con ciertos elementos como oxígeno, azufre o cloro.

El metilmercurio es la forma orgánica principal del mercurio, compuesto resultante de la unión del metal con el carbono. Algunos microorganismos acuáticos (bacterias, hongos y fitoplancton) son capaces de metilar el mercurio elemental e inorgánico, pasándolo a su forma orgánica. Por sus características fisicoquímicas y la capacidad de bioacumulación en los organismos vivos, los compuestos orgánicos de mercurio —y en especial, el metilmercurio— son los

Tabla 17.10. Principales características de las formas de mercurio^o.

	Elemental (Hg ⁰)	Sales inorgánicas (Hg ²⁺)	Metilmercurio (CH ₃ Hg ⁺)
Fuentes de exposición	Amalgamas dentales, exposición laboral	Oxidación de Hg ⁰ , desmetilación de CH ₃ Hg ⁺	Consumo de pescado
Vía principal de exposición	Inhalatoria	Oral	Oral
Órgano diana principal	Sistema nervioso central	Riñón	Sistema nervioso central
Sintomatología clínica sistémica			
Riñón	Proteinuria	Proteinuria, necrosis tubular	
Sistema nervioso central	Eretismo, temblores		Parestesia, ataxia, pérdida visual y auditiva
Sistema nervioso periférico	Neuropatía periférica	Acrodinia	
Vida media aproximada	58 días	1-2 meses	70-80 días

^o Extraído de Clarkson *et al.* (2003) y de Counter y Buchanan (2004).

más tóxicos y pueden provocar graves daños en la salud de las personas expuestas. Desgraciadamente, existen importantes precedentes de contaminación por metilmercurio a través de la dieta. Durante los años 50 y 60, en la bahía de Minamata (Japón), la empresa Chisso descargó grandes cantidades de residuos con mercurio, el cual se transformó en metilmercurio, incorporándose a la cadena trófica (Gochfeld, 2003). Los pescadores de la zona, que mayoritariamente se alimentaban de pescado, vieron como la ingestión de peces altamente contaminados de mercurio provocó la muerte en muchos de ellos, así como graves secuelas entre los habitantes del área y sus descendientes. El número total de afectados por la enfermedad de Minamata se ha establecido en alrededor de 3.000 muertos y más de 10.000 enfermos. Es reconocida como una de las contaminaciones medioambientales más importantes del siglo XX (Eto, 2000).

2. Valores de referencia

La IARC considera que no hay evidencias suficientes ni en animales ni en humanos para considerar el mercurio como carcinógeno (grupo 3). Se considera que los niveles normales de Hg en sangre son los inferiores a 10 µg/L, y en orina, aquellos por debajo de 20 µg/L. Como en el resto de metales, para la desintoxicación gene-

ralmente se recurre al tratamiento con quelantes (Ferrer, 2003).

3. Concentración de mercurio en alimentos

Las concentraciones de mercurio encontradas en alimentos de consumo humano son relativamente bajas. En el estudio del Laboratorio de Toxicología y Salud Medioambiental de la Universidad «Rovira i Virgili», solo se detectó mercurio en pescado y marisco (Tabla 17.11).

Los niveles más apreciables de este metal en alimentos también fueron hallados en este mismo grupo alimenticio (con una media de 0,097 µg/g). En ambos casos, la determinación fue de mercurio total (orgánico + inorgánico).

La investigación desarrollada en Huelva por Bordajandi *et al.* (2004) también demostró que el grupo alimenticio comprendido por pescado y marisco es el que tiene una mayor concentración de mercurio total: entre 0,0234 y 0,549 µg/g peso fresco (almeja y cazón, respectivamente).

Como ya se ha comentado, el metilmercurio es la principal forma orgánica del mercurio. Microorganismos acuáticos de diversos géneros, principalmente metanogénicos e instalados en los sedimentos marinos, pueden transformar el mercurio elemental y el inorgánico en mercurio orgánico. Así pues, los organismos mari-

Tabla 17.11. Concentración de mercurio ($\mu\text{g}/\text{g}$ peso fresco) en alimentos de diversa procedencia.

	Tarragona 1998 ^a	Tarragona 2003 ^b	Cataluña 2001 ^c	Huelva 2004 ^d
Vegetales	nd	nd	0,001	0,0018-0,0033
Legumbres	nd	nd	0,001	—
Pan y cereales	nd	nd	0,030	0,0134
Tubérculos	nd	nd	0,003	0,003
Fruta	nd	nd	0,001	0,0054-0,0074
Pescado y marisco	0,089	0,058	0,097	0,0234-0,549
Carne	nd	nd	0,012	0,0035-0,237
Huevos	nd	nd	0,008	0,0057
Derivados lácticos	nd	nd	0,012	0,0033
Leche	nd	nd	0,003	0,0032-0,0033
Grasas	—	—	0,030	0,001-0,002

^a Llobet *et al.* (1998)^b Bocio *et al.* (2005)^c Llobet *et al.* (2003)^d Bordajandi *et al.* (2004)

nd: no detectado

nos serían los más expuestos al metilmercurio debido a la proximidad de estos a las fuentes. Entre ellos, los seres vivos más longevos son los que presentan concentraciones más elevadas de

metilmercurio (tiburón, pez espada, caballa y blanquillo), debido a la capacidad de este contaminante a bioacumularse en tejidos animales (US EPA, 2004). Recientemente, Sanz Landa-

Tabla 17.12. Consumo diario de mercurio (μg) y porcentaje de ISTP que representa para diferentes grupos de población^a.

	10-17 años	18-24 años	25-44 años	45-64 años	65-75 años
Vegetales	0,06	0,08	0,09	0,11	0,09
Legumbres	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Pan y cereales	7,41	6,21	5,79	4,65	3,96
Tubérculos	0,21	0,19	0,18	0,19	0,17
Fruta	0,07	0,07	0,10	0,15	0,16
Pescado y marisco	4,07	4,56	5,63	7,66	6,31
Carne	1,42	1,38	1,51	1,28	0,95
Huevos	0,18	0,20	0,19	0,19	0,16
Derivados lácticos	1,44	1,32	1,38	1,08	0,96
Leche	0,77	0,69	0,57	0,59	0,60
Grasas	1,11	1,14	1,14	1,11	0,99
Total	16,74	15,84	16,59	17,02	14,34
%ISTP	43,4	35,8	37,5	38,4	31,9

^a A partir de los datos de Llobet *et al.* (2003) y Serra-Majem *et al.* (2003).

luze *et al.* (2004) analizaron la concentración de metilmercurio en hígado de lisas procedentes del estuario de Nerbioi-Ibaizabal (País Vasco). Se observaron valores de entre 8,6 y 91 ng/g p.s., en función del punto de muestreo. Teniendo en cuenta que el mercurio en peces se encuentra entre un 70 y un 100% en su forma metilada (Storelli *et al.*, 2003), los valores serían muy similares a los observados en distintas investigaciones llevadas a cabo en España.

Partiendo de los datos de Llobet *et al.* (2003) y del reciente estudio de hábitos dietéticos en Cataluña (Serra-Majem *et al.*, 2003), la ingesta de mercurio se establece en 15,78 µg/g para las mujeres adultas, y 18,67 µg/g para los hombres residentes en dicha comunidad (Tabla 17.12).

Urieta *et al.* (1996) describieron un consumo diario de mercurio en 18 µg (Tabla 17.13). Con anterioridad, Schuhmacher *et al.* (1994) habían determinado en 16 µg/día la ingestión de mercurio por el consumo de productos locales marinos por parte de los habitantes de la provincia de Tarragona.

Los alimentos que más contribuyeron fueron, pan y cereales, por un lado, y pescado y marisco, por otro (Figura 17.4). En el caso de los productos relacionados con los cereales (pan, bollería y cereales), el consumo diario por parte de la población es muy significativo, especialmente

Tabla 17.13. Ingestas diarias de mercurio (µg) en diferentes países.

Lugar	Valor	Referencia
Andalucía (Huelva)	7.7	Bordajandi <i>et al.</i> (2004)
Cataluña	21	Llobet <i>et al.</i> (2003)
Dinamarca	3.3	Larsen <i>et al.</i> (2002)
Gran Bretaña	31	Ysart <i>et al.</i> (2000)
Gran Bretaña	5	Ysart <i>et al.</i> (1999)
Tarragona	5	Llobet <i>et al.</i> (1998)
Egipto	78	Saleh <i>et al.</i> (1998)
País Vasco	18	Urieta <i>et al.</i> (1996)
Nueva Zelanda	13	Vannoort <i>et al.</i> (1995)
USA	8	Gunderson <i>et al.</i> (1995)

para los hombres (154 y 213 g/día para población adulta femenina y masculina, respectivamente). Aunque la concentración de mercurio en estos alimentos no sea elevada, la suma total provoca que sea una de las principales vías por las que se ingiere este metal. Por otro lado, como ya se ha comentado, pescado y marisco son los grupos que registran unos niveles más altos de mercurio. En consecuencia, a pesar que el consumo diario de estos es menor (cerca de 60 g/día), la ingesta de mercurio a través del pescado sigue siendo importante.

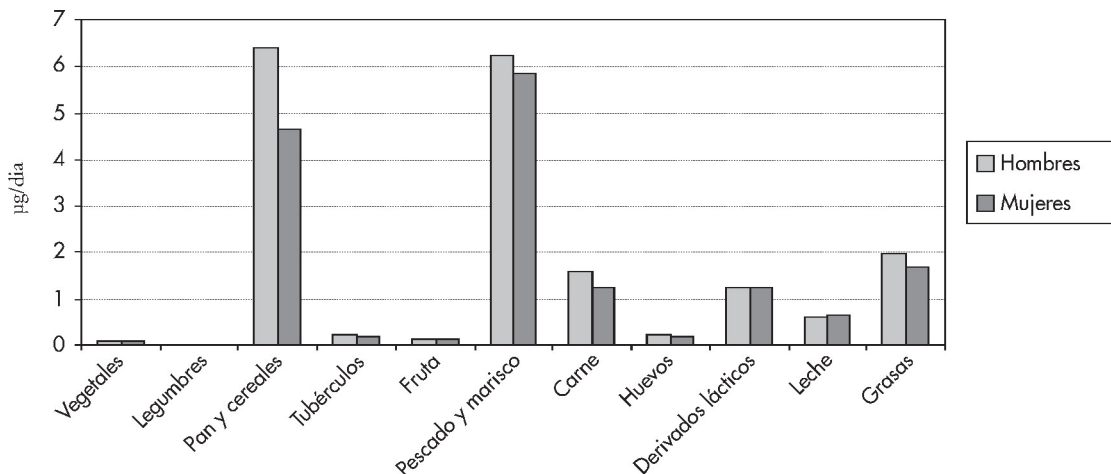


Figura 17.4. Ingesta diaria de mercurio (en µg) en función del tipo de alimento para hombres y mujeres adultos.

4. Evaluación del riesgo

La ISTP para el mercurio está establecida en 5 µg/kg de peso corporal o bien 43 µg/día para un individuo de 60 kg (WHO, 1993). En todos los casos, los niveles encontrados en alimentos de España son menores al 40% de este valor. Para el metilmercurio, el límite semanal está marcado en 3,3 µg/kg de peso corporal (28 µg/día para un individuo de 60 kg), aunque con fecha 12 de mayo de 2004, a través de una nota informativa, la Unión Europea manifestó el interés en rebajar este valor a la mitad (1,6 µg/kg de peso corporal) (Comisión Europea, 2004). Si se considera el peor escenario, es decir, que todo el mercurio está en su forma orgánica en base a los datos para Cataluña, la ingesta de pescado y marisco no supondría ningún riesgo para la salud de las personas, ya que en ningún caso superaría el límite marcado por la OMS. De modo específico, el porcentaje respecto a la ISTP es de 40,2% en el caso de las mujeres adultas, y de 37,3% en el caso de los hombres.

Bibliografía

- ATSDR (1999a) *Toxicological profile for lead*. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, Georgia.
- ATSDR (1999b) *Toxicological profile for mercury*. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, Georgia.
- Bocio A, Nadal M, Domingo JL (2005). Human exposure to metals through the diet in Tarragona, Spain: temporal trend. *Biol Trace Elem Res* 104: 193-202.
- BOE (2000) Boletín Oficial del Estado n.º 88, de 24 de marzo. *Real Decreto 403/2000*.
- BOE (2001) Boletín Oficial del Estado n.º 162, de 6 de julio. *Real Decreto 785/2001*.
- BOE (2003) Boletín Oficial del Estado n.º 45, de 21 de febrero. *Real Decreto 140/2003*.
- Bordajandi LR, Gómez G, Abad E, Rivera J, Fernández-Bastón MM, Blasco J *et al.* (2004). Survey of persistent organochlorine contaminants (PCBs, PCDD/Fs, and PAHs), heavy metals (Cu, Cd, Zn, Pb, and Hg), and arsenic in food samples from Huelva (Spain): Levels and health implications. *J Agric Food Chem* 52: 992-1001.
- Clarkson TW, Magos L, Myers GJ (2003). The toxicology of mercury – Current exposures and clinical manifestations. *N Engl J Med* 349: 1731-1737.
- Collins JF, Brown JP, Painter PR, Jamall IS, Zeise LA, Alexeeff GV *et al.* (1992). On the carcinogenicity of cadmium by the oral route. *Regul Toxicol Pharmacol* 16: 57-72.
- Comisión Europea (2004) Nota de información: *Metilmercurio en pescado y productos de la pesca*. Dirección General de Salud y Protección del Consumidor. Bruselas, 12 de mayo.
- Counter SA, Buchanan LH (2004). Mercury exposure in children: a review. *Toxicol Appl Pharmacol* (en prensa).
- Departament de Medi Ambient (2002) *La qualitat de l'aire a Catalunya*. Dades manuals i automàtiques. Període 2001-2002. Direcció General de Qualitat Ambiental. Departament de Medi Ambient, Generalitat de Catalunya, Barcelona, 2002.
- Edmonds JS, Francesconi KA (1993). Arsenic in seafood: human health aspects and regulations. *Mar Pollut Bull* 26: 665-674.
- Elghany NA, Schumacher MC, Slattery ML, West DW, Lee JS (1990). Occupation, cadmium exposure, and prostate cancer. *Epidemiology* 1: 107-115.
- Ellen G, Egmond E, Van Loon, Sahertian JW, Tolsma K (1990). Dietary intakes of some essential and non-essential trace elements, nitrate, nitrite and N-nitrosamines by Dutch adults: estimated via a 24-hour duplicate portion study. *Food Addit Contam* 7: 207-221.
- Eto K (2000). Minamata disease. *Neuropathology* 20: S14-S19.
- Fernández-Álvarez F, Ternero M, Fernández AJ, Gutiérrez-Dabán A. Physical speciation of arsenic, mercury, lead, cadmium and nickel in inhalable atmospheric particles. *Anal Chim Acta* 524: 33-40.
- Ferrer A (2003). Metal poisoning. *An Sist Sanit Navar* 26 Suppl 1: 141-153.
- Fowler SW (1990). Concentration of selected contaminants in water, sediments and living organisms. In: Technical Annexes to the Report on the State of the Marine Environment, pp 143-208. UNEP Regional Seas Reports and Studies No 114/1.

- Gochfeld M (2003). Cases of mercury exposure, bio-availability, and absorption. *Ecotoxicol Environ Safety* 56: 174-179.
- Gordon RA, Roberts G, Amin Z, Williams RH, Paloucek FP (1998). Aggressive approach in the treatment of acute lead encephalopathy with an extraordinarily high concentration of lead. *Arch Pediatr Adolesc Med* 152: 1100-1104.
- Gordon JN, Taylor A, Bennett PN (2002). Lead poisoning: case studies. *Br J Clin Pharmacol* 53: 451-458.
- Gundersen EL (1995). FDA Total Diet Study, July 1986-April 1991: dietary intakes of pesticides, selected elements, and other chemicals. *J AOAC Int* 78: 1353-1363.
- Hornig CJ, Tsai JL, Lin SR (1999). Determination of the urinary arsenic, mercury, and selenium in steel production workers. *Biol Trace Elem Res* 70: 29-40.
- IARC (1980) *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man*, vol. 23. World Health Organization, Lyon, France.
- Kaise T, Watanabe S, Itoh K (1985). The acute toxicity of arsenobetaine. *Chemosphere* 14: 1327-1332.
- Larsen EH, Andersen NL, Moller A, Petersen A, Mortensen GK, Petersen J (2002). Monitoring the content and intake of trace elements from food in Denmark. *Food Addit Contam* 19: 33-46.
- Leblanc JC, Malmauret L, Guérin T, Bordet F, Boursier B, Verger P (2000). Estimation of the dietary intake of pesticide residues, lead, cadmium, arsenic and radionuclides in France. *Food Addit Contam* 17: 925-932.
- Llobet JM, Granero S, Schuhmacher M, Corbella J, Domingo JL (1998). Biological monitoring of environmental pollution and human exposure to metals in Tarragona, Spain. IV. Estimation of the dietary intake. *Trace Elem Electrolytes* 15: 136-141.
- Llobet JM, Falcó G, Casas C, Teixidó A, Domingo JL (2003). Concentrations of arsenic, cadmium, mercury, and lead in common foods and estimated daily intake by children, adolescents, adults, and seniors of Catalonia, Spain. *J Agric Food Chem* 51: 838-842.
- McIntosh DL, Spenglet JD, Özkaynak H, Tsai LH, Ryan PB (1996). Dietary exposure to selected metals and pesticides. *Environ Health Perspect* 104: 202-209.
- Mohri T, Hisanaga A, Ishinishi N (1990). Arsenic intake and excretion by Japanese adults: a 7-day duplicate diet study. *Food Chem Toxicol* 28: 521-529.
- Müller M, Anke M, Illing-Günther H, Thiel C (1998). Oral cadmium exposure of adults in Germany. 2: Market basket calculations. *Food Addit Contam* 15: 135-141.
- Nogawa K, Ishizaki A, Kobayashi E (1979). A comparison between health effects of cadmium and cadmium concentration in urine among inhabitants of the Itai-Itai disease endemic district. *Environ Res* 18: 397-409.
- NRC (2001) Arsenic in drinking water. Subcommittee on arsenic in drinking water, National Research Council. National Academy of Sciences. National Academy Press, Washington DC.
- Rayment GE (1995). Sources of cadmium in agricultural products, Invited National Cadmium Workshop, May 1995, DPIE/NFA, Canberra, Australia.
- Saleh ZA, Brunn H, Paetzold R, Hussein L (1998). Nutrients and chemical residues in an Egyptian total mixed diet. *Food Chem* 63: 535-541.
- Sanz P, Nogué S (1990). Intoxicación por metales de origen alimentario. *Med Clin (Barc)* 94: 215-217.
- Sanz Landaluze J, de Diego A, Raposo JC, Mada-riaga JM (2004). Methylmercury determination in sediments and fish tissues from the Nerbioi-Ibaizabal estuary (Basque Country, Spain). *Anal Chim Acta* 508: 107-117.
- Schuhmacher M, Batista J, Bosque MA, Domingo JL, Corbella J (1994). Mercury concentrations in marine species from the coastal area of Tarragona Province, Spain. Dietary intake of mercury through fish and seafood consumption. *Sci Total Environ* 156: 269-273.
- Schuhmacher M, Bocio A, Agramunt MC, Domingo JL, de Kok HAM (2002). PCDD/F and metal concentrations in soil and herbage samples collected in the vicinity of a cement plant. *Chemosphere* 48: 209-217.
- Serra-Majem L, Ribas L, Salvador G, Castells C, Serra J, Jover L *et al.* (2003). *Avaluació de l'estat nutricional de la població catalana 2002-2003. Evolució dels hàbits alimentaris i del consum d'aliments i nutrients a Catalunya (1992-2003)*. Direcció General de Salut Pública. Departament de Sanitat i Seguretat Social. Generalitat de Catalunya.
- Storelli MM, Giacomini-Stuffler R, Storelli A, D'Addabbo R, Palermo C, Marcotrigiano GO (2003). Survey of total mercury and methylmer-

- cury levels in edible fish from the Adriatic Sea. *Food Addit Contam* 20: 1114-1119.
- Urieta I, Jalón M, Eguileor I (1996). Food surveillance in the Basque Country (Spain). II. Estimation of the dietary intake of organochlorine pesticides, heavy metals, arsenic, aflatoxin M1, iron, and zinc through the Total Diet Study, 1990/91. *Food Addit Contam* 13: 29-52.
- US EPA (1996a) IRIS: Integrated Risk Information System. U.S. Environmental Protection Agency, Micromedex Inc., Englewood, CO.
- US EPA (1996b) Risk-based concentration table, January-June 1996. U.S. Environmental Protection Agency Region 3, Philadelphia, PA.
- US EPA (2004) What you need to know about mercury in fish and shellfish. EPA-823-R-04-005. U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Environmental Protection Agency, Washington D.C.
- Vannoort RW, Hannah ML, Pickston L (1995b). 1990/91 New Zealand total diet survey. Part 2. Contaminant elements. ESR Client Report FW95/7. Wellington, New Zealand.
- WHO (1986) Regional Office for Europe. *Air quality guidelines. Vol. II*. World Health Organization, Geneva, 1-34.
- WHO (1992) Cadmium. Environmental Health Criteria 134, Geneva, Suiza.
- WHO (1993) Evaluation of certain food additives and contaminants. *Technical Report Series 837*, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Wilhelm M, Wittsiepe J, Schrey P, Feldmann C, Idel H (2003). Dietary intake of lead by children and adults from Germany measured by the duplicate method. *Int J Hyg Environ Health* 206: 493-503.
- Ysart G, Miller P, Crews H, Robb P, Baxter M, De L'Argy C *et al.* (1999). Dietary exposure estimates of 30 elements from the UK Total Diet Study. *Food Addit Contam* 16: 391-403.
- Ysart G, Miller P, Croasdale M, Crews H, Robb P, Baxter M *et al.* (2000). 1997 UK Total Diet Study-dietary exposures to aluminium, arsenic, cadmium, chromium, copper, lead, mercury, nickel, selenium, tin and zinc. *Food Addit Contam* 17: 775-786.

IMPORTANCIA DE LA ESPECIACIÓN DE ELEMENTOS EN TOXICOLOGÍA ALIMENTARIA

Ana Sayago, Ana M.^a Cameán, Manuel Repetto, Agustín G. Asuero.

Introducción y concepto de especiación. Importancia toxicológica de la especiación. Clasificación. Técnicas analíticas aplicadas a los estudios de especiación. Ejemplos de elementos cuya especiación reviste interés toxicológico. Bibliografía.

«Speciation is of prime importance in studies of the interactions of dissolved heavy metals with suspended particles, sediments surfaces and organisms. It is highly significant for concentration regulation in waters and for toxic effects. Thus species-sensitive methods of determination provide a much wider potential for application than methods which are only element specific».

H. W. Nürberg, *Anal Chim Acta* 164 (1984) 1-21.

Introducción y concepto de especiación

El término especiación denota, de acuerdo con la definición de la IUPAC, el proceso que da evidencia de la forma atómica o molecular de un analito, refiriéndose, por tanto, solo a su análisis cualitativo (Evans, 2003). Se añade la palabra análisis con el propósito de incluir el proceso de determinación cuantitativa de componentes traza. El análisis de especiación de elementos traza se refiere, pues, a nuestra capacidad de definir qué formas de un elemento dado aparecen en una muestra concreta y a qué niveles se encuen-

tran presentes estas especies. El significado de la palabra «elemento» en el contexto del análisis por especiación, se restringe en determinadas ocasiones a metales y metaloides, con objeto de evitar la connotación «especiación de carbono» en lugar de análisis orgánico. La definición tiende a restringir el término especiación al estado de distribución de un elemento entre diferentes especies químicas en una muestra. En la práctica, no obstante, su uso es mucho más amplio, especificando bien la transformación y/o distribución de especies, o la actividad analítica, para identificar las especies químicas y medir su distribución. La actividad analítica implicada en la identificación y medida de especies se define como análisis por especiación. Dependiendo del

alcance y propósito de la investigación, el análisis por especiación puede llevarse a cabo de varias maneras diferentes.

Muchos procedimientos antiguos, en especial los utilizados en la determinación de compuestos orgánicos, se han aplicado durante largo tiempo sin recurrir al uso del término especiación. Sobre 1950, el análisis por especiación se conectaba solo con los ciclos biológicos de los metales en la hidrosfera, y se distinguían dos formas metálicas: formas metálicas solubles y metales absorbidos sobre materia suspendida. Entonces era suficiente filtrar la muestra acuosa a través de un filtro de tamaño de poro de 0,45 µm para obtener la separación de las dos fases. Más tarde, el desarrollo de los métodos electroquímicos hizo posible diferenciar entre las diversas formas solubles: iones metálicos libres y complejados. Investigaciones paralelas de los posibles estados de equilibrio entre iones y ligandos (orgánicos e inorgánicos también) permitieron concluir qué metal se presentaba en una amplia variedad de formas en el agua como medio. Hoy día, el análisis por especiación incluye no solamente metales, sino también otros elementos en diversos tipos de muestras.

La especiación se refiere, por tanto, al análisis dirigido hacia el reconocimiento de las formas fisicoquímicas de una sustancia en el curso del cual no solo se determina el contenido total de un componente, sino también la forma en que se encuentra presente en una matriz concreta (estado de oxidación, acuo- o ión complejo, polímero molecular, partícula coloidal, etc.) cuali y cuantitativamente (Ure y Davidson, 1995). *La especiación define, pues, el estado de oxidación, la concentración y la composición de cada especie presente en una muestra, ya sea de interés ambiental y/o toxicológico.*

Importancia toxicológica de la especiación

La presencia de compuestos organometálicos en el medio ambiente ha despertado un gran interés

debido a su asociación con la fase lipídica en los sistemas biológicos (posibilidad de atravesar las membranas celulares) o la capacidad para reaccionar con las estructuras celulares, y al aumento de la toxicidad resultante. La adquisición de información molecular de las especies individuales implicadas en biosíntesis inducidas por metales y procesos de biotransformación, por otra parte, es esencial de cara a la interpretación de los mecanismos de acción en estudios metabólicos y farmacocinéticos. Este reconocimiento de que la biodisponibilidad, metabolismo y toxicidad de los elementos traza depende de su especiación ha estimulado la investigación en diferentes áreas, como la toxicología y la química ambiental, la nutrición, etc.

Metales y metaloides se presentan en todos los compartimientos de nuestro medio ambiente, y las rutas ambientales que siguen estos elementos son de elevada importancia en relación con su toxicidad hacia la flora y la fauna. Sus niveles de concentración, movilidad, y procesos de transformación y acumulación en los ecosistemas dependen de parámetros tales como pH, condiciones redox, estados de oxidación, temperatura, presencia de materia orgánica y actividad microbiana. Todos estos factores influyen fuertemente los ciclos biogeoquímicos de los elementos en nuestro medio ambiente.

La necesidad de determinar las formas químicas de los elementos se plantea cuando se sabe que estas especies tienen una conducta e impacto diferentes, en términos de toxicidad o movilidad. La toxicidad de los metales depende principalmente de su forma química, no de su contenido total (Quevauviller *et al.*, 1993). Tanto los diferentes estados de oxidación de un elemento, como los diferentes compuestos inorgánicos u orgánicos de los que forman parte, implican diferencias en las propiedades tanto estructurales como fisicoquímicas, y consecuentemente, diferencias con respecto a la absorción, transporte, distribución, acumulación y efecto final (Soria *et al.*, 1995). Las medidas de concentración total de elementos traza proporcionan escasa información sobre su actividad biológica,

puesto que las distintas especies se asimilan de forma diferente.

Consecuentemente, el análisis de las concentraciones totales de elementos contaminantes no basta, por lo que se requiere un replanteamiento de las políticas de gestión de contaminantes, hecho que se reconoce en las diversas regulaciones gubernamentales (Agencia de Protección del Medio Ambiente, EPA; Organización para la Alimentación y Agricultura, FAO; Comisión Europea del Medio Ambiente, EEC, etc.).

La necesidad de determinar las diferentes especies de elementos traza, tanto en el medio ambiente como en materiales biológicos, se ha convertido en estas últimas décadas en un reto, jugando un papel fundamental en diversas áreas, entre las que se pueden destacar, la química medioambiental, la toxicología (determinación de la toxicidad y ecotoxicidad de elementos), la bromatología y nutrición (Quinteros *et al.*, 2001), el control de calidad de productos farmacéuticos y medicamentos, la química clínica, la

evaluación del impacto de instalaciones tecnológicas, la exposición ocupacional, etc. (Kot y Namiesnik, 2000).

Los efectos perjudiciales de las diferentes formas químicas de los contaminantes metálicos se observan durante la monitorización de los distintos compartimientos ambientales (aire, aguas naturales, suelos, sedimentos, biota). Ejemplos como la determinación de organoplúmbicos en gasolina con plomo, organoestánnicos emitidos por pinturas antiincrustantes, o la discriminación entre mercurio iónico y metilmercurio en el medioambiente, clínica y muestras de alimentos (dada su diferente toxicidad) han sido durante mucho tiempo áreas de interés preferente en especiación. La Tabla 18.1 muestra ejemplos de las principales áreas de aplicación del análisis de especiación.

La contaminación de los alimentos por metales pesados ha sido y continua siendo probablemente uno de los aspectos más serios y preocu-

Tabla 18.1. Principales áreas de análisis de especiación (Tomada de Kot y Namiesnik, 2000).

Aluminio, Al	Productos de polimerización. Formas de aluminio (e.g., lábil, complejado) en suero. Formas de aluminio en productos alimentarios.
Antimonio, Sb	Formas redox y compuestos orgánicos en el medio ambiente y en productos alimentarios.
Arsénico, As	Formas redox y compuestos organoarsénicos en el medio ambiente. Proteínas enlazadas a arsénico en suero y hemoglobina. Arsénico en productos alimentarios. Formas de arsina, H ₃ As (hidruro arsenioso), en interiores de lugares de trabajo.
Cadmio, Cd	Complejos organocádmicos unidos a metalotioneina.
Cromo, Cr	Formas redox de cromo Cr(VI), en el medio ambiente.
Estaño, Sn	Formas organometálicas en el medio ambiente y en productos alimentarios (e.g. conservas de pescado).
Fósforo, P	Fosfina (fosfuros de hidrógeno) en atmósferas internas en lugares de trabajo.
Hierro, Fe	Fe (II) y Fe(III) en alimentos.
Iodo, I	Iodo formado en el medio y fluidos biológicos.
Mercurio, Hg	Formas de compuestos de mercurio en el medio ambiente y alimentos (en particular metilmercurio).
Platino, Pt	Formas inorgánicas en el medio ambiente.
Plomo, Pb	Formas de compuestos de plomo en el medio ambiente: compuestos de plomo trialkilados.
Selenio, Se	Compuestos inorgánicos y organometálicos en el medio ambiente y en alimentos.
Serie de los actínidos	Formas químicas de compuestos en el medio ambiente y en lugares de almacenamiento de residuos radiactivos.

pantes. El desastre de Minamata en Japón, originado por niveles elevados de metilmercurio en alimentos marinos, tuvo como consecuencia daños permanentes en el sistema nervioso de los adultos y niños afectados (Evans, 2003). Este y otros incidentes posteriores han generado una gran atención pública acerca de este problema. Metales como plomo, cadmio, mercurio, que intoxican el ganado o el pescado, pueden ejercer efectos tóxicos acumulativos sobre los consumidores de estos alimentos contaminados de origen animal. Estos elementos, junto con el arsénico, y en ciertas ocasiones el antimonio y el talio, entre otros, son de una particular importancia en ecotoxicología.

Una de las vías más significativas de entrada de los metales tóxicos en las cadenas alimentarias es la atmósfera. Los metales se depositan tanto por vía seca como por vía húmeda en los ecosistemas terrestres y acuáticos, haciendo de los alimentos la fuente más importante de entrada en el organismo de los xenobióticos. La deposición atmosférica de metales pesados, tales como plomo y cadmio, especialmente en ambientes urbanos, puede contaminar vegetales.

Los compuestos organomercuriales se han empleado ampliamente en la industria y en la agricultura. Muchas de sus aplicaciones provienen de su efectividad y potencia como fungicidas de amplio espectro.

Los compuestos orgánicos de estaño encuentran amplio uso y aplicación debido a su actividad fungicida y como estabilizadores del cloruro de polivinilo. El estaño inorgánico, la forma en que se presenta predominantemente el estaño como contaminante de los alimentos al nivel de varios cientos de ppm, es relativamente poco tóxico; de aquí que se haya prestado escasa atención a su determinación en alimentos.

Los compuestos organometálicos, por lo general, son más tóxicos que los compuestos inorgánicos, y en virtud de su elevada liposolubilidad plantean un gran riesgo sanitario.

Los compuestos inorgánicos de arsénico se han utilizado como plaguicidas desde hace más de 250 años y, en la actualidad, diversos compuestos inorgánicos y orgánicos de arsénico se

utilizan como insecticidas, herbicidas y fungicidas, encontrándose asimismo como impurezas en fertilizantes fosfatados. Los compuestos organoarsenicales también se utilizan popularmente como aditivos animales, añadiéndose al pienso, por ejemplo, de aves de corral y cerdos, para estimular su crecimiento y controlar enfermedades. Consecuentemente, las aves de corral, en sus huevos y carnes pueden contener niveles de arsénico más elevados.

Las cosechas incorporan cantidades variables de contaminantes de acuerdo con la naturaleza del suelo, fertilizantes, tratamiento con insecticidas y proximidad a zonas industriales. La posterior recolección de cosechas, almacenamiento, procesamiento y envasado, en especial el enlatado, también pueden afectar al contenido de contaminantes en los alimentos que se consumen. No todos estos procesos tienden a aumentar la contaminación; por ejemplo, el rechazo de hojas externas, así como el lavado y cocción de los alimentos, puede conducir a una reducción.

La composición natural de determinados elementos metálicos en alimentos puede, pues, no solo aumentar por contaminación accidental, sino también como consecuencia de los procesos de fabricación y envasado. Una vía adicional de entrada de los elementos en la cadena alimentaria es a partir de los utensilios de cocina. Por ejemplo, con el uso de los aceros inoxidable en recipientes y utensilios de cocina, existe la posibilidad de contaminación por níquel al tratar los alimentos, aunque actualmente está prohibida la presencia de níquel en estos utensilios. El cadmio, el aluminio y el cromo, entre otros elementos, pueden entrar también en la cadena alimenticia a partir de los utensilios de cocina (Deshpande, 2002).

Hoy día son necesarias las medidas de especiación para el estudio de la toxicidad de metales sobre organismos acuáticos y alimentos y para un mejor conocimiento del transporte de elementos traza en ríos y estuarios. El conocimiento de la especiación de los elementos ambiental y biomédicamente relevantes, así como su distribución en diferentes formas,

reviste importancia, ya que la actividad biológica y toxicidad dependen críticamente de la forma química. Las medidas de concentración total de elementos traza proporcionan escasa información sobre su actividad biológica, puesto que las distintas formas se asimilan de forma diferente.

Se reconoce en la actualidad que la legislación internacional acerca del contenido de elementos traza en alimentos, en el medio ambiente o en el ambiente laboral, se basa en los contenidos totales de los elementos, proporcionándose los correspondientes límites máximos o niveles guía de los mismos, siendo escasas las regulaciones que tienen en cuenta las especies moleculares de los elementos.

Existe, por tanto, una especie de círculo (Berg y Larsen, 1999) (Figura 18.1), en el que el progreso de las investigaciones no repercute sobre la legislación de los elementos en cuestión, y consecuentemente, los legisladores continúan estableciendo datos sobre el contenido total de los mismos. Una situación que ha de cambiar, intentando romper, por ejemplo, dicho círculo vicioso.

Es necesario realizar y publicar investigaciones específicas acerca de las posibles especies

de contaminantes y nutrientes minerales desde distintas disciplinas: investigaciones analíticas, toxicológicas, nutricionales y epidemiológicas. Hay necesidad, por ejemplo, de validar métodos de control de tipo rutinario, incluyendo materiales de referencia certificados de formas o especies específicas. En segundo lugar, debe existir una buena comunicación entre dichos resultados relevantes, obtenidos en las investigaciones, y los legisladores, con el objetivo final de establecer regulaciones específicas de especies individuales de elementos de interés biológico y toxicológico.

Clasificación

El interés en química medioambiental y toxicológica, se ha centrado en el estudio de la producción natural de organoelementos en el medio ambiente, el destino de los contaminantes antropogénicos (degradación, reparto en la biota, transporte a largo plazo) y la transformación de organoelementos vía procesos bióticos en ciclos biogeoquímicos.

Las especies de interés pueden dividirse en tres amplios grupos (Tabla 18.2) (Lobinski, 1994).

Históricamente, el área de investigación relacionada con la especiación ha sido la diferenciación de *especies redox*, una de las cuales es a menudo tóxica, mientras que la otra es prácticamente inocua o incluso puede ser esencial.

El segundo grupo está formado por especies simples *organoelementos* (alquil y aril). Las especies metilelemento suelen ser de origen natural (excepto Pb y parcialmente Hg) mientras que por lo general, las especies con un número elevado de átomos de carbono se sintetizan con un propósito específico. Estas especies son muy versátiles en sus usos y aplicaciones puesto que las propiedades químicas y biológicas pueden modificarse variando la naturaleza de los grupos orgánicos. Las especies plomo

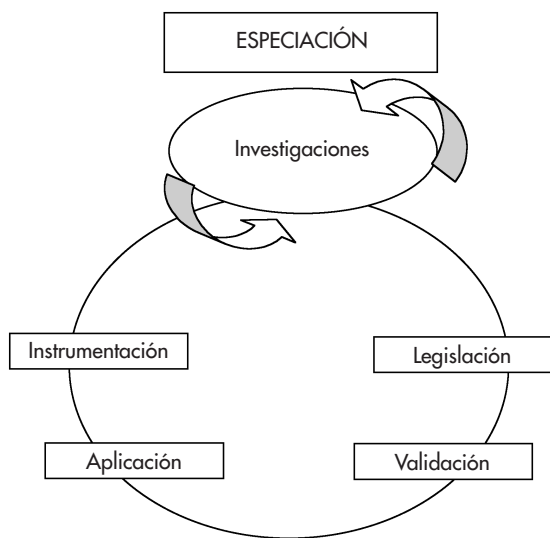


Figura 18.1. El círculo de la especiación (tomado de Berg y Larsen, 1999).

Tabla 18.2. Especies de interés en la especiación de elementos.

Sistemas redox:	Se(IV), Se(VI); As(III), As(V); Sb(III), Sb(V); Cr(III), Cr(VI); Fe(II), Fe(III)
Especies aquil-elemento:	Metil-Hg, Ge, Sn, As, Sb, Se. Etil- Pb, Hg. Butil Sn Ciclohexil- Sn Octa- Sn
Compuestos de masa molecular elevada:	metaloproteínas, metaloporfirinas, metalofármacos, metaloenzimas.

tetra-alquilo (metil, etil, y mixtas metil-etil) se usan como aditivos antidetonantes de la gasolina. Butil, fenil, y ciclohexil-estaño se emplean como biocidas en pinturas antiincrustantes y en agricultura; y el octilestaño como agente estabilizador de plásticos.

El último grupo de interés en análisis de especiación son los metalocompuestos de elevada masa molecular, particularmente importantes en química clínica y en toxicología, así como en la industria relacionada con la energía (metaloporfirinas).

En contraste con los materiales inorgánicos, donde el número de especies elementales es relativamente pequeño, los elementos traza pueden encontrarse presentes en la materia viva en una gran variedad de formas químicas. Sin embargo, cuando se toman en consideración los principales campos de aplicación, pueden distinguirse dos grupos principales, los que forman parte de compuestos con una masa molecular relativamente pequeña, o bien los englobados en macromoléculas.

Técnicas analíticas aplicadas a los estudios de especiación

El reconocimiento de riesgo medioambiental de los compuestos organometálicos y el creciente

interés de su especiación en otros campos, tales como la toxicología alimentaria, han creado la necesidad de disponer de métodos analíticos rápidos, selectivos y sensibles para su determinación. El requisito previo para que un procedimiento sea válido es la capacidad para discriminar entre diferentes formas químicas del mismo elemento, tanto en forma orgánica como inorgánica.

Las medidas de especiación presentan dificultades, pero han mejorado bastante con los avances conceptuales llevados a cabo en la metodología analítica en las últimas décadas y también con el uso de los modernos ordenadores y «software», por lo que los resultados obtenidos con las técnicas experimentales de medida pueden extrapolarse hasta niveles de detección previamente inalcanzables.

El análisis de especiación se encuentra afectado con frecuencia por el problema de la labilidad. Si se cambian las condiciones ambientales que prevalecen en sistemas industriales, biológicos o medioambientales, se perturban a menudo los equilibrios existentes. En estas circunstancias, las especies detectadas y monitorizadas no son representativas de las realmente presentes. Esto obliga a efectuar una extrapolación retrospectiva de las experiencias llevadas a cabo, o bien, a aplicar métodos de análisis no invasivos. Algunos investigadores se decantan por la simulación (aproximación no perturbadora) que combina extensas bases de datos de constantes fisicoquímicas, análisis de componentes totales para una experiencia dada, y programas de ordenador para efectuar los cálculos de especiación.

Los métodos instrumentales clásicos empleados en la química bioinorgánica y de productos naturales, tales como resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopía Mössbauer y espectroscopías electrónica, vibratoria o de difracción circular, no son adecuados para el estudio de la especiación de elementos trazas, lo que ha motivado el rápido desarrollo de aproximaciones basadas en técnicas hifenadas (tandem, acopladas, híbridas). Los pioneros en el uso de estas técnicas fueron Van Loon y Suzuki en 1970. Una técnica de separación cromatográfica

combinada con una detección sensible y selectiva de una especie, en general un espectrómetro, constituye un ejemplo típico, aunque también se utilizan las reacciones químicas postcolumna y detectores electroquímicos.

Entre las técnicas de separación y detección en uso, la cromatografía de gases (GC) goza de la mayor popularidad, puesto que es superior a la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en términos de resolución, facilidad de interfase eficiente a un espectrómetro atómico y disponibilidad de detectores selectivos y sensibles. La extracción con fluidos supercríticos y la cromatografía tienen todavía mucho que aportar en lo que se refiere a las aplicaciones en análisis de especiación. El uso consecutivo de técnicas con mecanismos de separación y el uso creciente de técnicas específicas de determinación de estruc-

turas, tal como la espectrometría de masas con atomización electrostática acoplada con masas (ESMS/MS) están siendo, cada vez en mayor medida, objeto de aplicación. Asimismo, el advenimiento de métodos de preparación de especies basados en técnicas de biología molecular es inminente. En la Tabla 18.3 se resumen las técnicas analíticas comúnmente utilizadas para el análisis de especiación.

Como se ha descrito, los métodos analíticos empleados para la determinación de las diferentes especies de un elemento están basados en etapas sucesivas que pueden variar según el procedimiento utilizado; no obstante, todos ellos presentan un esquema común que nos permite evaluar las posibles fuentes de error a la que están sometidos. La Tabla 18.4 resume los pasos del procedimiento de especiación y las principa-

Tabla 18.3. Aplicación de técnicas analíticas al análisis de especiación.

Técnicas		Aplicación
Cromatografía de gases	Se utiliza con diferentes detectores, frecuentemente, no selectivos.	Determinación de compuestos alquil- elemento de Ge, Sn, Pb, As, Sb, Se. Separación de metaloporfirinas.
Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	Con detectores como UV-vis, fluorescencia, absorción atómica electrotérmica (ETAAS), ICP-MS, ICP-AES, espectrometría fluorescencia atómica. – Cromatografía de fase inversa. – Cromatografía de exclusión. – Cromatografía de intercambio iónico (catiónico/aniónico).	Especiación de Al, Cr, V, Hg, Se, Cu, Zn, Fe, Cd, As, Sb..., etc.
Electroforesis	Técnica basada en la separación en un campo eléctrico que se realiza en sus tres modos básicos: – zona – isoeléctrico – isotacoforesis.	Especiación de compuestos de As y Se. Análisis de Hg. Separación de Metaloproteínas, fosforo-proteínas y selenoproteínas. Separación de metaloenzimas.
Polarografía Voltamperometría catódica y de inversión anódica	Técnicas utilizadas para la diferenciación de los diferentes estados de oxidación de un elemento.	Análisis de especiación de Sn.
Electrodos ion-selectivos	Técnica utilizada para la determinación de elementos en diferentes estados de oxidación. (baja sensibilidad).	Análisis de especiación de Cd y Cu en presencia de ácidos húmico y fúlvico.
Espectroscopia electrónica y EPR (resonancia de spin electrónico)	Raramente aplicadas.	Especiación de Fe en fluidos biológicos en presencia de ascórbico y oxígeno.
Resonancia magnética nuclear (NMR)	Su área de aplicación es cada vez más amplia.	Determinación de compuestos de aluminio.

Tabla 18.4. Principales fuentes de error del proceso de especiación.

Etapa	Método	Fuente de error
Almacenamiento y secado de la muestra	Almacenamiento húmedo Congelación Secado Liofilización	Inestabilidad de los compuestos (volatilización, degradación)
Pretratamiento	Extracción	Extracción incompleta/cambio de la especie inicial. Pérdidas durante la etapa de limpieza (<i>clean-up</i>)
Derivatización	Generación de Hidruros Vapor frío Etilación, etc.	Inhibición Transformación incompleta Descomposición
Separación	GC, HPLC, etc.	Descomposición de las especies Adsorción de las especies en la columna
Detección	Específica (AAS, ICP, MS...) No específica (FID, ECD...)	Interferencias Problemas durante la atomización o ionización.

les fuentes de error asociadas a los mismos (Quevauviller *et al.*, 1993).

Ejemplos de elementos cuya especiación reviste interés toxicológico

Se ha citado anteriormente que elementos tales como arsénico, cromo, mercurio, estaño y selenio, entre otros, presentan un elevado interés en el campo de la toxicología en general y de la toxicología alimentaria en particular, debido a que las distintas formas en las que pueden presentarse estos elementos en la cadena trófica dan lugar a diferencias en cuanto a su biodisponibilidad y toxicidad (Crews, 1998). A continuación se presentan las principales características de estos elementos, cuya especiación reviste especial importancia e interés.

1. Arsénico

Resulta particularmente difícil caracterizar al arsénico como un elemento simple, debido a la compleja química que presenta, y a la existencia de muy diversos compuestos de arsénico y especies arsenicales (Tabla 18.5) (Gong *et al.*, 2002).

Su ubicuidad en el medio ambiente y organismos vivos, y el hecho de que su toxicidad varíe extraordinariamente según su estado de oxidación y forma química, hacen que sea uno de los elementos tóxicos más estudiados, no solo en su contenido total, sino cuantificando sus diferentes especies (Ibáñez *et al.*, 1995).

Desde un punto de vista biológico y toxicológico, los compuestos de arsénico en sus dos estados de oxidación III y V pueden clasificarse en tres grupos principales. Un primer grupo formado por compuestos inorgánicos de arsénico, entre los cuales destacan como derivados del arsénico III, el trióxido de arsénico, el tricloruro de arsénico y el arsenito sódico, y como derivados del estado pentavalente, el pentóxido de arsénico, ácido arsénico y arseniatos. Un segundo grupo constituido por compuestos orgánicos del arsénico, como el ácido arsanílico, las formas metiladas tales como el ácido monometilarsónico (MMAA), el ácido dimetilarsónico (DMAA), trimetilarsina óxido (TMAO), así como arsenobetaina (AB), arsenocolina (AC) y los arsenoazúcares. Y un tercer grupo formado por el gas arsina o arseniuro de hidrógeno.

Los compuestos inorgánicos son mucho más tóxicos que las formas metiladas y estas a su vez más tóxicas que la arsenobetaina, arsenocolina y arsenoazúcares, generalmente reconocidos como prácticamente inocuos. Aunque

Tabla 18.5. Especies arsenicales comúnmente detectadas en el medio ambiente y muestras biológicas.

Nombre	Abreviatura	Fórmula química
Arsenito (ácido arsenioso)	As ^{III}	As(OH) ₃
Arseniato (ácido arsénico)	As ^V	AsO(OH) ₃
Ácido monometilarsónico	MMAA ^V	CH ₃ AsO(OH) ₂
Ácido monometilarsenioso	MMAA ^{III}	CH ₃ As(OH) ₂
Ácido dimetilarsínico	DMAA ^V	(CH ₃) ₂ AsO(OH)
Ácido dimetilarsenioso	DMAA ^{III}	(CH ₃) ₂ AsOH
Dimetilarsinoiletanol	DMAE	(CH ₃) ₂ AsOCH ₂ CH ₂ OH
Trimetilarsina óxido	TMAO	(CH ₃) ₃ AsO
Ión tetrametilarsonio	Me ₄ As ⁺	(CH ₃) ₄ As ⁺
Arsenobetaina	AB	(CH ₃) ₃ As+CH ₂ COO ⁻
Arsenobetaina 2	AB-2	(CH ₃) ₃ As+CH ₂ CH ₂ COO ⁻
Arsenocolina	AC	(CH ₃) ₃ As+CH ₂ CH ₂ OH
Trimetilarsina	TMA ^{III}	(CH ₃) ₃ As
Arsinas	AsH ₃ , MeAsH ₂ , Me ₂ AsH	(CH ₃) _x AsH _{3-x} (x = 0-3)
Etilmetilarsinas	Et _x AsMe _{3-x}	(CH ₃ CH ₂) _x As(CH ₃) _{3-x} (x = 0-3)
Ácido fenilarsónico	PAA	C ₆ H ₅ AsO(OH) ₂

MMAA y DMAA son considerados productos derivados de los procesos de detoxificación en humanos, hay evidencias de que son promotores de cáncer (Vela *et al.*, 2001).

Más de 400 artículos de investigación se han publicado entre los años 2000-2003 sobre el desarrollo y aplicación de técnicas y métodos de especiación de As, que han sido revisados y agrupados por Francesconi y Kuehnelt (2004).

El agua de bebida contiene normalmente niveles de arsénico inferiores a 5 µg/L (Goyer y Clarkson, 2001), y a excepción de algunos tipos de pescados, crustáceos y algas, la mayoría de los alimentos contienen bajos niveles de arsénico, generalmente por debajo de los 0.25 mg/kg (Ishinishi *et al.*, 1986). En zonas endémicas de altas concentraciones de As en aguas, como la región de Lagunera (México), este medio se ha asumido como la principal fuente de exposición al elemento; el As de estas aguas contaminadas empleadas en la cocción de alimentos puede ser transferido a los mismos, constituyendo su consumo una fuente importante adicional de exposición a As (Del Razo *et al.*, 2002). Las especies dominantes de As en aguas son arsenito y arseniatos inorgánicos, especies más tóxicas; los

organoarsenicales están presentes en aguas naturales, pero a concentraciones más bajas (Dasgupta *et al.*, 2002)

Los niveles de arsénico encontrados en alimentos y bebidas son un reflejo de la acumulación de este en el medio ambiente, ya sea por causas naturales o de origen antropogénico. Solo una pequeña parte de la exposición humana está bajo nuestro control, ya que los alimentos y bebidas constituyen la principal fuente de exposición al elemento, considerándose inevitable una ingesta de 45 µg/día y 10 µg/día a partir de agua y alimentos, respectivamente. Los contenidos de As en los alimentos suelen oscilar entre 0,05 y 40 (ATSDR, 2000).

La unión FAO/OMS y el Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA), recomiendan una ingesta semanal tolerable provisional (PTWI) para el arsénico inorgánico de 15 µg/kg peso corporal, que trasladado a la ingesta diaria es 2,1 µg/kg/día (FAO/WHO, 1989).

La concentración de As en el medio ambiente terrestre, incluyendo las plantas, vegetales de consumo humano, es generalmente baja (Helgesen y Larsen, 1998). El contenido de arsénico en vegetales está aparentemente relacionado con

el contenido de arsénico soluble en suelo, la composición de este y la especie de planta implicada. Por otra parte, la contaminación por el uso de insecticidas puede aumentar el contenido de arsénico en los vegetales, y así los vinos procedentes de cosechas tratadas con insecticidas arsenicales pueden contener niveles más elevados de este metal (Ishinishi *et al.*, 1986; Herce-Pagliai *et al.*, 2002).

La concentración de arsénico en organismos marinos y algas es en general mayor que la de otros alimentos. Numerosas especies de peces espinosos contienen entre 1 y 10 $\mu\text{g/g}$, mientras que los crustáceos, algas y peces que se alimentan en los fondos marinos pueden llegar a tener alrededor de 100 $\mu\text{g/g}$ de As en sus formas orgánicas tanto lipo como hidrosolubles.

Son numerosos los trabajos realizados sobre la especiación de arsénico en alimentos, especialmente en pescados y alimentos de origen marino, ya que, como hemos comentado, las concentraciones más elevadas de As se alcanzan en este tipo de alimentos y constituyen la fuente más significativa del mismo a través de la dieta (Muñoz *et al.*, 2000; Villa-Lojo *et al.*, 2002)).

En alimentos marinos la arsenobetaina es el compuesto encontrado con mayor frecuencia (Ibáñez *et al.*, 1995; Vélez *et al.*, 1995) seguida de DMAA y MMAA procedentes de la metilación del arsénico por el fitoplancton (Vélez *et al.*, 1996). La AB llega a alcanzar porcentajes del 81% del As total en pescado fresco (Vélez *et al.* 1995). En aquellos casos en los que el contenido total de As en pescados, moluscos y crustáceos es elevado pero el porcentaje de As como (AB) es bajo, Ibáñez *et al.* (1995) consideran necesario cuantificar las especies tóxicas, especialmente As(III) y As(V). En pescados en conserva se ha comprobado además que la especie dominante llega a ser DMAA, pudiéndose explicar este hecho como consecuencia de la degradación de AB, proceso llevado a cabo por enzimas endógenos o enzimas derivados de la actividad microbiana del alimento (Vélez *et al.*, 1996; Vélez y Montoro, 1998). En moluscos bivalvos el As se incorpora en forma de arseno-

azúcares, y estos dominan generalmente sobre AB (Larsen *et al.*, 1997). En crustáceos, AB y AC son dominantes (Fattorini *et al.*, 2004). También se ha detectado TMAO en diversas especies marinas, procedente de la descomposición microbiana de AB o por metilación de As(V) en las glándulas digestivas de los animales, mientras que la proporción de As inorgánico es muy baja en las especies marinas, constituyendo generalmente el 2% del contenido de As total (Brisbin *et al.*, 2002).

Podemos decir que la cantidad de arsénico ingerida diariamente por el hombre está influenciada en gran medida por la cantidad de productos de origen marino ingeridos, y que los patrones de distribución de las especies orgánicas arsenicales, tales como AB, AC, MMAA y DMAA muestran una gran variedad en este tipo de alimentos.

En peces de río y peces cultivados las principales especies fueron AB (92-100% en salmónidos) y DMAA; As(III) y TMAO fueron detectadas en bajas concentraciones en algunos ciprínidos. Algunos autores indican la existencia de una correlación entre la familia de pescado y el patrón de especiación de arsénico (Slejkovec *et al.*, 2004). Sin embargo, en zonas endémicas con altos contenidos de As inorgánico en aguas, y donde existe una alta prevalencia de la enfermedad de Blackfoot, el porcentaje de As inorgánico encontrado en peces cultivados fue superior a los registrados por otros autores, existiendo una correlación entre concentraciones de As en las aguas empleadas en acuicultura y las concentraciones de As inorgánico del alimento (Huang *et al.*, 2003).

En la dieta china, donde los alimentos de origen marino (algas, pescados, moluscos) constituyen una parte importante de la misma, se ha comprobado similarmente que el porcentaje de As inorgánico es bajo, inferior al 2% del As total, y entre las especies dominantes destacan AB y arsenoazúcares (Li *et al.*, 2003)

En alimentos infantiles se ha detectado As total principalmente en alimentos de origen marino, siendo AB la especie exclusivamente presente en la mayoría de las muestras (Pardo-

Martínez *et al.*, 2001; Viñas *et al.*, 2003). Arsénico inorgánico y DMAA son las especies mayoritarias en fórmulas infantiles a base de arroz y cereales, aunque también se han detectado trazas de MMAA (Vela y Heitkemper, 2004).

Si bien esta capacidad del pescado y moluscos para bioacumular la especie AB, otros alimentos como el arroz son capaces de acumular especies más tóxicas, como As inorgánico, MMAA y DMAA (Pizarro *et al.*, 2003), predominando entre las especies inorgánicas la forma arsenito (Kohlmeyer *et al.*, 2003). En zanahorias cultivadas en suelos contaminados con As se encontraron las especies As(III) y As(V) (Helgesen y Larsen, 1998), y su consumo aportó el 4% de la PTWI del As inorgánico establecida por FAO/WHO. También es posible detectar MMAA cuando las concentraciones de As son elevadas (Vela *et al.*, 2001).

Ciertos hongos superiores, algunos comestibles, son capaces de acumular As, de forma que en suelos contaminados procedentes de áreas industriales el consumo de los mismos puede tener implicaciones toxicológicas para la población. Los niveles de As total en la especie comestible *Laccaria amethystina* en áreas no contaminadas oscilaron entre 23-77 µg/g, mientras que se alcanzaron niveles de hasta 1.420 µg/g en zonas contaminadas. La especie dominante en esta especie resultó ser DMAA, lo cual demuestra que los hongos o sus bacterias asociadas pueden biosintetizar DMAA a partir de ácido arsénico del suelo; asimismo, se detectaron pequeñas cantidades de AB y trimetilarsina óxido (TMAO), lo cual implica que la síntesis de estas especies arsenicales no se restringe a la biota marina (Larsen *et al.*, 1998).

Se ha investigado en cervezas las posibles diferencias en la distribución de las especies arsenicales dependiendo del contenido alcohólico de las mismas. Si bien los contenidos medios de As total fueron similares en los dos tipos de cervezas estudiadas, cervezas denominadas con alcohol (cuyo contenido osciló 5-5,45 % v/v) y cervezas denominadas sin alcohol (0,62-1,29 % v/v de etanol), en las bebidas con mayor gra-

duación alcohólica la especie más abundante fue MMAA, seguida de DMA y As(III), de forma que las especies orgánicas cubrían prácticamente el total del contenido arsenical. Por el contrario, en las cervezas sin alcohol, el porcentaje de arsénico inorgánico fue similar al de especies orgánicas, de forma que las especies estaban presentes siguiendo el orden siguiente: As(III) >MMAA >DMMA. Teniendo en cuenta el consumo medio de cerveza, se estimó que la exposición dietética al As fue de 0,47 µg/persona/día, de los cuales 0,15 correspondieron a As inorgánico (32%). Dicha ingesta de As inorgánico fue inferior a la PTWI establecida por el Comité de Expertos FAO/OMS sobre Aditivos Alimentarios (Herce-Pagliai *et al.*, 1999).

Nuestro equipo de investigación, de forma similar, estudió la presencia de As total y de sus especies en 45 muestras de vino, con diferente graduación alcohólica: 15 muestras de vinos de Jerez (15% de alcohol), 15 vinos de mesa comerciales blancos(10-11%) y 15 mostos. De acuerdo con el rango de valores obtenido para As total de 2,1-14,6 µg/L de As, todas las muestras cumplieron el límite máximo permitido de 500 µg/L, no existiendo diferencias significativas en el contenido de As total en los diferentes tipos de muestras. En vinos, encontramos una predominancia de las especies orgánicas, siendo DMMAA o MMAA las especies predominantes, según el tipo de vino. En mostos, aumenta el porcentaje de As inorgánico hasta un 25%, y DMAA predomina sobre MMAA. Las ingestas diarias estimadas de As total y As inorgánico fueron de 0,78 y 0,15 µg/persona/día respectivas, lo cual sugiere que el consumo de este tipo de vinos no conlleva una contribución importante a la ingesta de As inorgánico en el caso de bebedores normales (Herce-Pagliai *et al.*, 2002).

Respecto a las dietas totales, en nuestro país se ha registrado una ingesta diaria total de As de 291 µg/día de As en el País Vasco (Urieta *et al.*, 1996), representando la proporción de As inorgánico en el grupo de consumidores de pescado un porcentaje muy bajo, del 0,3-1,8% (Urieta *et al.*, 2001).

2. Cromo

El cromo es un elemento abundante en la corteza terrestre, pudiendo encontrarse en diferentes estados de oxidación, tales como Cr(II), Cr(III) o Cr(VI). Sin embargo, son las formas trivalente y hexavalente las que presentan importancia biológica y toxicológica.

La forma trivalente es la más frecuente, resultando esencial para el hombre y los animales por el papel que desempeña en el metabolismo de la insulina como factor de tolerancia de glucosa (GTF), y en el metabolismo lipídico y de las proteínas, recomendándose una ingesta entre 50 y 200 µg/diarios (Lendinez *et al.*, 2001).

Los efectos adversos de este elemento en los seres humanos han sido atribuidos a la forma hexavalente, de elevado interés en el campo industrial. El principal efecto tóxico tras la ingestión de altas dosis de Cr(VI) es un daño tubular y glomerular agudo; estos efectos tóxicos renales también se producen por exposición crónica a bajas dosis de Cr(VI). El Cr (VI) es corrosivo y produce úlceras en piel, así como reacciones alérgicas, estas últimas independientes de la dosis (Gover y Clarkson, 2001).

Los compuestos de Cr(III) no son irritantes ni corrosivos y son considerablemente menos tóxicos que los compuestos de Cr(VI).

Según la Agencia Internacional de Investigaciones sobre el cáncer (IARC) (<http://www.iarc.fr>), el Cr(VI) se encuentra clasificado dentro del grupo 1 de sustancias con suficiente evidencia de ser carcinógenas para el hombre, mientras que el Cr(III) se incluye en el grupo 3 entre los agentes no clasificables por su carcinogenicidad en humanos. Se ha especulado que los efectos tóxicos de Cr(VI) pueden estar relacionados con su reducción a Cr(III) y la formación de complejos con macromoléculas intracelulares, y ello podría también estar implicado en el mecanismo de carcinogenicidad de Cr(VI) (Gover y Clarkson, 2001).

Para el hombre, la dieta diaria constituye la fuente principal de entrada de cromo en el organismo, estimándose un valor inferior o similar a 100 µg/día, principalmente a partir de alimentos,

aunque pequeñas cantidades proceden del agua de bebida y de la inhalación de aire (Goyer y Clarkson, 2001; Ysart *et al.*, 2001). Esta ingesta satisface los requerimientos nutricionales de individuos sanos, aunque se han introducido en el mercado diversos suplementos de Cr (Cubadda *et al.*, 2003).

El contenido en Cr varía considerablemente de unos alimentos a otros. Así los alimentos cárnicos, pescados mariscos, cereales, frutos secos y legumbres, constituyen fuentes ricas en cromo con un contenido medio de 0,100 µg/g, mientras que las frutas, el azúcar, las grasas y los aceites vegetales contienen cantidades inferiores (Bratakos *et al.*, 2002).

El metal y sus compuestos se emplean en electrochapado y en el tratamiento de la superficie de latas de alimentos, por lo que se ha constatado el fenómeno de migración de pequeñas cantidades de Cr a los alimentos a partir de utensilios de cocina y envases.

A la vista del papel tanto nutricional como de la importancia toxicológica del elemento Cr, la determinación de sus niveles en alimentos ha sido y continúa siendo una materia de gran interés.

Como hemos comentado anteriormente, el grupo de carnes suele contener cantidades más elevadas de Cr en comparación con otros grupos de alimentos (Ysart *et al.*, 2000). En el grupo de lácteos, los niveles de Cr en leche y yogurt son del orden de 29-30 ng/g (Farre y Lagarda, 1986). Un estudio del contenido de Cr en diversos grupos de alimentos españoles (aceite de oliva, productos lácteos, pescados, cereales, vegetales y patatas) ha revelado, de acuerdo con los consumos de la población, que los cereales seguidos de los productos lácteos son los que más contribuyen a la ingesta diaria de Cr (Lendinez *et al.*, 2001).

El incremento en la producción de Cr(VI) debido a la oxidación de Cr(III) en las plantas industriales y por la oxidación espontánea en suelos debido a la presencia de oxidantes fuertes como permanganato, hace que aumente la acumulación de Cr(VI) en el medio ambiente, y la absorción de este por las plantas.

Por ello, y teniendo en cuenta el papel de Cr(III) como nutriente, es necesario desarrollar métodos simples, sencillos, rápidos que permitan la determinación de ambas especies, a niveles de trazas (Paleologos, *et al.*, 1998). Sin embargo, son muy escasos los estudios de especiación de este elemento, sobre todo en matrices como los alimentos (Paleologos *et al.*, 1998), reconociéndose que la mayor parte del Cr presente en los alimentos se encuentra en forma trivalente Cr(III) (Ysart *et al.*, 2000).

3. Mercurio

Debido a su abundancia geológica natural, el mercurio se encuentra ampliamente distribuido en el medio ambiente mayoritariamente como mineral de sulfuro de mercurio, HgS. No obstante, diversas actividades en el campo de la industria electroquímica, fabricación de baterías, termómetros, empleo de amalgamas en odontología, pesticidas, fungicidas, catalizadores, pigmentos para pinturas, etc., han supuesto como consecuencia un aumento considerable de la contaminación por este elemento (Harrington, 2000).

El mercurio se presenta en distintas formas químicas, con diferentes comportamientos medioambientales, biológicos y toxicológicos. La interconversión de estas formas controla la movilidad medioambiental del mercurio y determina sus propiedades biológicas y toxicológicas, constituyendo unos de los mejores ejemplos que ilustran la necesidad de los estudios de especiación. Puede encontrarse como mercurio elemental, como compuestos derivados del catión mercurioso (Hg^{1+}) y del mercúrico (Hg^{2+}) y formando parte de compuestos orgánicos del tipo R-Hg^+ y $\text{R-Hg-R}'$ como consecuencia de las transformaciones por sistemas no enzimáticos, microalgas y microorganismos (Jonnalagadda y Rao, 1993; Ebdon *et al.*, 2002). La transformación de Hg orgánico a Hg inorgánico, es más compleja pero también ocurre.

Desde un punto de vista toxicológico, conviene clasificar los compuestos de Hg en inorgánicos y orgánicos. Dentro de los compuestos inorgánicos, el mercurio elemental y las sales de

Hg(II) son los que presentan mayor interés toxicológico. Los compuestos orgánicos pueden dividirse en dos grupos: compuestos relativamente estables (compuestos alquilméricos de cadena corta) que son excretados a través de los riñones de forma inalterada o conjugados, y un segundo grupo formado por los compuestos de fenilmercurio y metoxialquilmérico, que se descomponen rápidamente en el organismo y presentan asimismo gran importancia toxicológica.

La toxicidad producida por los compuestos organoméricos, varía de acuerdo a su forma química. Son más liposolubles que el Hg^0 y Hg(II) por lo que penetran mejor en los tejidos; no obstante, son metabolizados más rápidamente. Por otra parte, los derivados alquilméricos son más tóxicos que los arilméricos (Carro y Mejuto, 2000).

Cabe destacar, por tanto, la importancia del proceso de metilación, que facilita la interconversión entre las diferentes especies mercuriales. Este proceso tiene lugar principalmente en los sedimentos marinos y sistemas acuáticos, de ahí que gran parte del mercurio encontrado en alimentos marinos se encuentre principalmente como metilmercurio (MeHg), que una vez producido entra en la cadena trófica acuática, a través del plancton, pescados herbívoros, pescados carnívoros, produciéndose el proceso de bioconcentración. Este proceso de interconversión está influenciado por factores externos tales como condiciones redox, pH, contenido de materia orgánica y nutrientes, salinidad, y concentración de oxígeno.

Debido a su naturaleza lipofílica, el MeHg se acumula en la cadena trófica animal y humana con mayor facilidad que las especies inorgánicas del ciclo del mercurio. En general, la principal fuente de exposición del hombre a los compuestos mercuriales a través de la dieta la constituyen alimentos de origen marino, tales como pescados, crustáceos y moluscos. No obstante, debido al empleo de este elemento en la agricultura (pesticidas como fungicidas) y en la industria, distintas formas de mercurio pueden aparecer en productos alimenticios como cereales, frutas y verduras, pudiendo extenderse a

otros productos de origen animal como carne, leche y huevos, a través de la cadena trófica. Los compuestos inorgánicos de Hg también se encuentran en los alimentos, su fuente es desconocida y la cantidad ingerida es muy inferior a los niveles considerados como tóxicos.

Es difícil estimar con precisión la ingesta de Hg procedente de alimentos y, aunque se parte de que casi la totalidad del Me-Hg ingerido a través de la dieta procede del pescado y productos pesqueros, dependerá de la concentración presente en el pescado y la cantidad consumida de este (Soria y Repetto, 1995).

Como hemos comentado, el Me-Hg es la forma más importante de Hg en términos de toxicidad humana a partir de exposición ambiental, siendo el consumo de pescado su principal fuente de exposición. Tras la tragedia de Minamata, el comité mixto FAO/WHO ha establecido como PTWI de Hg total y Me-Hg 300 µg/60 kg y 200 µg/60 kg, respectivamente. Estas cantidades equivalen a 5 y 3 µg/kg de peso, respectivamente (WHO, 1972; Deshpande, 2002).

Los principales efectos tóxicos observados son neurológicos, siendo el cerebro el principal órgano diana. Las manifestaciones clínicas de dichos efectos neurotóxicos son: parestesia, ataxia, neurastenia, pérdida de visión y audición, espasticidad y temblor, y finalmente, coma y muerte (Goyer y Clarkson, 2001). Además, estos efectos neurotóxicos pueden presentarse en embarazadas y en fetos expuestos a Me-Hg durante el embarazo. De hecho, la FDA (FDA, 2001) ha aconsejado en embarazadas evitar el consumo de pescados de gran tamaño, de edad elevada, carnívoros, por los niveles elevados que puedan contener de Me-Hg (aproximadamente 0,7 µg/g peso húmedo) y porque pueden afectar al sistema nervioso del feto.

Además, los organomercuriales, especialmente Me-Hg, pueden producir daño renal, intestinal, y afectar al sistema inmunitario (Carro y Mejuto, 2000).

La mayoría de los trabajos de especiación que versan sobre el mercurio en alimentos están realizados en matrices de origen marino, gene-

ralmente en peces (Gray *et al.*, 2000; Chiou *et al.*, 2001; Jitaru *et al.*, 2003; Dasgupta *et al.*, 2004; Storelli *et al.*, 2004; Landaluce *et al.*, 2004), crustáceos (Dong *et al.*, 2004; Gómez-Ariza *et al.*, 2004 y moluscos (Liang *et al.*, 2003a; Liang *et al.*, 2003b; Trombini *et al.*, 2003) ya sean matrices reales o materiales de referencia certificados, por constituir estos la principal fuente de exposición de estos compuestos para el hombre. Particular énfasis se presta en aquellas técnicas que permiten la determinación simultánea de Hg inorgánico, y formas orgánicas como Me-Hg o Me₂Hg.

En los organismos marinos el porcentaje de Me-Hg es muy superior a los encontrados en agua de mar, y a niveles intermedios de la cadena trófica marina se alcanzan porcentajes de Me-Hg que representan el 60-80% del Hg total. En pescados depredadores grandes (atunes, etc.), y de mayor edad, el Me-Hg puede ser el 70-90% del Hg total acumulado (Dietz *et al.*, 2000, Dasgupta *et al.*, 2004). Ello es debido posiblemente al carácter lipofílico de la especie y al alto contenido en grasa presente en estas especies marinas.

Holsbeek *et al.* (1997) han establecido que dependiendo de la especiación de Hg en peces, se pueden establecer tres mecanismos de acumulación. El tipo I cubre la mayoría de las especies y describe un patrón aceptado como normal, incrementándose los niveles de Hg orgánico (Me-Hg) con la edad del pescado, combinado con un nivel bajo y constante de Hg inorgánico; esta acumulación puede hacer que la fracción de Hg orgánico sea del 90-100%, como hemos comentado anteriormente. El Tipo II se presenta en géneros plantívoros y se caracteriza por un incremento de los niveles de Hg inorgánico combinado con concentraciones bajas y constantes de Hg orgánico, lo cual conlleva una disminución del mismo con la edad; este comportamiento se ha registrado en algunas especies marinas y parece deberse a mecanismos de desmetilación o a influencias regionales de los niveles de Hg. Un modelo intermedio, tipo III, presenta incrementos tanto de Hg orgánico como inorgánico con la edad.

Los moluscos se sitúan en el segundo nivel trófico y acumulan menos Me-Hg que los pescados depredadores, pero su consumo a largo plazo puede ocasionar acumulación del mismo en humanos. Los porcentajes de Me-Hg respecto al Hg total pueden oscilar entre 20-90% (Liang *et al.*, 2003b; Trombini *et al.*, 2003); las variaciones en dichos porcentajes encontradas en diferentes localizaciones pueden deberse a variaciones en la temperatura, salinidad, pH, contenido de materia orgánica, número y especies de bacterias que pueden convertir Me-Hg a partir de Hg inorgánico.

4. Estaño

El estaño, debido a su ubicuidad tanto en la corteza terrestre como en el medio acuático, penetra en la cadena alimenticia, y como consecuencia, la mayoría de los alimentos naturales contienen trazas de este elemento. La concentración de estaño en los alimentos se ha incrementado en las últimas décadas debido al empleo de pesticidas organoestánicos y al almacenamiento de los alimentos en contenedores de PVC y latas. No obstante, la mejora en el almacenamiento de los alimentos ha implicado una disminución de la ingesta diaria de los 17 mg/día de décadas anteriores a los 3,5 mg/día o inferior de Sn (Goyer y Clarkson, 2001).

El estaño puede encontrarse como estaño metálico y en sus dos estados de oxidación Sn(II) y Sn(IV) formando compuestos inorgánicos estables; además, el Sn(IV) podemos encontrarlo como hidruro volátil SnH_4 y formando compuestos orgánicos de importante relevancia toxicológica, en los que el estaño se encuentra covalentemente unido a uno o más átomos de carbono.

Desde un punto de vista toxicológico, los compuestos de estaño pueden dividirse en tres grandes grupos.

El primer grupo estaría formado por el Sn metálico para el cual no existen estudios de biodisponibilidad, por lo que se asume un valor bajo para la misma y como consecuencia una baja toxicidad (Rüdel 2003). Algunos

estudios sugieren incluso su esencialidad para humanos.

El segundo grupo lo formarían los compuestos inorgánicos de estaño. Existe un elevado número de compuestos inorgánicos en los que el estaño se encuentra tanto en su forma divalente (sulfatos, cloruros, fluoruros, etc.) como en su forma tetravalente (óxidos, cloruros, etc.). El estudio de las sales inorgánicas de Sn, revela una baja toxicidad para los organismos vivos, debido a que presentan una baja absorción después de la ingesta (Sn(II) > Sn(IV)) y a la rápida absorción y completa eliminación de los mismos a través de la orina. No obstante, estudios realizados para determinar la concentración efectiva media (CE50) en el ensayo de inmovilización de *Dafnia*, se señala que el Sn(II) presenta mayor toxicidad que Sn(IV).

El tercer grupo lo integrarían los compuestos orgánicos de Sn, de mayor relevancia toxicológica. El Sn, en su estado de oxidación tetravalente, forma compuestos orgánicos de fórmula general $\text{R}_{(4-n)}\text{-Sn-X}_n$ ($n = 0-3$). R son grupos alquil o aril covalentemente unidos al átomo de estaño, y X son aniones ($-\text{OH}$, $-\text{SH}$, $-\text{OSnR}_3$, o $-\text{OR}'$). Presentan relevancia química por su extendido uso como biocidas y pesticidas los compuestos de butil y fenil estaño, mono, di, o tri sustituidos, tales como monobutilestaño (MBT), dibutilestaño (DBT), tributilestaño (TBT), monofenilestaño (MPT), difenilestaño (DPT) y trifenilestaño (TPT). MBT y DBT se utilizan principalmente como estabilizadores del calor y de la luz en materiales poliméricos, como cloruro de polivinilo (PVC). Dependiendo de las condiciones ambientales podemos encontrarlos como pares iónicos, complejos o cationes. En comparación con los compuestos inorgánicos, algunos compuestos orgánicos, como trimetilestaño y trietilestaño, son extremadamente tóxicos (neurotóxicos).

La toxicidad de los compuestos organoestánicos, está relacionada con la biodisponibilidad de los mismos, concentración y duración de la exposición y sensibilidad de los organismos.

Los compuestos órgano-Sn pueden inducir en mamíferos, además de neurotoxicidad, inmu-

notoxicidad, irritaciones en la piel y ojos, mutagenicidad y carcinogenicidad (Kart, 1996). La exposición humana puede producir, a niveles elevados de estos compuestos, convulsiones y diferentes anormalidades; a bajas concentraciones pueden suprimir la respuesta inmune (Forsyth y Casey, 2003). Específicamente, los compuestos de butil-Sn inhiben los linfocitos T y las células NK, reduciendo sus efectos sobre células tumorales (Whalen *et al.*, 1999).

Diversos estudios de monitorización señalan que los compuestos organoestánicos son ubicuos en organismos acuáticos, produciéndose el fenómeno de bioacumulación (Sun *et al.*, 2001).

Las primeras restricciones al uso de pinturas en cuya composición intervinieran TBT y otros organoestánicos ocurrieron en Francia, motivadas por los efectos adversos producidos sobre los bancos de ostras. La Organización Marítima Internacional (IMO) ha llamado a la prohibición general del uso de los mismos en la pintura de barcos desde enero de 2003, y a una completa prohibición en enero de 2008 (Rüdel, 2003). Estas restricciones de uso han traído consigo una disminución de los niveles de TBT en peces, tanto en Europa como en Japón.

El TBT y TPT, presentan propiedades de disruptores endocrinos (véase capítulo correspondiente) provocando en determinados organismos acuáticos el fenómeno denominado «imposex» (Morcillo y Porte, 1999; Morcillo y Porte, 2000). Durante las dos últimas décadas, el fenómeno del «imposex» se ha descrito en más de 120 especies en todo el mundo. Consiste en el desarrollo de características masculinas (aparición de órganos masculinos) en organismos femeninos de algunas especies de gasterópodos, existiendo grandes evidencias de que dicho fenómeno está ligado a la exposición a TBT y TPT, no excluyéndose la posibilidad de que otros compuestos también lo causen. Los efectos endocrinos se han observado a niveles de aproximadamente 1 ng/L de TBT (Gibbs y Bryan, 1996) y se sospecha que el TPT posee efectos de similar potencia. El mecanismo de producción de «imposex» aún no está dilucidado, existiendo una disminución de los niveles de

estradiol y un aumento de la razón testosterona/estradiol en las hembras afectadas.

La toxicidad del TBT para mamíferos es tal que la OMS y el Ministerio de Salud de Japón han definido límites para el consumo humano de 1,3 y 0,6 µg de TBT (como Sn)/kg (Pannier *et al.*, 1996)

Son escasos los estudios de especiación de Sn en alimentos, pudiendo destacar los estudios de determinación de compuestos organoestánicos en moluscos y pescados. El interés de estos estudios reside en que estos moluscos y pescados cultivados (salmón) expuestos a la contaminación por TBT se comercializan posteriormente para uso humano, considerándose que la ingesta de los mismos constituye la principal fuente de exposición a estos compuestos tóxicos.

En mejillones de áreas contaminadas se han detectado del orden de 1.000 µg TBT/g y en zonas menos contaminadas concentraciones 10 veces inferiores (Pannier *et al.*, 1996). En moluscos adquiridos en supermercados, listos para el consumo humano, se han encontrado niveles de TBT de hasta 233 ng/g, y las concentraciones máximas de DBT y MBT fueron 88 y 53 ng/g, respectivamente (Forsyth y Casey, 2003).

Un estudio acerca del grado de contaminación de pescados y crustáceos comerciales en diversas ciudades de China reveló la existencia generalizada de compuestos butil-Sn, oscilando las concentraciones de TBT entre < 6,9 17.175 ng de Sn/ de peso húmedo de alimento. Los factores de bioconcentración de los contaminantes desde el agua a los correspondientes organismos fueron variables, llegando a ser del orden de 10³. Los niveles de butil-Sn permanecieron estables durante las operaciones de cocinado o procesado usuales de la cocina china (lavado, adición de aditivos y congelado). Los resultados indicaron el peligro tóxico para la salud que puede representar el consumo de estos alimentos contaminados con compuestos butil-Sn, en las zonas estudiadas (Zhou *et al.*, 2001).

Como consecuencia del empleo de diversos compuestos de butil-Sn en la fabricación de materiales de PVC, se ha detectado la presencia de DBT en vinos canadienses, en cantida-

des variables (1,44-138 $\mu\text{g/L}$). En vinos portugueses de mesa y de Oporto, las cantidades de DBT fueron inferiores, oscilando entre 0,07-0,15 $\mu\text{g/L}$, el MBT fue detectado a niveles < 0,05 $\mu\text{g/L}$, mientras que el TBT no llegó a detectarse (Azenha y Vasconcelos, 2002). Los vinos secos parecen contener generalmente mayores niveles de DBT que los vinos dulces, y los licores suelen presentar concentraciones inferiores a las encontradas en vinos (Liu y Jiang, 2002).

Estos estudios indican la necesidad de continuar las investigaciones sobre los niveles de las diferentes especies de compuestos organoestánicos presentes en alimentos y bebidas diversos. Además, resulta también de enorme interés tener información acerca de la exposición humana a los mismos y evaluar los efectos en humanos, mediante su determinación en muestras biológicas (Kannan *et al.*, 1999), sobre todo dada la variabilidad humana existente en cuanto a la capacidad de biotransformarlos (Nielsen y Strand, 2002).

5. Selenio

El Se es un elemento esencial que puede existir en varias formas químicas, orgánicas e inorgánicas, en los alimentos y suplementos nutricionales. En la naturaleza se encuentra como Se^{6+} , Se^{4+} , Se^{2+} , Se^0 , y Se^{2-} (Goyer y Clarkson, 2001), formando parte de compuestos orgánicos e inorgánicos. Su disponibilidad, así como su potencial toxicológico, depende de su forma química y sobre todo de su solubilidad. Consecuentemente, la determinación de las diferentes especies químicas presenta mayor relevancia que la determinación de su contenido total (Vonderheide *et al.*, 2002).

La presencia de selenio es inherente en la mayoría de alimentos que ingerimos; no obstante, el interés en el consumo de selenio se ha visto incrementado a medida que han ido aumentando las investigaciones acerca de sus propiedades anticarcinogénicas; de hecho, el consumo de suplementos de selenio ha aumentado entre la población durante las última décadas. Parece ser

que el selenio previene diferentes tipos de cáncer mediante la inducción de la apoptosis en lesiones premalignas. Por otra parte, este elemento resulta necesario para el funcionamiento de diversas enzimas, como la selenoenzima glutatión peroxidasa, que protege al organismo del estrés oxidativo. Además de reducir la toxicidad de diversos metales y xenobióticos, participa asimismo en reacciones de tipo inflamatorio e inmunitario y en el metabolismo del ácido araquidónico. Por estas características, además de su potencial actividad en la prevención y tratamiento de enfermedades degenerativas, se emplea en enfermedades inflamatorias y cardiovasculares, y desórdenes neurológicos, siendo importante vigilar la ingesta del elemento, sobre todo en el caso de los niños (Torres *et al.*, 1999).

Frente a estos efectos beneficiosos, la toxicidad del Se aparece cuando la ingesta excede la capacidad de eliminación por parte del organismo. La toxicidad varía con la especie química, de forma que, por ejemplo, la dosis letal 50 (DL_{50}) en ratas de selenito sódico es 7 mg/kg, y para Se elemental es 6.700 mg/kg.

La dieta constituye una fuente esencial de Se para el hombre. Se estima que la ingesta diaria para un adulto debe oscilar entre 50 y 70 $\mu\text{g/día}$ (Högberg y Alexander, 1986), siendo los alimentos de origen marino, carnes, productos lácteos y granos los que proporcionan mayores cantidades de Se a la dieta (Goyer y Clarkson, 2001). Los niveles de selenio en semillas y vegetales dependen del contenido de selenio del suelo en el que estos se desarrollen. El selenio del suelo es absorbido por las plantas y como consecuencia es ingerido posteriormente por animales y personas.

Ya que, tanto la biodisponibilidad como la toxicidad del elemento están correlacionadas con la forma química ingerida, su caracterización en diferentes especies es totalmente imprescindible.

Se han llevado a cabo diferentes estudios de especiación de Se en vegetales (McSheehy *et al.*, 2000; Zhang y Frankenberger, 2001; Vonderheide *et al.*, 2002), levaduras (Chassaingne *et al.*, 2002; Ruiz Encinar *et al.*, 2003) pescados

(Le *et al.*, 1998; Önning, 2000) y crustáceos y moluscos (Quijano *et al.*, 2000; Moreno *et al.*, 2001).

El Se se encuentra en las plantas y alimentos animales predominantemente en diversas formas orgánicas, como selenoproteínas que contienen selenoaminoácidos, tales como selenocisteína (SeCys) y selenometionina (SeMet). Entre los alimentos más ricos en Se de forma natural se encuentran las nueces de Brasil (*Bertholletia excelsa*), y los estudios de especiación de los Se-aminoácidos disponibles han revelado que SeMet es el aminoácido más abundante en su composición (Vonderheide *et al.*, 2002). Diversas especies del género *Allium* (cebollas y ajos) también han sido objeto de estudio, identificándose por ejemplo la especie γ -glutamil-Se-metilselenocisteína (McSheehy *et al.*, 2000).

Existe cierta especificidad en la distribución de especies de Se en función del tipo de alimento. Por ejemplo, la SeMet, componente esencial de las selenoproteínas, está presente en diferentes alimentos como pescados, vegetales, crustáceos y en concentraciones variables. Se ha detectado selenocistina (SeCys₂) en muestras vegetales (0,1-0,7 $\mu\text{g/g}$) y en muestras de atún enlatado (Le *et al.*, 1998). Se ha demostrado en pescados una variabilidad en la distribución de especies de Se en diferentes especies (Önning, 2000). En atún y mejillones se ha detectado la presencia de la especie ión trimetilselenonio (TMS⁺). En levaduras, también se pueden encontrar diferentes especies inorgánicas de Se, selenito y seleniato (Moreno *et al.*, 2004).

Como se ha comentado anteriormente, a partir de estos Se-aminoácidos el Se puede incorporarse a las selenoproteínas como selenocisteína, en el sitio activo de diversas enzimas, ya que actúa como cofactor de las enzimas glutatión peroxidasa, iodotironina 5-deiodinasa tipo 1 y selenoproteína P (Goyer y Clarkson, 2001). Sin embargo, en levaduras el Se se incorpora a las proteínas en lugar del grupo sulfuro, químicamente similar, en sitios no específicos. Hoy día la especiación de Se no solo incluye la determinación de selenoaminoácidos sino también de

selenoproteínas (Moreno *et al.*, 2004), con el objeto de investigar las funciones específicas del Se en los procesos bioquímicos de los seres vivos, en los que está implicado.

Otro foco de interés reside en la especiación simultánea de multielementos entre los que existen complejas interacciones en los organismos vivos y medio ambiente, tales como Se y As (Le *et al.*, 1998). Diferentes formas de As pueden antagonizar la toxicidad del Se, otras, por el contrario, pueden aumentar su toxicidad. Dichas interacciones dependientes de la especie química indican claramente la importancia de los estudios de especiación de metabolitos procedentes de elementos con actividad biológica, y de sus posibles interacciones.

Bibliografía

- ATSDR (2000) *Toxicology profile for arsenic*. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- Azenha M, Vasconcelos MT (2002). Headspace solid-phase micro-extraction gas chromatography-mass detection method for the determination of butyltin compounds in wines. *Analytica Chim. Acta* 458: 231-239.
- Berg T, Larsen EH (1999). Speciation and legislation –Where are we today and what do we need for tomorrow? *Fresenius J. Anal. Chem.* 363: 431-434.
- Bratakos MS, Lazos ES, Bratakos SM (2002). Chromium content of selected Greek foods. *Science of the Total Environment* 290: 47-58.
- Brisbin JA, B'Hymer C, Caruso JA (2002). A gradient anion exchange chromatographic method for the speciation of arsenic in lobster tissue extracts. *Talanta* 58: 133-145.
- Carro AM, Mejuto MC (2000). Application of chromatographic and electrophoretic methodology to the speciation of organomercury compounds in food analysis. *J. Chrom. A* 882: 283-307.
- Chassaing H, Chéry CC, Bordin G, Rodríguez AR (2002). Development of new analytical methods for selenium speciation in selenium-enriched yeast material. *J Chromatography A* 976: 409-422.

- Chiou CS, Jiang SJ, Danadurai KSK (2001). Determination of mercury compounds in fish by microwave-assisted extraction and liquid chromatography-vapor generation-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 56: 1133-1142.
- Crews HM (1998). Speciation of trace element in food, with special reference to cadmium and selenium: is it necessary? *Spectrochimica Acta part B* 53: 213-219.
- Cubadda F, Giovannangeli S, Iosi F, Raggi A, Stacchini P (2003). Chromium determination in foods by quadrupole inductively coupled plasma-mass spectrometry with ultrasonic nebulization. *Food Chemistry* 81: 463-468.
- Dasgupta PK, Huang H, Zhang G, Cobb GP (2002). Photometric measurement of trace As(III) and As(V) in drinking water. *Talanta* 58: 153-164.
- Dasgupta S, Onders RJ, Gunderson DT, Mims SD (2004). Methylmercury concentrations found in wild and farm-raised paddlefish. *J Food Science*, I press.
- Del Razo LM, García-Vargas GG, García-Salgado J, Sanmiguel MF, Rivera M, Hernández MC, Cebrian ME (2002). Arsenic levels in cooked food and assessment of adult dietary intake of arsenic in the Region Lagunera, Mexico. *Food Addit Contam* 40: 1423-1431.
- Deshpande SS (2002). *Handbook of food toxicology*. Marcel Dekker, New York.
- Dietz C, Madrid Y, Cámara C, Quevauviller P (2000). The capillary cold trap as a suitable instrument for mercury speciation by volatilization, cryogenic trapping, and gas chromatography coupled with atomic absorption spectrometry. *Analytical Chemistry* 72: 4178-4184.
- Dong LM, Yan XP, Li Y, Jiang Y, Wang SW, Jiang DQ (2004). On-line coupling of flow injection displacement sorption preconcentration to high-performance liquid chromatography for speciation analysis of mercury in seafood. *Journal of Chromatography A* 1036: 119-125.
- Ebdon L, Foulkes ME, Le Roux S, Muñoz-Olivas R (2002). Cold vapour atomic fluorescence spectrometry and gas chromatography-pyrolysis-atomic fluorescence spectrometry for routine determination of total and organometallic mercury in food samples. *Analyst* 127: 1108-1114.
- Evans EH (2003). New concepts in speciation analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* 376: 1943-1949.
- Fattorini D, Alonso-Hernandez CM, Díaz-Asencio M, Muñoz-Caravaca A, Pannacciulli FG, Tangherlini M *et al.* (2004). Chemical speciation of arsenic in different marine organisms: Importance in monitoring studies. *Marine Environ Res* 58: 845-850.
- FDA (2001). FDA announces advisory on methyl mercury in fish. FDA Talk Paper, T01-04.
- Forsyth DS, Casey V (2003). Butyltin compounds in retail mollusc products. *Food Addit Contam.* 20: 445-452.
- Francesconi KA, Kuehnelt D (2004). Determination of arsenic species: A critical review of methods and applications, 2000-2003. *Analyst* 129: 373-395.
- Gibbs PE, Bryan GW (1996). TBT-induced imposex in neogastropod snails: masculinization to mass extinction. En: de Mora SJ (ed.) *Tributyltin: Case study of an environmental contaminant*, Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 212-236.
- Gómez-Ariza JL, Lorenzo F, García-Barrera T, Sánchez-Rodas D (2004). Analytical approach for routine methylmercury determination in seafood using gas chromatography-atomic fluorescence spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 511: 165-173.
- Gong Z, Lu X, Ma M, Watt C, Le C (2002). Arsenic speciation analysis. *Talanta* 58 :77-96.
- Goyer RA, Clarkson TW (2001). Toxic effects of metals. En: Klaassen CD (ed.), *Casarett & Doull's Toxicology: The basic science of poisons*. McGraw-Hill, New York, pp. 811-867.
- Gray JE, Theodorakos PM, Bailey EA, Turner RR (2000). Distribution, speciation, and transport of mercury in stream-sediment, stream-water, and fish collected near abandoned mercury mines in southwestern. *Science Total Environ* 260: 21-33.
- Harrington CF (2000). The speciation of mercury and organomercury compounds by using high performance liquid chromatography. *TRAC* 19:167-179.
- Helgesen H, Larsen EH (1998). Bioavailability and speciation of arsenic in carrots grown in contaminated soil. *Analyst* 123: 791-796.
- Herce-Pagliai C, González G, Cameán AM, Repetto M (1999). Presence and distribution of arsenical species in beers. *Food Addit Contam* 16: 267-271.
- Herce-Pagliai C, Moreno I, González G, Repetto M, Cameán AM (2002). Determination of total arsenic, inorganic, and organic arsenic species in wine. *Food Addit Contam* 19: 542-546.

- Högberg J, Alexander J (1986). Selenium. En: Friberg L, Nordberg GF, Bouk VB (eds.). *Handbook on the toxicology of metals*. Vol. II, 2nd ed. Elsevier, Amsterdam. pp.482-520.
- Holsbeek L, Das HK, Joiris CR (1997). Mercury speciation and accumulation in Bangladesh freshwater and anadromous fish. *Sci Total Environ* 198: 201-210.
- Huang YK, Lin K, Chen H, Chang C, Liu C, Yang M, et al. (2003). Arsenic species contents at aquaculture farm and in farmed mouthbreeder (*Oreochromis mossambicus*) in blackfoot disease hyperendemic areas. *Food Chem Toxicol* 41: 1491-1500.
- Ibáñez N, Vélez D, Tejedor W, Montoro R (1995). Optimization of the extraction, clean-up, and determination of arsenobetaine in manufactured seafood products by coupling liquid chromatography with inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *J Anal. Atom. Spectrometry* 10: 459-465.
- Ishinishi N, Tsuchiya K, Vahter M, Fowler BA (1986). Arsenic. En: Friberg L, Nordberg GF, Bouk VB (Eds.). *Handbook on the toxicology of metals*. Vol. II, 2nd ed. Elsevier, Amsterdam. pp. 43-83.
- Jitaru P, Infante HG, Adams FC (2003). Multicapillary gas chromatography coupled to inductively coupled plasma-time-of-flight mass spectrometry for rapid mercury speciation analysis. *Anal Chimica Acta* 489: 45-57.
- Jonnalagadda SB, Rao PV (1993). Toxicity, bioavailability and metal speciation. *Comp. Biochem. Physiol.* 106: 585-595.
- Kannan K, Senthilkumar K, Giesy JP (1999). Occurrence of butyltin compounds in human blood. *Environ Sci Technol* 33: 1776-1779.
- Karl F (1996). Ecotoxicology of organotin compounds. *Crit Rev Toxicol.* 26: 1-117.
- Kohlmeyer U, Jantzen E, Kuballa J, Jakubik S (2003). Benefits of high resolution IC-ICP-MS for the routine analysis of inorganic and organic arsenic species in food products of marine and terrestrial origin. *Anal Bioanal Chem.* 377: 6-13.
- Kot A, Namiesnik J (2000). The role of speciation in analytical chemistry. *TrAC* 19: 69-79.
- Landaluze JS, Diego A, Raposo JC, Madariaga JM (2004). Methylmercury determination in sediments and fish tissues from the Nerbioi-Ibaizabal estuary (Basque Country, Spain). *Anal Chimica Acta* 508: 107-117.
- Larsen EH, Hansen M, Gössler W (1998). Speciation and health risk considerations of arsenic in the edible mushroom *Laccaria amethystina* collected from contaminated and uncontaminated locations. *Applied Organometallic Chem.* 12: 285-291.
- Larsen EH, Quérel CR, Muñoz R, Fiala-Medioni A, Donard OFX (1997). Arsenic speciation in shrimp and mussel from the Mid-Atlantic hydrothermal vents. *Marine Chem.* 57: 341-346.
- Le XC, Li XF, Lai V, Ma M, Yalcin S, Feldman J (1998). Simultaneous speciation of selenium and arsenic using elevated temperature liquid chromatography separation with inductively coupled plasma mass spectrometry detection. *Spectrochimica Acta Part B* 53: 899-909.
- Lendinez E, Lorenzo ML, Cabrera C, Lopez MC (2001). Chromium in basic foods of the Spanish diet: seafood, cereals, vegetables, olive oils and dairy products. *Sci Total Environment* 278: 183-189.
- Li W, Wei Ch, Zhang Ch, van Hulle M, Cornelis R, Zhang X (2003). A survey of arsenic species in chinese seafood. *Food Chem Toxicol.* 41: 1103-1110.
- Liang LN, Jiang GB, Liu JF, Hu JT (2003). Speciation analysis of mercury in seafood by using high-performance liquid chromatography on-line coupled with cold-vapor atomic fluorescence spectrometry via a post column microwave digestion. *Anal Chimica Acta* 477: 131-137.
- Liang LN, Shi JB, He B, Jiang GB, Yuan CG (2003b). Investigation of methylmercury and total mercury contamination in mollusc samples collected from coastal sites along the Chinese Bohai sea. *J. Agric. Food. Chem.* 51: 7373-7378.
- Liu J, Jiang G (2002). Survey on the presence of Butyltin compounds in Chinese alcoholic beverages, determined by using headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography-flame photometric detection. *J Agric Food Chem.* 50: 6683-6687.
- Lobinski R (1994). Gas chromatography with element selective detection in speciation analysis. Status and future prospects. *Analisis* 22: 37-48.
- McSheehy S, Yang W, Pannier F, Szpunar J, Lobinski R, Auger J et al. (2000). Speciation analysis of selenium in garlic by two-dimensional high-performance liquid chromatography with parallel inductively coupled plasma mass spectrometric and electrospray tandem mass spectrometric detection. *Analytica Chim. Acta* 421: 147-153.

- Morcillo Y, Porte C (1999). Evidence of Endocrine Disruption in the Imposex-Affected Gastropod *Bolinus brandaris*. *Environ Res* 81: 349-354.
- Morcillo Y, Porte C (2000). Evidence of endocrine disruption in clams - *Ruditapes decussata* - transplanted to a tributyltin-polluted environment. *Environ Pollution* 107: 47-52.
- Moreno P, Quijano MA, Gutiérrez AM, Pérez-Conde MC, Cámara C (2001). Fractionation studies of selenium compounds from oysters, and their determination by high-performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Anal At Spectrom*. 16: 1044-1050.
- Moreno P, Quijano MA, Gutiérrez AM, Pérez-Conde MC, Cámara C (2004). Study of selenium species distribution in biological tissues by size exclusion and ion exchange chromatography inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Anal Chimica Acta* 524; 1-2: 315-327.
- Muñoz O, Devesa V, Suner MA, Vélez D, Montoro R, Urieta I, et al. (2000). Total and inorganic arsenic in fresh and processed fish products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48: 4369-4376.
- Nielsen JB, Strand J (2002). Butyltin compounds in human liver. *Environ Res Section A* 88: 129-133.
- Nurberg HW (1984). *Anal Chim Acta* 164: 1-21.
- Önning G (2000). Separation of soluble selenium compounds in different fish species. *Food Chemistry* 68: 133-139.
- Paleologos EK, Lafis SI, Tzouwara-Karayanni SM, Karayannis MI (1998). Speciation analysis of CrIII-CrVI using flow injection analysis with fluorometric detection. *Analyst* 123: 1005-1009.
- Pannier F, Astruc A, Astruc M, Morabito R (1996). Determination of Butyltin compounds in mussel samples: a comparative study of Analytical Procedures. *Applied Organometallic Chem.* 10: 471-476.
- Pardo-Martínez M, Viñas P, Fisher A, Hill SJ (2001). Comparison of enzymatic extraction procedures for use with directly coupled high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry for the speciation of arsenic in baby foods. *Anal Chimica Acta* 441: 29-36.
- Pizarro I, Gómez M, Cámara C, Palacios MA (2003). Arsenic speciation in environmental and biological samples: Extraction and stability studies. *Anal Chimica Acta* 495: 5-98.
- Quevauviller PH, Maier EA, Griepin B (1993). Projects for the improvement of the quality of chemical speciation analyses in environmental matrices. *Fresenius J Anal Chem* 345: 282-286.
- Quijano MA, Moreno P, Gutiérrez AM, Pérez-Conde MC, Cámara C (2000). Selenium speciation in animal tissues after enzymatic digestion by high-performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. 35: 878-884.
- Quinteros A, Farré R, Lagarda MJ (2001). Optimization of iron speciation (soluble, ferrous and ferric) in beans, chickpeas and lentils. *Food Chemistry* 75: 365-370.
- Rüdel H (2003). Case study: bioavailability of tin and tin compounds. *Ecotoxicol Environ Safety* 56: 180-189.
- Ruiz Encinar J, Sliwka-Kaszynska M, Potatajko A, Vacchina V, Szpunar J (2003). Methodological advances for selenium speciation analysis in yeast. *Anal Chimica Acta* 500: 171-183.
- Slejkovec Z, Bajc Z, Doganoc DZ (2004). Arsenic speciation patterns in freshwater fish. *Talanta* 62: 931-936.
- Soria ML, Repetto G, Repetto M (1995). Revisión general de la toxicología de los metales. En: Repetto M. (ed.) *Toxicología avanzada*, Díaz de Santos, Madrid. pp. 293-358.
- Soria ML, Repetto M (1995). Estado actual de la toxicología del mercurio. En: *Toxicología Avanzada*, Repetto M. (Ed.) Díaz de Santos, Madrid. pp. 359-391.
- Storelli MM, Storelli A, Giacomini-Stuffler R, Marcotrigiano GO (2004). Mercury speciation in the muscle of two commercially important fish, hake (*Merluccius merluccius*) and striped mullet (*Mullus barbatus*) from the Mediterranean sea: estimated weekly intake. *Food Chemistry*, in press.
- Sun H, Dai S, Huang G (2001). Bioaccumulation of butyltins via an estuarine food chain. *Water, Air and Soil Pollution* 125: 55-68.
- Torres MA, Verdoy J, Alegría A, Barberá R, Farré R, Lagarda MJ (1999). Selenium contents of human milk and infant formulas in Spain. *Science Total Environ* 228: 185-192.
- Trombini C, Fabbri D, Lombardo M, Vassura I, Zavoli E, Horvat M (2003). Mercury and methylmercury contamination in surficial sediments and clams of a coastal lagoon (Pialassa Baiona, Ravenna, Italy). *Continental Shelf Research* 23: 1821-1831.

- Ure AM, Davidson CM (1995). Introduction to speciation. En: A.M. Ure, C.M. Davidson (eds.) *Chemical speciation in the environment*. Academic & Professional, Chapman & Hall, Glasgow.
- Urieta I, Jalon M, Eguileor I (1996). Food surveillance in the Basque Country (Spain). II. Estimation of the dietary intake of organochlorine pesticides, heavy metals, arsenic, aflatoxin M1, iron and zinc through the Total Diet Study, 1990/91. *Food Add Contam* 13: 29-52.
- Urieta I, Jalon M, Macho ML (2001). Arsenic intake in Basque country (Spain): A real need for speciation. Trace element speciation for environment, *Food Health* 241-250.
- Vela NP, Heitkemper DT (2004). Total arsenic determination and speciation in infant food products by ion chromatography-inductively plasma-mass spectrometry. *J AOAC Intern.* 87: 244-252.
- Vela NP, Heitkemper DT, Stewart KR (2001). Arsenic extraction and speciation in carrots using accelerated solvent extraction, liquid chromatography and plasma mass spectrometry. *Analyst* 126: 1011-1017.
- Vélez D, Ibáñez N, Montoro R (1995). Percentages of total arsenic represented by arsenobetaine levels of manufactured seafood products, *J. Agric Food Chem.* 43: 1289-1294.
- Vélez D, Ibáñez N, Montoro R (1996). Monomethylarsonic and dimethylarsinic acid contents in seafood products. *J Agric Food Chem.* 44: 859-864.
- Vélez D, Montoro R (1998). Arsenic speciation in manufactured seafood products. *J Food Protection* 61: 1240-1245.
- Villa-Lojo MC, Alonso-Rodríguez E, López-Mahía P, Muniategui-Lorenzo S, Prada-Rodríguez D (2002). Coupled high performance liquid chromatography-microwave digestion-hydride generation-atomic absorption spectrometry for inorganic and organic arsenic speciation in fish tissue. *Talanta* 57: 741-750.
- Vinas P, Lopez-Garcia I, Merino-Merono B, Campillo N, Hernández-Cordoba M (2003). Speciation of arsenic in baby foods and the raw fish ingredients using liquid chromatography-hydride generation-atomic absorption spectrometry. *Chromatographia* 57: 611-616.
- Vonderheide PA, Wrobel K, Kannamkumarath SS, B'Hymer C, Montes-Bayón M, Ponce de León C, *et al.* (2002). Characterization of selenium species in Brazil nuts by HPLC-ICP-MS and ES-MS. *J Agric Food Chem.* 50: 5722-5728.
- Whalen MM, Loganathan BG, Kannan K (1999). Immunotoxicity of environmentally relevant concentrations of butyltin on human natural killer cells in vitro. *Environ Res.* 81: 108-116.
- Ysart G, Miller P, Croasdale M, Crews H, Robb P, Baxter M *et al.* (2000). 1997 UK Total diet study—dietary exposures to aluminium, arsenic, cadmium, chromium, copper, lead, mercury, nickel, selenium, tin and zinc. *Food Addit Contam.* 17: 775-786.
- Zhangy, Frankenberger WT Jr (2001). Speciation of selenium in plant water extracts by ion exchange chromatography-hydride generation atomic absorption spectrometry. *Sci Total Environ* 269: 39-47
- Zhou Q, Jiang G, Liu J (2001). Small-scale survey on the contamination status of butyltin compounds in seafoods collected from seven Chinese cities. *J Agric Food Chem.* 49: 4287-4291.

Gillermana Font, Mónica Fernández, M.^a José Ruíz, Yolanda Picó

Introducción. Clasificación de los plaguicidas. Legislación. Preparación de la muestra. Determinación. Métodos inmunoquímicos. Incidencia de los residuos de plaguicidas en los alimentos y evaluación de su riesgo toxicológico. Bibliografía.

Introducción

Los plaguicidas comprenden un grupo de sustancias pertenecientes a distintas familias químicas con la única característica común de ser eficaces contra las plagas; incluyen compuestos con una gran variedad de estructuras químicas y, por consiguiente, presentan diferencias en sus modos de acción, absorción, biotransformación, y eliminación. Estos compuestos se utilizan para combatir las enfermedades y las plagas que afectan la producción agrícola y animal, y como reguladores del crecimiento, desfoliantes, o desecantes, aunque estos últimos no se emplean normalmente como plaguicidas. Sin embargo, algunos residuos de estos compuestos persisten en los alimentos y constituyen un riesgo importante para la salud humana (Repetto *et al.*, 1995).

Los plaguicidas se vinculan con un gran rango de riesgos, que abarcan desde efectos a

corto plazo generales como dolores de cabeza y náuseas hasta los efectos crónicos como cáncer, daños en el sistema reproductor, y disrupción endocrina (Ecobichon, 2001). Los efectos de salud crónicos pueden presentarse años después de la exposición a pequeñas cantidades provenientes del medio ambiente, o de los residuos presentes en aguas y alimentos. El espectro de toxicidad para los mamíferos abarca desde compuestos muy tóxicos, como algunos organofosforados y carbamatos, pasando por compuestos de baja toxicidad aguda pero con un potencial importante para producir efectos a largo plazo, como muchos fungicidas, hasta compuestos que son prácticamente no tóxicos (Repetto *et al.*, 1995; Ecobichon, 2001).

La mayoría de los países han definido Límites Máximos de Residuos (LMR) legales para limitar los residuos de plaguicidas en aguas y alimentos con objeto de proteger la seguridad de los consumidores y regular su presencia en el

ambiente. La determinación de residuos de plaguicidas es un requisito necesario para garantizar el cumplimiento de la legislación, dirigir programas de monitorización en alimentos y muestras ambientales, y estudiar su modo de la acción y distribución. Las metodologías analíticas utilizadas han de ser capaces de determinar residuos a niveles muy bajos, así como de identificarlos y cuantificarlos inequívocamente (Seiber *et al.*, 1999; Picó *et al.*, 2000a; Juan *et al.*, 2003; Picó *et al.*, 2004a).

En este capítulo se recopilan los métodos desarrollados para la determinación de residuos de plaguicidas en alimentos, y su aplicación, con el fin de establecer el contenido en plaguicidas, comprobar si cumplen la legislación vigente, y evaluar el riesgo toxicológico derivado de su presencia.

Clasificación de los plaguicidas

Los plaguicidas se clasifican en función de su uso, estructura química, modo de acción, y/o formulación, aunque algunos de ellos se usan contra dos o más grupos de plagas, y pueden tener diferentes modos acción (Repetto *et al.*, 1995).

La clasificación más importante se establece de acuerdo con la plaga que controlan. Los grupos son insecticidas que destruyen insectos, herbicidas que eliminan malas hierbas, fungicidas que controlan hongos, etc. Los más usados son insecticidas y herbicidas; sin embargo, hay muchas otras aplicaciones.

La segunda clasificación en orden de importancia los agrupa por su naturaleza química. Los plaguicidas se dividen en dos grupos químicos: inorgánicos y orgánicos. La mayoría de los actualmente en uso son compuestos orgánicos, de los cuales una pequeña proporción está constituida por aquellos presentes de manera natural en las plantas o derivados de estos (incluyen

productos como rotenona, piretrina y nicotina). La mayoría, sin embargo, son compuestos sintéticos, responsables de la expansión rápida del uso de los plaguicidas desde la década de los 40, que son eficaces y específicos en su actividad (Ecobichon, 2001). La Tabla 19.1 ilustra las estructuras más representativas de los grupos químicos más importantes que son:

- (I) Organoclorados, un grupo de hidrocarburos con uno o más átomos de cloro, como clordano, dieldrin, y DDT.
- (II) Organofosforados integrados por ésteres del ácido fosfórico, fosfónico, fosfotióico, u otros ácidos relacionados. Algunos de los ejemplos más comunes en este grupo son: diazinon, diclorvos, y malation.
- (III) Carbamatos formados por sales o ésteres del ácido carbámico, como carbaril y propoxur.
- (IV) Piretrinas, los plaguicidas más representativos de origen natural, y piretroides sintéticos, como D-fenotrin, cipermetrin, deltametrin con acción similar al piretro.
- (V) Triazinas, constituidas por anillos triazínicos con distintos sustituyentes en posiciones 1, 3, 5, que son herbicidas clásicos, como atrazina, simazina o prometrina.
- (VI) Ureas sustituidas, que comprenden numerosos subgrupos como fenilureas, sulfonilureas, o benzoilureas, que son principalmente herbicidas, aunque algunas tienen actividad insecticida. Ejemplos son monuron, linuron o rimsulfuron.

Además de estos grupos, se han desarrollado nuevos compuestos como lactonas macrocíclicas, tetranortriterpenoides, sales de amonio cuaternario, dinitroanilinas, acetamidas, oximas, triazoles y moléculas con un núcleo de piridina con modos de acción muy heterogéneos (Picó *et al.*, 2000a).

Tabla 19.1. Estructura química de los plaguicidas más importantes.

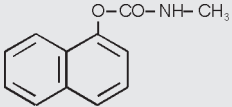
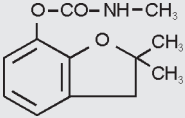
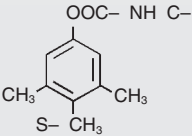
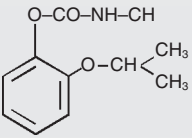
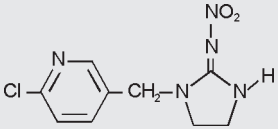
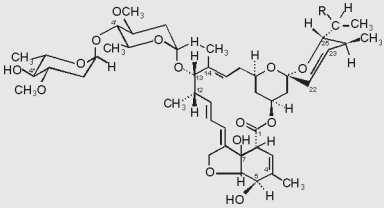
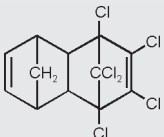
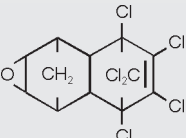
Clase	Plaguicida	Estructura química
Insecticidas		
Carbamatos	Aldicarb	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3-\text{S}-\text{C}-\text{CH}=\text{N}-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
	Carbaril	
	Carbofurano	
	Metiocarb	
	Propoxur	
Cloronicotilo	Imidacloprid	
Lactona macrocíclica	Abamectina	
Organoclorados	Aldrin	
	Dieldrin	

Tabla 19.1. Estructura química de los plaguicidas más importantes (Continuación).

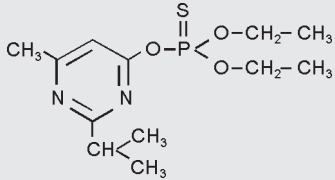
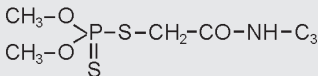
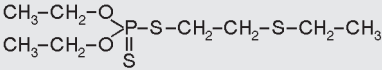
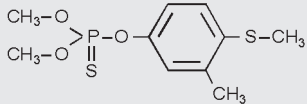
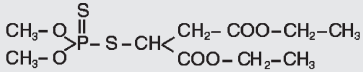
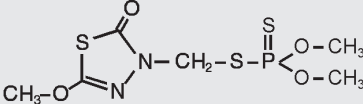
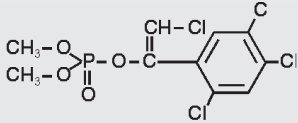
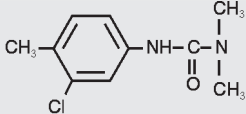
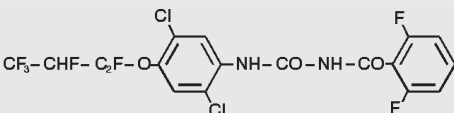
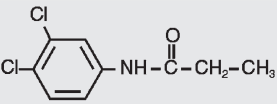
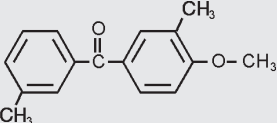
Clase	Plaguicida	Estructura química
Organofosforados	Diazinon	
	Dimetoato	
	Disulfoton	
	Fention	
	Malation	
	Metidation	
	Tetraclorvinfos	
Urea	Clortoluron	
	Lufenuron	
Herbicidas		
Amida	Propanil	
Benzofenona	Metoxifenona	

Tabla 19.1. Estructura química de los plaguicidas más importantes (Continuación).

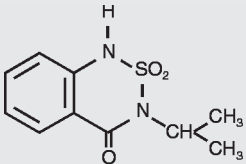
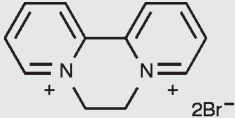
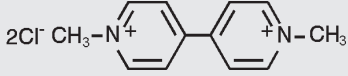
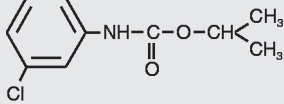
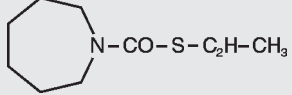
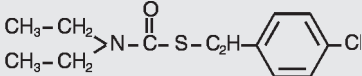
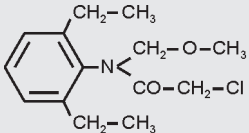
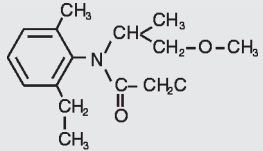
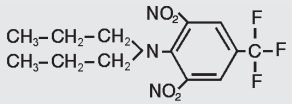
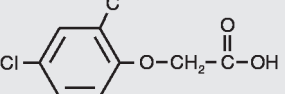
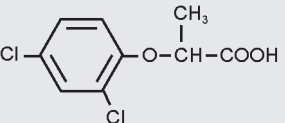
Clase	Plaguicida	Estructura química
Benzotiadiazol	Bentazona	
Bipiridilos	Dicuat	
	Paracuat	
Carbamatos	Clorprofam	
	Molinato	
	Tiobencarb	
Cloroacetamidas	Alacloro	
	Metolacoloro	
Derivados de la dinitroanilina	Trifluralina	
Fenoxiácidos clorados	2,4-D	
	Diclorprop-p	

Tabla 19.1. Estructura química de los plaguicidas más importantes (Continuación).

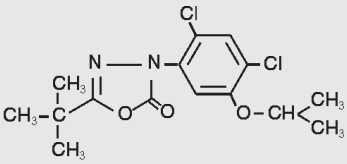
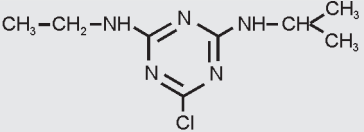
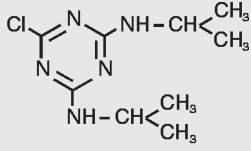
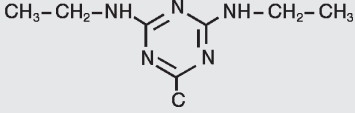
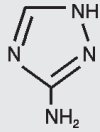
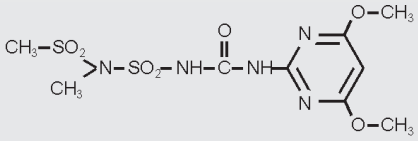
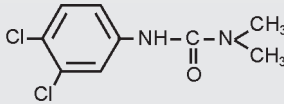
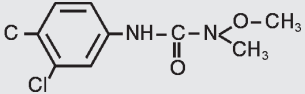
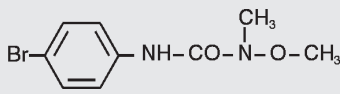
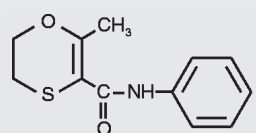
Clase	Plaguicida	Estructura química
Oxadiazol	Oxadiazon	
Triazinas	Atrazina	
	Propazina	
	Simazina	
Triazol	Amitrol	
Ureas	Amidosulfuron	
	Diuron	
	Linuron	
	Metobromuron	
Fungicidas		
Anilidas	Carboxin	

Tabla 19.1. Estructura química de los plaguicidas más importantes (Continuación).

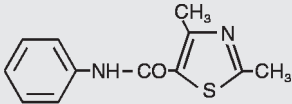
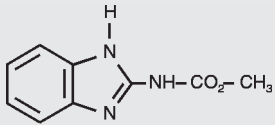
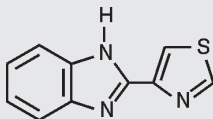
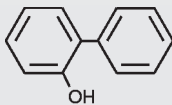
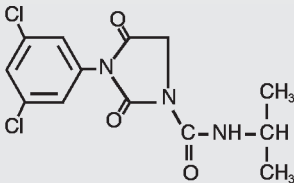
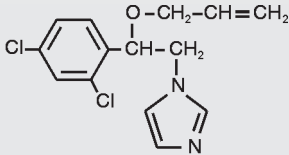
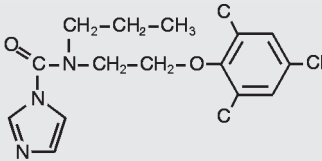
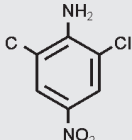
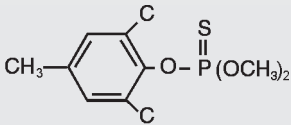
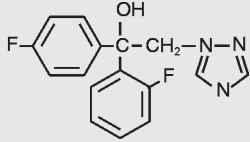
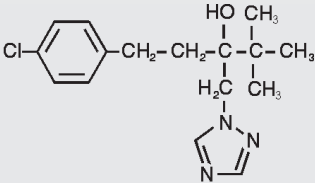
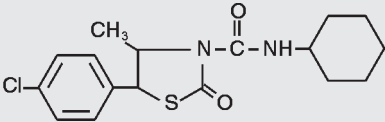
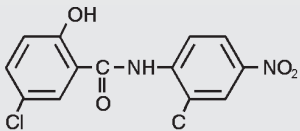
Clase	Plaguicida	Estructura química
Bencimidazoles	Metsulfovax	
	Carbendazima	
	Triabendazol	
Bifenilo	Ortofenilfenol	
Dicarboximida	Iprodiona	
Imidazoles	Imazalil	
Nitroanilina clorada	Procloraz	
	Dicloran	
Organofosforado	Tolclofos metil	

Tabla 19.1. Estructura química de los plaguicidas más importantes (Continuación).

Clase	Plaguicida	Estructura química
Triazoles	Flutriafol	
	Tebuconazol	
Acaricida Carboxamida	Hexitiazox	
Molusquicida Salicilanilida	Niclosamida	

Legislación

Los residuos de plaguicidas que pueden estar presentes en los alimentos como consecuencia de las prácticas agrícolas están limitados por las autoridades gubernamentales, que se guían por las recomendaciones de organismos internacionales como el Comité Conjunto de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO) sobre Residuos de Plaguicidas (JMPR). Estos grupos establecen ingestas diarias admisibles (IDA) y recomiendan límites máximos de residuos (LMR).

La legislación española para plaguicidas, está homologada a la europea, y esta última se remonta a noviembre de 1976 cuando la directi-

va del Consejo 76/895 / EEC ajustó los LMR para 43 sustancias activas en frutas y verduras.

Para más información sobre la legislación, niveles, e intervalos de seguridad, se pueden consultar las páginas web <http://europa.eu.int/> y <http://www.mcx.es/plaguicidas/espanol.asp>.

Preparación de la muestra

La preparación de la muestra es el paso más complejo en la determinación de residuos en alimentos, representando más del 50 % del tiempo de análisis. Este proceso se compone de extracción de los plaguicidas desde la matriz y purificación del extracto (Seiber, 1999).

1. Extracción con disolventes orgánicos

Métodos clásicos

Para la extracción de los residuos de plaguicidas presentes en alimentos hay numerosos procedimientos que emplean mezclas muy variadas de disolventes, ya que no hay método oficial establecido (Seiber, 1999; Ahmed 2001; Juan *et al.*, 2003; Picó *et al.*, 2004a). Los tres procedimientos de extracción más aplicados son: homogeneización con acetona y reparto con éter de petróleo o con una mezcla de diclorometano-hexano; con acetonitrilo sin reparto posterior, y extracción con acetato de etilo y sulfato sódico anhidro para eliminar el agua.

La Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos también ha recopilado en el Manual Analítico de Plaguicidas (PAMI) (FDA, 1994) métodos especiales dirigidos al análisis de ciertos grupos de plaguicidas como carbamatos (método de Krause) y fenilureas. En la Figura 19.1 se esquematizan estos métodos, poniéndose de manifiesto su complejidad y laboriosidad.

Nuevas tendencias en la extracción con disolventes orgánicos

Las técnicas tradicionales de extracción con disolventes son laboriosas y requieren grandes volúmenes de disolventes orgánicos. Además, algunas veces se forman emulsiones que disminuyen la reproducibilidad del análisis. Para superar estas deficiencias se emplean otros métodos de extracción recientemente desarrollados, como extracción asistida por microondas (EAM) y extracción líquida presurizada (ELP) o extracción acelerada con disolventes, que se ayudan de elevada temperatura y/o presión. Ambos proporcionan la precisión analítica adecuada, disminuyen el consumo de disolventes y han sido ampliamente aplicados a la determinación de plaguicidas en alimentos (Ahmed, 2001, Nunes y Barceló, 1999).

En la Tabla 19.2 se comparan las ventajas e inconvenientes de estos nuevos métodos de extracción con respecto a los métodos clásicos.

2. Purificación

Los extractos orgánicos se purifican mediante reparto con disolventes orgánicos, cromatografía de adsorción sobre florisil o carbón, y cromatografía de permeación sobre gel (CPG). El método usado para la purificación de los extractos depende del tipo de muestra y la selectividad de los métodos de detección (Nunes y Barceló, 1999; Tadeo *et al.*, 2000, Ahmed 2001).

Muchos de los métodos propuestos utilizan reparto con grandes cantidades de diclorometano u otros disolventes orgánicos. Una desventaja del uso de diclorometano es su impacto ambiental como disolvente clorado (Nunes y Barceló, 1999).

La CPG es probablemente la purificación más universal que separa compuestos de acuerdo con sus respectivos tamaños moleculares. Esta técnica fue propuesta para el análisis de plaguicidas por Stalling *et al.* (Tadeo *et al.*, 2000), elaborada y mejorada por Specht y Tillkes (Ahmed, 2001) y posteriormente optimizada para reducir el elevado consumo de disolventes asociado a esta técnica, tanto en las aplicaciones que utilizan columnas preparativas como en las que emplean columnas de alta resolución. La separación se realiza con geles de poliestireno y divinilbenceno, principalmente Bio-Beads SX-3 y la elución con mezclas de acetato de etilo y ciclohexano. Es una técnica apropiada para casi todos los tipos de plaguicidas, ya que estos tienen masas moleculares entre 100 y 500, mientras que la mayoría de los compuestos interferentes procedentes de la matriz como lípidos y colorantes tienen masas de 600 a 1.500.

La purificación con columnas de adsorción, especialmente florisil, alúmina, y sílice también es muy utilizada. La mayoría de las fases proporcionan una purificación adecuada cuando los plaguicidas (compuestos poco polares) se eluyen con mezclas de disolventes de baja polaridad, y las impurezas (compuestos polares) procedentes de la matriz quedan retenidas en la fase.

La extracción en fase sólida (EFS) es una técnica de preparación de la muestra que también se utiliza para purificar extractos. Los analitos y algunos componentes de la matriz quedan en la

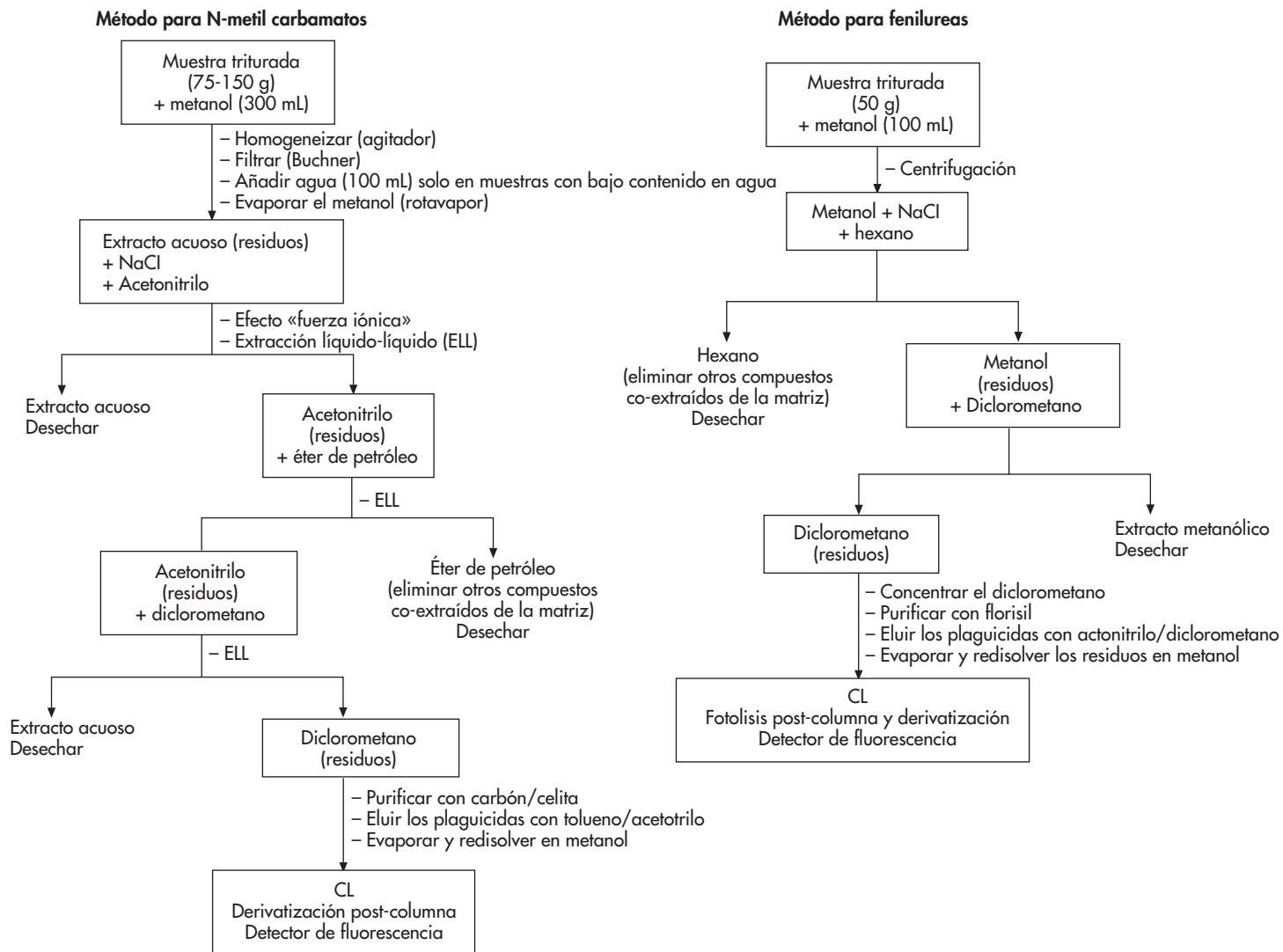


Figura 19.1. Esquema de los métodos de extracción para N-metil carbamatos y fenilureas.

Tabla 19.2. Estudio comparativo de distintos métodos de extracción con disolventes orgánicos.

Técnica de extracción	Tiempo Tamaño de muestra Cantidad disolvente	Ventajas	Inconvenientes
Sonicación La muestra se sumerge en disolvente orgánico y se coloca en un baño de ultrasonidos.	– 10-60 min. – 1-30 g. – 30-200 ml.	– Económico. – Permite múltiples extracciones.	– Elevado consumo de disolventes orgánicos. – Se requiere purificación.
Soxhlet La muestra se coloca en un soporte inerte y es repetidamente percolada con el vapor condensado del disolvente.	– 3-48 horas. – 1-30 g. – 100-500 ml.	– Económico. – No requiere filtración.	– Elevado tiempo de extracción. – Elevado consumo de disolventes orgánicos. – Se requiere purificación. – Altas temperaturas que pueden degradar algunos plaguicidas.
EAM La muestra se sumerge en un disolvente orgánico dentro de un recipiente que se irradia con microondas.	– 10-60 min. – 1-30 g. – 10-150 ml.	– Rapidez. – Bajo consumo de disolventes orgánicos. – Permite múltiples extracciones.	– El disolvente ha de ser capaz de adsorber microondas. – Se requiere purificación. – Tiempo de espera para que el recipiente se enfríe. – Altas temperaturas que pueden degradar algunos plaguicidas.
ELP La muestra y el disolvente se calientan y se someten a presión.	– 5-30 min. – 1-30 g. – 10-100 ml.	– Rapidez. – Bajo consumo de disolventes orgánicos. – No requiere filtración – Sistema automatizado.	– Se requiere purificación.

fase sólida y los compuestos de interés se desorben posteriormente con un disolvente apropiado. Los plaguicidas polares y moderadamente polares se aíslan sobre fases polares como carbón o sílice modificada con grupos amino, diol, o ciano. Los analitos apolares o poco polares se extraen con fases no polares, como sílice modificada con grupos ciclohexil, octil, u octadecil. La EFS puede realizarse utilizando como soportes de la fase, columnas, cartuchos o discos de membrana.

Existen métodos de purificación alternativos que usan técnicas como la cromatografía líquida (CL) o la diálisis de membrana que tratan de minimizar el tratamiento de la muestra para las matrices grasas.

3. Extracción en fase sólida

En las últimas dos décadas, se ha dedicado especial atención a la miniaturización de las técnicas de preparación de la muestra y se han propuesto varias: extracción en fase sólida (EFS), dispersión de matriz en fase sólida (DMFS), microextracción en fase sólida (MEFS) y extracción sobre barras magnéticas (EBM) (Ahmed, 2001). La Tabla 19.3 resume las ventajas e inconvenientes de las distintas variantes.

Estas técnicas evitan los inconvenientes asociados a la extracción con disolventes como el elevado consumo de los mismos, la formación de emulsiones, y ofrecen otras ventajas como la

Tabla 19.3. Estudio comparativo de distintos métodos de extracción en fase sólida.

Técnica	Tiempo Tamaño de muestra Cantidad de fase Volumen de disolvente	Ventajas	Inconvenientes
Extracción en fase sólida	<ul style="list-style-type: none"> - 10-30 min. - 10-100 ml. - Cartuchos y discos: C₁₈, C₈, carbón, grafito, resinas poliméricas, intercambio catiónico y cartuchos con inmunosorbentes. - 5-15 ml. 	<ul style="list-style-type: none"> - Sencillez y rapidez. - Automatización. - Bajo consumo de disolventes orgánicos. - Disponibilidad de una gran variedad de fases. 	<ul style="list-style-type: none"> - Las muestras sólidas requieren una extracción previa con disolventes miscibles con agua. - Las matrices más complejas requieren purificación.
Dispersión de matriz en fase sólida	<ul style="list-style-type: none"> - 10-30 min. - 0,5 g de muestra (sólida o semisólida). - 0,5 g de fase sólida: C₁₈, C₈, ciano, amino, fenil, florisil y sílice. - 5-15 ml. 	<ul style="list-style-type: none"> - Extracción directa de muestras sólidas y semisólidas. - Miniaturización: rapidez y bajo coste, reducción del material necesario para la extracción. - Bajo consumo de disolventes orgánicos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Las muestra utilizada puede que no sea representativa del lote entero.
Microextracción en fase sólida	<ul style="list-style-type: none"> - 15-60 min. - 10 mL (solución acuosa). - Fibra recubierta con una capa de 30-100 mm polidimetilsiloxano (PDMS), poliacrilato, carbowax-PDMS, PDMS-divinilbenceno, carboxen-PDMS. 	<ul style="list-style-type: none"> - Extracción directa de muestras líquidas . - Miniaturización: rapidez y bajo coste, reducción del material necesario para la extracción. - Automatización del proceso de extracción con posibilidad de acoplar CL, CG y EC. - No se precisa de disolventes orgánicos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Se desconoce el efecto que puede tener la matriz sobre el proceso. - No se puede realizar extracción directa sobre las muestras sólidas.
Extracción con barra magnética	<ul style="list-style-type: none"> - Extracción: 15-60 min, desorción: 15 min. - 10 mL (solución acuosa). - Fibra recubierta con una capa de > 100 mm de PDMS. 	<ul style="list-style-type: none"> - Extracción directa de muestras líquidas . - Miniaturización: rapidez y bajo coste, reducción del material requerido para la extracción. - Mayor sensibilidad que la MEFS. - No se precisa de disolventes orgánicos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Limitada disponibilidad de fases para las sustancias más polares.

reducción de la cantidad de muestra y del tiempo de extracción (Picó *et al.*, 2004a).

Extracción en fase sólida convencional (EFS)

Esta técnica consiste en extraer los plaguicidas disueltos que quedan retenidos al atravesar la fase y eluir posteriormente con una cantidad mínima de disolvente. La elección de la fase sólida depende de la polaridad de los plaguicidas, siendo las más empleadas C₁₈ y Florisil. Antes de que la EFS pueda aplicarse a alimentos sólidos se requiere

una extracción con disolventes miscibles con agua tales como metanol, acetonitrilo, acetona o etanol (Nunes y Barceló, 1999, Juan *et al.*, 2003).

Dispersión de matriz en fase sólida (DMFS)

La dispersión de matriz en fase sólida (DMFS) es una técnica que consiste en dispersar la muestra (sólida, semisólida o líquida) en una fase sólida como C₁₈, C₈ o Florisil, etc., hasta conseguir una mezcla homogénea que se introduce en una columna cromatográfica, que puede conte-

ner o no otra fase sólida que permite purificar simultáneamente, eluyendo posteriormente los plaguicidas con diferentes disolventes orgánicos o mezclas de ellos (Barker, 2000a).

La DMFS es una alternativa valiosa a los métodos de extracción más clásicos porque permite una reducción importante de la cantidad de muestra y el consumo de disolvente necesario para el análisis multiresiduo. Además, dependiendo de la naturaleza de la fase seleccionada, se produce una purificación simultánea del extracto (Barker, 2000b).

Microextracción en fase sólida (MEFS)

La microextracción en fase sólida (MEFS) se basa en la adsorción de los plaguicidas sobre una fibra recubierta con una fase estacionaria, y una posterior desorción, que puede realizarse directamente en el inyector de un cromatógrafo de gases o de líquidos (Kataoka *et al.*, 2000, Beltran *et al.*, 2000). La extracción se puede realizar por inmersión de la fibra en una muestra líquida o por espacio de cabeza. La principal ventaja de esta técnica es que elimina la utilización de disolventes.

La MEFS se aplica sobre extractos acuosos, pero está transformándose en una técnica popular para el análisis de plaguicidas en alimentos, especialmente seguida por la cromatografía de gases (CG). Las muestras sólidas, como fruta y miel, se extraen por agitación con mezclas hidroalcohólicas, mientras que las muestras líquidas, incluyendo zumos de frutas, simuladores de alimentos o vinos, se extraen directamente o tras diluir con agua para eliminar o reducir las interferencias de matriz (Beltran *et al.*, 2000, Lord y Pawliszyn, 2000).

Extracción por agitación con barras magnéticas (EBM)

La EBM es una técnica de reciente introducción similar a la microextracción en fase sólida pero que utiliza una barra magnética recubierta de fase en lugar de una fibra. La principal diferen-

cia entre ambas técnicas es que la cantidad de fase en la barra magnética es mayor que en la fibra lo que le confiere una mayor sensibilidad y reproducibilidad (Baltussen *et al.*, 2002). La EBM se ha utilizado para determinar plaguicidas en naranjas y mieles tras extraer la muestra con una mezcla hidroalcohólica. Los plaguicidas se eluyen con metanol y se determinan por una técnica cromatográfica.

4. Extracción con fluidos supercríticos

Es un proceso basado en la utilización de fluidos supercríticos para solubilizar compuestos de baja volatilidad presentes en una muestra. Un fluido supercrítico es aquel que cuando se encuentra por encima de su presión y temperatura críticas aumenta su poder de solvatación para fraccionar mezclas de compuestos o separar los compuestos orgánicos de los inorgánicos. Estos fluidos se comportan como líquidos al disolver el analito, pero tienen la capacidad de difusión y transporte propios de los gases. Los fluidos más utilizados son CO₂, NO₂ y NH₃, por ser inertes, no tóxicos y económicos (Ahmed, 2001; Juan *et al.*, 2003; Picó *et al.*, 2004a).

Esta técnica es rápida, selectiva, emplea pequeñas cantidades de disolventes y se puede acoplar en línea a sistemas de CG, CL o cromatografía con fluidos supercríticos (CFS) aumentando así su poder de resolución. Sin embargo, también presenta inconvenientes como baja reproducibilidad e interferencias de matriz que hacen que su uso esté menos generalizado (Ahmed *et al.*, 2001).

Determinación

La determinación se realiza mediante técnicas de separación eficaces y rápidas como la cromatografía líquida, cromatografía de gases y electroforesis capilar (Ahmed *et al.*, 2001; Juan *et al.*, 2003; Picó *et al.*, 2004a). Las tres técnicas tienen características propias que las hacen más adecuadas para unos compuestos que para otros, como se resume en la Tabla 19.4.

Tabla 19.4. Comparación de la CG, CL y EC.

Técnica	Ventajas	Inconvenientes	Solución
Cromatografía de gases	<ul style="list-style-type: none"> - Elevado poder de resolución. - Sensibilidad. - Selectividad. - Disponibilidad de librerías con espectros de masas para la identificación de sustancias desconocidas. 	<ul style="list-style-type: none"> - Inadecuado para el análisis de sustancias polares, termolábiles y poco volátiles. - Consumo de gases de gran pureza y caros. 	<ul style="list-style-type: none"> - Derivatización.
Cromatografía líquida	<ul style="list-style-type: none"> - Aplicable a cualquier sustancia a pesar de su volatilidad y termolabilidad. - Disponibilidad de distintas fases móviles y estacionarias. 	<ul style="list-style-type: none"> - Insuficiente eficiencia en la separación y selectividad. - Elevado consumo de disolventes orgánicos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Desarrollo de columnas con materiales más eficientes y selectivos (inmunosorbentes, y polímeros de huella molecular). - Mejora de la selectividad mediante la espectrometría de masas.
Electroforesis capilar	<ul style="list-style-type: none"> - Elevada eficiencia en la separación. - Bajo consumo de reactivos tóxicos y caros. - Automatización y miniaturización (microchip). 	<ul style="list-style-type: none"> - Baja sensibilidad. 	<ul style="list-style-type: none"> - Enriquecimiento de la muestra. - Desarrollo de métodos de acoplamiento que combinen la electroforesis con detectores selectivos.

1. Cromatografía de gases (GC)

La CG es, sin duda, la técnica de determinación que más se ha utilizado para el análisis de plaguicidas y muchos de sus metabolitos, en especial aquellos con estructuras termoestables y de polaridad baja. Los compuestos que contienen halógenos, azufre y/o fósforo, son detectables a concentraciones muy bajas y con selectividad alta debido a detectores como el detector de captura de electrones (DCE), detector fotométrico (DF) y detector nitrógeno-fósforo (DMF). Además de estos detectores selectivos para moléculas que contienen determinados átomos, la CG se emplea también con sistemas de emisión atómica (EA) y con espectrometría de masas (EM) simple y en tándem para la confirmación y la identificación estructural de plaguicidas (van der Hoff y van Zoonen, 1999). Actualmente, estos detectores han desplazado a los tradicionales porque no requieren purificaciones tan exhaustivas ni técnicas alternativas de confirmación. En la Figura 19.2 se muestra el cromatograma correspondiente a la separación de 20

plaguicidas utilizando CG-EM de baja presión y convencional (Mastovska *et al.*, 2001).

El uso de la CG con espectrometría de masas en tándem (EM/EM) permite obtener confirmación de la identidad de un plaguicida, con sensibilidad similar a los detectores convencionales. En este proceso, el analito ionizado, se retiene en el espectrómetro de masas, que a continuación realiza con él, un segundo espectro. La Figura 19.3 muestra el cromatograma y el espectro EM/EM del metamidofos utilizando impacto de electrones e ionización química (Martínez-Vidal, 2002).

La CG es la técnica de elección para la determinación de compuestos volátiles y termoestables. Sin embargo, los plaguicidas de reciente síntesis son cada vez menos volátiles, más polares y termolábiles, por lo que esta ya no es la técnica más adecuada para la separación.

2. Cromatografía líquida (CL)

La aplicación de la CL para el análisis de residuos de plaguicidas se ha incrementado especta-

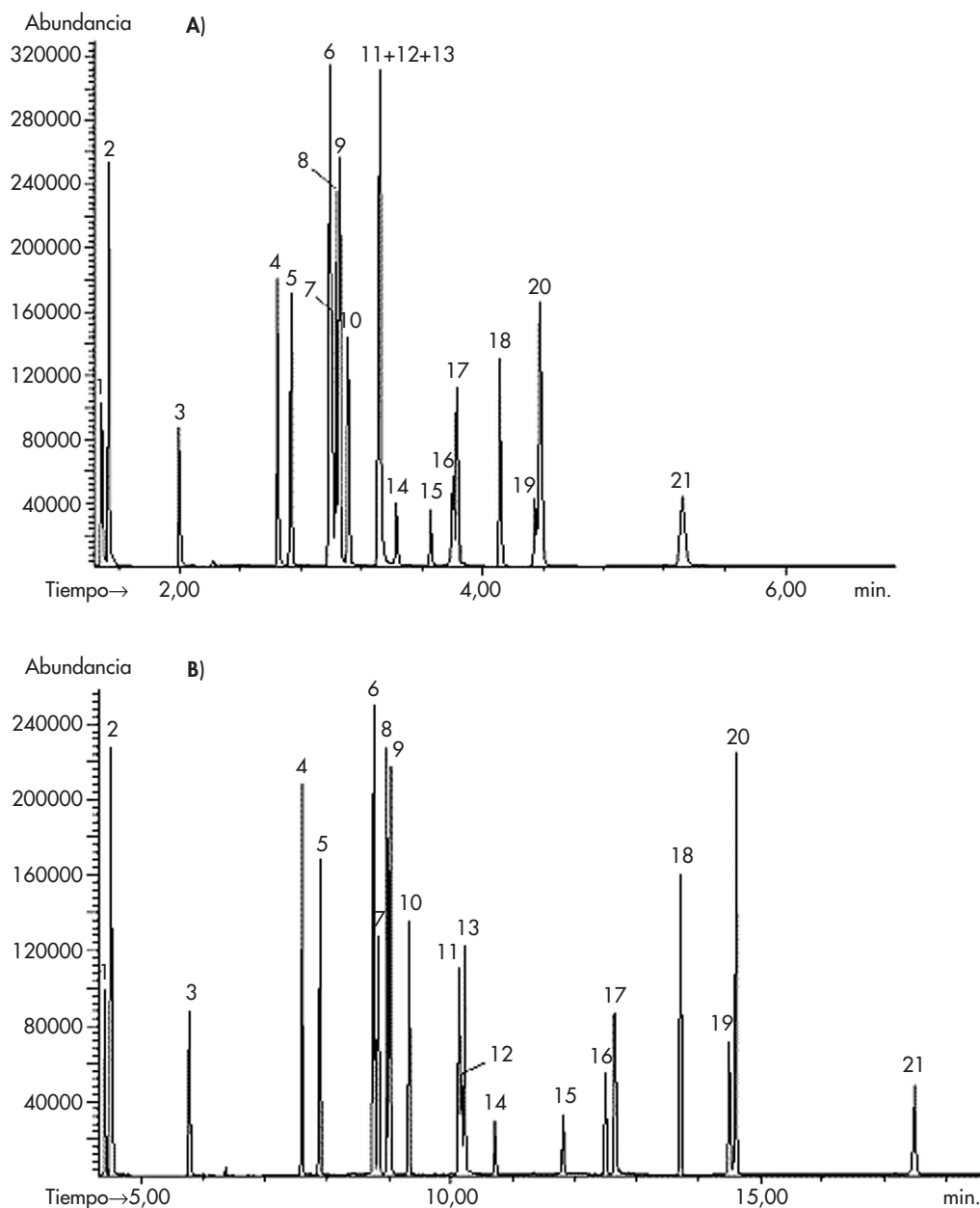


Figura 19.2. Cromatograma de una mezcla de plaguicidas (volumen de inyección: 1 μ l, concentración de cada plaguicida en tolueno 5 μ g/ml) en: (A) condiciones de CG-EM a baja presión; (B) condiciones de CG-EM convencionales: 1. metamidofos, 2. diclorvos, 3. acefato, 4. dimetoato, 5. lindano, 6. carbaril, 7. heptacloro, 8. pirimifos-metil, 9. metiocarb, 10. clorpirifos, 11. captan, 12. tiabendazol, 13. procimidona, 14. endosulfan I, 15. endosulfan II, 16. endosulfan sulfato, 17. propargita, 18. fosalone, 19. *cis*-permetrin, 20. *trans*-permetrin, 21. deltametrin. (Reproducida de Mastovska *et al.* 2001 con permiso de Elsevier).

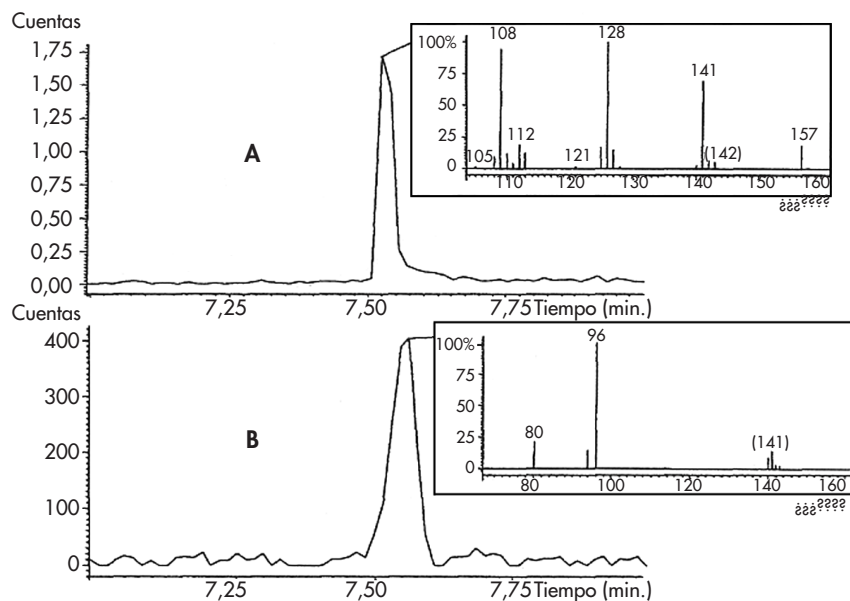


Figura 19.3. Cromatograma y espectro del metamidofos: (A) ionización química-EM/EM, (B) impacto electrónico-EM/EM. (Reproducida de Martínez-Vidal 2003 con permiso de Springer Verlag).

cularmente en los últimos diez años (Picó *et al.*, 2000a; Ahmed 2001; Careri *et al.*, 2002). Esta técnica presenta un poder de resolución inferior al de la CG pero seleccionando una fase móvil y estacionaria adecuadas se obtienen separaciones aceptables como se muestra en la Figura 19.4 (Fernández *et al.* 2002).

La técnica de CL más frecuentemente utilizada es la fase reversa con columnas analíticas rellenas de C_8 y C_{18} con una longitud máxima de 25 cm y fases móviles formadas por mezclas de metanol-agua y acetonitrilo-agua, adicionadas o no de sales y tampones (Ahmed, 2001).

Los detectores utilizados son: UV-Vis, que es universal pero poco selectivo ya que muchas moléculas absorben a una misma longitud de onda; fluorescencia, que por el contrario es muy selectiva, pero la mayoría de plaguicidas no son fluorescentes y se precisa de reacciones de derivatización, y espectrometría de masas, que es un detector muy sensible (Ahmed, 2001).

El auge de esta técnica está asociado al desarrollo de los detectores de espectrometría de masas, ya que son selectivos y sensibles, y permiten identificar y cuantificar los plaguicidas a

niveles muy bajos. Combinar la cromatografía líquida con espectrometría de masas ha sido complicado, ya que una técnica utiliza grandes cantidades de agua a flujos elevados, y la otra requiere vacío a elevadas temperaturas. La CL-EM se transformó en una técnica de rutina, gracias a las interfases de ionización a presión atmosférica (IPA): electrospray (ES) e ionización química a presión atmosférica (IQPA), que son técnicas de ionización suaves, que suelen proporcionar como ión mayoritario la molécula protonada o desprotonada y algún fragmento característico de la molécula. El inconveniente de estas técnicas de ionización es que no proporcionan tanta información estructural como la ionización de impacto electrónico utilizada tradicionalmente en CG, y por lo tanto hace más difícil la identificación (Picó *et al.*, 2000b; Careri *et al.*, 2002).

La CL también se combina con la EM en tándem, aplicándose especialmente el triple cuadrupolo (TC) y la trampa de iones (TI) para el aislamiento de los fragmentos. Estas técnicas son muy interesantes, porque el segundo espectro de masas mejora mucho el aporte de infor-

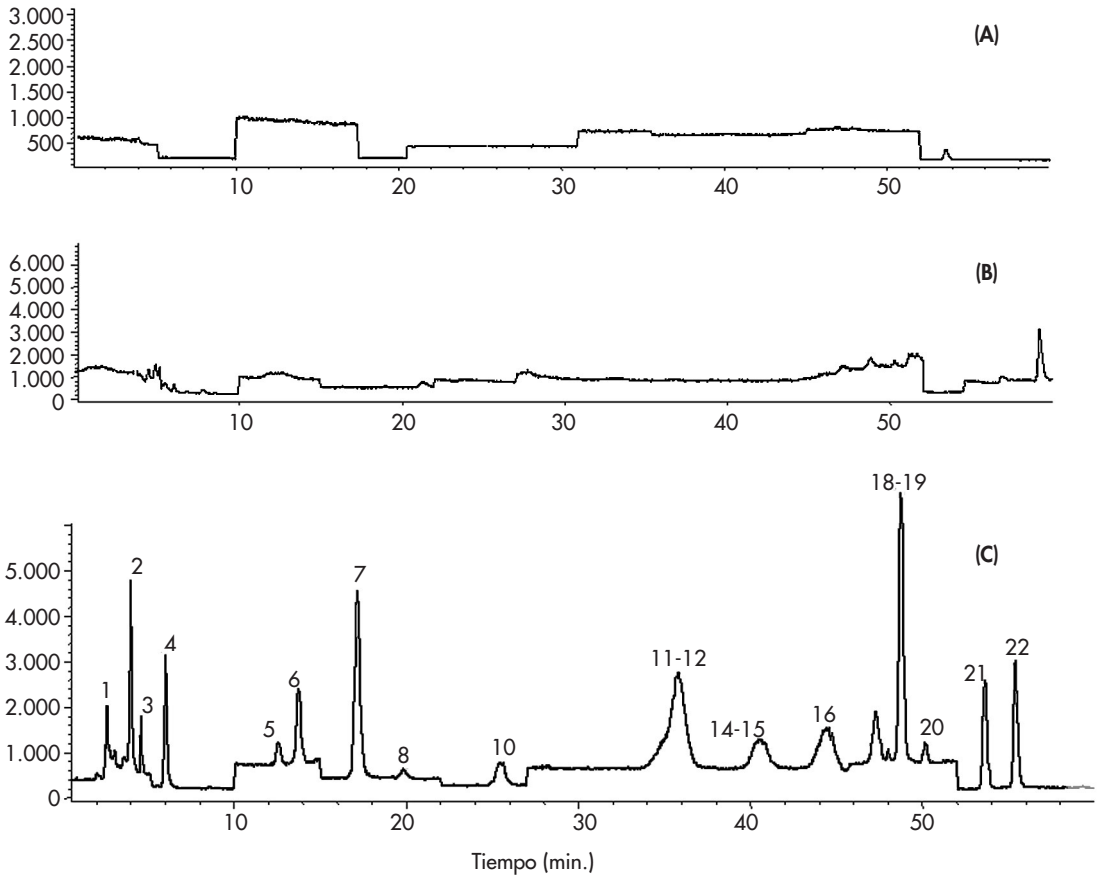


Figura 19.4. Cromatograma obtenido por CL-IQPA-EM de: (A) una muestra de miel no adicionada en ionización positiva; (B) una muestra de miel no adicionada en ionización negativa; y (C) una muestra de miel adicionada en ionización negativa. Identificación de los picos: 1. ometoato, 2. vamidotion, 3. dimetoato, 4. paraoxon, 5. heptenofos, 6. metidation, 7. metilparation, 8. malation, 9. tiazofos, 10. etil azinfos, 11. quinalfos, 12. fentoato, 13. paration, 14. diazinon, 15. cumafos, 16. fonofos, 17. metil pirimifos, 18. fosalone, 19. pirazofos, 20. metil clorpirifos, 21. etil pirimifos, 22. bromofos. (Reproducida de Fernández *et al.* 2001 con permiso de Springer Verlag).

mación estructural (Picó *et al.*, 2004b). La Figura 19.5 ilustra claramente como la utilización de la EM en tándem permite distinguir plaguicidas con la misma relación masa-carga (m/z). El carbaril se identifica por la pérdida de metil isocianato, CH_3NCO , ($\Delta 57$) y el tiabendazol por la pérdida de cianhídrico HCN ($\Delta 27$) de la molécula protonada que para ambos es m/z 202, obteniéndose iones productos a m/z 145 y m/z 175, respectivamente (Taylor *et al.*, 2002).

3. Electroforesis capilar (EC)

Las posibilidades de la electroforesis capilar (EC) en el análisis de plaguicidas son muy prometedoras ya que proporciona alta eficiencia en la separación, tiempos de análisis más cortos, poco consumo de reactivos costosos y disolventes tóxicos y la posibilidad de realizar el análisis en formato miniaturizado (tecnología de microchip) para analizar con regularidad muestras que

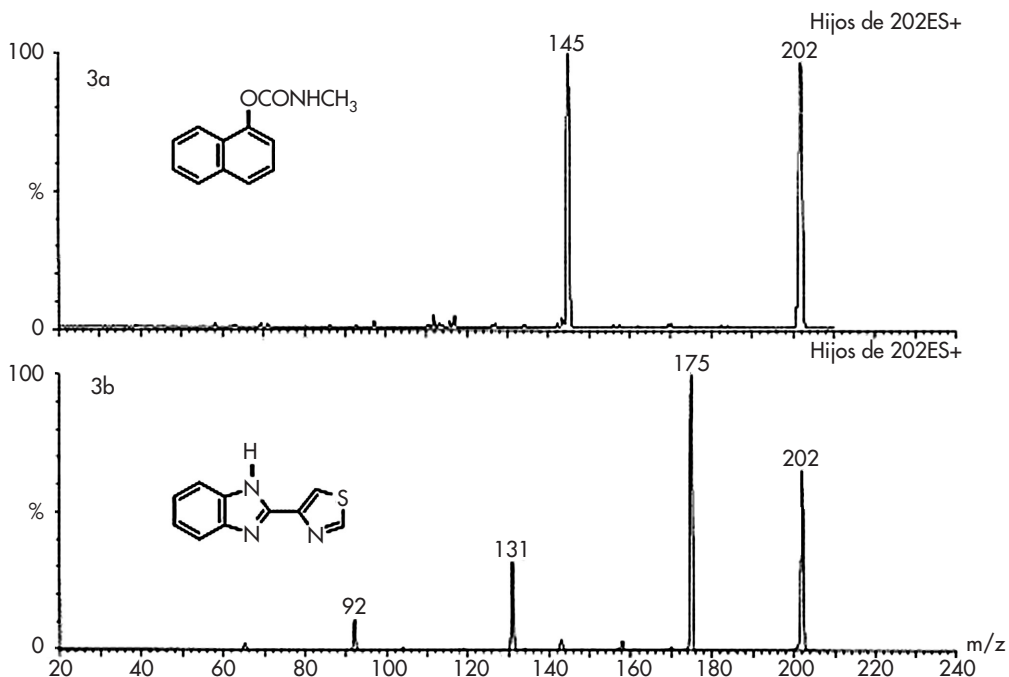


Figura 19.5. Espectro de masas del ión producto de (A) carbaril y (B) tiabendazol. (Reproducida de Taylor *et al.* 2002 con permiso de Elsevier).

contienen plaguicidas. La EC y electroforesis de capilar electrocinética micelar (ECEM) son los modos más aplicados en el análisis de plaguicidas (Picó *et al.*, 2003, Malik y Faubel, 2001).

El mecanismo de separación de EC está basado en las diferencias en la relación m/z de las moléculas. La separación se optimiza ajustando el pH y la fuerza iónica del tampón y adicionándole disolventes orgánicos. La Figura 19.6 ilustra la elevada eficacia en la separación que se obtiene ajustando estas condiciones (Rodríguez *et al.*, 2001).

La ECEM está basada en la interacción de los analitos con micelas de tensioactivos que se adicionan al tampón de separación, y que pueden separar tanto iones como solutos neutros (Picó *et al.* 2003).

La EC también permite separar enantiómeros mediante la adición de sustancias quirales al tampón de separación. Las combinaciones de tensioactivos (aquirales) y ciclodextrinas (quirales) también se utilizan para la separación de

enantiómeros y/o otros isómeros de plaguicidas (Malik y Faubel, 2001).

El inconveniente de esta técnica es la sensibilidad inadecuada debida al pequeño volumen de muestra inyectada (entre 1-10 nl). La sensibilidad de la EC se incrementa utilizando técnicas de preconcentración dentro del capilar. Las más populares concentran los analitos en base a los cambios de velocidad electroforética entre tampones de distinta fuerza iónica (Picó *et al.*, 2003).

La EC se puede combinar con casi los mismos detectores que la cromatografía líquida: UV-VIS, detector de filas de diodos (DFD), fluorescencia y EM, siendo este último, el más sensible y selectivo (Picó *et al.*, 2003; Malik y Faubel, 2001).

Métodos inmunoquímicos

Los métodos inmunoquímicos se basan en técnicas inmunológicas y biosensores. Estos méto-

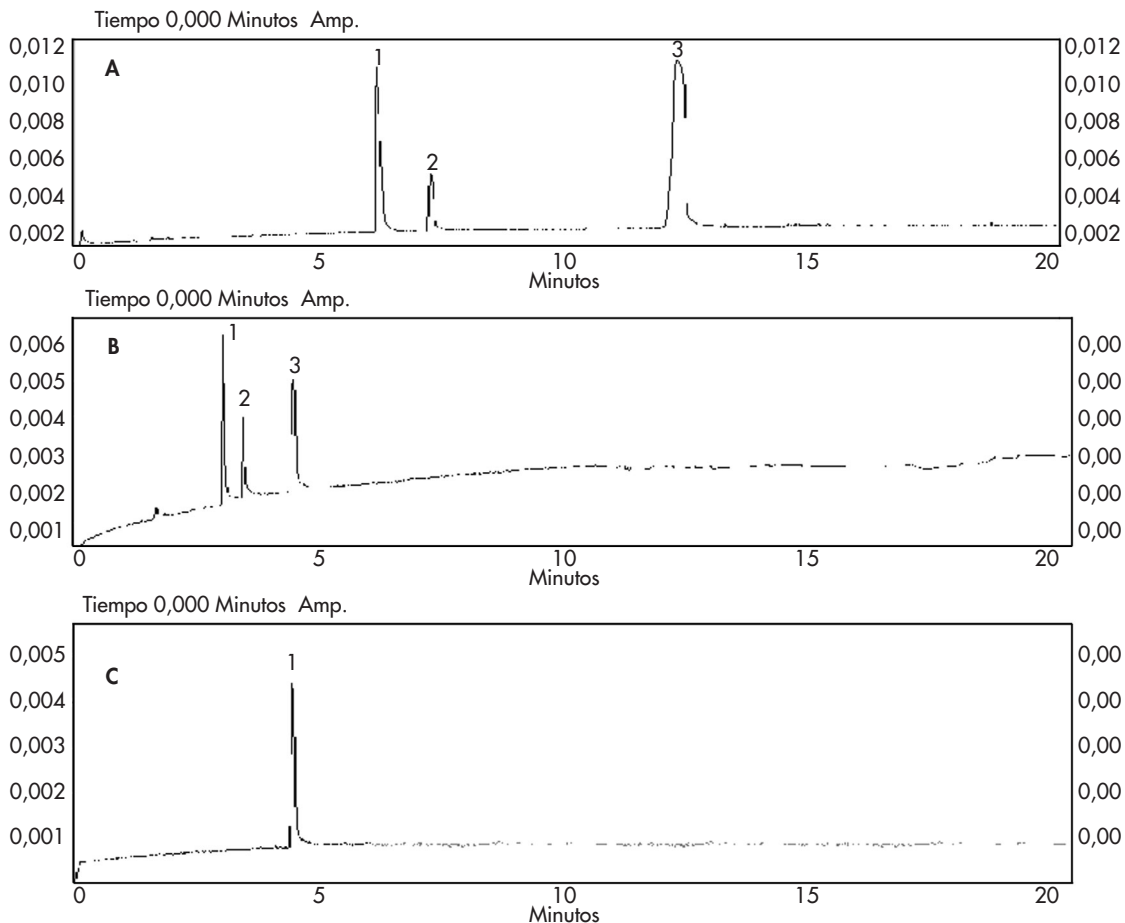


Figura 19.6. Electroferogramas de fungicidas utilizando diferentes pHs. Condiciones: tampón de fosfato 4 mM; voltaje de separación 25 kV; detección a 210 nm; capilar 60 cm \times 75 μ m D.I. (longitud efectiva 50 cm); inyección hidrodinámica 5 s; (A) pH 2,0; (B) pH 3,5; (C) pH 10,0: Identificación de los picos: 1. tiabendazol, 2. procloraz, 3. procimidona. (Reproducida de Rodríguez *et al.* 2001 con permiso de la Royal Society of Chemistry).

dos son una alternativa muy interesante a los métodos químicos porque son sencillos, económicos y permiten procesar un gran número de muestras en poco tiempo. Aunque muchos químicos reconocen el potencial de estos métodos para el análisis de alimentos, su uso todavía no se ha generalizado. Una de las causas que restringen su difusión es que en el caso de detectarse la presencia de algún plaguicida, es necesario realizar una confirmación por técnicas clásicas como CG o CL (Nunes *et al.*, 1998).

El método inmunoquímico más utilizado es el ensayo de enzimas unidas a inmuoadsorben-

tes (ELISA). El ELISA se ha desarrollado para determinar plaguicidas organofosforados y carbamatos en productos vegetales. Los resultados de los ELISA demuestran tener una buena correlación con los obtenidos por CG o CL.

Los biosensores también representan una alternativa a las técnicas convencionales, y se basan en la unión específica del analito de interés a un sistema biológico de reconocimiento inmovilizado en un soporte adecuado (Velasco-García y Mottram, 2003; Patel, 2002). Los sistemas más utilizados son: enzima/sustrato, antígeno/anticuerpo y ácidos nucleicos/secuencias

complementarias. La interacción entre el analito y el material biológico provoca un cambio en alguna propiedad fisicoquímica (cambio de pH, transferencia de electrones, cambio de masa o transferencia de calor) que es detectado y medido por detectores ópticos, amperométricos, termopiezoeléctricos o magnéticos. Los detectores amperométricos son los más empleados, y permiten detectar los productos originados a partir de un analito por un sistema enzimático mediante un electrodo selectivo. La Figura 19.7 muestra el esquema del funcionamiento básico de estos sistemas. Los dos tipos de biosensores que se han desarrollado en la actualidad para determinar plaguicidas en alimentos son los basados en la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, que se utilizan para detectar plaguicidas organofosforados y carbamatos, y los basados en la

inhibición del proceso fotosintético para las fenilureas.

Incidencia de los residuos de plaguicidas en los alimentos y evaluación de su riesgo toxicológico

Los LMR establecidos en las distintas legislaciones intentan hacer compatible la protección de la salud del consumidor y la defensa sanitaria de los cultivos. Con objeto de vigilar el cumplimiento de la legislación vigente se efectúan muestreos y controles sobre productos alimenticios en fase de comercialización para asegurar que no se

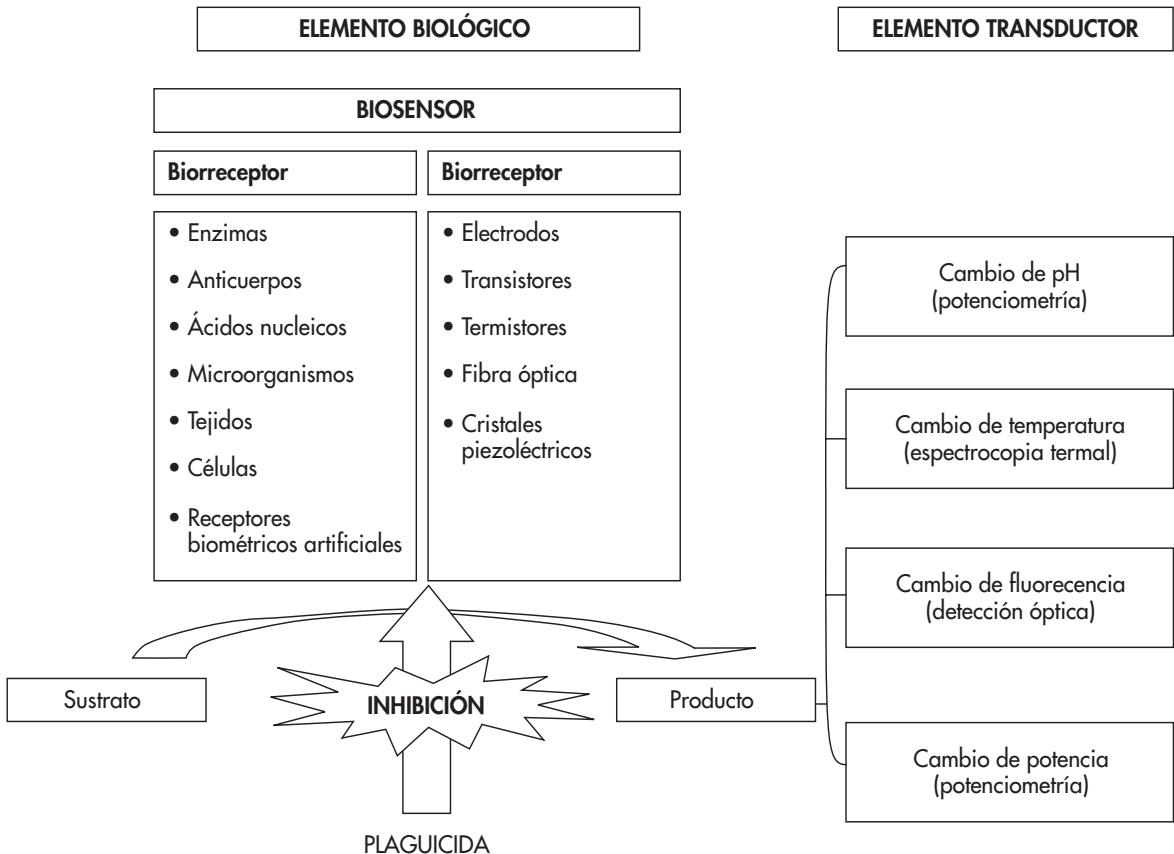


Figura 19.7. Esquema del funcionamiento básico de un biosensor.

superan los LMR. De los distintos estudios realizados en laboratorios oficiales se deduce, que si bien la mayoría de las muestras cumplen la legislación y o no contienen residuos de plaguicidas detectables o los contienen en niveles inferiores a los LMR, siempre hay una pequeña proporción que supera estos LMR y que en general oscila entre el 2 y el 10 % de las muestras analizadas. Esta proporción no representa un riesgo real para la salud del consumidor pero pone de manifiesto la necesidad y la importancia de estos programas de monitorización de residuos para garantizar la seguridad alimentaria (Programa de control de LMR 1999).

El grado de exposición de la población a los residuos de plaguicidas en los alimentos, depende del tratamiento que se efectúe y, por otra parte, de la composición de la dieta alimentaria media en la zona geográfica considerada. Para ello es necesario conocer la proporción de los alimentos y los residuos que cada uno de ellos puede contener. Estos datos permiten estimar la ingestión diaria media de los distintos plaguicidas por la población y garantizar que sea inferior a la ingesta diaria admisible (IDA) establecida por la FAO/OMS (Oliva *et al.*, 2003; Poulsen y Andersen, 2003; Dogheim *et al.*, 2002; Cressey y Vannoort, 2003).

En España, se han efectuado estudios teniendo en cuenta la composición de la cesta de la compra y los LMR establecidos en la normativa vigente. En estos, la ingesta diaria estimada

(IDE) teórica y su comparación con las ingestas diarias admisibles (IDA) permite determinar que el riesgo para la población es mínimo cuando no se superan los LMR (Fernández *et al.*, 2001; Valenzuela *et al.*; 2001, Blasco *et al.*, 2002).

Del conjunto de resultados, se puede concluir que los residuos provenientes del muestreo de campo son siempre más elevados que la media ingerida por la población, ya que los contenidos de plaguicidas disminuyen debido a que existe una disipación adicional desde el momento de la recolección hasta el consumo, y a que la mayoría de frutas y hortalizas se lavan e incluso muchas de ellas se pelan previamente al consumo.

Un ejemplo que ilustra la dinámica de estos estudios se muestra en el análisis de 250 muestras de naranjas dentro de un programa de control de residuos de seis plaguicidas: imidacloprid, carbendazima, tiabendazol, metiocarb, imazalil y hexitiazox en cítricos destinados al consumo humano. En la Tabla 19.5 se muestran los resultados obtenidos, 200 de las 250 muestras analizadas contenían plaguicidas, pero solo el imidacloprid en una muestra y el metiocarb en otra superaban los LMR establecidos por la legislación española. Las concentraciones de plaguicidas encontradas en las demás muestras fueron inferiores a los LMR establecidos por las distintas legislaciones de la UE, Estados Unidos y España, aunque en el caso del hexitiazox, alguna muestra resultó con residuos superiores

Tabla 19.5. Residuos de plaguicidas en 250 muestras de naranjas analizadas

Plaguicida	N.º muestras LMRs ^a	N.º muestras <LMRs	Concentración (mg kg ⁻¹)		
			Media ^b	Media ^c	Intervalo (mín-máx)
Imidacloprid	1	19	0,02	0,30	0,02-1,52
Carbendazima	0	132	0,32	0,60	0,1-2,98
Tiabendazol	0	50	0,10	0,48	0,1-1,54
Metiocarb	1	5	0,001	0,04	0,03-0,07
Imazalil	0	62	0,15	0,60	0,05-2,92
Hexitiazox	0	124	0,16	0,32	0,02-0,93

^a LMRs establecidos por la legislación española.

^b Valor medio de todas las muestras analizadas.

^c Valor medio de todas las muestras que contenían el plaguicida.

al LMR recomendado por la FAO/OMS que son de 0,5 mg kg⁻¹.

Carbendazima es el plaguicida que se encontró con más frecuencia, seguido de hexitiazox, imazalil y tiabendazol. Imidacloprid y metiocarb son los que aparecen con menos frecuencia.

La Figura 19.8 representa el porcentaje de residuos de plaguicidas encontrados en las muestras de naranjas. De las 250 muestras de naranjas analizadas, en el 20% (50 muestras) de los casos no se detectó ningún plaguicida, el 22% (56 muestras) contenía solo un plaguicida, el 38% (94 muestras) contenía dos plaguicidas y el 20% (50 muestras) tres.

La Tabla 19.6 compara la contribución de la IDE de los plaguicidas estudiados en naranjas con la ingesta diaria admisible IDA establecida por la FAO/OMS, para así evaluar la significación toxicológica de la exposición humana a estos residuos.

La diferencia entre la ingesta anual admisible de estos plaguicidas (81,4 mg de plaguicidas por kg de peso corporal) y la contribución de los mismos a la ingesta anual (0,04 mg por kg de peso corporal) debida al consumo de naranjas muestra que el riesgo para la salud humana es mínimo, ya que el margen de seguridad es de 2×10^3 .

Los valores de residuos de plaguicidas generalmente encontrados ponen de manifiesto que es necesario seguir trabajando en los siguientes puntos:

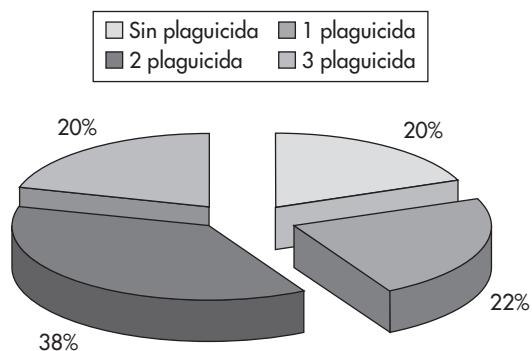


Figura 19.8. Porcentaje de residuos de plaguicidas en las muestras de naranja analizadas.

Tabla 19.6. IDAs e IDEs para los residuos de los plaguicidas estudiados en naranjas.

Plaguicida	IDA ^a (µg kg ⁻¹)	IDE ^a (µg kg ⁻¹)	% IDA
Imidacloprid	57	0,021	0,04
Carbendazima	10	0,269	2,69
Tiabendazol	100	0,082	0,08
Metiocarb	1	0,0001	0,08
Imazalil	30	0,121	0,42
Hexitiazox	25	0,138	0,55
Valor total	223	0,638	—
Valor anual total	81.395	232,87	—

^a IDE se calculó utilizando la ecuación: $IDE = (\Sigma c) (C N^{-1} \cdot D^{-1} \cdot K^{-1})$, donde Σc es la suma de las concentraciones de residuos de cada plaguicida encontradas en las muestras analizadas (µg kg⁻¹); C es la ingesta media anual por persona (18,68 kg de naranjas por persona); N es el número total de muestras analizadas; D son los días del año; y K es el peso corporal medio que se consideró de 60 kg.

- Análisis de residuos de plaguicidas en alimentos, que permitan evaluar las concentraciones a las que se encuentran.
- Estudios de ingesta que permitan detectar posibles variaciones en estos valores.

Bibliografía

- Ahmed FE (2001). Analyses of pesticides and their metabolites in foods and drinks. *Trends Anal Chem* 20: 649-661.
- Baltussen E, Cramers CA, Sandra PJ (2002). Sorptive sample preparation. *Anal Bioanal Chem* 373: 3-22.
- Barker SA (2000a). Matrix solid-phase dispersion. *J Chromatogr A* 885: 115-127.
- Baker SA (2000b). Application of matrix solid-phase dispersion in food analysis. *J Chromatogr A* 880: 63-68.
- Beltrán J, López FJ, Hernández F (2000). Solid-phase microextraction in pesticide residue analysis. *J Chromatogr A* 885: 389-404.
- Blasco C, Picó Y, Font G (2002). Monitoring of five postharvest fungicides in fruit and vegetables by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography/mass spectrometry. *J AOAC Int* 85: 704-711.

- Careri M, Bianchi F, Corradini C (2002). Recent advances in the application of mass spectrometry in food-related analysis. *J Chromatogr A* 970: 3-64.
- Cressey PJ, Vannoort RW (2003). Pesticide content of infant formulae and weaning foods available in New Zealand. *Food Addit Contam* 20: 57-64.
- Dogheim SM, El-Marsafy AM, Salama EY, Gadalla SA, Nabil YM (2002). Monitoring of pesticide residues in Egyptian fruits and vegetables during 1997. *Food Addit Contam* 19: 1015-1027.
- Ecobichon DJ (2001). Toxic effect of pesticides. En: Klaasen CD (ed) *Cassarett and Doull's Toxicology*. McGraw-Hill, New York, 763-810.
- Fernández M, Picó Y, Mañes J (2001). Pesticide residues in oranges from Valencia (Spain). *Food Addit Contam* 18: 615-624.
- Fernández M, Picó Y, Mañes J (2002). Rapid screening of organophosphorus pesticides in honey and bees by liquid chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia* 56: 577-583.
- Food and Drug Administration (FDA) (1994) *Pesticide analytical manual*. Volume 1, 3.^a Ed. <http://vm.cfsan.fda.gov/~frf/pami3.html>
- Juan A, Picó Y, Font G (2003). Revisión de los métodos de determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en alimentos. *Rev Toxicol* 20: 166-176.
- Kataoka H, Lord HL, Pawliszyn J (2000). Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *J Chromatogr A* 880: 35-62.
- Lord H, Pawliszyn J (2000). Evolution of solid-phase microextraction technology. *J Chromatogr A* 885: 153-193.
- Malik AK, Faubel WA (2001). Review of analysis of pesticides using capillary electrophoresis. *Crit Rev Anal Chem* 31: 223-279.
- Martínez-Vidal JL, Arrebola FJ, Mateu-Sánchez M (2002). Multi-residue method for determination of pesticides in vegetable samples by GC-MS-MS. *Chromatographia* 56: 475-481.
- Ma_tovská K, Lehotay SJ, Haj_lová J (2001). Optimization and evaluation of low-pressure gas chromatography-mass spectrometry for the fast analysis of multiple pesticide residues in a food commodity. *J Chromatogr A* 926: 291-308.
- Nunes GS, Barceló D (1999). Analysis of carbamate insecticides in foodstuff using chromatography and immunoassay techniques. *Trends Anal Chem* 18: 99-107.
- Nunes GS, Toscano IA, Barceló D (1998). Analysis of pesticides in food and environmental samples by enzyme-linked immunosorbent assays. *Trends Anal Chem* 17: 79-87.
- Oliva R, Gemal AL, Nobrega AW, Araujo AC (2003). Pesticide monitoring programme of the Ministry of Health of Brazil. *Food Addit Contam* 20: 758-763.
- Patel PD (2002). (Bio)sensors for measurements of analytes implicated in food analysis: a review. *Trends Anal Chem* 21: 96-111.
- Picó Y, Font G, Moltó JC, Mañes J (2000)^a. Pesticide residue determination in fruits and vegetables by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 882:153-173.
- Picó Y, Font G, Moltó JC, Mañes J (2000)^b. Pesticide (New generation) and related compounds. En: Meyers RA (ed.) *Encyclopedia of analytical chemistry*, John Wiley & Sons, Chichester, 6450-6486.
- Picó Y, Rodríguez R, Mañes J (2003). Capillary electrophoresis for the determination of pesticide residues. *Trends Anal Chem* 22: 133-151.
- Picó Y, Font G, Mañes J (2004)^a. Organophosphates residues in food. En: L.M.L. Nollet (ed) *Handbook of food analysis* 2nd ed. John Wiley & Sons, New York.
- Picó Y, Blasco C, Font G (2004)^b. Environmental and food applications of LC-tandem mass spectrometry in pesticide-residue analysis: an overview. *Mass Spectrom Rev* 23: 45-85.
- Programa de Control Nacional sobre los LMR (1999) *Programa Nacional de vigilancia de residuos de productos fitosanitarios en origen 1998*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.
- Poulsen ME, Andersen JH (2003). Results from the monitoring of pesticide residues in fruits and vegetables on the Danish market, 2000-01. *Food Addit Contam* 20: 742-757.
- Repetto M, Martínez D, Sanz P (1995). Actualización de la toxicología de los plaguicidas En: Repetto M. (ed.) *Toxicología avanzada*. Díaz de Santos, Madrid, 557-601.
- Rodríguez R, Boyer I, Font G, Picó Y (2001). Capillary zone electrophoresis for the determination of thiabendazole, prochloraz and procymidone in grapes. *Analyst* 126: 2134-2138.
- Seiber JN (1999). Determination methods. En: Fong WG, Moye HA, Seiber JN, Toth JP (eds.). *Pesticide residues in food. Methods, techniques, and regulations*. John Wiley & Sons. New York, 63-103.

- Tadeo JL, Sánchez-Brunete C, Pérez RA, Fernández MD (2000). Analysis of herbicide residues in cereals, fruits and vegetables. *J Chromatogr A* 882: 175-191.
- Taylor MJ, Hunter K, Hunter KB, Lindsay D, Le Bouhellec S (2002). Multi-residue method for rapid screening and confirmation of pesticides in crude extracts of fruits and vegetables using isocratic liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 982: 225-236.
- Valenzuela AI, Picó Y, Font G (2001). Determination of five pesticide residues in oranges by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography to estimate daily intake of consumers. *J AOAC Int* 84: 901-909.
- Van der Hoff GR, van Zoonen P (1999). Trace analysis of pesticides by gas chromatography. *J Chromatogr A* 843: 301-322.
- Velasco-García MN, Mottram T (2003). Biosensors technology addressing agricultural problems. *Biosyst Eng* 84: 1-12.

CONTAMINANTES ORGÁNICOS PERSISTENTES EN ALIMENTOS: DIOXINAS POLICLORADAS (PCDD), FURANOS POLICLORADOS (PCDF) Y BIFENILOS POLICLORADOS (PCB)

Carlos Cubría, César Ordóñez, Rosa M. Reguera, Yolanda Pérez, Rafael Balaña, David Ordóñez

Introducción. Estructura química de las dioxinas. Fuentes de formación y exposición a dioxinas y furanos. Toxicocinética. Mecanismo de acción. Toxicidad. Presencia de dioxinas en alimentos. Métodos de análisis. Conclusiones, evolución y riesgos futuros. Bibliografía.

Introducción

La prohibición del uso de plaguicidas organoclorados (DDT y derivados) en la segunda mitad del siglo XX, después de un historial de éxitos y controversias, supuso un hito para las organizaciones protectoras del medio ambiente, que con razón venían denunciando el impacto negativo de estos compuestos químicos persistentes sobre la fauna silvestre. Como consecuencia de los fenómenos de bioacumulación y biomagnificación, las concentraciones en los tejidos grasos de organismos superiores (incluido el hombre) se cifraban en órdenes de magnitud muy superiores a las medioambientales (Carson, 1962). Sin embargo, a pesar de su prohibición, otros contaminantes orgánicos persistentes (POPs)* catalogados dentro de la

lista de los *dirty dozen*** , siguen estando presentes en los alimentos, siendo en la actualidad los protagonistas de continuas alertas toxicológicas de las que se hacen eco los medios de comunicación. Entre estos compuestos destacan los bifenilos policlorados (PCB), así como las dibenzodioxinas (PCDD) y dibenzofuranos policlorados (PCDF); todos ellos clasificables como *dioxin-like compounds**** (DLC). Todos estos compuestos deben considerarse contaminantes alimentarios, ya que ninguno de ellos es añadido a los alimentos de manera intencionada, lo que ha obligado a estrictas regulaciones en la mayoría de los países desarrollados.

** del inglés «los doce sucios» . El título procede de una conocida película titulada en español «Doce del patíbulo», e incluye los siguientes POP: Aldrín, clordano, DDT, dieldrín, dioxinas, endrín, furanos, heptacloro, hexaclorobenceno, Mirex, PCB y toxafeno.

*** del inglés «compuestos tipo dioxina» . Se refiere a todos los compuestos clorados que tienen un comportamiento toxicológico semejante a las dioxinas.

* del inglés «Persistent Organic Pollutants»

La historia de los efectos contaminantes de estos compuestos se remonta a finales de los años 40, cuando trabajadores de las fábricas de herbicidas clorados de Monsanto empezaron a desarrollar eccemas en la piel, dolores en las piernas y articulaciones, debilidad, irritabilidad, nerviosismo y pérdida de la libido. En 1949 una explosión ocurrida en la planta de nitro, en West Virginia, originó trastornos semejantes entre los individuos afectados. Sin embargo, no fue hasta 1957 cuando el agente contaminante responsable de esas alteraciones fue identificado como una dioxina.

Con posterioridad, el ejército de Estados Unidos utilizó cantidades masivas de herbicidas desfoliantes (agente naranja) derivados del 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 2,3,5-triclorofenoxiacético (2,3,5-T) sobre las selvas de Vietnam. Los estudios epidemiológicos posteriores establecieron la causalidad entre los niveles de dioxinas que contaminaban las formulaciones y determinadas patologías (Dwyer y Flesch-Janys, 1995).

Durante 1968 en Yusho (Japón) y 1978 en Yu-cheng (Taiwán), 2.000 personas sufrieron una intoxicación por el consumo de aceite de arroz contaminado por dioxinas procedentes de fluidos industriales que contenían PCB con impurezas de PCDF (Aoki, 2001).

La emisión de dioxinas más conocida se produjo en Meda, al norte de Seveso (Italia) en 1976. La planta industrial de ICMESA de la empresa Hoffman-La Roche, liberó accidentalmente una nube tóxica que contenía 500 g de DLC. El viento del sudeste produjo numerosas víctimas entre los animales domésticos y obligó a la evacuación de más de 700 personas. Los gases emitidos produjeron víctimas mortales, así como la aparición de casos de embriotoxicidad que se tradujeron en malformaciones congénitas (Pesatori *et al.*, 2003).

Recientemente se han producido alertas alimentarias por contaminación de dioxinas en distintos países. En el sur de EE UU se encontraron residuos elevados de dioxinas en huevos, pollos y peces de aguas continentales, contaminados al usar una arcilla de bentonita como antiapelmazante de los piensos que les servían de alimento. La alimentación de ganado bovino con pulpa de cítricos importada de Brasil originó un nuevo

escándalo en Europa en 1997-98. Los productos de origen animal contaminados con este material contenían residuos de dioxinas entre 20 y 100 veces superiores a los de los alimentos no contaminados. En febrero de 1999 aparece en Bélgica un nuevo episodio relacionado de nuevo con la contaminación de alimentos destinados al consumo humano. En esta ocasión el origen se encuentra en la contaminación de piensos destinados al cebado de pollos que contenían residuos de PCB y PCDD/F que excedían en más de 250 veces los niveles de tolerancia.

Las denuncias recientes de alimentos de procedencia animal (pollos, cerdos, salmones) contaminados con dioxinas, como consecuencia de la utilización de piensos que contienen grasas de origen industrial contaminadas con estas sustancias, han reavivado la polémica sobre la toxicidad y el riesgo de exposición a estos compuestos, así como el de la seguridad química de nuestros alimentos.

Estructura química de las dioxinas

Por el término dioxina se conocen un conjunto de sustancias cuyo núcleo central es la dibenzo-*para*-dioxina. Los derivados clorados de este núcleo (congéneres), se denominan genéricamente dibenzodioxinas policloradas (PCDD), y entre ellas la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD) es la molécula de referencia del grupo. Junto a las dioxinas propiamente dichas, existen otros grupos de sustancias químicamente relacionadas que están asociadas a las primeras desde un aspecto toxicológico. Los dibenzofuranos policlorados (PCDF) y los bifenilos polihalogenados, tanto en sus versiones cloradas (PCB) como bromadas (PBB) presentan características estructurales y toxicológicas muy parecidas, por lo que serán considerados de forma semejante a lo largo de este capítulo.

Mientras que los derivados PCB son estructuras bicíclicas, los PCDD/F, son estructuras aromáticas tricíclicas con propiedades físico-químicas semejantes. Teóricamente, según el

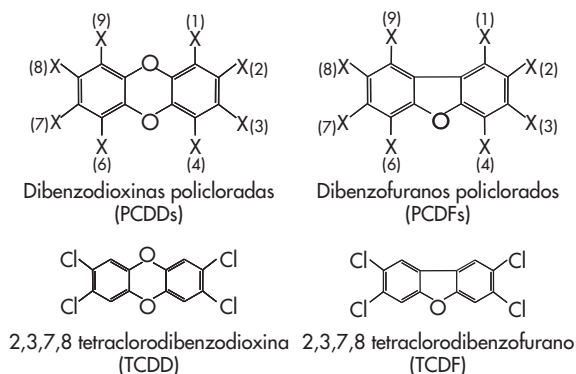


Figura 20.1. Estructura química general de los compuestos dioxínicos (DLC), dioxinas policloradas (PCDD) y furanos policlorados (PCDF). Como ejemplo la figura presenta las estructuras de los derivados tetraclorados más representativos de cada serie.

grado de cloración y sustitución en la molécula, pueden esperarse hasta 75 posibles congéneres PCDD y 135 PCDF, de los que apenas 7 de los primeros y 10 de los segundos, presentan efectos tóxicos tipo dioxina. Por su parte, el número de congéneres bifenílicos llega a 209, aunque solo 11 de ellos se comportan como DLC.

Entre sus características fisicoquímicas más relevantes destacan su elevada liposolubilidad y su gran estabilidad química y térmica. Estas propiedades se las proporciona en gran medida el grado de cloración, de manera que los coeficientes de partición octanol/agua (K_{ow}) de los congéneres están en el rango de 10^6 a 10^8 . Los elevados K_{ow} s de estas sustancias determinan su persistencia medioambiental y su acumulación en la cadena trófica.

Los PCB con comportamiento tipo dioxina (Figura 20.2), contienen entre cuatro y seis átomos de cloro sustituidos en posiciones *para*- y *meta*- (PCBs *no-orto* o PCBs coplanares). Aunque estructural y toxicológicamente difieren de estos, los congéneres *mono-orto* sustituidos suelen incluirse dentro de este grupo.

1. Los conceptos de I-TEF e I-TEQ

La cuantificación de los PCDD/F precisa de un tratamiento especial con el fin de tener en cuen-

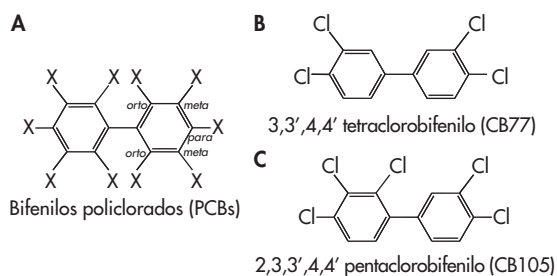


Figura 20.2. Estructura química general de los bifenilos policlorados (A), así como dos ejemplos de PCB coplanares con estructura *no-orto* (B) y *mono-orto* sustituidos (C). X suele ser un átomo de cloro, aunque puede ser Br en el caso de los bifenilos polibromados (PBBs).

ta el grado y orden de cloración entre los diferentes congéneres. La finalidad es obtener el potencial toxicológico de estos compuestos cuando se encuentran en una mezcla. En muestras reales los DLC no se encuentran por separado, sino como una mezcla de congéneres con diferente toxicidad. Con este fin se introdujo en 1988 el factor de equivalencia tóxica (I-TEF)* que está basado en dos supuestos: (1) todos los compuestos clorados en posición 2, 3, 7, 8 tienen el mismo mecanismo de acción (en términos cualitativos) aunque su potencial tóxico puede variar de uno a otro y (2) la respuesta tóxica de una mezcla de estas sustancias, es el resultado de la suma del comportamiento de cada una de ellas por separado. Basados en estos dos principios se puede asignar un valor de I-TEF a cada compuesto independientemente. Ya que el compuesto más tóxico es el 2, 3, 7, 8-TCDD, se le asignó el valor arbitrario de 1, siendo el resto fracciones del mismo (Tabla 20.1).

Junto con el concepto de I-TEF se introdujo el término de cantidad de equivalencia tóxica (I-TEQ)** que resulta de multiplicar la concentración de cada uno de los congéneres por su correspondiente I-TEF y sumarlos todos en una mezcla. De esta manera, la toxicidad real de una mezcla de PCDD/F se expresa como la suma de los I-TEQ de sus 17 congéneres, obteniendo un

* del inglés «International-Toxic Equivalent Factor»

** del inglés «International-Toxic Equivalent Quantity»

Tabla 20.1. Factores de equivalencia tóxica (I-TEF) de los 17 congéneres PCDD y PCDF.

PCDFs	I-TEF	PCDD	I-TEF
2, 3, 7, 8-TCDF	0,1	2, 3, 7, 8-TCDD	1
1, 2, 3, 7, 8-PeCDF	0,5	1, 2, 3, 7, 8-PeCDD	0,5
2, 3, 4, 7, 8-PeCDF	0,05		
1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDF	0,1	1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDD	0,1
1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDF	0,1	1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDD	0,1
1, 2, 3, 7, 8, 9-HxCDF	0,1	1, 2, 3, 7, 8, 9-HxCDD	0,1
2, 3, 4, 6, 7, 8-HxCDF	0,1		0,01
1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDF	0,01	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDD	0,01
1, 2, 3, 4, 7, 8, 9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,01	OCDD	0,001

Los prefijos T = tetra; Pe = penta; Hx = hexa; Hp = hepta y O = octa indican el grado de cloración de los congéneres.

valor indicativo. Recientemente la OMS ha propuesto un nuevo concepto de I-TEQ que incluye los factores de equivalencia para PCB coplanares (Van den Berg *et al.*, 1998).

Fuentes de formación y exposición a dioxinas y furanos

Salvo los PCB, los PCDD/F son subproductos no intencionados de la combustión incompleta de la materia orgánica, ya sea de fuentes naturales (incendios forestales) o antropogénicas (incineración de basuras) (Tuppurainen *et al.*, 2003). Los procesos industriales (fabricación de papel o de productos químicos) y biológicos también contribuyen en menor cuantía a su liberación al medioambiente. Sin embargo, debido a la resistencia de los PCB a elevadas temperaturas se les utilizó masivamente desde los años 30 en la fabricación de transformadores, capacitadores y fluidos hidráulicos, hasta su prohibición en 1977. A pesar de su prohibición, la exposición a PCB todavía existe, debido a su elevada persistencia en el aire, suelos y sedimentos acuosos.

Además, todavía forman parte de viejos dispositivos eléctricos, luces fluorescentes, y electrodomésticos antiguos que aún siguen en uso.

1. Combustión incompleta de la materia orgánica

La fuente más importante de liberación de DLC al medioambiente es la incineración de residuos sólidos (basura municipal sólida, medicamentos y desperdicios médicos, residuos peligrosos, etc.) la quema de combustibles fósiles (carbón, y derivados del petróleo), así como los incendios accidentales incontrolados (incendios forestales, erupciones volcánicas, etc.). La combustión a temperaturas inferiores a 700 °C, el enfriamiento de gases y partículas en su ascenso por las chimeneas, la presencia de cenizas en suspensión, el grado de oxigenación y las trazas de metales de transición (sobre todo de cobre), son factores todos ellos que facilitan la liberación de DLC a la atmósfera. En resumen, la presencia de dioxinas en la cámara de combustión de las incineradoras, la síntesis a partir de precursores (bencenos clorados o compuestos aromáticos monocíclicos) o la síntesis *de novo* a temperaturas de 200 a 500 °C en presencia de catalizadores metálicos, son las tres formas de liberar DLC a la atmósfera (Taylor y Lenoir, 2001).

2. Esmaltado y refinado de metales

Hay varios tipos de operaciones en el refinado y esmaltado de metales que son fuente de liberación de DLC al medio ambiente. Las operaciones secundarias del esmaltado y refinado de metales no ferrosos tales como el aluminio, cobre, plomo y zinc, pueden formar DLC debido al contenido de contaminantes orgánicos (plásticos, pinturas y disolventes) y de compuestos clorados (NaCl y KCl) en los metales, usados durante el proceso de esmaltado.

3. Fabricación de compuestos químicos

La industria del papel utiliza pulpa de madera que en muchas ocasiones está contaminada con derivados fenólicos. También el blanqueado de papel mediante tratamiento con cloro forma lodos contaminantes de aguas residuales. Por su parte, el gas cloro que se sintetiza industrialmente mediante procesos electrolíticos se ha servido de células de mercurio que contenían electrodos de grafito responsables de la generación de PCDFs, hasta su sustitución en los años 80 por electrodos de titanio. La producción, manufactura y almacenaje de compuestos químicos orgánicos halogenados tales como clorofenoles (herbicidas y fungicidas fenólicos) y clorobencenos (usados como intermediarios en la producción de anilina, fenol y varios plaguicidas) puede ser el origen de la contaminación por DLC. Finalmente, aunque la fabricación de PCB coplanares se prohibió en 1977, cientos de miles de toneladas están aún en uso dentro de equipos eléctricos fabricados con anterioridad a esta fecha, que pueden liberarse accidentalmente al entorno. En la Unión Europea la fabricación de PCB está prohibida desde 1978, y contempla la eliminación y descontaminación completa de equipos que los contengan para finales del año 2025 (Convención de Estocolmo). Otros productos relacionados con la formación de DLC son: cloruro de polivinilo, compuestos clorados alifáticos, pigmentos, tintes y ciertos tipos de tintas de impresión.

4. Procesos biológicos y fotoquímicos

Las dioxinas pueden formarse bajo ciertas condiciones ambientales. La presencia de dioxinas en ciertos tipos de abonos, procede posiblemente de la deposición atmosférica sobre las plantas o del transporte del aire al abono. Pero también de los ácidos húmicos procedentes de la putrefacción del sustrato vegetal. Muchos compuestos clorados fenólicos se forman en la descomposición fúngica de la madera y pueden ser convertidos en dioxinas por los microorganismos del suelo en reacciones de oxidación con peróxido de hidrógeno. Existen evidencias de que las dioxinas pueden generarse por fotólisis de los pentaclorofenoles, pero esta reacción solo ha sido demostrada *in vitro* y no se sabe si se produce en la naturaleza.

5. Reservorios de los DLC

La elevada persistencia ambiental de las dioxinas puede incrementarse al permanecer ligadas a sustratos orgánicos o inorgánicos que sirven como reservorios. La movilidad relativa de estos reservorios puede ser una de las vías de entrada en la cadena trófica. Las dioxinas presentes en depósitos arcillosos pueden haberse generado en tiempos remotos y podrían ponerse en circulación gracias a procesos geodinámicos. Sin embargo, las dioxinas liberadas en procesos antropogénicos o biológicos pueden depositarse en suelos y sedimentos constituyendo reservorios intermedios. Estos depósitos persisten durante muchos años sin degradación potencial, pudiendo movilizarse como consecuencia del consumo de suelo por rumiantes o la contaminación de vegetales frescos y frutas, etc. El transporte atmosférico de aerosoles o cenizas contaminados por dioxinas a diferentes áreas geográficas y su depósito en el suelo, les convierten en reservorios intermedios. Finalmente, los depósitos grasos de animales expuestos a alimentos contaminados constituyen reservas a corto mucho más dinámicas que otras fuentes. Sin embargo, los periodos generacionales de algunas especies animales (bovinos) podrían ser lo suficientemente largos para como para clasificarlos de reservorios intermediarios.

6. Procesos de transformación y persistencia

Los DLC son compuestos estables y muy resistentes a la mayoría de los procesos de degradación ambiental. Los procesos de transformación de los DLC comprenden la fotooxidación atmosférica mediada por radicales libres, la fotólisis en el aire, suelo y agua y la biodegradación por los microorganismos del suelo.

La fotooxidación atmosférica es el principal proceso de degradación de DLC. Las velocidades de fotooxidación aumentan con la temperatura en los meses de verano y disminuyen en función del grado de cloración. La vida media troposférica oscila entre los 2 días del TCDD a los 39 días del OCDF. De la misma manera las vidas medias de los PCB varían entre los 11 días para los derivados tetraclorados a más de 94 días para los heptaclorados (Atkinson, 1991).

La degradación fotolítica es el destino mayoritario de los DLC en el medio acuático, pero es un proceso relativamente lento, influenciado por el grado de cloración y la posición de los sustituyentes en el congénere. El TCDD tiene una vida media de 3 días con luz estival y de 16 con luz invernal. Por su parte, la fotólisis de los PCB se estima entre 4 y 11 días. En suelos, los DLC se unen con firmeza a la materia orgánica, lo que les protege de su degradación debajo de la superficie del suelo. Los DLC que están en contacto con la superficie están sujetos a cierta degradación fotolítica aunque a una velocidad menor que en el agua. La vida media de los DLCs en suelos se estima en 15 meses, aunque los tetra y octaclorados apenas muestran una degradación aparente.

Aunque se ha demostrado una cierta degradación microbiana para algunos DLC este no parece ser un proceso importante de transformación. Derivados DLC hexaclorados pueden ser degradados en un 70-75% por el hongo *Phanerochaete sordida*, siendo más resistentes a esta degradación el TCDD y el PCDD. La degradación reductora en condiciones anaeróbicas parece favorecer el proceso, aunque también se produce en aerobiosis. Los microorganismos pueden tar-

dar hasta 7 meses en degradar un 30% de la carga de TCDD, transformándolo en formas menos con menor grado de cloración. Por su parte, los PCB son degradados por varias especies de microorganismos tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. La capacidad de biodegradación aeróbica disminuye conforme aumenta el grado de cloración de los congéneres (Wittich, 1998).

Toxicocinética

La ruta mayoritaria de exposición a los DLC es la ingestión de alimentos contaminados. El elevado K_{ow} de todos los congéneres favorece la absorción en su totalidad a lo largo del tracto gastrointestinal. La velocidad de absorción depende del grado de cloración de los mismos. De esta manera los derivados hepta- y octo-sustituidos son absorbidos más lentamente que los que tienen un menor grado de cloración. Factores biológicos tales como la edad del individuo y el componente graso, influyen en la absorción gastrointestinal de dioxinas. Los lactantes absorben estos compuestos en mucha menor medida que los adultos, de ahí que el riesgo de exposición en esta franja de edad deba ser reconsiderado. Debido a su alta liposolubilidad, se produce una rápida redistribución orgánica unidos a proteínas plasmáticas, concentrándose finalmente en tejidos grasos: tejido adiposo > SNC > hígado > grasa subcutánea. Una vez acumulados en los depósitos grasos su biodisponibilidad orgánica suele ser muy baja. Los estudios realizados en voluntarios demuestran que cerca del 87% de una dosis de dioxina disuelta en aceite de maíz puede ser absorbida, y alrededor del 90% de la misma se redistribuye en tejido adiposo.

Todos estos compuestos son muy estables y sufren una metabolización continua pero muy lenta. Son sustratos de isoenzimas de la CYP4501A2 que producen su deshalogenación oxidativa. Son también sustratos de la glutatión S-transferasa por reacciones de sustitución con

halógenos, lo que permite su eliminación en las heces en forma de glutatiónil conjugados. Los resultados experimentales indican que los intermediarios de metabolización son menos tóxicos que los parentales (Van den Berg *et al.*, 1994).

El aclaramiento de estos compuestos depende del congénere, de modo que el grado de cloración favorece su acumulación en el organismo. La eliminación puede ser urinaria o biliar, de manera que puede aumentar su biodisponibilidad orgánica al sufrir sucesivos ciclos enterohepáticos. Debido a su liposolubilidad, existe una eliminación significativa en la leche materna, siendo esta la ruta principal de ingestión de dioxinas en los recién nacidos. La vida media estimada de estos compuestos depende de la cloración del congénere, de la especie animal y de variaciones idiosincrásicas intraespecíficas (edad, sexo y peso corporal entre otras). La vida media del TCDD ha sido estimada en adultos humanos en 2.840 días (casi 8 años) un tiempo 150 veces mayor que el determinado experimentalmente en ratas (19 días). Este factor ha sido considerado una constante para extrapolar a humanos las vidas medias de otros congéneres determinadas en ratas. Geyer *et al.* (2002) estiman rangos de 12,6 a más de 110 años para los congéneres PeCDD y OCDD, respectivamente. El contenido graso del individuo y su edad influyen decisivamente en la biodisponibilidad de las dioxinas. La vida media del TCDD es de apenas 153 días para los niños recién nacidos, lo que supone un riesgo más limitado a estos compuestos (Kreuzer *et al.*, 1997).

Mecanismo de acción

La semejanza de los efectos tóxicos causados por los PCDD/F y PCB coplanares sustentan la hipótesis de que estas sustancias tienen un mecanismo de acción común. La unión y activación del receptor citosólico AhR (receptor hidrocarburo de arilo o receptor de dioxina) por estos compuestos, y la inducción de genes nucleares

específicos de respuesta a dioxinas, es la hipótesis actual de trabajo (Figura 20.3). El receptor AhR es un factor de transcripción que actúa una vez que se ha unido un ligando a su centro activo funcionando como un sensor biológico de señales externas e internas (Bock, 1994).

Los DLC y otras sustancias semejantes se unen reversiblemente al receptor AhR que tiene que ser previamente estabilizado en el citoplasma por una proteína de 90 kDa (HSP 90) y por la chaperona XAP2. Este complejo estabilizado se desplaza hacia el núcleo celular con la ayuda de una importina, donde el AhR queda libre uniéndose a un translocador nuclear (ARNT). El heterodímero AhR/ARNT identifica ciertas regiones del ADN cromosómico denominadas Elementos de Respuesta a Dioxinas (ERD), e induce la transcripción de los genes situados corriente abajo, entre ellos diferentes isoenzimas CYP1A1 con actividades hidrocarburo aromático hidroxilasa (AHH) y etoxiresorufina O-desetilasa (EROD) (Figura 20.4). Las enormes diferencias de inducción enzimática encontradas en

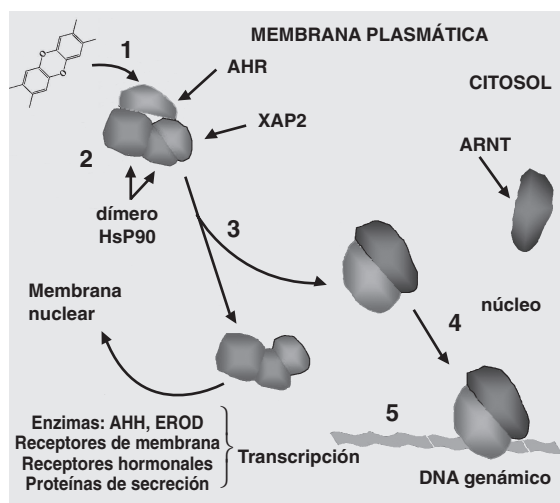


Figura 20.3. La mayoría de los efectos del TCDD son mediados por su unión al receptor citosólico AhR (1). La formación del complejo de estabilización con las proteínas HSP90 y XAP2 (2) permite su traslocación nuclear (3) donde formará un heterodímero con la proteína ARNT (4) cuya unión a los elementos de respuesta a dioxinas (ERDs) genómicos (5) aumenta la transcripción de los genes presentes corriente abajo.

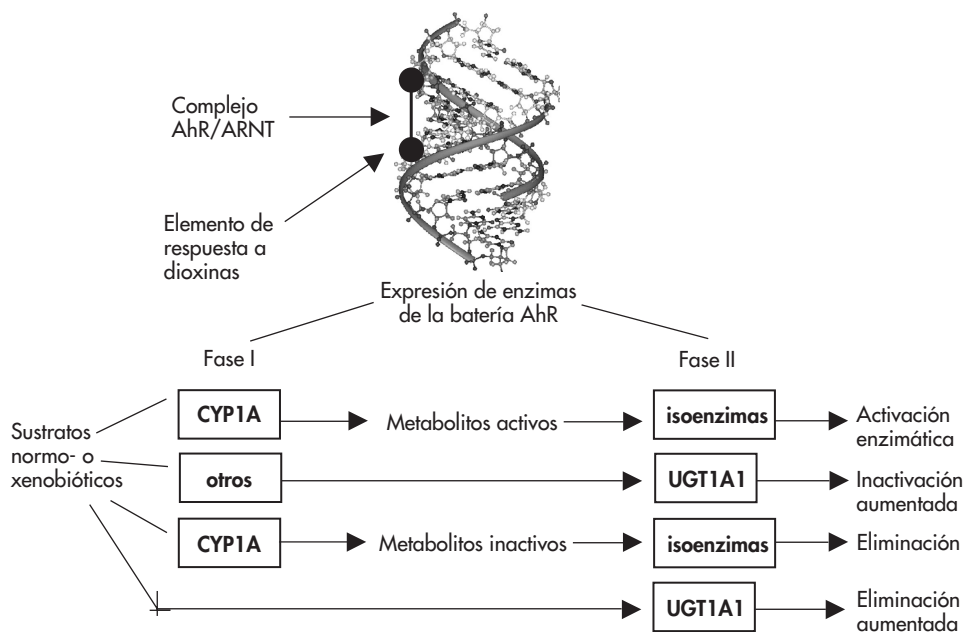


Figura 20.4. Posibles consecuencias de la expresión de los genes ligados a los elementos de respuesta a dioxinas (ERD), relacionados con el metabolismo de xenobióticos.

animales de experimentación a los DLC se deben en gran parte a la distinta afinidad del complejo AhR/ARNT con los ERD. Además, modificaciones postranscripcionales como la fosforilación de estas proteínas por las proteínas quinasas citosólicas influyen en la expresión de las proteínas ligadas a los ERD (Safe, 2001).

El TCDD se une al receptor AhR con una elevada afinidad. Los estudios de estructura/actividad demuestran la buena relación entre la afinidad de unión al receptor y su capacidad de inducir enzimas hepáticas o de producir respuestas tóxicas como la atrofia de timo. La constante de afinidad por el receptor AhR por los distintos DLC, determina la aparición de los efectos tóxicos y está estrechamente relacionada con las sustituciones en las posiciones laterales (posiciones 2, 3, 7 y 8) de los congéneres PCDD/F. La cloración en otras posiciones disminuye la unión al receptor y sus consecuencias fisiológicas. Por lo general, una estructura planar aromática con un tamaño molecular de $3 \times 10 \text{ \AA}$ parece ser el condicionante estructural óptimo para interactuar efectivamente con el receptor

AhR. Para los PCB coplanares la máxima afinidad por el receptor AhR la presentan los congéneres con átomos de cloro sustituyendo en posición *para* (4, 4') y dos o más en *meta* (3, 3' y 5, 5') con ausencia de sustituyentes en posición *orto*- (2, 2' y 6, 6'). La ausencia de cloros en *orto*- induce estructuras planares, comportándose como isoesterioisómeros de los PCDD. Los congéneres mono-*orto* sustituidos de los PCB tienen una configuración planar disminuida y una menor afinidad por el receptor AhR que sus congéneres no-*orto* sustituidos (Safe, 1994).

El receptor AhR está presente en los tejidos de multitud de especies animales con un elevado grado de conservación filogenética (Hahn, 2002) y es estructuralmente semejante a los receptores citosólicos para esteroides. Sin embargo, ninguna hormona tiene capacidad de unirse a este receptor, ni recíprocamente, los derivados clorados tienen afinidad por los receptores esteroides. La unión de los PCDD al receptor AhR no garantiza una respuesta biológica. De este modo, los hidrocarburos aromáticos policíclicos, flavonas sustituidas y cumarinas pueden unirse al

receptor AhR, pero no producen sus efectos tóxicos, y son rápidamente metabolizados.

Toxicidad

Mientras que los PCDD/F se encuentran entre los compuestos de origen antropogénico más tóxicos a dosis única, no lo son así los PCB cuyas DL₅₀ estimadas están en el rango de 2-10 g/kg de peso corporal. En animales de experimentación las DL₅₀ de los PCDD/F son muy variables y dependen de la especie animal y de la estructura química del congénere estudiado, influyendo el grado de cloración y la posición de los sustituyentes (Tabla 20.2). A pesar de su toxicidad, los DLC no producen intoxicaciones agudas, siendo su riesgo una consecuencia de la exposición ocupacional continuada o de su acumulación en la cadena trófica.

En animales de experimentación, la muerte se produce después de una progresiva pérdida de peso acompañada por una reducción drástica del consumo de alimento. Los efectos somáticos son muy semejantes en todas las especies estudiadas, independientemente de su susceptibilidad (Tabla 20.3) e incluyen neuropatía periférica, fatiga, depresión, cambios de la personalidad, adelgazamiento, hepatitis, hepatomegalia, *porfiria cutánea tarda* y erupciones cutáneas acneiiformes (Mukerjee, 1998). Los efectos agudos de la intoxicación son una consecuencia de la inte-

racción de las dioxinas con el receptor AhR. R ratones transgénicos en los que se ha anulado el gen codificante del receptor AhR (ratones AhR⁻) son 10 veces menos susceptibles a la administración de TCDD (DL₅₀ = 2.000 µg/kg de peso corporal), no presentando ninguno de los síntomas de intoxicación descritos con anterioridad (González y Fernández-Salguero, 1998).

Sin embargo, son los efectos a largo plazo, los que resultan más peligrosos y difíciles de controlar (Hays y Aylward, 2003). Entre los efectos más relevantes se incluyen: (1) cloracné, (2) inmunotoxicidad, (3) hepatotoxicidad (4) carcinogenicidad y (5) efectos embriotóxicos y de la reproducción.

1. Cloracné

El término cloracné fue acuñado en Alemania en 1899 para describir un trastorno ocupacional de la piel ocurrido a los trabajadores de una fábrica de cloro. El cloracné es una formación acneiiforme semejante al acné de los adolescentes que se establece como un efecto a largo plazo de la exposición a TCDD y otros DLC. El primer signo de cloracné es una piel excesivamente oleosa, seguido por la aparición de numerosas espinillas, que en los casos más suaves se limitan al área periorbital, extendiéndose a las sienes, mientras que en los casos más severos pueden aparecer en muchos lugares del cuerpo, especialmente sobre el área malar, detrás de las orejas y a lo largo de los brazos. Las espinillas están frecuentemente acompañadas de comedones rellenos de líquido y de un crecimiento excesivo del pelo. La piel se vuelve más gruesa y se desescama. En los casos más graves pueden aparecer úlceras abiertas y escaras permanentes. La condición desaparece muy lentamente, pudiendo permanecer durante años después de cesar la exposición, debido a la liberación continuada de dioxinas desde los depósitos grasos del organismo. La severidad y la aparición repentina de cloracné es dependiente de la dosis y las lesiones suelen ser resistentes a los tratamientos convencionales de acné juvenil (Yamamoto y Tokura, 2003).

Tabla 20.2. Toxicidad aguda del TCDD (DL₅₀) en diferentes especies animales.

Especie animal	DL ₅₀ µg/kg peso corporal
Cobaya	0,6 - 1
Mono	> 70
Rata	25-60
Conejo	100
Ratón	200-600
Hámster	5.500

Tabla 20.3. Signos y síntomas de la exposición a elevadas concentraciones de TCDD en humanos.

1. EFECTOS DÉRMICOS:	4. EFECTOS SISTÉMICOS:
Cloracné	Fibrosis hepática suave
Hiperqueratosis	Incremento de las transaminasas séricas
Hiperpigmentación	Hipercolesteroolemia
Elastosis	Hipertrigliceridemia
2. EFECTOS NEUROLÓGICOS:	Apetito reducido y pérdida de peso
Alteraciones sexuales	Problemas digestivos
Dolores de cabeza	Dolor en músculos y articulaciones
Neuropatías	Glándulas linfáticas hinchadas
Alteraciones visuales	Problemas cardíacos
Disminución de los sentidos del oído y del olfato	Problemas del tracto urinario
3. EFECTOS PSICOLÓGICOS:	Dificultades respiratorias
Alteración del sueño	Problemas pancreáticos
Depresión	
Energías reducidas	
Arranques de mal humor	

2. Efectos inmunitarios

El TCDD interrumpe los procesos de maduración y diferenciación del sistema inmunitario, directa (en el caso de los linfocitos B) o indirectamente (en el caso de los T). La exposición a dosis elevadas de TCDD produce atrofia de timo, por un mecanismo mediado por el receptor AhR, e inmunosupresión a dosis mucho menores (Holsapple *et al.*, 1996; Kerkvliet, 2002). Los efectos inmunosupresores de los DLC sirven de marcadores tempranos y extraordinariamente sensibles de exposición a estos contaminantes ya que se producen a dosis a las que no se observan otros signos de toxicidad. Las alteraciones inmunitarias afectan tanto a la respuesta humoral como a la celular en roedores de experimentación, pollos y primates no humanos expuestos a TCDD. Los efectos inmunosupresores dependen del organismo y del congénere o mezcla de congéneres a los que se está expuesto. De esta manera los organismos en desarrollo embrionario y fetal, neonatos y lactantes son particularmente sensibles a la exposición a dioxinas. Entre los efectos somáticos, el TCDD impide la maduración de los timocitos e induce la diferen-

ciación final de las células epiteliales del timo. La producción de anticuerpos se ve igualmente afectada. En aves, el TCDD y otras dioxinas, afectan a la bolsa de Fabricio y al timo, suprimiendo el desarrollo de dichos órganos cuando se inyectan en huevos. En consecuencia, los mecanismos de defensa del hospedador se suprimen aumentando la susceptibilidad a los agentes infecciosos.

Los estudios epidemiológicos revelan alteraciones de la inmunidad innata y de la adquirida semejantes a las observadas en animales de experimentación tratados con TCDD. Un estudio realizado con niños esquimales expuestos accidentalmente a DLC demostró la correlación entre la ingesta de DLC y la diferenciación de linfocitos T-ayudantes (CD4) en linfocitos T-supresores (CD8) (Dewailly *et al.*, 1993). Estos estudios complementarían otros obtenidos con adultos suecos consumidores de pescados contaminados que mostraron bajas proporciones de células *natural killers* (Svensson *et al.*, 1994). Como en otras patologías, la potencia del TCDD como inmunosupresor es mayor que la de cualquiera de sus congéneres. Por lo general la capacidad inmunotóxica disminuye con el grado de

cloración de los PCDD/F de manera que las potencias de los congéneres hexa- y hepta- sustituidos son respectivamente 10 y 100 veces menores que la del TCDD.

En el caso de los PCB coplanares los congéneres *no-orto* son agentes inmunotóxicos más potentes que los *mono-orto* sustituidos. Los individuos expuestos al incidente de Yucheng presentaban una baja resistencia a gran variedad de infecciones. Durante el primer año se observó un descenso de las IgM e IgAs circulantes, disminución de los porcentajes de los diferentes tipos de linfocitos T, sin cambios en los linfocitos B y aumento de la linfoproliferación inducida por ciertos mitógenos.

3. Hepatotoxicidad

La inducción de enzimas hepáticas es uno de los efectos tóxicos más reproducibles producidos por la exposición a TCDD. Este efecto se produce después de la exposición a concentraciones de TCDD tres órdenes de magnitud inferiores a la de su umbral de toxicidad aguda (Bock, 1994). La inducción enzimática es una consecuencia de la unión de la dioxina al receptor AhR y al aumento de la transcripción de los genes que están corriente abajo de los elementos de respuesta a dioxinas. Como se dijo anteriormente, las dos actividades catalíticas del complejo CYP4501A1 y 1A2, AHH y EROD son especialmente sensibles a la exposición a TCDD (Schrenk, 1998). Sin embargo, no queda claro si la inducción enzimática es un proceso tóxico en sí mismo: (1) por un lado la inducción enzimática parece estar relacionada con alteraciones del crecimiento, diferenciación, apoptosis y comunicación intracelular; (2) por otro, es un intermediario indispensable en la activación metabólica de multitud de compuestos normo- y xenobióticos, que pueden ser cancerígenos potenciales. Se han encontrado buenas correlaciones entre la inducción enzimática y crecimiento reducido, atrofia tímica *in vivo* en roedores de laboratorio (Menear y Lee, 1994). La inducción de la AHH y la EROD ha sido descrita para otros PCDD/F y PCB coplanares en animales de laboratorio

(Safe, 1994) y diferentes tipos de peces tanto adultos como en estado larvario.

Casi no existen datos disponibles de inducción enzimática por TCDD en humanos; y en los pocos estudios realizados no se encontró correlación entre las concentraciones de TCDD séricas y la inducción enzimática en hígado humano.

4. Efectos reproductivos y del desarrollo

El TCDD es fetotóxico para distintas especies animales incluidas ratas, ratones, cobayas, hámsters y conejos. Entre otras malformaciones morfológicas, la exposición prenatal al TCDD origina, fisura palatina, hidronefrosis y riñones atrofiados a ratones en desarrollo, a concentraciones que no comprometen la salud de las madres gestantes (tenTusscher y Koppe, 2004). La intervención del receptor AhR en la aparición de estas anomalías se ha puesto de manifiesto usando ratones modificados genéticamente (AhR⁻) incapaces de sintetizar esta proteína (González y Fernández-Salguero, 1998). El TCDD afecta a la reproducción de la rata originando un reducido número de crías, menor supervivencia y retraso del crecimiento de las mismas. Los efectos reproductivos se han observado tanto en machos como en hembras. La exposición prenatal y durante la lactación de ratas macho induce problemas en su madurez sexual, incluyendo niveles reducidos de testosterona, producción reducida de esperma y comportamientos sexuales feminizantes. Por su parte, las hembras descendientes de madres tratadas con dioxinas retrasan el comienzo de la pubertad y presentan malformaciones en los genitales externos (Birnbaum, 1995). Una reducción de la fertilidad y de la capacidad reproductiva se ha encontrado igualmente en monos rhesus tratados con TCDD. La exposición crónica a TCDD origina endometriosis dosis-dependiente en estos animales.

Los estudios realizados en Seveso, han demostrado alteraciones significativas en la relación de sexos de los descendientes nacidos de

los progenitores expuestos al accidente de 1976 (Mocarelli *et al.*, 1996). Otros estudios epidemiológicos parecen relacionar déficits intelectuales (IQ*) y del comportamiento en niños nacidos de madres expuestas a dioxinas, producidos por alteraciones hormonales durante el embarazo. Existe una fase crítica en el desarrollo del cerebro humano comprendida entre el tercer trimestre del embarazo y los dos años de vida del niño que coincide con las 3-4 semanas de la fase neonatal del ratón que tiene una especial sensibilidad a la presencia de dioxinas. Un reciente estudio ha puesto de manifiesto la relación entre los niveles de exposición a PCDD/Fs y PCB de la leche materna y un desarrollo neurológico neonatal subóptimo (Faroon *et al.*, 2001).

Los PCB coplanares causan fisura palatina en ratones. Hembras alimentadas con 3,3', 4,4', 5-PeCB (CB 126) tuvieron un número menor de descendientes, así como reducción de peso y déficits neuromusculares. La descendencia de ratas (machos y hembras) tratadas oralmente con 3,3', 4,4', 5,5'-HxCB (CB 169) tenían un éxito reproductivo disminuido. Los resultados indican alteraciones en el comportamiento sexual en animales tratados con dosis subtóxicas de CB 118 o CB 126.

5. Carcinogenicidad

Entre los riesgos más importantes a la exposición a DLC está su potencial carácter carcinogénico. La IARC (*International Agency for Research on Cancer*)* ha establecido el riesgo de carcinogenicidad de los DLC en humanos basándose en tres criterios: (1) mecanicistas, (2) ensayos de experimentación animal, y (3) datos epidemiológicos. Mientras que los dos primeros parecen indicar claramente la carcinogenicidad del TCDD, no son tan concluyentes los resultados basados en datos epidemiológicos. La IARC había sostenido hasta 1997 que no existían datos concluyentes sobre la carcinogenicidad del TCDD en humanos, aunque sí se había demos-

trado repetidamente en animales de experimentación. Por esta razón fue clasificado como un posible carcinógeno para humanos (IARC, grupo 2B). Sin embargo, el mecanismo de acción común del TCDD en animales y humanos (relacionado con la unión al receptor AhR), indujeron a su reclasificación a partir de 1997 como un carcinógeno humano (IARC, grupo 1) (Cole y *et al.*, 2003).

El TCDD no ha mostrado efectos mutagénicos ni genotóxicos y por lo tanto no debe ser considerado un iniciador tumoral. Por el contrario, su mecanismo de acción debe relacionarse con la unión al receptor AhR, tal y como se ha descrito con anterioridad (Safe, 2001). La característica de promotor, y su unión a receptores definidos para ejercer su toxicidad, suponen que el efecto carcinogénico del TCDD sería dependiente de la dosis y por lo tanto presentaría umbral de toxicidad (Kitchin *et al.*, 1994).

El TCDD es un potente carcinógeno en animales de laboratorio. Las dioxinas se han considerado carcinógenos pluripotenciales, de manera que los cánceres humanos asociados a estos compuestos comprenden cáncer de pulmón y próstata, mieloma múltiple, sarcomas de tejidos blandos, linfoma no Hodgkin y hepatocarcinomas. Sin embargo, los resultados en ratas son más limitados ya que más del 50 % de los mismos son carcinomas hepatolenticulares y carcinomas escamosos de la cavidad bucal. La mayor susceptibilidad de las hembras parece estar relacionada con la acción de las hormonas ováricas.

Los resultados epidemiológicos de carcinogenicidad por exposición al TCDD no demuestran la relación causal a ningún nivel de exposición (Cole *et al.*, 2003). A menudo los estudios no parten de cohortes de sujetos homogéneas, otras carecen de un número significativo de individuos, o el tiempo de latencia hasta la aparición de los síntomas no ha sido suficientemente largo, o no han podido eliminarse otros factores ambientales, ocupacionales o hábitos personales (tabaquismo), o de identificación del agente tóxico que pueden alterar el valor estadístico de los resultados. Ni los estudios realizados con trabajadores de plantas de herbicidas clorados,

* Agencia Internacional de Investigación del Cáncer

* IQ del inglés «Intelligence Quotient»: Cociente intelectual

ni los estudios realizados entre la población del área de Seveso demuestran una tendencia significativa a incrementar el riesgo de cáncer entre la población expuesta (Cole *et al.*, 2003).

Otros estudios muestran resultados discutibles. Ott y Zober (1996) estudiaron la incidencia de cáncer en más de 100 trabajadores alemanes de una planta química 20 años después de un accidente en el que estuvieron expuestos a elevados niveles de TCDD. Los resultados demostraban un exceso de 2 veces en la aparición de cáncer. En un estudio con 1.500 trabajadores químicos alemanes Manz *et al.* (1991) se encontró un exceso del 24% en la aparición de cáncer. El seguimiento de 1.189 de estos trabajadores, demostró que los hombres con la mayor exposición a PCDD/F desarrollaban cáncer a un ritmo 3,3 veces superior a los controles (Flesch-Janys *et al.*, 1995). En un estudio internacional a gran escala con trabajadores encargados de la producción de herbicidas derivados del ácido fenoxiacético de 12 países se encontró que los individuos que manejaban herbicidas contaminados con PCDD/F presentaban una prevalencia hasta de un 20% mayor en el desarrollo de cualquier tipo de cáncer, que aquellos que manipulaban plaguicidas técnicamente «limpios» (Becher *et al.*, 1996).

Otros congéneres DLC y PCB coplanares han sido estudiados como potenciales promotores tumorales. Únicamente el TCDD es declarado carcinógeno para humanos (IARC, grupo 1) pero no así otros PCDD, cuyo mecanismo de acción está también relacionado con su unión al receptor AhR. Como la potencia de otros PCDD/F es solo una fracción de la del TCDD, la IARC les ha registrado dentro del grupo 3 (no clasificados como carcinógenos para humanos). Los estudios realizados tras el incidente de Yusho (Japón) demostraron que los afectados por dicha exposición tenían una probabilidad tres veces mayor de desarrollar cáncer de hígado que individuos no expuestos. La IARC ha concluido que no existe certeza de que los PCB sean carcinógenos para humanos, aunque sí existe certidumbre con animales de experimentación, por lo que se han clasificado como probables carcinógenos humanos (IARC, grupo 2A).

Presencia de dioxinas en los alimentos

La vía de entrada de las dioxinas en la cadena trófica es su depósito en el suelo o en la superficie de plantas que después van a servir para la alimentación humana o de los animales de explotación. Estos niveles de contaminación deben ser considerados como niveles de fondo. Los niveles de fondo en peces continentales proceden de la contaminación de las aguas lacustres o fluviales procedentes de suelos contaminados o desechos industriales. Sin embargo, los niveles de residuos por encima de los valores de fondo se producen cuando los animales se alimentan de productos contaminados previamente con elevadas concentraciones de dioxinas, tanto por vías naturales como antropogénicas.

El ganado bovino cuidado en régimen extensivo es la especie de explotación más expuesta a la contaminación por dioxinas debido a la ingesta de plantas y forrajes contaminados con estos productos. Este tipo de alimentación contiene entre un 70% a un 79% de la ingesta total de las dioxinas presentes en los tejidos de terneros y vacas lecheras, respectivamente. Otra fuente importante de exposición a dioxinas es la ingestión de suelo mezclado con la vegetación durante el pasto (20-29% de la exposición total). Los animales criados en régimen intensivo alimentados con grano están menos expuestos al consumo accidental de dioxinas durante el periodo previo a su sacrificio. La inclusión de productos de origen animal en la dieta de terneros de cebo (carne y huesos de otros animales) influye muy significativamente en la ingesta de dioxinas. No obstante, la prohibición en Europa de estos productos tras los brotes de encefalitis espongiiforme bovina (enfermedad de las «vacas locas») ha disminuido significativamente esta fuente de exposición. Finalmente, el lamido o la masticación de los utensilios de madera de las granjas de producción de ganado tratados con conservantes a base de pentaclorofenol suponen una fuente adicional de contaminación.

1. Niveles de dioxinas en alimentos

La presencia de dioxinas en los alimentos es una consecuencia de sus propiedades fisicoquímicas y de su tendencia a acumularse en la cadena trófica (Pollit, 1999). Se estima que más del 90% de la exposición a dioxinas en humanos es de origen alimentario, principalmente por el consumo de alimentos grasos. Los niveles de dioxinas en los alimentos son muy bajos, para la mayoría de alimentos están por debajo de los límites de detección de los métodos analíticos utilizados rutinariamente. Por esta razón y debido al elevado coste de los métodos analíticos recomendados internacionalmente para su detección y cuantificación, las bases de datos de residuos de dioxinas en alimentos son escasas

La mayor parte de las dioxinas suelen llegar al ser humano a través de la leche, huevos carne y pescado (Tabla 20.4).

Con base a los datos de la Tabla 20.4 y usando el porcentaje de los diferentes ingredientes alimentarios en la dieta, se han podido calcular los diferentes grados de contaminación por dioxinas:

Huevos: la presencia de congéneres de PCDD/F en huevos de países de la UE es mayor (rango entre 0,5 y 2,7 pg I-TEQ/g) que la encontrada en EE UU (0,29 pg WHO-TEQ/g) y Canadá

(0,044 pg TEQ de dioxinas y 0,029 ng TEQ de PCBs coplanares)/kg de peso.

Pescados y crustáceos: las poblaciones habituadas al consumo de pescado, tienden a una acumulación mayor de DLC en su tejido adiposo que las habituadas al consumo moderado o a las no consumidoras. La contaminación por dioxinas de pescados y sus derivados es muy heterogénea, debido a las diferentes especies y a su distinto origen de procedencia. Muchas especies de pescado contienen concentraciones por debajo de 1 pg I-TEQ/g. En algunas especies como anguilas y cangrejos las concentraciones pueden ser mayores, así como los que proceden de zonas contaminadas. Por lo general los pescados y crustáceos suelen estar más contaminados de PCB que de dioxinas, con una diferencia de entre 2 a 5 veces. En general, el pescado enlatado presenta contenidos superiores de dioxinas al pescado fresco.

Carne: los valores medios de dioxinas en carne de pollo, ternera y cordero varían entre 0,6-1 pg I-TEQ/g, mientras que en carne de cerdo estos valores estaban por debajo de 0,4 pg I-TEQ/g. Estos valores son significativamente mayores en animales de caza.

Leche y productos lácteos: los análisis recientes muestran valores medios de 0,3-2,1 pg I-TEQ/g y 0,2-1,8 pg PCB-TEQ/g para dioxinas y PCB, respectivamente. Un estudio realizado

Tabla 20.4. Contenido de dioxinas en alimentos básicos evaluados por el SCAN expresados en ng I-TEQ/kg de materia seca (únicamente TCDD y TCFD).

Alimentos	Dioxinas (ng I-TEQ/kg de materia seca)		
	mínimo	media	máximo
Cereales y legumbres	0,01	0,1	0,4
Derivados de cereales y azúcar	0,02	0,1	0,7
Aceite vegetal	0,1	0,2	1,5
Pescados (Europa)	0,04	1,2	5,6
Aceite de pescado (Europa)	0,7	4,8	20
Grasa animal	0,5	1	3,3
Carnes	0,1	0,2	0,5
Productos lácteos	0,06	0,12	0,48
Elementos traza, macrominerales	0,1	0,2	0,5
Premezclas	0,02	0,2	0,5

sobre muestras de leche de 12 granjas en España (Ramos *et al.*, 1997) demostró que los residuos de dioxinas eran mayores en los productos procedentes de zonas cercanas a plantas incineradoras, fábricas químicas o metalúrgicas.

Vegetales, frutas y cereales: los productos de origen vegetal (frutas, hortalizas y cereales, con menos de un 2% de contenido graso) tienen una concentración de dioxinas muy homogéneo del orden de 0,02-0,03 pg I-TEQ/g de alimento.

Grasas y aceites: muchos tipos de grasas y aceites, tanto de origen animal como vegetal se usan en la industria para la manufactura de diferentes productos alimentarios. Los estudios realizados en Europa muestran valores de contaminación por debajo de 1 pg I-TEQ/g de aceite El aceite de pescado puede contener valores consistentemente mayores a esta media.

2. Ingesta diaria de dioxinas

Los valores de ingesta diaria estimada de PCDD/F de los habitantes de la Unión Europea en los últimos 10 años (1995-2004) está en el rango de 0,4-1,5 pg I-TEQ/kg peso corporal/día. Estos valores son significativamente menores que los encontrados en las décadas anteriores (1,7-5,2 pg I-TEQ/kg peso corporal/día), como consecuencia de las medidas reguladoras tomadas en esos años. La contribución de los PCB coplanares al TEQ total está en el rango de 0,8 – 1,8 pg PCB-TEQ/kg peso corporal/día. La mayor contribución a esta ingesta estimada procede de la leche y de los productos lácteos (rango 16-39%), carne y productos cárnicos (rango 6-32%) y pescados (rango 11-63%). Los productos de origen vegetal contribuyen entre el 6 y el 26%. En la mayoría de los países en los que hay datos disponibles, los niños pequeños sufren una mayor exposición a dioxinas que los adultos (unas dos veces más), especialmente durante la lactación (de 1 a 2 órdenes de magnitud mayor). Los niveles de dioxinas en la leche materna son mayores que los de la mayoría de los alimentos. La OMS ha establecido que la ingesta estimada en España puede llegar a 4,5 pg TEQ/kg de peso corporal/día (Jiménez *et al.*, 1996). La dieta

Mediterránea, de vegetales y cereales, contribuye significativamente a los altos niveles de ingesta de PCDD/F (Domingo *et al.*, 1999).

Hasta ahora no existen datos que relacionen la aparición de respuestas tóxicas como consecuencia de los hábitos dietéticos generadores de niveles de fondo de DLC. Sin embargo, sus efectos inmunosupresores sí se han observado en niños lactantes al aumentar su susceptibilidad a desarrollar infecciones óticas, por la secreción de estos compuestos en la leche de las madres consumidoras de una dieta rica en pescado contaminado con PCBs (Dallaire *et al.*, 2000).

3. Niveles de exposición tolerables

Reducir la ingesta de alimentos contaminados por DLC es un objetivo de salud pública para cualquier administración nacional e internacional y un importante aspecto en política de desarrollo sostenible global (Parzefall, 2002). La Environmental Protection Agency (EPA)* de EE UU, ha optado por un modelo muy conservador para establecer una ingesta diaria admisible (IDA) para estos compuestos, basado en los datos de su carcinogenicidad experimental en ratas. Este modelo supone que las dioxinas no solo son promotoras del crecimiento demostrados sino también iniciadoras tumorales (agentes genotóxicos). Por esta razón, la EPA ha calculado una IDA extraordinariamente baja para el TCDD de 6 fg /kg de peso corporal.

Los países europeos han sido menos conservadores, considerando que los DLC son únicamente promotores tumorales y no iniciadores, y por tanto susceptibles a la existencia de un umbral de toxicidad por muy pequeño que este sea. Basándose en datos de experimentación animal se pudo establecer un nivel de exposición sin efectos observables (NOEL)** de 1.000 pg/kg de peso corporal/día, y un factor de incertidumbre (seguridad) de 200, lo que supone un IDA de 5 pg TCDD/kg de peso corporal/día. La OMS en 1992 reconoció un IDA de 10 pg

* Agencia de Protección Ambiental de EE UU

** del inglés «Non Observable Effect Level»

TCDD/kg peso corporal/día, aunque lo revisó en 1998 a la vista de nuevos datos sobre los efectos inmunológicos, reproductivos y de comportamiento a 1-4 pg TCDD/kg de peso corporal/día (van Leeuwen *et al.*, 1998). La legislación española dentro de estas directrices considera un IDA de 4 pg TCDD/kg de peso corporal/día.

Métodos de análisis

La Comisión Europea ha preparando un documento que recoge los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de PCDD/F y PCB en alimentos. La base de este documento es definir unos criterios de funcionamiento entre los laboratorios oficiales de los países integrantes, más que describir una batería de tests obligatorios.

1. Análisis por GC/MS

Los métodos analíticos para la determinación y cuantificación de PCDD/F y PCB coplanares se basa en la extracción y lavado extensivo de la muestra, seguido de la separación mediante cromatografía de gases (GC) y detección por espectrometría de masas (MS) de alta resolución. Tras el aislamiento del sustrato graso, las dioxinas se purifican por una combinación de cromatografía en gel, óxido de aluminio o carbón activado. Simultáneamente se añaden a las muestras estándares marcados radiactivamente para compensar las pérdidas de recuperación y cuantificación (dilución isotópica).

La GC-MS permite la separación de los 17 congéneres PCDD/F y 4 PCB coplanares *ortho*. Los PCBs mono-*ortho* pueden analizarse por MS de baja resolución. Se han llevado a cabo estudios multicentro para el análisis de dioxinas y PCB, demostrando que las variaciones en analíticas de estos contaminantes no difieren de las de otros compuestos químicos. Los límites de detección para todos estos compuestos en los alimentos, deben estar en el rango de las ppts. La Comisión Europea recomienda la publicación de los resultados analíticos de los distin-

tos congéneres individualmente, así como de las concentraciones totales en I-TEQ.

2. Métodos alternativos para la determinación de dioxinas

Debido al elevado costo de los métodos analíticos anteriormente descritos, se han propuesto una serie de métodos alternativos basados en sus características toxicológicas, que están en fase de desarrollo para su validación oficial.

Las técnicas de inmunoensayo desarrolladas con este fin son muy específicas pero presentan una escasa sensibilidad, lo que las hace inadecuadas para el análisis de muestras alimentarias. Más prometedores parecen los bioensayos de detección de DLC basados en su mecanismo de acción en cultivos celulares (unión al receptor AhR). Dichos tests detectan el contenido total de TEQ pero no la concentración de cada uno de sus congéneres individualmente. Ya que no solo los compuestos DLC son capaces de unirse al receptor AhR, es preciso un procedimiento de limpieza previo para aumentar su especificidad. Estos ensayos pueden usarse como un sistema de cribado rápido, y requieren la confirmación de las muestras positivas mediante GC/MS. El método CALUX es un bioensayo validado en la UE para DLC (incluidos PCB) para detectar residuos en alimentos. Este método tiene menos de un 1% de falsos negativos en muestras de alimentos, sin embargo el porcentaje de falsos positivos varía en la medida en que se van conociendo nuevos compuestos relacionados con las dioxinas que interactúan con el ensayo (Schoeters *et al.*, 2004)

Conclusiones, evolución y riesgos futuros

Disminuir la exposición a residuos de DLC en la dieta como resultado de la restricción de las fuentes de liberación medioambiental es el objetivo prioritario de las administraciones europeas.

La drástica reducción en los últimos 30 años es una consecuencia del descenso sustancial en la exposición a dichos compuestos (se estima que entre un 90-95% desde finales de los años 60 y comienzos de los 70). Ya que las cargas corporales han disminuido significativamente en este periodo, las previsiones para los próximos años no tendrán el impacto de las décadas anteriores. Estimaciones hechas hasta el año 2030 sugieren que incluso una reducción de 10 veces en los valores actuales de exposición (una disminución poco posible basándose con el conocimiento actual de las fuentes de contaminación por DLC en alimentos) afectaría solo marginalmente a los niveles séricos de estos compuestos.

Un estudio comparativo de la evolución de la carga ambiental y corporal de DLC en los últimos 70 años, ha demostrado que ambos parámetros han disminuido drásticamente en los últimos 30 años y que tal caída continuará en un futuro próximo sin ninguna necesidad adicional de medidas reguladoras (Aylward y Hays, 2002). Desde los años 70, las emisiones de dioxinas desde fuentes cuantificables — vertederos, incineradores y combustión de gasolinas con plomo — han disminuido drásticamente y así seguirá en el futuro próximo. Los datos toxicocinéticos para el TCDD indican que la ingestión de esta dioxina ha disminuido en más de un 95% desde los niveles anteriores a 1972 y que la ingesta para todos los demás congéneres ha disminuido al menos en 10 veces en este mismo periodo. Reflejo de la disminución en la exposición e ingesta de TCDD las cargas corporales de TCDD disminuyeron en un 90% entre 1970 y 2000, y si los niveles de exposición continúan disminuyendo a la misma velocidad que en el 2000, las cargas corporales caerán en un 50 % de las actuales en 2010. Para el resto de los congéneres la carga corporal disminuirá algo más lentamente debido a que las vidas medias de algunos de ellos son superiores a las del TCDD.

Solo mediante el cumplimiento estricto de las medidas reguladoras establecidas por las administraciones, y el control periódico de las fuentes potenciales de liberación al medioambiente y de las rutas de entrada en la dieta humana, se podrá garantizar la seguridad de los ali-

mentos, amenazada por estos contaminantes insidiosos por su persistencia y su toxicidad.

Bibliografía

- Aoki Y (2001). Polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, and polychlorinated dibenzofurans as endocrine disrupters. What we have learned from Yusho disease. *Environ Res A* 86: 2-11.
- Atkinson R (1991). Atmospheric lifetimes of dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans. *Sci Total Environ* 104: 17-33.
- Aylward LL, Hays SM (2002). Temporal trends in human TCDD body burden: Decreases over three decades and implications for exposure levels. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 12: 319-328.
- Becher H, Flesch-Janys D, Kauppinen T, Kogevinas M, Steindorf K, Manz A *et al.* (1996). Cancer mortality in German male workers exposed to phenoxy herbicides and dioxins. *Cancer Causes Control* 7: 312-321.
- Birnbaum LS (1995). Developmental effects of dioxins and related endocrine disrupting chemicals. *Toxicol Lett* 82-83: 743-750.
- Bock KW (1994). Aryl hydrocarbon or dioxin receptor: biologic and toxic responses. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 125: 1-42.
- Carson R (1962). *Silent Spring*. Houghton Mifflin, 318pp.
- Cole P, Trichopoulos D, Pastides H, Starr T, Mandel JS (2003). Dioxin and cancer: a critical review. *Regul Toxicol Pharmacol* 38: 378-388.
- Dallaire F, Dewailly E, Laliberte C, Muckle G, Ayotte P (2002). Temporal trends of organochlorine concentrations in umbilical cord blood of newborns from the lower north shore of the St. Lawrence river (Quebec, Canada). *Environ Health Perspect* 110: 835-838.
- Domingo JL, Schuhmacher M, Granero S, Llobet JM (1999). PCDDs and PCDFs in food samples from Catalonia, Spain. An assessment of dietary intake. *Chemosphere* 38: 3517-3528.
- Dwyer JH, Flesch-Janys D (1995). Agent Orange in Vietnam. *Am J Public Health* 85: 476-478
- Flesch-Janys D, Berger J, Gurn P, Manz A, Nagel S, Waltsgott H *et al.* (1995). Exposure to polychlorinated dioxins and furans (PCDD/F) and mortality

- in a cohort of workers from a herbicide-producing plant in Hamburg, Federal Republic of Germany. *Am J Epidemiol* 142:1165-1175.
- Faroon O, Jones D, de Rosa C (2001). Effects of polychlorinated biphenyls on the nervous system. *Toxicol Ind Health* 16: 305-333.
- Dewailly E, Ayotte P, Bruneau S, Laliberte C, Muir DC, Norstrom RJ (1993). Inuit exposure to organochlorines through the aquatic food chain in arctic Quebec. *Environ Health Perspect* 101: 618-620.
- Geyer HJ, Schramm KW, Feicht EA, Behechti A, Steinberg C, Brüggemann R *et al.* (2002) Half-lives of tetra-, penta-, hexa- and octachlorodibenzo-p-dioxins in rats, monkeys and humans – a critical review. *Chemosphere* 48: 631-644.
- González FJ, Fernández-Salguero P (1998). The aryl hydrocarbon receptor studies using the AhR-null mice. *Drug Metab Dis* 26: 1194-1198.
- Hahn ME (2002). Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem Biol Interact* 141: 131-160.
- Hays SM, Aylward LL (2003). Dioxin risks in perspective: past, present and future. *Regul Toxicol Pharmacol* 37: 202-217.
- Holsapple MP, Karras JG, Ledbetter JA, Schieven GL, Burchiel SW, Davila DR *et al.* (1996). Molecular mechanisms of toxicant-induced immunosuppression: role of second messengers. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36: 131-159.
- Jiménez B, Hernández LM, Eljarrat E, Rivera J, González MJ (1996). Estimated intake of PCDDs, PCDFs and co-planar PCBs in individuals from Madrid (Spain) eating an average diet. *Chemosphere* 33: 1465-1474.
- Kerkvliet NI (2002). Recent advances in understanding the mechanisms of TCDD immunotoxicity. *Int Immunopharmacol* 2: 277-291.
- Kitchin KT, Brown JL, Setzer RW (1994). Dose-response relationship in multistage carcinogenesis: promoters. *Environ Health Perspect* 102: 255-264.
- Kreuzer PE, Csanady GA, Baur C, Kessler W, Papke O, Greim H *et al.* (1997). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and congeners in infants. A toxicokinetic model of human lifetime body burden by TCDD with special emphasis on its uptake by nutrition. *Arch Toxicol* 71: 383-400.
- Manz A, Berger J, Dwyer JH, Flesch-Janys D, Nagel S, Waltsgott H (1991). Cancer mortality among workers in chemical plant contaminated with dioxin. *Lancet* 338: 959-964.
- Menear JH, Lee CC (1994). Polybrominated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans: literature review and health assessment. *Environ Health Perspect* 102: 265-274.
- Mocarelli P, Gerthoux PM, Ferrari E, Patterson DG Jr, Kieszak SM, Brambilla P *et al.* (1996). Paternal concentrations of dioxin and sex ratio of offspring. *Lancet* 355: 1858-1863.
- Mukerjee D (1998). Health impact of polychlorinated dibenzo-p-dioxins: a critical review. *J. Air Waste Manag Assoc* 48: 157-165.
- Ott MG, Zober A (1996). Cause specific mortality and cancer incidence among employees exposed to 2,3,7,8-TCDD after a 1953 reactor accident. *Occup Environ Med* 53: 606-612.
- Parzefall W (2002). Risk assessment of dioxin contamination in human food. *Food Chem Toxicol* 40: 1185-1189.
- Pesatori AC, Consonni D, Bachetti S, Zocchetti C, Bonzini M, Baccarelli A *et al.* (2003). Short- and long-term morbidity and mortality in the population exposed to dioxin after the «Seveso accident». *Ind Health* 41: 127-138.
- Pollitt F (1999). Polychlorinated dibenzodioxins and polychlorinated dibenzofurans. *Regul Toxicol Pharmacol* 30: S63-S68.
- Ramos L, Eljarrat E, Hernández LM, Alonso L, Rivera J, González MJ (1997). Levels of PCDDs and PCDFs in farm cow's milk located near potential contaminant sources in Asturias (Spain). Comparison with levels found in control, rural farms and commercial pasteurized cow's milks. *Chemosphere* 35: 2167-2179.
- Safe SH (1994). Polychlorinated biphenyls (PCBs): environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. *Crit Rev Toxicol* 24: 87-149.
- Safe SH (2001). Molecular biology of the Ah receptor and its role in carcinogenesis. *Toxicol Lett* 120: 1-7.
- Schoeters G, Goyvaerts MP, Ooms D, Van Cleuvenbergen R (2004). The evaluation of dioxin and dioxin-like contaminants in selected food samples obtained from the Belgian market comparison of TEQ measurements obtained through the CALUX bioassay with congener specific chemical analyses. *Chemosphere* 54: 1289-1297.
- Schrenk D (1998). Impact of dioxin-type induction of drug-metabolizing enzymes on the metabolism of endo- and xenobiotics. *Biochem Pharmacol* 55: 1152-1162.

- Svensson BG, Hallberg T, Nilsson A, Schutz A, Hagmar L (1994). Parameters of immunological competence in subjects with high consumption of fish contaminated with persistent organochlorine compounds. *Int Arch Occup Environ Health* 65: 351-358.
- Taylor PH, Lenoir D (2001). Chloroaromatic formation in incineration processes. *Sci Total Environ* 269: 1-24.
- ten Tusscher GW, Koppe JG (2004). Perinatal dioxin exposure and later effects-a review. *Chemosphere* 54: 1329-1336.
- Tuppurainen K, Asikainen A, Ruokojarvi P, Ruuskanen J (2003). Perspectives on the formation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans during municipal solid waste (MSW) incineration and other combustion processes. *Acc Chem Res* 36: 652-658.
- Van der Berg M, De Jongh J, Poiger H, Olson JR (1994). The toxicokinetics and metabolism of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) and their relevance for toxicity. *Crit Rev Toxicol* 24: 1-74.
- Van den Berg M, Birnbaum L, Bosveld AT, Brunstrom B, Cook P, Feeley M *et al.* (1998). Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ Health Perspect* 106: 775-792.
- Wittich RM (1998). Degradation of dioxin-like compounds by microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 49: 489-499.
- Yamamoto O, Tokura Y (2003). Photocontact dermatitis and chloracne: two major occupational and environmental skin diseases induced by different actions of halogenated chemicals. *J Dermatol Sci* 32: 85-94.

Arturo Anadón, M.^a Rosa Martínez-Larrañaga

Introducción. Medicamentos veterinarios. Evaluación del riesgo toxicológico por residuos de medicamentos. Riesgos de los residuos de medicamentos veterinarios para la salud pública. Investigación de residuos. Bibliografía.

Introducción

La seguridad de la alimentación humana y animal está siendo desde hace unos años foco de interés especial a nivel europeo y nacional, de forma que la producción animal no puede dissociarse de la calidad y la seguridad de los alimentos que produce. Las crisis alimentarias sucedidas en los últimos años, tales como la crisis de las «vacas locas» o «encefalopatía espongiforme bovina» (BSE) en carne de vacuno y su relación con la inducción de la variante humana de la enfermedad Creutzfeldt-Jakob (CJD), la muerte trágica de consumidores escoceses como resultado de la presencia de *Escherichia coli* 0157 en carne de vacuno, la pérdida de confianza por parte del consumidor belga en su sector agroalimentario por la crisis de los «pollos belgas» o de contaminación por dioxinas y la crisis de la listeria, han impulsado a la Comisión Europea y a los Estados miembros de la Unión Europea (UE) a

un replanteamiento fundamental acerca de la integridad de la cadena alimentaria y cómo debería ser regulada. Tras el incidente de las dioxinas en 1999, la UE se planteó ejercer un control más estricto en la alimentación animal (Anadón *et al.*, 2000, 2000b). Por ello, la Comisión de las Comunidades Europeas publicó en el año 2000 el *Libro Blanco sobre la Seguridad Alimentaria* en el que se comprometía a acometer 84 acciones en favor de la seguridad alimentaria antes del mes de diciembre del año 2002. Entre estas, la más importante era la creación de un organismo alimentario europeo independiente denominado «Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria» (EFSA) como medio más apropiado para satisfacer la necesidad de garantizar un nivel elevado de seguridad alimentaria. El resultado ha sido también la creación de Agencias de Seguridad Alimentaria en muchos estados miembros de la UE; a este respecto, en España se ha creado la Agencia Española para la Seguridad Alimentaria (AESAs), con el objeto de replan-

tear la política de seguridad alimentaria y disponer de instrumentos para la gestión integral de la seguridad alimentaria en toda la cadena de producción, elaboración, distribución y consumo y también se han creado agencias en ciertas comunidades autónomas.

Los actuales sistemas de control y vigilancia de los productos alimenticios tienen que incorporarse en un sistema integral y eficaz de vigilancia de la seguridad alimentaria «desde la granja a los consumidores», ya que los productos que consumimos han de ser de calidad pero a la vez seguros (Anadón *et al.*, 2000a, 2000b); así, una cadena alimenticia «desde la granja a la mesa», correctamente regulada y eficazmente controlada, es el camino para construir esta confianza perdida por las crisis alimentarias que han sucedido en la UE. Estas acciones se aplican, entre otras, al control microbiológico de los alimentos y a los residuos de medicamentos veterinarios y a otros contaminantes potencialmente peligrosos.

Medicamentos veterinarios

En la UE, la producción, comercialización, prescripción y uso de medicamentos veterinarios está regulada por un Código Comunitario que es detallado en la Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo modificada por la Directiva 2004/28/CE. En esta última Directiva en su Art.º 1 se define al medicamento veterinario como toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades animales, o que pueda administrarse al animal con el fin de restablecer, corregir o modificar las funciones fisiológicas del animal ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o establecer un diagnóstico médico.

La FAO y la OMS en 1984, definieron al medicamento veterinario como «cualquier sustancia aplicada o administrada a los animales produc-

tores de alimentos, tales como animales productores de carne, aves, pescados o abejas, con fines terapéuticos, profilácticos o de diagnóstico, o de modificación de las funciones fisiológicas, y para la prevención y tratamiento de las enfermedades» (FAO/WHO, 1984).

En los animales productores de alimentos, con fines zootécnicos se usan también aditivos para la alimentación animal y sustancias hormonales, principalmente. Los aditivos para la alimentación animal se definen como sustancias, microorganismos y preparados distintos de las materias primas para piensos y de las premezclas, que se añaden intencionalmente a los piensos o al agua (Reglamento (CE) N.º 1831/2003). Los objetivos de estos aditivos son: (a) influir favorablemente en las características de las materias primas para piensos o de los piensos compuestos o de los productos de origen animal; (b) satisfacer necesidades nutricionales de los animales o mejorar la producción animal, en particular influyendo en la flora gastrointestinal o en la digestibilidad de los piensos; (c) aportar a la alimentación elementos que favorezcan la obtención de objetivos de nutrición específicos o atender a necesidades nutricionales particulares momentáneas de los animales; (d) prevenir o reducir las molestias ocasionadas por las deyecciones animales o mejorar el entorno de los mismos; (e) afectar favorablemente el color de los peces y aves ornamentales; (f) poseer un efecto frente a la coccidiosis o histomoniasis (Anadón *et al.*, 2000b). El Reglamento (CE) N.º 1831/2003 establece 5 categorías distintas de aditivos (tecnológicos, organolépticos, nutritivos, zootécnicos y coccidiostáticos y otras sustancias medicamentosas) que se subdividen a su vez en grupos funcionales. Los aditivos zootécnicos se suelen usar para influir positivamente en la productividad de los animales que gozan de buena salud o en el medio ambiente; estos se agrupan en los grupos funcionales de digestivos, equilibradores de la flora intestinal, promotores del crecimiento, y mejoradores de la salud y los aditivos coccidiostáticos y otras sustancias medicamentosas que se utilizan en diferentes especies y categorías de animales de forma con-

tinuada en el pienso para prevenir enfermedades originadas por protozoos (por ejemplo, decoquinato, halofuginona, lasalocid sódico, monensina sódica, narasina, salicomicina sódica, robenidina clorhidrato, diclazuril, maduramicina sódica, semduramicina sódica). Entre los aditivos antibióticos promotores del crecimiento usados a niveles subterapéuticos durante periodos largos con el fin de favorecer el crecimiento y la eficacia alimenticia, actualmente tenemos autorizados en la UE el flavofosfolipol para conejos, la salinomina para lechones y cerdos de engorde, y la avilamicina para lechones y cerdos de engorde, pollos de engorde y pavos (Anadón *et al.*, 2000a, 2000b). Para estos antibióticos promotores del crecimiento, así como para los coccidiostáticos, se necesitan llevar a cabo diferentes estudios toxicológicos y cinéticos para el establecimiento de los límites máximos de residuos (LMRs) (Directiva del Consejo 87/153/CEE modificada por la Directiva de la Comisión 94/40/CE).

Residuos de medicamentos veterinarios

Durante la cría de animales productores de alimentos se utilizan muchas sustancias, por lo que pueden crear cantidades residuales en los productos alimenticios derivados para consumo. Entre estas sustancias xenobióticas tenemos los residuos de medicamentos veterinarios. Se conoce que el propósito principal que contempla la legislación veterinaria de la UE es la protección al consumidor frente a la peligrosidad o riesgo que puedan presentar la presencia de residuos de medicamentos en los productos alimenticios de origen animal.

Los residuos de medicamentos veterinarios se definen como sustancias farmacológicamente activas (principios activos y excipientes, productos de degradación y metabolitos) que permanezcan en los productos alimenticios obtenidos a partir de animales a los que se les hubiera administrado el medicamento veterinario (Reglamento (CEE) No 2377/90). Por su trascendencia legal, podemos tomar en consideración la definición de residuos recogida en el Art.º 2 de

la Directiva del Consejo 96/23/CE, e incluida en el Art.º 2.3 del Real Decreto 1749/1998, expresada como «el residuo de sustancias de acción farmacológica, de sus productos de biotransformación y de otras sustancias que se transmitan a los productos animales y que puedan resultar nocivos para la salud humana»; el uso en animales productores de alimentos de sustancias ilegales puede ser constitutivo de delito contra la salud pública en nuestro Código Penal (Díaz y Anadón, 2000, 2000a).

Para el uso de medicamentos veterinarios, está en vigor el Reglamento del Consejo (CEE) N.º 2377/1990 de 26 de Junio por el que se establece un procedimiento comunitario para fijar los límites máximos de residuos (LMR) o tolerancias de medicamentos veterinarios. En este Reglamento se contemplan 4 Anexos para los principios activos componentes de los medicamentos veterinarios:

- Anexo I: incluye aquellos principios activos con los LMR establecidos.
- Anexo II: incluye aquellos principios activos que no necesitan fijarse sus LMR.
- Anexo III: incluye aquellos principios activos con LMR provisionales establecidos.
- Anexo IV: incluye los principios activos que no pueden fijarse un LMR porque cualquier nivel de residuos es peligroso (modificado por Reglamento (CE) N.º 508/1999).

Límites máximos de residuos y autorización de medicamentos veterinarios

Para el caso de los residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal, la legislación comunitaria ha establecido las normas para la fijación de los LMR de estas sustancias en los productos alimenticios. Se entiende como límite máximo de residuos (LMR o MRL) al contenido máximo de residuos (principio activo y en casos también metabolitos) resultantes de la utilización de un medicamento veterinario permitido en la UE (expresado en mg/kg

o $\mu\text{g}/\text{kg}$ sobre la base del peso del alimento de origen animal en fresco), es decir reconocido como nivel admisible de una determinada sustancia en un producto alimenticio. Como metabolitos se entiende a todo producto de biotransformación del principio activo inicial administrado al animal (Reglamento (CEE) N.º 2377/90). Los LMR fijados vienen publicados mediante Reglamentos de la Comisión en los que se hace constar: la sustancia activa farmacológica, el residuo marcador, las especies animales, el LMR ($\mu\text{g}/\text{kg}$) y los tejidos-diana. A parte de los LMR de la UE, existen los LMR establecidos por el *Codex Alimentarius* que rigen en el comercio internacional de alimentos y que son aceptados por la mayoría de lo que consideramos como terceros países. Se entiende por tejido-diana, el tejido comestible seleccionado para controlar el total de residuos de un medicamento en el animal de destino. Este tejido suele ser, aunque no necesariamente, el que presenta la velocidad mas baja de depleción de los residuos. Si se va a utilizar un medicamento en ganado vacuno o en aves ponedoras, los tejidos-diana incluirán también la leche o los huevos, además del tejido-diana (músculo, hígado, riñón, piel y grasa) comúnmente seleccionado para la monitorización de los residuos del medicamento en el animal tras su sacrificio. Se define como residuo-marcador al residuo (compuesto padre inalterado o sus metabolitos, o una combinación de ambos) cuya concentración tiene una relación conocida con la concentración del residuo total en cada unos de los diversos tejidos comestibles, que pueden servir de tejido-diana. El LMR precisa la concentración ($\mu\text{g}/\text{kg}$) del residuo-marcador tolerable en el tejido-diana. En el caso de la leche o de los huevos, puede ser necesario elegir un residuo marcador diferente del seleccionado para los tejidos-diana representativos procedentes del animal. (Anadón *et al.*, 1999c, 1999d).

Los LMR se fijan en función de los datos toxicológicos relevantes y de los datos cinéticos de absorción, distribución, metabolismo y excreción del principio activo y metabolitos. Tiene que ser incluida información detallada en el expediente que presentan las compañías far-

macéuticas para la autorización de la comercialización del medicamento e incluye: (a) datos farmacodinámicos y farmacocinéticos en animales de experimentación y de abasto, (b) factores cinéticos que puedan afectar a la relación dosis/respuesta, (c) estudios de toxicidad aguda y crónica (distintos de carcinogénesis), tales como toxicidad sistémica, inmunotoxicidad y efectos endocrinos (d) efectos sobre la reproducción y el desarrollo y (e) genotoxicidad y carcinogénesis (Anadón y Martínez-Larrañaga, 1999). JECFA, en 2003, ha señalado los datos científicos que se necesitan para el establecimiento de los LMR de los diferentes compuestos: (1) identidad química y propiedades del fármaco; (2) nivel de dosis de uso y frecuencia; (3) farmacocinética, estudios metabólicos y farmacodinámicos en animales de experimentación y en animales productores de alimentos, y en el hombre, cuando sean disponibles; (4) estudios de depleción de residuos con el fármaco radiactivamente marcado en animales diana, desde tiempo cero a tiempos superiores al tiempo de espera estimado (tiempo entre la última dosis del medicamento y el sacrificio del animal de abasto) con el fin de proporcionar información de los residuos totales, incluyendo residuos libres y copulados (extractables y no-extractables), y los componentes de los residuos mayoritarios para permitir una adecuada selección del residuo-marcador y los tejidos diana; (5) estudios de depleción de residuos en el animal de destino tras la administración del medicamento, para determinar las concentraciones del residuo-marcador frente al tiempo en los tejidos-diana, y en huevos, leche y miel; se deben incluir estudios con las formulaciones farmacéuticas para las que se solicita autorización de uso, vías de administración y especies animales; (6) los métodos analíticos validados que pueden usarse por las autoridades reguladoras para la detección o monitorización de los residuos en los tejidos-diana; (7) el procedimiento analítico (incluyendo todos los criterios de validación) empleado por el fabricante para la detección y determinación de los residuos del compuesto padre o principio activo; (8) estudios destinados a evaluar el impacto de los residuos de agentes antimicrobia-

nos sobre el procesado de alimentos; y (9) concordancia con los requerimientos de las GLP (buenas prácticas de laboratorio).

La evaluación de la seguridad de los residuos de medicamentos debe basarse primariamente en la evaluación del compuesto inalterado y de sus metabolitos potenciales; los consumidores podemos estar expuestos a metabolitos libres del fármaco inicial o principio activo, metabolitos bien conjugados a pequeñas moléculas (ácido glucurónico, sulfato, aminoácidos, glutatión) o metabolitos unidos covalentemente a macromoléculas orgánicas (proteínas, ácidos nucleicos), de forma que podemos considerar como «residuos totales» los siguientes compuestos (Botso-glou *et al.*, 2001): (1) compuesto inalterado, (2) metabolitos libres producidos principalmente vía hidrólisis, oxidación y/o reducción, (3) metabolitos conjugados a pequeñas moléculas, y (4) metabolitos unidos covalentemente a macromoléculas. Por todo ello, para poder evaluar la seguridad de los residuos, se requieren apropiados estudios de metabolismo en las especies animales productoras de alimentos, con el objeto de identificar el residuo marcador.

En definitiva, en el uso de los medicamentos veterinarios en animales productores de alimentos tenemos como parámetros de seguridad alimentaria el LMR y el tiempo de espera; el Plan Nacional de Investigación de Residuos obliga el control del cumplimiento de los LMR.

Tiempo de espera

Según el Art.º 1 de la Directiva 2004/28/CE, el tiempo de espera o de retirada es el periodo de tiempo necesario entre la última administración del medicamento veterinario a un animal, en las condiciones normales de empleo, y la obtención de productos alimenticios de dicho animal, a fin de proteger la salud pública, garantizando que dichos productos alimenticios no contengan residuos en cantidades que superen los LMR de sustancias activas fijados de conformidad con el Reglamento (CEE) N.º 2377/90. Los tiempos de espera se instauraron como medida de seguridad alimentaria para el consumidor, alargando

prudentemente el periodo de tiempo que media entre la administración del fármaco y el momento del sacrificio del animal a fin de asegurar que la concentración de sus residuos en el momento del sacrificio del animal de consumo humano esté por debajo del LMR (Anadón *et al.*, 2001; Anadón *et al.*, 2002; Martínez-Larrañaga *et al.*, 2004). Para la prescripción excepcional en el caso de un medicamento veterinario preparado extemporáneamente, este debe ser preparado por una persona autorizada por la normativa nacional, con arreglo a una prescripción veterinaria; si el medicamento utilizado no indica el tiempo de espera para las especies animales de que se trate, el tiempo de espera no deberá ser inferior a 7 días para los huevos, 7 días para la leche, 28 días para la carne de aves de corral y mamíferos incluidos la grasa y los menudillos, y 500 grados-día, para la carne de peces (Art.º 11, Directiva 2004/28/CE)

Evaluación del riesgo toxicológico por residuos de medicamentos

Las fases de la evaluación del riesgo se expresan en la Tabla 21.1.

La caracterización del riesgo conlleva establecer una ingesta diaria admisible (IDA o ADI) para un determinado principio activo o sustancia farmacológica. La IDA de un medicamento veterinario se establece sobre la base de un examen completo de la información disponible [incluido datos sobre las propiedades bioquímicas, metabólicas, farmacológicas y toxicológicas del medicamento, datos obtenidos de estudios en animales de experimentación y en animales de destino (metabolismo y depleción de residuos), y de las observaciones realizadas en el hombre] (Anadón *et al.*, 1999c, 1999d). Se utiliza como punto de partida el nivel sin efecto adverso observable (NOAEL) respecto de los datos toxicológicos obtenidos en el ensayo más sensible y en la especie del animal de experi-

Tabla 21.1. Fases de la evaluación del riesgo.

Evaluación del riesgo:

- Identificación de la peligrosidad.
- Evaluación dosis o exposición/respuesta.
- Evaluación de la exposición del hombre.
- Caracterización del riesgo.

Manejo del riesgo: incorpora los resultados de la caracterización del riesgo y las consideraciones sobre la salud pública, socio-económicas, y sociales.

Comunicación del riesgo: comunicación eficaz del proceso y caracterización del riesgo.

mentación también más sensible. Para determinar la IDA que se ha de aplicar al hombre, al NOAEL observado se le aplica un factor de seguridad que tiene en cuenta el tipo de efecto, la gravedad o su reversibilidad, y los problemas de variabilidad entre las especies y dentro de ellas. Si se dispone de datos de toxicidad obtenidos directamente del hombre, al estimar la IDA generalmente se aplicaría al NOAEL un factor de seguridad más pequeño. La IDA también puede obtenerse a partir de datos sobre propiedades farmacológicas de una determinada sustancia (efectos cardiovasculares, respiratorios, hormonales, actividad microbiológica o propiedades antibacterianas) (Anadón *et al.*, 1999c, 1999d) (Tabla 21.2).

El Comité de Expertos, conjunto FAO/OMS, sobre Aditivos Alimentarios (JECFA) ha desarrollado un árbol de decisión para evaluar el efecto potencial de residuos de medicamentos veterinarios sobre la microflora intestinal humana (Figura 21.1) indispensable para la fijación de una IDA microbiológica (WHO, 2002).

Se ha expresado cierta preocupación por el hecho de que pueden aparecer efectos tóxicos agudos por el consumo de carnes que contienen altas concentraciones de residuos, en tejidos comestibles procedentes bien de los puntos o lugares de inyección o administración de fármacos en animales de consumo u otros tejidos y alimentos derivados. Ello ha originado que se haya establecido la «dosis de referencia aguda» para evaluar las situaciones agudas de peligro

Tabla 21.2. Pasos a seguir en la fijación de los LMR(s).

- 1.º Toxicología.
- 2.º NOAEL en el animal más sensible, mg/kg p.c.
- 3.º IDA o ADI para el hombre, mg/kg p.c., teniendo en cuenta un factor de seguridad (entre 100 y 1.000).
- 4.º LMR o MRL (microgramo/kg o miligramo/kg) teniendo en cuenta un peso corporal para el hombre de 60 kg y las ingestas alimentarias(*).

(*): Grandes animales: músculo, 300 g; hígado, 100 g; riñón, 50 g; grasa, 50 g (en caso de los cerdos, piel + grasa, 50 g, en proporciones naturales), leche, 1.500 g.
 Aves: músculo, 300 g; hígado, 100 g; riñón, 10 g; piel + grasa, 90 g, en proporciones naturales; huevos, 100 g.
 Pescado: músculo + piel, 300 g, en proporciones naturales; miel, 20 g.

usando los mismos principios y métodos básicos empleados para calcular la IDA. Se identifica un NOAEL observado a partir de las bases de datos de efectos agudos (por ejemplo, discrasias sanguíneas y efectos neurotóxicos como neuropatía retardada e inhibición de la colinesterasa).

La caracterización del riesgo se traduce por el establecimiento del LMR para una sustancia en los tejidos comestibles de las diferentes especies animales sobre la base de los datos precedentes, tras la estimación de las frecuencias y naturaleza de los efectos indeseables. El LMR siempre garantiza el respeto de la IDA.

Los LMR para los residuos de medicamentos veterinarios en productos de origen animal, se basan en la IDA y en la información acerca de la distribución de los residuos en los tejidos comestibles de los animales diana. En el establecimiento de los LMR, la ingesta diaria máxima teórica (TMDI) se estima usando el paquete de consumo en fresco para productos de origen animal indicado en la Tabla 21.2; a la hora de fijar el LMR, no se tienen en cuenta los efectos industriales o de procesado doméstico de los alimentos en los residuos. Los residuos de medicamentos veterinarios incluyen el fármaco inalterado así como sus metabolitos potenciales. Los metabolitos se toman en consideración si son toxicológicamente relevantes, es decir, si están presentes en una considerable cantidad o

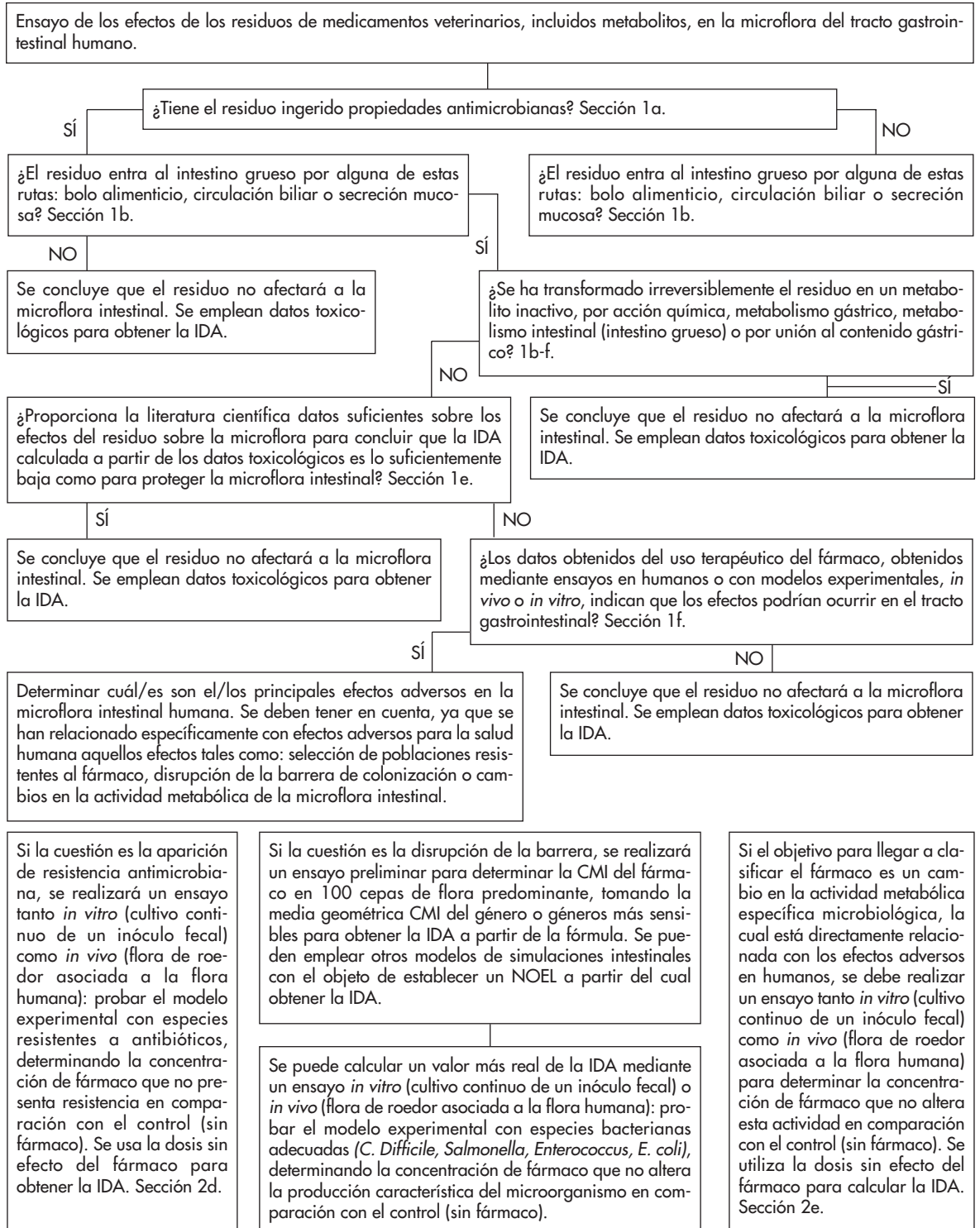


Figura 21.1. Árbol de decisión para la determinación de efectos microbiológicos adversos de residuos de antimicrobianos en animales productores de alimentos.

tienen un potencial toxicológico o farmacológico. El LMR, por tanto, se expresa en término del residuo marcador, es decir, nivel del fármaco inalterado, o nivel del fármaco inalterado más nivel de un metabolito principal, si se conoce el porcentaje del metabolito marcador formado a partir del compuesto inalterado o padre (Anadón *et al.*, 1999c, 1999d). Cuando las prácticas veterinarias usuales lo permiten, los valores de los LMR se rebajan a niveles de los contenidos de residuos de la sustancia observados en el marco de las buenas prácticas veterinarias en la utilización de los medicamentos veterinarios.

Riesgos de los residuos de medicamentos veterinarios para la salud pública

La concentración de residuos de un medicamento en los alimentos derivados de los animales tratados está en función de diversos factores que incluyen: el grado de absorción del medicamento a partir del lugar de administración, la dosis administrada del medicamento, la farmacocinética del producto, y el tiempo de espera o retirada del medicamento previo al sacrificio del animal. Una de las razones más obvia para que se produzcan residuos inaceptables por encima de los niveles tolerables o LMR, es el incumplimiento del tiempo de espera recomendado para un determinado medicamento veterinario (Deshpande, 2002).

En cuanto a los riesgos potenciales para la salud pública que pueden conllevar los residuos inaceptables por encima de los niveles tolerables o LMR de los medicamentos veterinarios en los productos alimenticios (carne, leche, huevos, miel) suelen ser de origen toxicológico, farmacológico, microbiológico e inmunológico. Los efectos pueden resumirse en:

- Efectos tóxicos directos.
- Efectos inmunológicos.
- Mutagénesis carcinogénesis teratogénesis.
- Efectos sobre la flora intestinal.

Efectos tóxicos directos

Los residuos de medicamentos en animales destinados a consumo tienen el potencial de producir efectos tóxicos directos. Ejemplos son los casos de desarrollo precoz sexual que se produjeron en Italia y Puerto Rico por consumo de carne que contenía residuos de sustancias con actividad estrogénica. Las hormonas esteroides endógenas como testosterona y estradiol son promotoras del crecimiento y se han usado como agentes anabolizantes en la producción de ganado vacuno. Otros compuestos sintéticos como la trembolona, o el zeranol, se han empleado con fines similares, aunque actualmente están prohibidos en la UE. La distribución y depleción tisular de los residuos de compuestos hormonales promotores del crecimiento lógicamente depende de su metabolismo y excreción; concentraciones significantes se encuentran normalmente en músculo, grasa, hígado, riñón, leche, así como en orina, bilis y heces, aunque las concentraciones más elevadas están en las excretas. (Botsoglou, 2001). Las hormonas sintéticas dietilestilbestrol, hexestrol y dienestrol, entre otras, son sustancias prohibidas por ser genotóxicas y carcinógenas.

Otra sustancia hormonal cuyo empleo ha dado lugar a un enfrentamiento comercial entre los EE UU y la UE es la somatotropina bovina (BST), hormona del crecimiento, polipéptido secretado por la glándula pituitaria. La administración a largo plazo de BST incrementa el peso del hígado, asociado a un incremento en la acumulación de proteínas, disminución del contenido de grasa y mejoras en la digestibilidad del pienso, siendo un potente estimulador de la producción de leche en vacas (20-40%); el uso de la BST está prohibido en la UE, por motivos de seguridad y bienestar animal.

Los compuestos tireostáticos, conocidos también como antihormonas, son capaces de inhibir la producción de hormonas tiroideas que reducen el metabolismo basal, disminuyen la motilidad gastrointestinal y favorecen la retención de agua extravascular, produciendo una ganancia de la masa muscular. El uso de los compuestos tireostáticos está también prohibido

en la UE ya que su uso principalmente supone un riesgo potencial para la salud, y también supone un fraude para el consumidor por una producción de carne de inferior calidad.

El clenbuterol, un fármaco beta-agonista, es otro producto prohibido en la UE como promotor del crecimiento; el clenbuterol, por su uso fraudulento como anabolizante, ha dado lugar a varias intoxicaciones en humanos, por consumo de hígado y de carne de ternera que contenían altas concentraciones de sus residuos. En concreto, en España en 1989 y 1990 hubo dos intoxicaciones que afectaron a 135 personas; posteriormente en 1992 otra intoxicación afectó a 232 personas. Los síntomas clínicos en más de la mitad de los pacientes incluyeron: temblores musculares y taquicardia frecuentemente acompañada de nerviosismo y palpitaciones, dolores de cabeza y mialgia, náuseas, fiebre, escalofríos, extrasístoles supraventriculares y fibrilación, siendo especialmente sensibles los enfermos cardíacos (Cameán *et al.*, 1995). El clenbuterol es una sustancia análoga a la adrenalina y noradrenalina que activa los receptores β_1 - y β_2 -adrenérgicos. Este fármaco agonista selectivo del receptor β_2 -adrenérgico es un buen broncodilatador, por lo que tiene aplicación clínica en el tratamiento del asma bronquial y la broncopatía crónica obstructiva (bronquiestasia, enfisema), y aunque en algunos países está autorizado su uso como medicamento, en ninguno caso se permite para uso en producción animal. Además, para el caso de fármacos beta-agonistas existen diferencias en cuanto a la autorización de su uso, ya que, por ejemplo, la ractopamina no está autorizada en la UE, pero sin embargo se permite su uso en los EE UU como promotor de crecimiento en cerdos sin tiempo de espera establecido; en estos casos es imprescindible el disponer de métodos que permitan evaluar los residuos de este fármaco en tejidos comestibles (Antignac *et al.*, 2002).

Por último, tenemos el caso de los residuos de ciertos fármacos antibióticos. En primer lugar citaremos al antibiótico cloranfenicol, causante de aplasia a dosis terapéuticas en el hombre, efecto que no se relaciona con la dosis; potencialmente residuos de este antibiótico en

alimentos derivados de los animales tratados pudieran también originar el mismo efecto (Anadón *et al.*, 1994). Este antibiótico se encuentra actualmente prohibido para uso en animales productores de alimentos. En segundo lugar podemos citar el grupo de los antibióticos polímeros ionóforos, compuestos ampliamente usados como antibióticos promotores del crecimiento y como agentes coccidiostáticos (lasalocid, monensina, narasina, salicomicina, maduramicina, semduramicina). Estos compuestos forman complejos reversibles liposolubles con cationes (principalmente monovalentes) participando así en el transporte e intercambio de los mismos a través de las membranas biológicas, produciendo una alteración de los niveles de cationes y aniones en el interior de la célula y de sus componentes subcelulares, lo cual influye en la regulación de las funciones celulares (Botsoglou *et al.*, 2001). Tienen bajo índice terapéutico y son muy tóxicos en ciertas especies (por ejemplo, caballos); así mismo, poseen interacciones con numerosos fármacos, principalmente con antibióticos macrólidos (eritromicina, oleandomicina) y con compuestos pleuromutilina tales como tiamulina. Así, por ejemplo, se han detectado intoxicaciones agudas en pollos, pavos y otras especies animales por el uso combinado de monensina y tiamulina. Se asume que la tiamulina reduce la degradación metabólica y retarda la excreción de ciertos polímeros como monensina. Se han descrito también otras interacciones de los polímeros ionóforos con otros fármacos como sulfamidas, cloranfenicol, y furazolidona (Anadón y Martínez-Larrañaga, 1990; Anadón y Reeve-Johnson, 1999b). Los antibióticos polímeros ionóforos deben utilizarse con precaución en combinación con otros fármacos en animales productores de alimentos, por poder originarse residuos no esperados.

Efectos inmunológicos

La alergia en medicina humana está bien establecida como efecto secundario del uso terapéutico de antibióticos, especialmente beta-lactámicos (penicilinas, cefalosporinas). Los efectos

secundarios por mecanismos alérgicos o inmunogénicos originados por antibióticos macrólidos son menos comunes. Clínicamente, la alergia medicamentosa está caracterizada por un espectro de reacciones que van desde un salpullido cutáneo medio (exantema, granos) a un angioma o anafilaxia grave (Deshpande y Salunkhe, 1995). Existe una gran inquietud acerca de los residuos de antibióticos en carne y otros alimentos de origen animal, ya que pueden ser potencialmente responsables de reacciones de hipersensibilidad en individuos susceptibles. En relación con el riesgo de sensibilización primaria, es poco probable que los residuos de antibióticos contribuyan a una respuesta inmunitaria completa, dado que los pacientes están expuestos a residuos de antibióticos con muy bajas concentraciones si se compara con los niveles de exposición recibidos durante el uso terapéutico. Para los antibióticos penicilinas y macrólidos, en el hombre, no existe evidencia de reacciones de hipersensibilidad por la presencia de residuos en alimentos de origen animal; además, la vía oral es mucho menos sensibilizante que la administración parenteral. Los estudios inmunoquímicos con penicilina indican que los complejos hapteno-proteína formados *in vivo* (pro-alergeno) son improbables de ser inmunogénicos principalmente debido a sus bajas dosis, densidad epítotope y unión a proteínas transportadoras (Rico, 1986). Como para los antibióticos betalactámicos, y por las mismas razones, los residuos de antibióticos macrólidos también son considerados poco probables de ser inmunogénicos. No se conocen bien los mecanismos por los cuales los macrólidos pueden inducir reacciones alérgicas o inmunogénicas (Anadón y Martínez-Larrañaga, 1999a; Anadón *et al.*, 1999c, 1999d). En general, también el riesgo de reacciones alérgicas en individuos presensibilizados es poco común; de nuevo factores tales como dosis, administración oral y baja densidad hacen improbable que pueda ser formado un derivado antigénico. Revisada la literatura sobre la hipersensibilidad a la penicilina, se evidencia un número pequeño de casos de individuos previamente sensibilizados en los que los residuos

de penicilina en leche pueden desencadenar una reacción alérgica, usualmente un salpullido. Aunque estos casos son muy raros (menos de 10 casos en los últimos 25 años), este hecho nos sugiere la necesidad de controlar los residuos de los antibióticos en los alimentos derivados de los animales tratados. De todas formas, la evaluación del riesgo indica que los LMR establecidos de penicilina, así como de otros antibióticos, en leche y productos cárnicos son apropiados para salvaguardar la seguridad humana. Con respecto a los modelos animales para establecer un NOAEL para el efecto de hipersensibilidad de un determinado antibiótico, estos ensayos son de poco valor a la hora de extrapolar al hombre los datos obtenidos en un modelo animal, debido a que el hombre puede presentar un exclusivo polimorfismo genético en la biotransformación de dicho antibiótico, así como una predisposición genética individual a sufrir reacciones alérgicas. De todas formas, algunos investigadores consideran que la escasez de efectos alérgicos ligados a los residuos de antimicrobianos en los alimentos es sorprendente en comparación con la enorme proporción de reacciones alérgicas que se presentan con el uso de los medicamentos antibacterianos entre la población humana; se sugiere que dichas reacciones anafilácticas pueden estar ligadas a otras alteraciones fisiológicas, especialmente en las personas de edad, y/o a la facilidad de desarrollar sensibilidad alérgica a las proteínas de la leche (Botsoglou *et al.*, 2001).

No obstante a todo lo expuesto, el Comité de Expertos Conjunto FAO/OMS sobre Aditivos Alimentarios (JECFA) pretende reconsiderar la evaluación del riesgo de alergenicidad de los medicamentos veterinarios. El desarrollo de protocolos experimentales aplicables al potencial alergénico de los medicamentos veterinarios será objeto de especial interés en un futuro (JECFA, 2003).

Mutagénesis, carcinogénesis, teratogénesis

La mayor preocupación que pueden generar los residuos de ciertos medicamentos y otras sustan-

cias usadas de forma fraudulenta en los animales de consumo humano es su potencial actividad mutagénica, carcinogénica, y teratogénica. Por ejemplo, el dietilestilbestrol (DES), administrado fraudulentamente por vía oral, persiste en el músculo hasta 70 días después de su aplicación; su empleo en forma de implantes subcutáneos en el ganado puede elevar el riesgo, por su persistencia más prolongada en los tejidos. La ingestión de alimentos con residuos de estilbenos puede alterar el equilibrio hormonal; se reconoce riesgo cancerígeno la exposición a estrógenos, especialmente del DES. Existe evidencia en animales de efectos carcinógenos ligados al DES; en mujeres embarazadas se ha observado una mayor incidencia de cáncer de endometrio y de adenocarcinoma cervical, efectos también ligados a la exposición de estos productos; el DES está clasificado en el Grupo 1 por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) (<http://www.iarc.fr>).

Otro es el caso de los medicamentos antimicrobianos del grupo de los nitrofuranos. Por su potencial de carcinogénesis, por un mecanismo genotóxico, el uso de antimicrobianos del grupo de los nitrofuranos ha sido prohibido en la UE (Directivas 93/3426/CEE y 95/1798/CEE); su actividad mutagénica está relacionada con su metabolismo: reducción del grupo nitro en posición 5, y subsiguiente formación de metabolitos reactivos que se unen covalentemente al ADN. El metabolito, 5-NO₂-derivado, en mamíferos, conduce a residuos covalentes de gran persistencia (Engeli, 2003; Hoogenbomm *et al.*, 2002; Kennedy *et al.*, 2003).

Otros compuestos medicamentos prohibidos por ser potencialmente genotóxicos son los derivados de la quinoxalina, empleados como promotores del crecimiento y como agentes terapéuticos en infecciones entéricas en cerdos. Dos derivados de la quinoxalina de mayor uso han sido el carbadox y el olaquinox (Anadón *et al.*, 1999a). Se conoce también que el fármaco tranquilizante clorpromazina puede causar efectos adversos sobre los sistemas nervioso y circulatorio, y también en sangre, piel y ojos; estudios recientes sugieren una posible actividad genotó-

xica ligada a la formación de metabolitos intermedios reactivos capaces de unirse a macromoléculas, incluyendo el ADN.

Se han demostrado, en animales de laboratorio, efectos teratogénos de sustancias antitiroideas, agentes alquilantes, agentes antifolato, ciertas hormonas, algunas sulfonamidas, ciertos corticoides y algunos insecticidas organofosforados y carbamatos. Las hormonas esteroides pueden afectar al sistema genitourinario; la progesterona y compuestos progestágenos pueden producir masculinización de fetos hembra; compuestos andrógenos y esteroides anabolizantes pueden inducir pseudohermafroditismo femenino. Muchos de los medicamentos antiparasitarios, del grupo de los benzimidazoles, también pueden presentar efectos teratogénos. Dependiendo de la especie animal, los fármacos parabendazol, fenbendazol, albendazol, oxfendazol, cambendazol y febantel pueden ser teratogénos, efecto ligado tanto al compuesto inalterado como a sus metabolitos. Por ejemplo, el parabendazol es teratogénico en ovejas y en ratas, produciendo alteraciones en huesos largos y pelvis. El fenbendazol se metaboliza a fendendazol sulfóxido, metabolito que se puede detectar en la leche de las vacas tratadas, habiéndose demostrado que es teratogénico para la rata y oveja.

Otras prácticas que originan residuos en productos de origen animal incluyen el tratamiento de los alojamientos de los animales con pesticidas, pudiéndose originar una contaminación del agua y/o pienso, lo que conlleva, por ejemplo, a residuos de pesticidas en la leche de vaca (De la Riva y Anadón, 1991). En general, se han encontrado niveles de plaguicidas en alimentos tales como cereales, leche y productos lácteos, huevos, carne, pescado, moluscos, frutas y vegetales, entre otros. Los insecticidas organoclorados merecen particular atención por su persistencia y acumulación en las cadenas alimentarias (De la Riva y Anadón, 1991).

Efectos sobre la flora intestinal

Algunos de los antibióticos usados como promotores del crecimiento y como medicamentos

han planteado riesgos (indirectos) para la salud humana. La ingestión de alimentos con residuos de antibióticos puede conducir a un aumento de la resistencia a las bacterias; esto principalmente puede implicar: (a) transferencia al hombre de la bacteria resistente al antibiótico, vía ingesta de alimentos, y (b) transferencia de factores de resistencia (factor-R) a partir de bacterias resistentes no patógenas a otra bacteria, lo cual conduce a difundir la resistencia (Anadón y Martínez-Larrañaga, 1999a). Es de particular importancia la resistencia observada entre enterococos a los antibióticos glicopéptidos, tales como vancomicina: alto nivel de resistencia mediada por genes *van* en *Enterococcus faecium* y otras especies (Anadón y Martínez-Larrañaga, 1999). Se ha señalado que el uso del compuesto glicopéptido avoparcina, aditivo antimicrobiano promotor del crecimiento para animales, presenta riesgo para la salud humana, ya que este antibiótico induce resistencia (mediada por genes *van*) a otros glicopéptidos usados en medicina humana, tales como los antibióticos vancomicina, teicoplanina y daptomicina; ésta resistencia transferida puede limitar la eficacia de una importante categoría de antibióticos reservados exclusivamente para el tratamiento o la prevención de infecciones graves en el hombre (Anadón y Martínez-Larrañaga, 2000a). Por este motivo se prohibió la avoparcina como aditivo antimicrobiano promotor del crecimiento para animales, en 1997 mediante la Directiva de la Comisión 97/6/CE aduciendo medida precautoria de carácter cautelar, ya que además se identificaron genes de resistencia *bcr* y *bacA*. Posteriormente, se prohibieron otros 4 antibióticos más: bacitracina de zinc, tilosina, espiramicina, y virginiamicina, mediante el Reglamento del Consejo (CE) N.º 2821/98 basado en una propuesta de la Comisión Europea sobre la base del «principio de precaución» (Pugh, 2002) aduciendo que dado que se habían detectado genes de resistencia *erm* para los macrólidos (tilosina y espiramicina), también se pudiera presentar resistencia cruzada en el hombre para los macrólidos eritromicina, azitromicina, claritromicina, entre otros, o bien con lincosamidas y

estreptograminas. Las estreptograminas, como la virginiamicina, pueden presentar resistencias con la pristinamicina (Synercid) de uso humano, ya que se han identificado los genes de resistencia *erm*, *sat*, *vat*, *vga*, *sbh* (Anadón y Martínez-Larrañaga, 1999). Sin duda, hoy en día preocupa el riesgo potencial que se puede originar por el uso terapéutico de compuestos antimicrobianos en los animales de granja o productores de alimentos por su eventual contribución a una presión selectiva sobre los microorganismos del tracto intestinal, y que a su vez pueden conducir a serias implicaciones médicas.

Este hecho ha sido el núcleo de muchos estudios científicos y ha sido debatido en numerosas reuniones y comités científicos (Anadón y Martínez-Larrañaga, 1999, 1999a). El uso de antibióticos en veterinaria y en agricultura puede contribuir a una presión selectiva sobre los microorganismos, a reservorios de resistencia, y a vías de transmisión. En Dinamarca, la muerte de dos pacientes por *Salmonella typhimurium* DT104-resistentes, bacteria adquirida a partir de cerdos infectados ha reavivado el problema de la resistencia por uso de antibióticos en veterinaria (Teuber, 2001). También, en el Reino Unido se ha establecido una relación entre la introducción en el mercado en terapéutica veterinaria de los agentes antimicrobianos fluoroquinolonas y la aparición en medicina humana de una menor susceptibilidad de la *Salmonella typhimurium* DT104 al ciprofloxacino; igualmente se ha demostrado disminución de susceptibilidad de otras *Salmonellas* zoonóticas frente al fármaco ciprofloxacino en EE UU y Dinamarca (WHO, 1998). Asimismo, se ha detectado un aumento de la prevalencia de la bacteria *Campylobacter jejuni* (resistente a las fluoroquinolonas) en músculo e hígado de pollo. Además de la resistencia a quinolonas, se ha observado también resistencia de *Campylobacter* a otros antibióticos, tales como los antibióticos macrólidos. Los animales sirven de reservorios para muchos patógenos transmisibles, tales como *Salmonella* y *Campylobacter*, microorganismos que pueden evidenciar resistencia a fluoroquinolonas y otros antibióticos (Anadón *et al.*, 2002).

Los riesgos para el hombre dependen lógicamente de la frecuencia y grado de exposición a que se ve impuesto por el consumo de alimentos conteniendo residuos inaceptables de antibióticos y por no respetarse el tiempo de retirada establecido del medicamento antes del sacrificio del animal de consumo, tiempo que asegura el cumplimiento de los LMR.

Un factor que puede reducir la ingesta de los residuos de medicamentos es el propio cocinado del alimento, pues este puede disminuir el grado de contaminación. Así, los residuos de sulfonamidas en músculo de pollo disminuyen tras la aplicación de diferentes técnicas de cocinado, siendo la técnica de microondas la más efectiva (Furusawa y Hanabusa, 2002). También es importante señalar en otro contexto que los residuos de antibióticos pueden alterar las fermentaciones propias implicadas en la tecnología de los alimentos.

Finalmente, por otra parte, es conocido cómo en medicina humana dosis terapéuticas de antibióticos también pueden causar efectos adversos sobre la ecología de la microflora intestinal, la cual juega un papel fundamental en el metabolismo no solo de sustratos endógenos como estrógenos, vitaminas, colesterol y ácidos biliares, sino también sobre xenobióticos como fármacos diversos, sobre todo aquellos que sufren circulación enterohepática, y sobre nutrientes.

Investigación de residuos

La Directiva del Consejo 96/23/CE, en su Anexo I, transpuesto literalmente en el Real Decreto 1749/1998, diferencia dos grupos de sustancias, denominados A y B. Grupo A: sustancias con efecto anabolizante y sustancias no autorizadas. Grupo B: sustancias antibacterianas, incluidas las sulfamidas, quinolonas, otros medicamentos veterinarios y contaminantes medioambientales (Tabla 21.3).

En el Anexo II de la Directiva del Consejo 96/23/CE (Real Decreto 1749/1998), se indica el grupo de residuos o sustancias que habrán de

Tabla 21.3. Sustancias del Anexo I, Real Decreto 1749/1998.

Grupo A. Sustancias con efecto anabolizante y sustancias no autorizadas:

- 1) Estilbenos, derivados de los estilbenos, sus sales y ésteres.
- 2) Agentes antitiroideos.
- 3) Esteroides.
- 4) Lactonas del ácido resorcílico (incluido zeranol).
- 5) Beta-agonistas.
- 6) Sustancias del Anexo IV del Reglamento (CEE) No 2377/90, de 26 de junio.

Grupo B. Medicamentos veterinarios (incluidas las sustancias no registradas que podrían utilizarse como medicamentos veterinarios) y contaminantes:

- 1) Sustancias antibacterianas, incluidas sulfamidas y quinolonas.
- 2) Otros medicamentos veterinarios:
 - a) Antihelmínticos.
 - b) Anticoccidiósicos, incluidos los nitroimidazoles.
 - c) Carbamatos y piretroides.
 - d) Tranquilizantes.
 - e) Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).
 - f) Otras sustancias con actividad farmacológica.
- 3) Otras sustancias y contaminantes medioambientales:
 - a) Compuestos organoclorados, incluidos los PCB.
 - b) Compuestos organofosforados.
 - c) Elementos químicos.
 - d) Micotoxinas.
 - e) Colorantes.
 - f) Otros.

detectarse según el tipo de animales, sus piensos y agua de bebida y por tipos de productos animales de origen primario (Tabla 21.4).

De acuerdo con la Directiva 96/23/CE, cada Estado miembro de la UE debe aprobar un plan de control oficial de residuos. Los criterios para el muestreo se especifican en la Directiva y los grupos a analizar incluyen: (a) medicamentos veterinarios, para el control de los LMRs (Tablas 21.5 a 21.13); (b) medicamentos prohibidos, del Anexo IV del Reglamento (CEE) N.º 2377/90; (c) β -agonistas y hormonas prohibidas, para los cuales se sigue el principio de «tolerancia cero», sin LMR establecido; y (d) contami-

Tabla 21.4. Anexo II, Real Decreto 1749/1998.

Grupo de residuos o sustancias que habrán de detectarse según el tipo de animales, sus piensos y agua de bebida y por tipos de productos animales de origen primario							
Tipos de animales y productos animales Grupos de Sustancias (A y B)	Animales de las especies del Real Decreto 147/1993	Aves de corral	Animales de acuicultura	Leche	Huevos	Carne de conejo y de caza de cría. Caza silvestre(*)	Miel
A1	X	X	X			X	
A2	X	X				X	
A3	X	X	X			X	
A4	X	X				X	
A5	X	X	X			X	
A6	X	X	X	X	X	X	
B1	X	X	X	X	X	X	X
B2a	X	X	X	X		X	
B2b	X	X			X	X	
B2c	X	X				X	X
B2d	X						
B2e	X	X		X		X	
B2f							
B3a	X	X	X	X	X	X	X
B3b	X			X			X
B3c	X	X	X	X		X	X
B3d	X	X	X	X			
B3e			X				
B3f							

(*) A la caza silvestre sólo le afectan los elementos químicos. (X, debe detectarse).

nantes medioambientales (metales pesados, pesticidas y micotoxinas).

En principio, cabe apuntar que el uso y administración de todas las sustancias recogidas en el grupo A del Anexo I de la Directiva del Consejo 96/23/CE completada por las Decisiones de la Comisión 97/747/CE y 98/179/CE y del Real Decreto 1749/1998 (su transposición a derecho nacional español), así como aquellas utilizadas

en tratamientos calificados de ilegales por la Directiva del Consejo 96/22/CE (sustancias de efecto hormonal y tireostático y sustancias beta-agonistas) darían lugar, en virtud del riesgo que suponen para la salud de los consumidores, a su automática calificación penal como sustancias nocivas no autorizadas, independientemente de que se detecte o no su residuo a cualquier concentración en el animal de abasto. La Directiva

Tabla 21.5. Lista de agentes antiinfecciosos con LMR.

Anexo I del Reglamento (CEE) N.º 2377/90	
Sulfamidas	Todas las sulfamidas.
Derivados diamino-pirimidina	Baquiloprim, trimetoprim.
Penicilinas	Amoxicilina, ampicilina, benzilpenicilina, cloxacilina, dicloxacilina, nafcilina, oxaciclina, penetamato, fenoximetilpenicilina.
Cefalosporinas	Cefacetilo, cefalexin, cefalonium, cefapirina, cefazolina, cefoperazona, cefquinoma, ceftiefur.
Quinolonas	Danofloxacin, difloxacin, enrofloxacin, flumequina, marblofloxacin, ácido oxolínico, sarafloxacin.
Macrólidos	Acetilsolvaleril-tilosina, eritromicina, espiramicina, tilmicosina, tilosina.
Fenicoles	Florfenicol, tianfenicol.
Tetraciclinas	Clortetraciclina, doxiciclina, oxitetraciclina, tetraciclina.
Naftaleno con anillo ansamicina	Rifaximina.
Pleuromutilinas	Tiamulina, valnemulina.
Lincosamidas	Lincomicina, pirlimicina.
Aminoglicósidos	Apramicina, dihidroestreptomina, gentamicina, kanamicina, neomicina, paromomicina, espectinomina, estreptomina.
Otros antibióticos	Novomicina.
Inhibidores beta-lactamasa	Ácido clavulánico.
Polipéptidos	Bacitracina.
Polimixinas	Colistina.

Tabla 21.6. Lista de Agentes Endoparasitidas con LMR.

Anexo I del Reglamento (CEE) N.º 2377/90	
Salicilanilidas	Closantel, rafoxanida.
Tetrahidroimidazoles	Levamisol.
Benzimidazoles y pro-benzimidazoles	Albendazol, albendazol oxido, febantel, fenbendazol, flubendazol, mebendazol, netobimin, oxfendazol, oxibendazol, tiabendazol, triclabendazol.
Derivados fenol incluyendo salicilanidas	Nitroxinil, oxiclozanida.
Benceno-sulfonamidas	Clorsulon.
Derivados piperazina	Piperazina.

Tabla 21.7. Lista de agentes ectoparasitidas con LMR.

Anexo I del Reglamento (CEE) N.º 2377/90	
Organofosforados	Coumafos, diazinon, foxim.
Formamidinas	Amitraz.
Piretroides	Alfa-cipermetrin, cialotrin, ciflutrin, cipermetrin, deltametrin, flumetrin, permetrin.
Derivados acil-urea	Diflubenzuron, teblufenzuron.
Derivados pirimidinas	Diclanil.
Derivados triazina	Ciromazina.

Tabla 21.8. Lista de agentes endo y ectoparasiticidas con LMR, Anexo I del Reglamento (CEE) N.º 2377/90.

Avermectinas	Avamectina, doramectina, emamectina, eprinomectina, ivermectina, moxidectina
--------------	--

Tabla 21.9. Lista de agentes antiprotozoarios con LMR, Anexo I del Reglamento (CEE) N.º 2377/90.

Derivados traizino-triona	Toltrazuril,
Derivados Quinazolona	Halofuginona
Carbanilidas	Imidocarb

Tabla 21.10. Lista de agentes que actúan sobre el sistema nervioso con LMR, Anexo I del Reglamento (CEE) N.º 2377/90.

Tranquilizantes butirofenona	Azaperona
Antiadrenérgicos	Carazolol
Agentes β 2-simpaticomiméticos	Clenbuterol clorhidrato

Tabla 21.11. Lista de agentes antiinflamatorios AINE con LMR, Anexo I del Reglamento (CEE) N.º 2377/90.

Derivados ácido arilpropiónico	Carprofeno, vedaprofeno
Derivados grupo fenamato	Flunixin, ácido tolfenámico
Derivados oxicam	Meloxicam
Derivados pirazolona	Metamizol
Derivados ácido fenilacético	Diclofenac

Tabla 21.12. Lista de agentes antiinflamatorios corticoides con LMR, Anexo I del Reglamento (CEE) N.º 2377/90.

Glucocorticoides	Betametasona, dexametasona, metilprednisolona, prednisolona
------------------	---

Tabla 21.13. Lista de agentes que actúan sobre el sistema reproductor con LMR, Anexo I del Reglamento (CEE) N.º 2377/90.

Progestágenos	Clormadinona, flugestona acetato
---------------	----------------------------------

96/22/CE, así como el Real Decreto 1749/1988, prohíben utilizar determinadas sustancias con efecto hormonal (estilbenos) y tireostático, y beta-agonistas para la cría del ganado, y prevén controles sobre inspecciones y planes anuales que se establecerán por los Estados miembros con un porcentaje mínimo de muestreo y con la responsabilidad de la destrucción del lote de animales en casos positivos. En definitiva, el Real Decreto 1749/1998 pretende: (a) hacer que los productores y todas aquellas personas que intervengan en el sector ganadero asuman una mayor responsabilidad en lo que respecta a la inocuidad de cualquier producto de origen animal de su propiedad que se despache al consumo humano; (b) se cree un órgano de coordinación de la ejecución de las investigaciones de las sustancias y de sus residuos, en el territorio nacional; (c) se regule la metodología de la recogida de muestras como los aspectos relativos al procedimiento administrativo y a las infracciones y sanciones aplicables en caso de incumplimiento; (d) se regulen aspectos relacionados con el control de determinadas sustancias y sus residuos, como normativa básica estatal y disposiciones aplicables a las importaciones de terceros países.

Los terceros países que desean exportar productos alimenticios a la UE deben someter un Plan de Residuos a la Comisión Europea (CE) para su evaluación y aprobación (Decisión 2003/702/CEE). Las autoridades nacionales deben poder demostrar que su legislación sobre el uso de medicamentos veterinarios es eficaz, en particular en lo referente a la prohibición o autorización de sustancias, su distribución y venta, y las reglas que cubren la administración e inspección y que existe un programa aceptable para detectar ciertas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos derivados; la garantía debe tener un efecto al menos equivalente al que proporciona la Directiva 96/23/CE.

Controles sobre la disponibilidad y uso de medicamentos veterinarios

Los controles eficaces sobre la distribución y uso de medicamentos veterinarios constituyen

un requisito implícito en los programas de control de residuos para los Estados miembros de la UE (Art.º 7, Directiva 96/23/CE) y los terceros países que implementan el *Codex* sobre la base de un sistema de monitorización de residuos. Las autoridades competentes de la UE deben estar dispuestas a demostrar que el sistema de control empleado para los medicamentos veterinarios es capaz de reducir la incidencia de residuos de sustancias ilegales en alimentos derivados de los animales. La Ley Alimentaria de la UE (Reglamento (CE) N.º 178/2002) enfatiza sobre la responsabilidad de los productores de alimentos y requiere que ellos mismos realicen su propio control sobre la seguridad de sus productos. En la UE, los resultados obtenidos a partir de la implementación de los planes nacionales de investigación de residuos en los Estados miembros se someten cada año a la Comisión Europea junto con los planes de investigación de residuos para el siguiente año; un resumen de estos resultados se publica en la página Web de la Dirección General SANCO de la CE. Además, la CE ha creado «un sistema de alerta rápido para alimentos y piensos» o «Rapid Alert System for Food and Feed» (RASFF) para proporcionar a las autoridades de control una herramienta eficaz en el intercambio de información sobre las medidas tomadas para asegurar la seguridad alimentaria. Siempre que un miembro de la red tiene cualquier información relacionada con la existencia de un serio riesgo directo o indirecto para la salud humana, esta información es inmediatamente notificada a la Comisión bajo la RASFF. La Comisión inmediatamente transmite esta información a los miembros de la red. El informe anual sobre el funcionamiento del RASFF en 2003 proporciona información sobre el número de notificaciones, su origen, países implicados, productos y riesgo identificado; con respecto a los residuos de medicamentos veterinarios en el 2003 se han notificado residuos de cloranfenicol, nitrofuranos y sus metabolitos, y de verde malaquita, entre otros en diferentes categorías de productos.

Por otra parte, hay que destacar que es conocido que la implementación de un sistema de

prescripción no es un requisito para la eficacia de un control de medicamentos, pero en casi todos los países que no son de la UE se reconoce el concepto de la prescripción veterinaria. El alcance de tales prescripciones (es decir, se cubren ciertas categorías de medicamentos) difiere ampliamente entre países.

En algunos países, los ganaderos no tienen dificultad para acceder a un amplio rango de medicamentos sin que sea necesaria la prescripción; en tales casos, la capacidad de las autoridades competentes para promover el uso responsable (posología correcta, observación del tiempo de espera antes del sacrificio) puede ser difícil. En algunos casos, la ausencia de información en el material de acondicionamiento (posología, indicación por especie animal, periodo de espera) que se requiere por la Legislación Comunitaria (Directiva 2001/82/CE) tiene el potencial para suprimir las garantías de exportación por los terceros países, especialmente acrecentado cuando no existe un ensayo de residuos para las sustancias en cuestión.

El archivo de los registros de información de medicamentos en las granjas es un área en el que se observa una considerable variación. Aunque es requerido por la legislación comunitaria y como consecuencia un requerimiento de equivalencia para terceros países, la custodia de tales registros de información, a menudo varía entre países y es dependiente del tipo de granja implicada.

Sustancias prohibidas y no autorizadas en la UE

Las sustancias expresamente prohibidas en la UE para uso en animales productores de alimentos pueden clasificarse en diferentes categorías:

1) *Hormonas (anabólicas) y betaagonistas que se usen con fines de promoción del crecimiento.* Tal uso está prohibido en la UE y por lo tanto la carne procedente de animales así tratados no puede importarse en la UE (Art.º 11, Directiva 96/22/CE). Los terceros países buscan la exportación de carne a la UE, pero deben tener un sistema de separación según el cual

ellos pueden garantizar que solo la carne procedente de animales no tratados es exportada, o una prohibición sobre el uso de tales sustancias de acuerdo con la legislación de la UE. En el caso de las sustancias clasificadas en el Anexo IV del Reglamento (CEE) N.º 2377/90 (nitrofuranos incluyendo furazolidona, ronidazol, dapsona, cloranfenicol, dimetridazol, colchicina, clorpromacina, cloroformo, metronidazol, *Aristolochia spp.* y sus preparaciones), estas sustancias están prohibidas para uso en animales productores de alimentos en la UE debido a que los residuos implicados de estas sustancias, cualquier nivel, en los alimentos de origen animal constituye un peligro o riesgo para la salud del consumidor (Art.º 5, Reglamento (CEE) N.º 2377/90); es decir una tolerancia cero para estas sustancias. De acuerdo con el Art.º 20(b) de la Directiva 72/462/CEE y el Art.º 22 de la Directiva del Consejo 97/78/CE, la Comisión y/o los Estados miembros pueden específicamente prohibir la importación de alimentos a partir de terceros países donde estas sustancias han sido usadas en animales destinados para la exportación a la UE sobre la base de la detección de residuos inaceptables.

2) *Antibióticos aditivos promotores del crecimiento.* Sustancias prohibidas en la UE para la alimentación animal referentes a varios aditivos promotores del crecimiento, sustancias que han sido específicamente prohibidas para uso en animales productores de alimentos en la UE debido a que existen preocupaciones acerca de la transferencia de resistencia de antibióticos a humanos. La UE ha retirado la avoparcina, bacitracina de zinc, tilosina, espiramicina, y virginiamicina o se cuestiona el perfil de seguridad de ciertos compuestos factores de crecimiento tales como carbadox y olaquinox (Reglamento (CE) N.º 2821/98 y Reglamento (CE) N.º 2788/98). Los alimentos procedentes de estos animales así tratados pueden contener residuos de esas sustancias o bacterias resistentes. Es difícil para un tercer país ofrecer garantías equivalentes a las que se dan en los países que cumplen la Legislación Comunitaria (Directiva del Consejo 96/23/CE),

pues muchos de ellos no poseen programas de monitorización de residuos para estas sustancias (Decisión 2003/702/CE).

3) *Sustancias que no han sido incluidas en los Anexos I, II y III del Reglamento del Consejo (CEE) N.º 2377/90 (es decir, no tienen LMR) son de facto prohibidos en la UE para uso en animales productores de alimentos.* Estas incluyen: (a) medicamentos veterinarios que contienen principios activos que no están autorizados para uso en otras especies de animales productores de alimentos (por ejemplo, tianfenicol, con un LMR para bovino, pero no para ovino); (b) medicamentos veterinarios conteniendo principios activos que no tienen LMR y no están por lo tanto autorizadas en especies de animales productores de alimentos (por ejemplo, fenilbutazona); y (c) sustancias que nunca han sido autorizadas como medicamentos veterinarios, no tienen LMR, pero han sido usadas como medicamentos (por ejemplo, verde malaquita en acuicultura).

Bibliografía

- Anadón A, Martínez-Larrañaga MR (1990). Facteurs affectant la toxicité des ionophores anticoccidiens chez la volaille. *Revue Médec Vétérinaire* 141 (1) : 17-24.
- Anadón A, Martínez-Larrañaga MR, Díaz MJ, Velez C, Bringas P (1990a). Pharmacokinetics and residue studies of quinolone compounds and olaquinox in poultry. *Annales Recher Vétérinaires* 21, suppl. 1, 137s-144s.
- Anadón A, Bringas P, Martínez-Larrañaga MR, Díaz MJ (1994). Bioavailability, pharmacokinetics and residues of chloramphenicol in the chicken. *J Veter Pharmacol Therap* 17 (1): 52-58.
- Anadón A, Martínez-Larrañaga MR (1999). Residues of antimicrobial drugs and feed additives in animal products: Regulatory aspects. *Livestock Production Science* 59 (2-3): 183-198.
- Anadón A, Martínez-Larrañaga MR (1999a). Current situation and future perspectives of the use of antibiotics as growth promoters. *Cahiers Options Méditerranéennes (CIHEAM)* 37: 65-76.

- Anadón A, Reeve-Johnson L (1999a). Macrolide antibiotics, drug interactions and microsomal enzymes: implications for veterinary medicine. *Res Veter Science* 66 (3): 197-203.
- Anadón A, Martínez-Larrañaga MR, Martínez MA (1999c). Residuos de medicamentos veterinarios en alimentos de origen animal (I). *Industria Farmacéutica XIV* (1), 113-118.
- Anadón A, Martínez-Larrañaga MR, Martínez MA (1999c). Residuos de medicamentos veterinarios en alimentos de origen animal (y II). *Industria Farmacéutica XIV* (2), 111-120.
- Anadón A., Díaz P., Martínez-Larrañaga M. R. (2000) Contaminación de materias primas destinadas a la alimentación animal y sus consecuencias en la salud del consumidor. *Nuestra Cabaña* Noviembre-Diciembre, 35-46.
- Anadón A, Martínez-Larrañaga MR (2000a). The use of drugs in rabbit meat production. Benefits and risks. *World Rabbit Science* 8 (Suppl. 1): 167B-185B.
- Anadón A, Frejo MT, Martínez-Larrañaga MR, Díaz MJ, Martínez MA (2000b). *Aditivos en la Alimentación Animal. Compendio Reglamentario*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Secretaría General de Agricultura y Alimentación, Dirección General de Ganadería, Madrid. pp. 1-219.
- Anadón A, Martínez-Larrañaga MR, Iturbe I, Martínez MA, Díaz MJ, Frejo (2001). Pharmacokinetic and residues of ciprofloxacin and its metabolites in broiler chickens. *Res Veter Science* 71:101-109.
- Anadón A, Martínez-Larrañaga MR, Díaz MJ, Martínez MA, Frejo MT, Martínez M *et al.* (2002). Pharmacokinetic characteristics and tissue residues for marbofloxacin and its metabolite N-desmethyl-marbofloxacin in broiler chickens. *American J Veter Res* 63 (7): 927- 933.
- Antignac JP, Marchand P, Le Bizec B, Andre F (2002). Identification of ractopamine residues in tissue and urine samples at ultra-trace level using liquid chromatography-positive electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatography B* 774: 59-66.
- Botsoglou NA, Fletuvris DJ (2001). *Drug residues in foods. Pharmacology, food safety, and analysis*. New York, Marcel Dekker.
- Camean AM, Repetto M (1995). Estado actual de la toxicología alimentaria. En: Repetto M *et al.* (eds.) *Toxicología avanzada*. Díaz de Santos, Madrid.
- Comisión de las Comunidades Europeas. *Libro Blanco sobre Seguridad Alimentaria*. COM (1999) 719 final.
- Council Directive 72/462/EEC of 12 December 1972 on health and veterinary inspection problems upon importation of bovine animals and swine and fresh meat from third countries.
- Council Directive 97/78/EC of 18 December 1997 laying down the principles governing the organisation of veterinary checks on products entering the Community from third countries.
- Commission Decision 2003/702/EC on the provisional approval of residue plans of third countries according to Council Directive 96/23/EC.
- Commission Regulation (EC) No 2788/98 of 22 December 1998 amending Council Directive 70/524/EEC concerning additives in feedstuffs as regards the withdrawal of authorisation for certain growth promoters.
- Council Regulation (EEC) No 2377/90 of 26 June 1990 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin.
- Council Regulation (EC) No 2821/98 of 17 December 1998 amending, as regards withdrawal of the authorisation of certain antibiotics, Directive 70/524/EEC concerning additives in feedstuffs.
- De la Riva C, Anadón A (1991). Organochloride pesticides in cow's milk from agricultural region of northwestern Spain. *Bull Environment Contam Toxicol* 46 (4): 527-533.
- Deshpande SS (2002). *Handbook of food toxicology*. Marcel Dekker, New York.
- Deshpande SS, Salunkhe DK (1995). Incidental food additives. En: Maga JA, Tu AT (eds.). *Food additive toxicology*. Marcel Dekker, New York.
- Díaz P, Anadón A (2000). Residuos de sustancias con actividad biológica en alimentos de origen animal y responsabilidad legal (1.ª Parte). *Eurocarne* 83, 83-94.
- Díaz P, Anadón A (2000a). Residuos de sustancias con actividad biológica en alimentos de origen animal y responsabilidad legal (2ª Parte). *Eurocarne* 84, 35-46.
- Directiva del Consejo 96/22/CE, de 29 de abril de 1996, por la que se prohíbe utilizar determinadas sustancias de efecto hormonal y tireostático y sustancias beta-agonistas en la cría del ganado y por la que se derogan las Directivas 81/602/CEE, 88/146/CEE y 88/299/CEE.

- Directiva del Consejo 96/23/CE, de 29 de abril de 1996, relativa a las medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos y por la que se derogan las Directivas 85/358/CEE y 86/469/CEE y las Decisiones 89/187/CEE y 91/664/CEE.
- Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 6 de noviembre de 2001 por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos veterinarios.
- Directiva 2004/28/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 31 de marzo de 2004 por el que se establece un código comunitario sobre medicamentos veterinarios.
- Engeli B (2003). Regulation of veterinary drug residues in foodstuffs of animal origin, special case nitrofurans. *Mitteilungen aus Lebensmittel und Hygiene* 94: 527-533.
- FAO/WHO (1984) Residues of veterinary drugs in foods. Expert Committee Report. Food and Agriculture Organization/World Health Organization, Rome, Oct 29-Nov 5.
- Furusawa N, Hanabusa R(2002). Cooking effects on sulfonamide residues in chicken thigh muscle. *Food Res Intern* 35: 37-42.
- Hoogenboom LAP, van Bruchem GD, Sonne K, Enninga IC, van Rhijn JA, Heskamp H *et al.* (2002). Absorption of a mutagenic metabolite released from protein-bound residues of furazolidone. *Environm Toxicol Pharmacol* 11: 273-287.
- JECFA (2003) Risk assessment policy for recommending maximum residue limits for veterinary drugs in food. Geneva, February 2003.
- Kennedy DG, Young PB, McCracken RJ (2003). Analysis of veterinary drug residues in food: The nitrofurans issue. *Mitteilungen aus Lebensmittel und Hygiene* 94: 510-526.
- Libro Blanco de la Comisión Europea sobre Seguridad Alimentaria* (DOC/00/1 COM/99/719) adoptado el 12 de enero de 2000.
- Martínez-Larrañaga MR, Anadón A, Martínez MA, Díaz MJ, Frejo MT, Castellano VJ *et al.* (2004). Pharmacokinetics of amoxicillin and the rate of depletion of its residues in pigs. *Veter Record* 154 (20): 627-632.
- Pugh DM (2002). The EU precautionary bans of animal feed additive antibiotics. *Toxicol Letters* 128: 35-44.
- Real Decreto 1749/1998, de 31 de julio, por el que se establecen las medidas de control aplicables a determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos.
- Reglamento (CE) N.º 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre, sobre los aditivos en la alimentación animal.
- Regulation (EC) N.º 178/2002 of the European Parliament and the Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and Laying down procedures in matters of food safety.
- Rico AG (1988). *Drug residues in animals*. London, Academic Press.
- Teuber M (2001). Veterinary use and antibiotic resistance. *Current Op Microbiol* 4: 493-499.
- WHO (1998) Use of quinolones in food animals and potential impact, *Report of a WHO Meeting*, World Health Organization, Geneva.
- WHO (1998) The medical impact of the use of antimicrobials in food animals, *Report of a WHO Meeting*, World Health Organization, Berlin.
- WHO (2002). Evaluation of certain veterinary drug residues in food. Fifty-eighth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *WHO Technical Report Series No. 911*.
- Woodward KN (1992) Use and regulation of veterinary drugs. En: Xenobiotics and food-producing animals: Metabolism and Residues, *ACS Symposium Series 503*, American Chemical Society, Washington, pp. 2-16.

RIESGOS TÓXICOS POR CONSUMO DE ANIMALES DE CAZA

Antonio Juan García-Fernández, Francisco Soler

La actividad cinegética y la seguridad alimentaria. Normativa sobre carnes de caza y seguridad alimentaria. Metales pesados en mamíferos de interés cinegético. El plomo en las aves de caza destinadas a consumo. Contaminantes orgánicos en la carne de caza. Bibliografía.

La actividad cinegética y la seguridad alimentaria

La Península Ibérica disfruta de un clima diverso, con gran variedad de hábitat naturales y variedad de fauna y flora que ha favorecido la práctica de la actividad cinegética, llegando a integrarse en nuestra historia, cultura y tradiciones.

Buena parte del territorio español está dedicado a la actividad cinegética, siendo Castilla-La Mancha, Andalucía y Extremadura las principales comunidades autónomas con terrenos dedicados prácticamente en exclusiva a la caza mayor.

Existe una gran variedad de especies animales de interés cinegético y la importancia de cada una fluctúa en términos temporales por diversas causas, habiéndose incrementado en los últimos años la importancia del jabalí y venado, creando a veces auténticos conflictos

con la agricultura y ganadería, mientras que ha disminuido la del conejo (mixomatosis, enfermedad vírica hemorrágica). En la Tabla 22.1 aparecen las principales especies de interés cinegético y la estimación del número de piezas cobradas por temporada, con visión clara de la evolución experimentada en los últimos tiempos. Son sin duda alguna el ciervo y el jabalí las principales especies de caza mayor en toda España, destacando como especies de caza menor el conejo y la perdiz roja, seguida a mucha distancia por la liebre y las aves migratorias (palomas, codornices, tórtola y zorzales) y las acuáticas (migratorias o sedentarias).

Esta actividad cinegética genera una importante cantidad de carne de caza que tiene cada vez mayor importancia en la dieta de los españoles. Si bien fundamentalmente se relaciona con un consumo estacional, este hecho está cambiando debido a diversos factores entre los que se encuentra el que esta carne es considerada como de elevado valor nutritivo (poca grasa, rica en proteínas de alto valor biológico) ade-

Tabla 22.1. Principales especies cinegéticas de interés bromatológico y estimación del número de piezas cobradas por temporada (Fuente: *Anuarios de Estadística Agraria* del MAPA).

Especie	Año			
	1985	1986	2000	2001
Ciervo (<i>Cervus elaphus</i>)	19.993	17.992	42.947	70.459
Jabalí (<i>Sus scrofa</i>)	32.768	35.499	113.352	131.277
Otra caza mayor: corzo (<i>Capreolus capreolus</i>), cabra montés (<i>Capra pyrenaica victoriae</i>), rebeco o sarrío (<i>Rupicapra rupicapra</i>), gamo (<i>Dama dama</i>), muflón (<i>Ovis ammon musimon</i>), arruí (<i>Ammotragus lervia</i>)	4.284	3.839	21.486	23.165
Liebre (<i>Lepus capensis</i>)	727.887	920.682	1.287.907	1.347.109
Conejo (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	10.130.584	10.272.755	4.320.562	4.366.344
Otra caza menor (mamíferos)	55.525	58.192	103.452	118.496
Perdiz (<i>Alectoris rufa</i>)	4.349.472	4.223.345	3.336.378	3.279.557
Codorniz (<i>Coturnix coturnix</i>)	1.100.943	1.159.469	1.402.234	1.376.321
Otra caza volátil: paloma torcaz (<i>Columba palumbus</i>), tórtola (<i>Streptopelia turtur</i>), zorzales (<i>Turdus philomelos</i> y <i>T. viscivorus</i>), ánade real (<i>Anas platyrhynchos</i>), pato colorado (<i>Netta rufina</i>), ánade friso (<i>Anas strepera</i>), porrón común (<i>Aythya ferina</i>), cerceta común (<i>Anas crecca</i>), pato cuchara (<i>Anas clypeata</i>), ánade silbón (<i>Anas penélope</i>), ánade rabudo (<i>Anas acuta</i>)	10.344.757	5.681.718	6.751.734	7.248.054

más de alimento «natural», existiendo una demanda social de productos seguros y naturales. La carne de caza carece de residuos de hormonas, antibióticos y otros fármacos que sí son usados, algunos de forma fraudulenta, en los animales de abasto para favorecer la producción, pero que tienen el inconveniente del riesgo tóxico de sus residuos (inseguridad alimentaria). Otros factores del cambio son la importante inversión de algunas empresas del sector, la publicidad, la obtención de derivados como patés, embutidos, etc, la especialización de algunos restaurantes en la preparación de este tipo de carnes lo que sirve de atracción turística, y el aumento del montante total en kg de carne de caza como consecuencia del aumento de las estructuras y explotaciones cinegéticas (Melchor, 2003).

Sin embargo, no todas las carnes de caza presentan unas características adecuadas para su consumo, sobre todo si tenemos en cuenta que son abatidas en pleno campo, en ocasiones con temperaturas elevadas, y con condiciones muy poco higiénicas, lo que facilita la contaminación microbiana. A esto hay que añadir el ries-

go que supone el consumo de animales sobre los que no se ha realizado un control sanitario durante su vida al estar fuera de los programas de sanidad animal y de protección de zoonosis. Esto ha hecho que tradicionalmente los riesgos para la salud pública que más se han estudiado en relación al consumo de especies cinegéticas son los enfocados a las zoonosis, particularmente de importantes enfermedades como la brucelosis, tuberculosis, salmonelosis, sarna, triquinosis, etc. (Ahl *et al.*, 2002; Fletcher, 1997; Lecocq, 1997).

Al igual que las especies animales domésticas, las especies silvestres sirven como importante fuente en la evaluación de los riesgos medioambientales para el hombre, ya que comparten ese medio ambiente con él (Dorn y Miller, 1987). Es habitual el uso de diversas especies animales silvestres como bioindicadores de contaminación ambiental. Varias de esas especies son de interés cinegético por lo que forman parte de la cadena alimenticia humana, pudiendo constituir una vía de ingreso de contaminantes ambientales en el organismo humano. Sin embargo, la mayoría de los artículos científicos

relativos a la presencia de contaminantes ambientales en especies cinegéticas comestibles hacen referencia a su papel como bioindicador (Helle, 1989) y proporcionalmente son muy pocos los estudios que hacen hincapié en la significación de esa contaminación con respecto a la salud pública.

Todos estos riesgos imponen el que la carne de caza tenga que ser sometida a un control sanitario pertinente por parte de los servicios veterinarios en cumplimiento de la normativa adecuada, siendo de especial interés el destacar el grave peligro que puede suponer la carne proveniente de la caza ilegal (furtivismo) que puede ser fatal para la salud humana.

Los principales elementos contaminantes encontrados en especies cinegéticas son claramente dos: los metales y los compuestos orgánicos clorados, que son los que van a plantear los principales problemas medioambientales por su alta persistencia en el medio. La presencia de contaminantes en tejidos, y a concentraciones superiores a los valores límite, se ha llegado a encontrar incluso hasta en el 29% de los muestreos realizados en especies cinegéticas, siendo las más afectadas las pequeñas especies de caza de pluma, seguido por los ungulados y en menor medida las pequeñas especies de caza de pelo (Rajzák *et al.*, 2001).

Normativa sobre carnes de caza y seguridad alimentaria

No existe normativa europea alguna que contemple de forma concreta y clara las actuaciones, restricciones o controles en materia de residuos o contaminantes en las carnes de caza silvestre. Existe una normativa, escasa, sobre las carnes de caza, incluida la silvestre, donde como veremos las menciones al control de residuos o contaminantes son ambiguas y poco concretas. Por otro lado, existe una normativa específica sobre la presencia de contaminantes en produc-

tos alimenticios, pero que sin embargo no explicita la carne de caza silvestre. A continuación abordaremos primero la normativa europea específicamente dedicada a la carne de caza silvestre y posteriormente la normativa sobre contaminantes en productos alimenticios.

1. Normativa sobre carnes de caza

La Directiva 92/45/CEE del Consejo, de 16 de junio de 1992 aborda los problemas sanitarios y de policía sanitaria relativos a la caza de animales silvestres y a la comercialización de la carne de estos animales. En ella se especifica lo que se entiende por «caza silvestre» a efectos legislativos, definiéndola como los *mamíferos terrestres silvestres de caza (incluidos los mamíferos silvestres que viven en territorios cerrados y en condiciones de libertad similares a las de los animales de caza silvestres)*, y *las aves de caza silvestres*. En la misma definición excluye de este grupo de animales a aquellos «*que no estén incluidos en el artículo 2 de la Directiva 91/495/CEE del Consejo, de 27 de noviembre de 1990*», la cual se dedica a la carne de conejo y de caza de cría, que define como los mamíferos terrestres y aves silvestres que se reproducen, crían y se sacrifican en cautividad. Así pues, para el capítulo que nos ocupa será de aplicación lo regulado en la Directiva 92/45/CEE. La Directiva define también «caza mayor» (mamíferos silvestres del orden de los ungulados), «caza menor» (mamíferos silvestres de la familia de lepóridos y las aves de caza silvestres destinados al consumo humano) y «carne de caza silvestre» (todas las partes de la caza silvestre que sean aptas para el consumo humano). La Directiva hace alguna que otra referencia a sustancias químicas, residuos o contaminantes, pero de forma ambigua o muy generalista. Así, en el apartado 2 del artículo 3 se señala que el veterinario oficial, durante su inspección, velará para que la carne de caza silvestre sea excluida para el consumo humano cuando *proceda de animales que hayan ingerido sustancias que puedan convertir la carne en peligrosa o nociva para la salud humana*. Igualmente, en el artícu-

lo 11 hace referencia a que deberán realizarse muestreos para controlar la presencia de contaminantes del medio ambiente, siendo responsabilidad de los Estados miembros velar para que queden excluidas de los intercambios las piezas que procedan de territorios que hayan sido puestos en entredicho por el control. Por último, esta Directiva, en el capítulo V del anexo I dedicado a la inspección sanitaria postmortem, establece que el veterinario oficial, entre otras cosas, deberá efectuar *un análisis de los residuos por muestreo, en particular cuando exista una sospecha fundada* (apartado d). Finalmente, en el mismo capítulo, en el apartado e, obliga a efectuar la detección de *la presencia de cuerpos extraños en las cavidades corporales, especialmente dentro del estómago o de los intestinos...* Esto, como se verá más adelante, tiene su particular interés en el problema del plumbismo en las aves acuáticas silvestres que ingieren perdigones de plomo.

La Decisión 97/468/CE de la Comisión establece las listas provisionales de establecimientos de los terceros países a partir de los cuales los Estados miembros podrán autorizar importaciones de carne de caza silvestre. Esta lista figura en el Anexo (Tabla 22.2), quedando sujetas estas importaciones a las demás disposiciones comunitarias adoptadas en el ámbito veterinario.

Posteriormente, por Decisión de la Comisión 2000/585/CE, de 7 de septiembre de 2000, se establecen las condiciones zoonositarias y de sanidad pública, así como la certificación veterinaria aplicables a la importación de carne de caza silvestre, carne de caza de cría y carne de conejo procedente de terceros países. En esta decisión se derogan las anteriores decisiones 97/217/CE, 97/218/CE, 97/219/CE y 97/220/CE que hacían referencia a las mismas condiciones y certificaciones de cada tipo de especie por separado. La Decisión vigente en su artículo 1 define «aves de caza de cría» incluyendo en ella a codornices, palomas, faisanes, perdices y todas las demás aves de caza, quedando excluidos los gallos, gallinas, pavos, pintadas, patos, ocas y rátidas. En el artículo 2 incluye una relación de tipos de importaciones de carne fresca que podrán autorizar los Estados miembros. Resulta interesante observar que toda referencia a carne de caza silvestre es autorizada siempre y cuando se hayan eliminado los despojos (vísceras), mientras que para la carne de caza de cría, es decir, los mismos animales pero criados en cautividad, se permite la importación de todas las partes del animal, incluidos los despojos.

De particular interés para el capítulo que nos ocupa es la Decisión de la Comisión 2004/212/CE, de 6 de enero de 2004, relativa a las condiciones sanitarias comunitarias aplicables a

Tabla 22.2. Lista de países y número de establecimientos a los que los Estados miembros pueden autorizar importaciones de caza silvestre según Decisión de la Comisión 96/468/CE.

País	N.º establecimientos	Tipo caza	País	N.º establecimientos	Tipo caza
Argentina ¹	18	a, b	Letonia	1	a
Australia	6	a, b	Lituania	1	a
Bulgaria	4	a, b	Namibia ¹	1	a ²
Canadá	1	a	N. Zelanda	10	a
Chile	2	b	Polonia	24	a
Eslovaquia	4	a, c	Rumania	5	a, b, c
Eslovenia	2	a, b, c	Sudáfrica ¹	1	a
Estonia	1	a ²	Túnez	1	c
Groenlandia	1	a	USA	1	a
Hungría	6	a, b, c	Uruguay	1	b

a = caza mayor; b = lepóridos; c = aves silvestres.

¹ Únicamente carne deshuesada y sin despojos

² Excluida la carne de jabalí

las importaciones de animales y carne fresca, incluida la carne picada, procedentes de terceros países, y por la que se modifican entre otras la que acabamos de comentar en el apartado anterior (Decisión 2000/585/CE). Concretamente, la modificación afecta a la carne procedente de biungulados de caza, tanto silvestres como de granja, y de équidos. La Comisión (apartado 10) considera que esta carne deberá someterse a los mismos criterios en lo referente a enfermedades veterinarias y zoonosis que la carne fresca de animales domésticos de las especies bovinas, porcina, equina, ovina y caprina. Como veremos más adelante, esta equiparación que establece la Comisión entre los controles a efectuar entre silvestres y domésticos nos permitirá asumir la aplicación del Reglamento 466/2001 sobre el contenido máximo de contaminantes en productos alimenticios aunque expresamente no mencione a la carne de caza silvestre.

2. Normativa sobre contaminantes presentes en productos alimenticios

El particular circuito de comercialización de la carne de caza silvestre, junto con las dificultades de un control alimentario riguroso pueden ser consideradas causas suficientes para explicar la carencia de información en materia de residuos de contaminantes en estas carnes. Para estos animales, las legislaciones española y europea no establecen límites concretos de contaminantes a partir de los cuales considerarlos no aptos para consumo. Esta carencia legislativa es otra de las causas que, con mucha probabilidad, ha impedido el que desde las administraciones se realizaran, con la suficiente frecuencia, los seguimientos y controles oportunos para conocer el estado de las carnes de caza silvestre en términos de seguridad alimentaria.

El Reglamento CEE 315/93 del Consejo, de 8 de febrero de 1993, por el que se establecen procedimientos comunitarios en relación con los contaminantes presentes en los productos alimenticios, incluye entre sus considerandos, tres que nos parecen relevantes:

1. En interés de la salud pública, los contenidos de contaminantes deben mantenerse en niveles aceptables desde el punto de vista toxicológico.
2. Deberán aplicarse restricciones más limitativas siempre que sean compatibles con las prácticas profesionales correctas.
3. Conviene, en lo que a la protección de la salud se refiere, dar prioridad a un planteamiento general de la cuestión de los contaminantes en la alimentación.

Particularmente este último considerando es el que nos permite asumir lo que para animales de abasto hay regulado de aplicación para las carnes de caza silvestre.

El Reglamento CEE 315/93, en su artículo 1, define «contaminante» como *cualquier sustancia que no haya sido agregada intencionadamente al alimento en cuestión, pero que sin embargo se encuentra en el mismo como residuo de la producción (incluidos los tratamientos administrados a los cultivos y al ganado y en la práctica de la medicina veterinaria), de la fabricación, transformación, preparación, tratamiento, acondicionamiento, empaquetado, transporte o almacenamiento de dicho alimento o como consecuencia de contaminación ambiental*. En el artículo 2, deja claramente establecido que no se podrán comercializar productos alimenticios que contengan contaminantes en proporciones inaceptables respecto de la salud pública y en particular desde el punto de vista toxicológico; para ello establece también que, en una lista comunitaria, se fijarán límites tolerados de las sustancias en distintos productos alimenticios, así como los límites de detección analíticos y la referencia a los métodos de muestreo y de análisis. Una modificación reciente del Reglamento establece que estos límites máximos serán establecidos previo asesoramiento por el Comité Permanente de la Cadena Alimentaria y de Sanidad Animal (Reglamento CE 1882/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de septiembre de 2003).

El Reglamento CE 466/2001, de 8 de marzo de 2001, por el que se fija el contenido

máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios hace tan solo referencia a la carne y vísceras cuando aborda los límites máximos autorizados de cadmio y plomo. Con esta normativa se consigue disponer de herramientas de control de seguridad alimentaria para los animales de abasto (vacas, ovejas, cerdos, aves de corral, etc.) que entran dentro de los circuitos de comercialización e inspección habituales, lo cual a su vez facilita la recopilación de interesante información que posteriormente servirá para adoptar nuevas medidas de producción y de protección de la salud. En este sentido se expresa la Comisión de las Comunidades Europeas en el Reglamento citado anteriormente, donde el apartado 3 de la introducción señala textualmente: *«En interés de la salud pública, resulta esencial mantener el contenido de contaminantes en niveles aceptables desde el punto de vista toxicológico. Siempre que sea posible, la presencia de contaminantes debe reducirse cuidadosamente mediante buenas prácticas agrícolas o de producción, con el fin de alcanzar un nivel más alto de protección de la salud, especialmente para los grupos más sensibles de la población»*. Una modificación posterior, concretamente el Reglamento CE 2375/2001 de 29 de noviembre de 2001, incluye una sección más dedicada a la dioxina como suma de policlorodibenzo-para-dioxinas (PCDD) y policlorodibenzofuranos (PCDF). Ninguna otra normativa europea específica ha sido publicada sobre niveles máximos tolerados en carnes y vísceras. A continuación comentaremos ambos reglamentos.

2.1. Metales pesados

El Reglamento CE 466/2001 nace de la necesidad de unificar criterios en todos los países miembros; sin embargo, para España, a diferencia de otros países de la UE, este será el primer texto legislativo que marca un nivel máximo de metales para carnes y productos animales, ya que hasta la fecha las referencias legislativas eran ambiguas. En los apartados 18 y 19 de la introducción hace mención expresa a los motivos que han llevado a incluir en este Reglamento

al plomo y al cadmio, respectivamente. En ambos casos hace alusión a que los contenidos máximos (Tabla 22.3) siempre habrán de ser lo más bajos posibles y no descarta seguir bajándolos debido a la toxicidad de los compuestos de ambos elementos. De hecho, el artículo 5 del Reglamento señala que la Comisión, a partir de nuevos datos científicos y de los resultados obtenidos de los controles efectuados por los Estados miembros, revisará los contenidos máximos de metales pesados cada cinco años con el objeto de garantizar un alto nivel de protección de la salud de los consumidores. En el caso del plomo (apartado 18) hace hincapié en el retraso del desarrollo mental e intelectual de los niños, mientras que en el caso del cadmio (apartado 19) comenta los efectos a nivel reproductor y la probabilidad de resultar cancerígeno.

Sin embargo, todo esto, tal y como comentábamos anteriormente, se regula solo para los animales de abasto, es decir, para aquellos sobre los que hay un control sobre la producción, tráfico y comercialización. A pesar de ello, el espíritu del texto legislativo no parece querer excluir al resto de posibles fuentes alimenticias donde estos elementos puedan estar presentes, tal es el caso de los animales objeto del presente capítulo. Por tal motivo, en los apartados correspondientes, haremos principalmente referencia a estos dos elementos (plomo y cadmio) en las principales especies de interés cinegético de las que haya al menos algún estudio que ayude a comprender la situación en la que nos encontramos.

2.2. Contaminantes orgánicos

Como comentábamos anteriormente la única normativa europea publicada hace referencia a la dioxina en el Reglamento CE 2375/2001, que modifica el Reglamento CE 466/2001 mediante la introducción de la sección 5 del anexo. En esta sección se detallan los contenidos máximos de PCDD+PCDF expresados en equivalentes tóxicos de la Organización Mundial de la Salud (EQT-OMS), utilizando los factores de equivalencia de toxicidad de la misma organización. A diferencia de lo que ocurría con el cadmio y el

Tabla 22.3. Contenidos máximos de plomo y cadmio en carne y vísceras establecidos por el Reglamento CE 466/2001.

Metal	Producto	Límite máximo (mg/kg, peso fresco)
Plomo	Carne de animales bovinos, ovejas, cerdos y aves de corral	0,1
	Despojos comestibles de vacas, ovejas, cerdos y aves de corral	0,5
Cadmio	Carne de animales bovinos, ovejas, cerdos y aves de corral	0,05
	Hígado de vaca, oveja, cerdo y aves de corral	0,5
	Riñones de vaca, oveja, cerdo y aves de corral	1,0

plomo, para la dioxina se fijan valores distintos en función del grupo de especies animales: rumiantes (bovinos y ovinos), aves de corral y caza de cría y cerdos; con especial mención a hígado y productos derivados, sin discriminar esta vez entre especies. Además, debido a la acumulación de estos compuestos en tejido graso, se incluyen referencias a los contenidos máximos en grasas animales discriminando también por especies (Tabla 23.4).

Metales pesados en mamíferos de interés cinegético

Como comentábamos en el primer apartado de este capítulo, los estudios sobre metales pesados en mamíferos de vida silvestre son relativamente escasos y muchas veces más orientados a su uso como bioindicadores de contaminación ambiental que por su interés como piezas de caza que serán consumidas (Pokorny y Ribaric-Lasnik, 2000; Santiago *et al.*, 1998). Se han realizado estudios en diversas partes del mundo, siendo quizá los más numerosos los que se han llevado a cabo en las zonas mineras e industriales de los países del Este (Polonia, Eslovenia, Eslovaquia, República Checa, Alemania, etc.) (Falandysz, 1994; Kierdorf y Kierdorf, 2000; Kottferová y Korénefová, 1998; Pokorny y Ribaric-Lasnik, 2000; Swiergosz *et al.*, 1993). También algunos estudios en Canadá, Finlandia o incluso España pueden ayudarnos a compren-

Tabla 22.4. Contenidos máximos de dioxina (PCDD + PCDF) en carne, hígado y sus derivados y grasa de animales establecidos por el Reglamento CE 2375/ 2001.

Producto	Contenido máximo (PCDD+PCDF) (pg EQT PCDD/F-OMS/g grasa) ¹
Carne y productos de carne procedentes de:	
— Rumiantes (bovino y ovino)	3
— Aves de corral y caza de cría	2
— Cerdos	1
Hígado y productos derivados	6
Grasas animales procedentes de:	
— Rumiantes	3
— Aves de corral y caza de cría	2
— Cerdos	1
— Grasas animales mezcladas	2

¹ Equivalente tóxico de la Organización Mundial de la Salud (EQT-OMS)

der la magnitud del problema (Gamberg y Scheuhammer, 1994; Rintala *et al.*, 1995; Santiago *et al.*, 1998).

Desde el punto de vista toxicocinético las diferencias entre especies no parecen ser un tema de especial interés ya que los metales pesados de los que vamos a hablar (plomo y cadmio) siguen una cinética prácticamente igual en todas las especies animales, incluida la especie humana. De hecho, es habitual acudir a la información disponible en la especie humana y en animales de experimentación para explicar lo que experimentalmente no se puede comprobar con estas especies de vida libre (García-Fernández *et al.*, 1995). Aunque algunos auto-

Tabla 22.5. Concentraciones de cadmio y plomo en ciervos (n=70) y jabalíes (n=30) cazados en Sierra Morena.

Especie	Tejido	Cd (mg/kg peso fresco)	Pb (mg/kg peso fresco)
Ciervo	Riñón	2,16 ± 1,05 (0,39-5,48)*	0,33 ± 0,32 (0,04-2,15)
	Hígado	0,21 ± 0,14 (0,08-0,96)	0,57 ± 1,53 (0,05-10,41)
Jabalí	Riñón	1,35 ± 1,42 (0,40-7,61)	0,62 ± 0,90 (0,10-4,34)
	Hígado	0,28 ± 0,16 (0,07-0,73)	2,61 ± 8,35 (0,11-43,06)

* Media ± desviación típica (mínimo-máximo).

res no han encontrado en animales de caza diferencias entre especies (Swiergosz *et al.*, 1993), en determinadas zonas sí es posible encontrar tales diferencias debidas más bien a los hábitos alimenticios propios de cada especie que a diferencias cinéticas (Kottferová y Korénefová, 1998; Santiago *et al.*, 1998). En un estudio realizado en Sierra Morena se observó que los jabalíes acumulaban más plomo, mientras que los ciervos más cadmio (Tablas 22.5 y 22.6) (Santiago *et al.*, 1998). El jabalí es una especie omnívora y por tanto con posibilidad de consumir pequeños animales o productos animales que participen del proceso de bioacumulación y biomagnificación a través de la cadena alimentaria; mientras que el ciervo es una especie estrictamente herbívora, y por tanto más predispuesta a la ingestión del cadmio que es absorbido por las plantas en zonas contaminadas. Además, el cadmio es movilizado por la lixiviación, concentrado en zonas húmedas y, por tanto, más fácilmente diseminado y biodisponible en el material vegetal que forma parte de la dieta de la mayoría de las especies de interés cinegético. Pokorny y Ribaric-Lasnik (2002),

estudiando la influencia de la época del año en las concentraciones tisulares de herbívoros de caza, comentan también la probabilidad de ingestión de hongos que provoquen un aumento de la ingesta de metales pesados, principalmente de cadmio.

Si comparamos los datos de los ciervos de Sierra Morena con los de zonas altamente industrializadas y mineras del Este de Europa (Tabla 22.7) se observa que no existen diferencias relevantes, más aún, en algunos casos las concentraciones son superiores en España. A pesar de ello, en estos países se han tomado medidas legislativas para controlar el consumo de vísceras de animales de caza. Así, en Eslovenia, debido a las concentraciones de cadmio renal, una directiva del año 1990 indicaba que los riñones de las especies de caza de toda Eslovenia, con independencia de la edad, debían ser considerados no aptos para consumo humano. Pokorny y Ribaric-Lasnik (2000) recomiendan además que esta prohibición se amplíe también a los hígados de los animales mayores de dos años debido a la mayor acumulación que se produce con la edad, ya que observan que las

Tabla 22.6. Distribución de ciervos y jabalíes cazados en Sierra Morena en función del límite legalmente establecido por la Unión Europea de concentración de plomo y cadmio en vísceras destinadas a consumo humano (Santiago *et al.*, 1998).

	Plomo (% animales)				Cadmio (% animales)			
	Hígado		Riñón		Hígado		Riñón	
	< 0,5*	> 0,5	< 0,5	> 0,5	< 0,5	> 0,5	< 1	> 1
Ciervo (n=70)	85,7	14,3	84,1	15,9	95,7	4,3	7,9	92,1
Jabalí (n=30)	62,1	37,9	76,0	24,0	86,2	13,8	48,0	52,0

* Concentración máxima (mg/kg peso fresco) según Reglamento CE 466/2001.

Tabla 22.7. Concentraciones de Cd y Pb (mg/kg, peso fresco) en vísceras y músculos de animales de vida libre de interés cinegético de algunos países del Este de Europa.

Especie	Tejido	Cd	Pb	Referencia	Zona
Corzo	Músculo	0,02 ± 0,03 ^a	1,40 ± 0,01	Kottferová y Korénefová, 1998	Eslovaquia
	Riñón	2,63 ± 2,24	0,25 ± 0,18		
	Hígado	0,21 ± 0,10	0,12 ± 0,03	Cibulka, 1991	Eslovaquia y Rep. Checa
	Riñón	0,27 – 3,30 ^b	0,38 – 1,12		
Hígado	0,13 – 3,32	0,56 – 9,70	Pokorny y Ribaric-Lasnik, 2000	Eslovenia	
Músculo	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01			
Riñón	22,73 ± 8,92	0,71 ± 0,65			
Hígado	3,92 ± 0,88	0,05 ± 0,03	Falandysz, 1994	Polonia	
Músculo	0,11 – 0,21	0,19 – 0,21			
Ciervo	Músculo	0,03 ± 0,02	0,09 ± 0,02	Kottferová y Korénefová, 1998	Eslovaquia
	Riñón	2,01 ± 1,32	0,31 ± 0,32		
	Hígado	0,31 ± 0,25	0,73 ± 0,64	Cibulka, 1991	Eslovaquia y Rep. Checa
	Riñón	0,70 – 9,80	0,77 – 10,40		
Hígado	0,38 ^c	0,28	Kottferová y Korénefová, 1998	Eslovaquia	
Músculo	0,05 ± 0,02	0,35 ± 0,48			
Riñón	1,48 ± 1,18	0,48 ± 0,25			
Hígado	0,39 ± 0,23	0,32 ± 0,11	Cibulka, 1991	Eslovaquia y Rep. Checa	
Riñón	3,61	1,43			
Hígado	0,77	0,69	Kottferová y Korénefová, 1998	Eslovaquia	
Músculo	0,02 ± 0,01	0,28 ± 0,11			
Riñón	0,24 ± 0,16	0,25 ± 0,14			
Hígado	0,44 ± 0,28	0,67 ± 0,52	Cibulka, 1991	Eslovaquia y Rep. Checa	
Riñón	0,24 – 1,72	0,39 – 9,00			
Hígado	0,18 – 0,30	0,26 – 7,90	Falandysz, 1994	Polonia	
Músculo	0,01 – 0,01	0,09 – 0,16			

^a Concentración media ± desviación típica^b Rango de concentraciones (mínimo – máximo)^c Concentración media

concentraciones en los adultos es cuatro veces superior a la de lactantes.

Uno de los pocos trabajos que centra su atención en el impacto sobre el principal grupo de riesgo, los cazadores, es el que realizaron Vahteristo *et al* (2003). Estos autores evaluaron la ingesta de cadmio por cazadores al consumir carne, hígado y riñón de alce. El 23% de los encuestados consumían riñones y el 69% hígados, lo cual provocaba un aumento considerable de la ingesta de cadmio. El consumo medio de carne suponía 17 kg/persona/año, lo cual solo contribuía a una ingesta de 0,16 mg de cadmio/persona/día. Sin embargo, el 10% de ellos tenía una ingesta de casi 9 mg/día solo debido al

consumo de alce. Por otro lado el margen de seguridad que se estimaba para los consumidores habituales de vísceras era muy estrecho, siendo considerados incluso como probables candidatos a sufrir efectos directos sobre su salud.

En un estudio realizado por Falandysz (1994), durante varios años en el que evaluó los contenidos de varios metales en carne y vísceras de la caza mayor del Norte de Polonia, se concluye que las concentraciones de metales son relativamente bajas, y no es de interés su estudio desde el punto de vista toxicológico del riesgo para los consumidores, a excepción hecha del plomo en músculo y el cadmio en riñones. Este

autor considera que, desde el punto de vista de salud pública, la contaminación del músculo con plomo como consecuencia de la fragmentación de la munición de plomo, así como la contaminación por cadmio procedente del ambiente contaminado son los dos aspectos de mayor interés.

En el *workshop* europeo sobre el impacto de disruptores endocrinos sobre la salud humana y la fauna silvestre celebrado en Weybridge, en 1996, se definió disruptor endocrino a toda sustancia exógena que causa efectos adversos en un organismo, o su progenie, debido a cambios en el sistema endocrino. En este sentido, se tiene conocimiento de que tanto el plomo como el cadmio son capaces de alterar la función endocrina en animales. Estudios experimentales realizados en ratones expuestos a bajas dosis de plomo en agua de bebida (1 ppm) durante largos periodos de tiempo (6 meses) mostraron alteraciones comportamentales relacionadas con la actividad locomotora, pautas de aseo y exploratorias (Martínez-Riera *et al.*, 2001). Este tipo de efectos suele darse en condiciones de exposición crónica ambiental en ausencia de efectos tóxicos agudos, lo que supone que el animal es aparentemente sano. La alteración en las funciones cognitivas o comportamentales puede generar en los animales de vida libre situaciones de disminución en la respuesta a la hora de intuir riesgos o amenazas, con lo que además de ser más fácilmente abatidos por los predadores naturales también lo serán por los cazadores. Teniendo en cuenta esto, no es de extrañar que los animales más expuestos a metales pesados sean piezas más fáciles para los cazadores, lo cual incrementa el riesgo para los consumidores de este tipo de carne.

La carencia de normativa reguladora del consumo de estas especies con respecto a su impregnación por metales llama poderosamente la atención cuando comparamos su situación con la estricta normativa aplicable a las especies de abasto. Frente a las concentraciones de metales entre rumiantes domésticos (Tabla 22.8) y rumiantes de vida libre (Tabla 22.7), y descartando previamente las concentraciones más ele-

vadas descritas en corzo (Pokorny y Ribaric-Lasnic, 2000; Falandysz, 1994), se observa que los animales de vida libre presentan concentraciones de cadmio en músculo, hígado y riñón que son 2,5-5, 6-10 y 11-14 veces superiores, respectivamente, a las de los animales de abasto. Teniendo en cuenta los datos anteriormente eliminados de la comparación se observa que las concentraciones en músculo, hígado y riñón aumentan con respecto a las de vacuno en 20, 108 y 122 veces, respectivamente.

De igual forma, si cotejamos los datos del estudio de Santiago *et al* (1998) de ciervos de Sierra Morena (Tabla 22.5) se observa que las concentraciones en hígado y riñón son 6 y 12 veces, respectivamente, superiores que las de vacuno ofrecidas por López *et al* (2003). Con respecto al plomo ocurre lo mismo que lo citado para el cadmio. Las concentraciones en músculo de animales de vida libre son de 2,5 a 100 veces superiores a las de vacuno, las de hígado de 3,5 a 50 veces y las de riñón de 15 a 45 veces. Con estas comparaciones es lógico deducir que el consumo de carne y, sobre todo vísceras, de los animales de caza suponen un riesgo mucho mayor que el consumo de animales de abasto.

De la ingesta total de cadmio aproximadamente 2/3 son aportados por plantas y el tercio restante es atribuida a la ingestión de productos animales, siendo los riñones y el marisco los que aportan las cantidades más significativas (Nasreddine y Parent-Massin, 2002). La ingesta semanal tolerable provisional (PTWI) de cadmio establecida por el Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios de la FAO/OMS (JECFA) ha sido establecida en 7 mg/kg peso vivo/semana (equivalente a 1 mg/kg peso vivo/día) (aprox. 60 mg/persona/día) (OMS, 1993). Urieta *et al.* (1996) estimaron una ingesta de cadmio de 10 mg/día/persona, lo cual supone aproximadamente un 17% del PTWI, siendo probablemente una de las ingestas estimadas de cadmio más bajas de Europa (Nasreddine y Parent-Massin, 2002). En el caso del plomo el PTWI se estableció en 25 mg/kg peso corporal/semana (equivalente a 3,6 mg/kg peso corporal/día) (aprox. 216 mg/persona/día) (OMS, 1993). La estima-

Tabla 22.8. Concentraciones de plomo y cadmio (mg/kg peso fresco) en animales de abasto de España.

Especie	Tejido	Cd	Pb	Referencia	Zona
Vacuno	Músculo	0,008 ^a (n.d.-0,036)	0,013 ^a (n.d.-0,034)	López <i>et al.</i> , 2003	Galicia
	Riñón	0,186 (0,042-1,388)	0,017 (n.d.-0,044)		
	Hígado	0,036 (0,017-0,187)	0,015 (n.d.-0,072)		
Ovino	Riñón	0,03 ± 0,04 ^b (0,002-0,218)	0,09 ± 0,06 ^b (0,011-0,353)	Calonge <i>et al.</i> , 2001	Castilla-León
	Hígado	0,03 ± 0,04 (0,001-0,161)	0,09 ± 0,06 (0,010-0,322)		
Aves	Riñón	0,044 ± 0,069 (0,003-0,303)	0,078 ± 0,033 (0,018-0,291)	Calonge <i>et al.</i> , 2001	Castilla-León
	Hígado	0,037 ± 0,014 (0,008-0,110)	0,075 ± 0,058 (0,014-0,249)		

^a Media geométrica (mínimo-máximo)

^b Media ± desviación típica (mínimo-máximo)

ción de Urieta *et al.* (1996) para el plomo fue de 39 mg/persona/día, un 18% del PTWI. Teniendo en cuenta estos datos y habida cuenta de los cálculos obtenidos en la comparación de concentraciones entre animales de abasto y animales de vida libre, los 17 y 18% del PTWI de cadmio y plomo, respectivamente, variarían considerablemente en aquellos consumidores habituales de carne de caza, por lo que el margen de seguridad se estrecharía enormemente, más aún en aquellos que consumieran las vísceras de estos animales.

El plomo en las aves de caza destinadas a consumo

Entre las aves de interés cinegético están las que habitan o frecuentan zonas húmedas, tal es el caso de las anátidas, fochas, etc., y las que no están asociadas a este tipo de ecosistemas, como las palomas, tórtolas, perdices, etc. Esta diferenciación en cuanto al tipo de ecosistema resulta particularmente interesante en el problema del plomo. Las zonas húmedas albergan decenas de miles de aves acuáticas, por lo que han sido

durante decenas de años objeto de una intensa actividad cinegética. Esto ha provocado la deposición en sus lodos de millones de perdigones de plomo que no impactaban en las piezas abatidas quedando así a disposición de las aves en su búsqueda de alimento o de gritt (pedrecitas para facilitar el proceso de trituración de las semillas en la molleja). En las zonas no húmedas, donde se practica otro tipo de caza, el problema es solo el de los perdigones impactados en el cuerpo de la pieza abatida. Por lo comentado, resulta lógico asumir que nos podemos encontrar ante dos situaciones bien distintas en cuanto al riesgo de ingestión de plomo, las de aquellas aves que solo presentan el plomo metálico impactado y las que además presentan el plomo incorporado al organismo como consecuencia de la ingestión previa de los perdigones presentes en lodos, lo que se conoce como «plumbismo de las aves acuáticas».

El plumbismo de las aves acuáticas es un problema conocido desde hace años que provoca importantes mortandades, principalmente de aves acuáticas, en todo el mundo, y que concretamente en España provoca anualmente la muerte de más de 50.000 aves (Guitart *et al.*, 1999). Este importante problema ecotoxicológico de

gran impacto ha sido la causa principal que llevó a muchos países a prohibir el uso de plomo en la munición, y recientemente a España (Real Decreto 581/2001, *por el que en determinadas zonas húmedas se prohíbe la tenencia y el uso de municiones que contengan plomo para el ejercicio de la caza y tiro deportivo*). La intensa actividad cinegética durante decenas de años en los humedales ha generado la deposición en sus lodos de toneladas de perdigones de plomo. En España, Guitart *et al.*, (2002) estiman que cada año, 1,2 millones de cazadores disparan 6.000 toneladas de plomo, de las cuales 30-50 toneladas son depositadas en las zonas húmedas. Estos perdigones serán posteriormente ingeridos por las aves en busca de grítt. El plomo así ingerido por las aves es retenido en la molleja durante varias semanas, donde por acción mecánica y por el pH ligeramente ácido irán disolviéndose poco a poco. El plomo disgregado se irá absorbiendo lentamente, llegando a todos los tejidos blandos, concentrándose en hígado y riñones, donde se incorpora biológicamente, para finalmente acumularse en tejidos calcificados, principalmente hueso (García-Fernández, 2000). Aunque no es acuática, la ingestión de perdigones de plomo también se ha comprobado, si bien de forma anecdótica, en la principal ave cinegética en España, la perdiz (Soler *et al.*, 2004).

Tan solo en el Delta del Ebro se estima que se abaten anualmente hasta 60.000 aves, entre patos y fochas (Guitart *et al.*, 1999), lo cual puede dar una idea de la enorme cantidad de piezas cazadas en nuestro país cada año y que serán consumidas por los cazadores, sus familias y el entorno próximo a estas zonas, si bien es cierto que actualmente se asiste a un mayor interés por el consumo más generalizado de especies de caza. Aunque no todas las especies cinegéticas son candidatas a ingerir elevadas cantidades de plomo por sus peculiares hábitos alimenticios, muchas de ellas sí lo serán (Tabla 22.9). Lógicamente, esto ocurrirá en aquellos humedales donde la caza esté permitida, o lo haya estado en el pasado, ya que se estima que los perdigones de plomo pueden llegar a permanecer entre 30 y 300 años en los lodos hasta

su desintegración total (Guitart *et al.*, 1999), con lo que el riesgo de ingestión por parte de las aves es muy elevado.

Aparte del problema que supone desde el punto de vista ecológico, el plumbismo en aves acuáticas lleva asociado un importante problema de salud pública, que si bien está restringido a un público concreto, no ha sido objeto de la atención que consideramos merece. Una vez puestas en marcha y demostrada la eficacia de las normativas reguladoras para disminuir las fuentes de emisión de plomo, como la prohibición de la gasolina plomada, la sustitución de tuberías de plomo o la retirada de pinturas con plomo, ha sido, en los últimos años, cuando ha empezado a observarse un interés por el impacto sobre la salud que supone el plomo que procede del uso en la munición (Guitart *et al.*, 2002, Johansen *et al.*, 2004).

Por mucho que las vísceras de las aves son a menudo consumidas, obviamente es de mayor importancia el consumo de su carne. La presencia de residuos en músculo de las aves acuáticas no es tan elevada como en las vísceras (hígado o riñón) pero, sin embargo, la elevada ingestión de plomo metálico por parte de ciertas especies (anátidas principalmente) genera una importante acumulación en el tejido muscular en comparación con las especies de aves de corral, superándose en gran medida los límites máximos permitidos por la normativa europea (Reglamento CE 466/2001) (Tabla 22.3).

En estudios realizados sobre porrones (Tabla 22.9) encontrados muertos en el Parque Natural de El Hondo se han hallado ejemplares con elevado número de perdigones en sus mollejas (hasta 66 perdigones), con concentraciones medias, sobre peso fresco, en hígado de 31 mg/kg (2,4-61 mg/kg) y en riñón de 188 mg/kg (50-393 mg/kg) (García-Fernández *et al.*, 2003). Las concentraciones medias citadas serían 62 y 376 veces mayores que las máximas permitidas por la Unión Europea para aves de corral en hígado y riñón, respectivamente. Aunque no se disponía de los niveles en músculo de estos animales, las estimaciones que se realizaron a partir del conocimiento de distribución del plomo, nos

Tabla 22.9. Especies de aves acuáticas de interés cinegético víctimas de plumbismo por ingestión de perdigones de plomo en España.

NOMBRE VULGAR	NOMBRE CIENTÍFICO
Ánade friso	<i>Anas strepera</i>
Ánade rabudo	<i>Anas acuta</i>
Ánade real	<i>Anas platyrhynchos</i>
Ánade silbón	<i>Anas penelope</i>
Ánsar común	<i>Anser anser</i>
Cerceta carretona	<i>Anas querquedula</i>
Cerceta común	<i>Anas crecca</i>
Focha común	<i>Fulica atra</i>
Pato colorado	<i>Netta rufina</i>
Pato cuchara	<i>Anas clypeata</i>
Porrón común	<i>Aythya ferina</i>
Porrón moñudo	<i>Aythya fuligula</i>

llevan a concluir que las concentraciones en músculo oscilarían entre 0,43 y 1,16 mg/kg, lo cual supone entre 4 y 12 veces el límite máximo marcado por el Reglamento CE 466/2001 (Peñalver, 2004). Teniendo en cuenta que el peso medio de un hígado de porrón es de aproximadamente 20 gramos, la ingestión de un solo hígado por un niño (30 kg de peso corporal) supondría un aporte de plomo de 0,6 mg, valor que es el 80% de la ingesta semanal tolerable marcada por la OMS (Peñalver, 2004). Por su parte, Guitart *et al.* (2002), sobre 411 hígados de aves acuáticas analizados, encuentran que el 40,39% de ellos tienen concentraciones de plomo superiores al límite autorizado de 0,5 mg/kg (peso fresco) para aves de corral por la Unión Europea y que varios individuos de 10 de las 13 especies estudiadas (principalmente anátidas) contenían plomo hepático por encima de los 5 mg/kg (peso fresco). Con estos datos, los autores mencionados concluyen que el consumo de tan solo un hígado (lo cual es muy frecuente en España) supondría una ingesta por el consumidor de entre 0,01 y 2,3 mg de plomo, cifra que debe ser considerada como un indicador de riesgo para la salud de los 30.000 cazadores de acuáticas y sus familias, pero sobre todo para los niños como grupo de mayor sensibilidad a los efectos del plomo. A todo ello hay que añadir el hecho de que las aves que no mueren como consecuencia del plumbismo sufren el proceso de forma más lenta, manifestando alte-

raciones comportamentales que afectan a su capacidad de respuesta a la huida (Burger y Gochfeld, 1993), siendo así presas más fáciles para los cazadores. En tales circunstancias aumenta la probabilidad de cazar a los individuos más expuestos y con ello aumenta el riesgo para los consumidores de las piezas cazadas.

Al problema específico del plumbismo de las aves acuáticas, que acabamos de comentar, ha de sumarse el riesgo que supone la ingestión de cualquier ave cazada con munición de plomo, con independencia de que hubiera ingerido o no perdigones. En esta situación han de incluirse, pues, todas las aves, tanto las asociadas a zonas húmedas como las de zonas secas (perdices, tórtolas, etc.). El plomo biológicamente incorporado se distribuye en cada tejido de manera uniforme, incluido el músculo. Sin embargo, los perdigones de plomo impactados como consecuencia del disparo se distribuyen aleatoriamente en la masa corporal del animal, con mayor incidencia en el músculo. La entrada de los perdigones en el cuerpo del animal supone la fragmentación de los mismos, sobre todo cuando impactan con tejidos duros como el hueso. Por tal motivo, el animal presentará unos pocos perdigones fácilmente perceptibles al ojo humano y otros muchos pequeños fragmentos (1-2 mm de diámetro) que pasarán inadvertidos y no serán retirados durante la preparación del ave para su consumo, pasando también inadvertidos en el momento de la ingestión (Johansen *et al.*, 2004). Esta forma de presentarse los perdigones en las piezas cazadas no ha sido tenida en cuenta como factor de riesgo hasta hace muy poco tiempo. Sin embargo, el reciente estudio realizado por Johansen *et al.* (2004) revela que el problema es más serio de lo que parecía. Estos autores analizaron las concentraciones de plomo en músculo (pechuga) de una especie de pato grande, edredón común (eider), comparando los resultados obtenidos en animales cazados (2,1-12 mg/kg, peso fresco) con otros capturados vivos (0,09-0,19 mg/kg, peso fresco). Además de esta significativa diferencia debida al hecho de la impacción de los perdigones, comprobaron que existían también notables diferencias entre el

análisis de la pechuga entera y el análisis de una fracción de la muestra de 0,5 gramos, encontrando que los niveles en pechuga entera (una vez retirados los fragmentos visibles) eran siete veces superiores a los de la fracción de muestra. Esto supone un problema desde el punto de vista de muestreo y análisis a la hora de decidir si una carne puede ser considerada apta o no para consumo, ya que el análisis de la fracción de muestra (lo cual es habitual) no permite en la mayoría de los casos que los fragmentos de plomo no visibles entren en la muestra a analizar, dando así un resultado erróneo sobre la carga real de plomo en la pechuga (Johansen *et al.*, 2004). Más aún, estos autores estiman que el consumo de una comida que contuviera 200 gramos de pechuga de estos animales supondría una ingestión de 1,22 mg de plomo, lo cual implicaría una ingesta de plomo muy cercana a la ingesta máxima tolerable semanal para un adulto (1,5 mg/persona/semana) y superior a la de un niño (0,75 mg/persona/semana).

Contaminantes orgánicos en la carne de caza

Son muy numerosos los compuestos orgánicos que pueden aparecer como residuos en la carne de las especies cinegéticas, siendo los más importantes y estudiados, al igual que en otras especies animales, los compuestos contemplados en el Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes, es decir, los compuestos clorados (plaguicidas, dioxinas, PCB y furanos). Si bien son los más importantes, no hay que olvidar la posible presencia de otras sustancias menos estudiadas, como otro tipo de plaguicidas (organofosforados, rodenticidas, herbicidas, etc.), las micotoxinas (Bukovjan *et al.*, 1992; Oberheu y Dabbert, 2001) y sustancias químicas diversas como los tiocianatos (Kramer *et al.*, 1993).

Los compuestos clorados son semivolátiles, por lo que tienden a ser transportados por la cir-

culación atmosférica a través de los ecosistemas contaminando por tanto áreas lejanas de sus lugares de emisión. Además, debido a su carácter lipofílico y su resistencia a la degradación, tienden a acumularse en los tejidos grasos de los organismos vivos y biomagnificarse, alcanzando concentraciones peligrosas en los animales de los niveles tróficos más altos, incluyendo el hombre. Los animales de caza de interés bromatológico no pertenecen a esos niveles tróficos altos por lo que, por lo general, los niveles de estos contaminantes suelen ser bajos, y si bien no plantean un riesgo directo agudo para el consumidor humano, sí que pueden suponer una fuente complementaria de aporte de esos compuestos.

Las especies cinegéticas absorben esos contaminantes directamente de la atmósfera o a través del agua de bebida o alimentos. No cabe duda de que mientras más cercanos estén a una fuente potencial de contaminantes (cultivos agrícolas, zonas industrializadas, incineradoras...) más posibilidades existen de que su contenido en contaminantes sea mayor. Altos niveles de PCB, dioxinas y furanos aparecieron en la carne de ciervo en las cercanías de un centro de tratamiento de residuos especiales en Alberta (Canadá) tras incidentes de emisiones accidentales y vertidos (Anónimo, 1997).

Una mención singular merece la exposición a contaminantes de las aves acuáticas al habitar unas zonas sobre las que la agricultura química tiene unas importantes repercusiones. Las aves acuáticas pueden exponerse a los contaminantes acuáticos no solo a través de la dieta, basada fundamentalmente en semillas, plantas e invertebrados, sino también mientras beben, se sumergen o desplazan por el agua, se arreglan las plumas con el pico o ingieren sedimentos. Los contaminantes lipofílicos (PCB, DDE, HCB) parecen permanecer en niveles más estables en el hígado que en otros tejidos (grasa, músculo) debido probablemente a la alta tasa metabólica del músculo de la pechuga (el músculo más activo de las aves) y a fluctuaciones en los lípidos almacenados (Mateo *et al.*, 1998). En el estudio realizado por estos autores concluyen que el consumo de la grasa abdominal, hígado y

pechuga de un solo pato de la zona estudiada supone una ingesta de HCB, PCB y DDE, a partir de un único alimento, que probablemente es inofensiva, pero que excede grandemente la ingesta diaria normal estimada de estos compuestos de una dieta normal. De este y otros estudios similares se derivan recomendaciones de que se debe evitar el consumo regular de anátidas de zonas contaminadas, y cuando se ingieran, deben ser evisceradas y la grasa y la piel debe ser eliminada antes del cocinado y consumo (Botero *et al.*, 1996; Foley, 1992; Mateo *et al.*, 1998).

En la Tabla 22.10 se presentan diversos estudios relacionados con la presencia de contaminantes orgánicos en especies cinegéticas.

Destaca el hecho de que los residuos de compuestos orgánicos que se investigan y se detectan pertenecen al grupo de los plaguicidas clorados, el HCB y los PCB. Sin embargo, la actual legislación sobre control de residuos en animales de caza silvestre (Real Decreto 1749/1998, de 31 de julio, por el que se establecen las medidas de control aplicables a determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos, que transcribe la Directiva 96/23/CE) establece que sobre la caza silvestre únicamente se investigarán los «elementos químicos», que no llega a concretar, excluyendo los compuestos organoclorados, entre los que se contemplan los PCB.

La diferencia en los niveles entre las distintas especies animales se debe mayoritariamente a diferencias en los patrones y hábitos alimenticios. Algunos animales como el jabalí también se alimentan de pequeños animales, por lo que la acumulación de estos compuestos ocurre a través de la cadena alimentaria. Sin embargo, en especies que se alimentan exclusivamente de material vegetal no aparece este fenómeno de acumulación. Así, en jabalí se han llegado a detectar cantidades de 71 ppm de HCB, mientras que ciervos de la misma zona contenían 0,03 ppm (Koss y Manz, 1976). En varias especies silvestres se ha comprobado que las que tienen costumbres herbívoras tienen cantidades 10 veces inferiores a las especies de costumbres carnívo-

ras (Englert, 1975; Przybycin y Juszkiwicz, 1993). Incluso en aves los niveles de DDE son superiores en especies carnívoras que en omnívoras e insectívoras (carnívoras > omnívoras > insectívoras). Sin embargo, las concentraciones de PCB son significativamente más altas en omnívoros (omnívoros > carnívoros > insectívoros) (Naso *et al.*, 2003).

Si bien es lógico pensar que las concentraciones tisulares de los compuestos clorados se verán afectadas directamente por el tiempo de exposición y se incrementarán con la edad, lo que se observa más claramente en los carnívoros (Kamrin y Ringer, 1994), en el caso de los ungulados esta afirmación no se cumple claramente, y se explican las altas concentraciones de compuestos clorados en los tejidos de animales jóvenes por su ingestión durante la lactación (Naso *et al.*, 2004).

El efecto negativo desde el punto de vista ambiental que supone la contaminación por los compuestos clorados ha hecho que se hayan promulgado normas para prohibir o limitar su uso e incluso el abandono de su producción. El ejemplo más claro lo constituye el Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes. Estas acciones han tenido como consecuencia una disminución paulatina de esos contaminantes en algunas zonas controladas, y por tanto en la fauna del entorno. En diversos estudios continuados sobre las especies de caza mayor que se han realizado en Polonia se observa claramente a partir de los años 90 (especialmente en los plaguicidas) esa tendencia a la disminución con respecto a la década anterior (Tabla 22.10). Situación similar se ha encontrado en ánades del Delta del Ebro (Mateo *et al.*, 1998).

1. Plaguicidas clorados

Son muy numerosos los plaguicidas pertenecientes al grupo de los clorados que pueden aparecer como residuos en las carnes de caza (DDT, aldrín, dieldrin, α -HCH, β -HCH, γ -HCH, δ -HCH, HCB, heptacloro, etc., y sus metabolitos). Los problemas ambientales y de introducción en

Tabla 22.10. Estudios realizados sobre contaminantes ambientales en tejidos de especies cinegéticas de interés bromatológico

Especie	Tejido	Compuestos y niveles detectados (valores medios, mg/kg)	Referencia	Zona
Jabalí	Músculo	Músculo: DDT (0,010), DDE: (0,035), PCB (0,092)	Hernández <i>et al.</i> (1985)	España (PN Doñana)
	Hígado	Hígado: DDT (0,014), DDE (0,070), PCB (0,103)		
	Grasa	Sigma-DDT (0,310), Sigma-HCH (0,010), HCB (0,005), PCB (0,014)	Falandysz y Centkowska (1989)	Polonia
	Grasa	HCB (71)	Koss y Manz (1976)	Alemania
	Grasa	PCB (0,046±0,034)	Przybycin y Juskiewicz (1993)	Polonia
	Grasa	Sigma-DDT (0,146), Sigma-HCH (0,003), HCB (0,003)	Rodziewicz y Hajduk (1995)	Polonia
	Grasa	Sigma-DDT (0,178), Sigma-HCH (0,007), HCB (0,005)	Rodziewicz y Hajduk (1991)	Polonia
	Plasma	DDE (0,63)*, PCB-74 (0,15)*, HCB (0,15-0,22)*	Nigg <i>et al.</i> (2000)	EE UU
	Grasa	HCB (0,410)	Courtney (1979)	Alemania
Ciervo	Músculo	Músculo: DDT (0,010), DDE (0,035), PCBs (0,101)	Hernández <i>et al.</i> (1985)	España (PN Doñana)
	Hígado	Hígado: DDT (0,017), DDE (0,039), PCBs (0,137)		
	Músculo	PCB, dioxinas y furanos	Anónimo (1997)	Canadá
	Grasa	Sigma-DDT (0,018), Sigma-HCH (0,008), HCB (0,006), PCB (0,017)	Falandysz y Centkowska (1989)	Polonia
	Grasa	Sigma-DDT (0,048), Sigma-HCH (0,013), HCB (0,005)	Rodziewicz y Hajduk (1991)	Polonia
	Grasa	Sigma-DDT (0,027), Sigma-HCH (0,004), HCB (0,003)	Rodziewicz y Hajduk (1995)	Polonia
	Grasa	PCB (0,021±0,016)	Przybycin y Juskiewicz (1993)	Polonia
Jabalí, ciervo y corzo	Grasa Cerebro	Plaguicidas clorados: DDT y derivados (DDE, DDD)	Zasadowski <i>et al.</i> (1988)	Polonia
Jabalí, ciervo y corzo	Grasa	PCB (0,009-0,047), DDT (rumiantes: 0,045-0,084; jabalí: 0,440), HCB (0,002-0,018)	Falandysz y Kannan (1992)	Polonia
Corzo y liebre		Plaguicidas clorados, HCB	Englert (1975)	Alemania
		HCB, PCB	Lutz (1985)	Alemania
Rebeco	Grasa	HCB (0,031±0,023), PCBs (0,012±0,009), DDE (0,002±0,001)	Guitart <i>et al.</i> (1990)	España (Pirineo catalán)
Gamo	Músculo	Músculo: DDT (0,011), DDE (0,035), PCB (0,090).	Hernández <i>et al.</i> (1985)	España (PN Doñana)
	Hígado	Hígado: DDT (0,013), DDE (0,027), PCB (0,085)		
Corzo	Músculo	PCB	Bachour <i>et al.</i> (1998)	Alemania
	Hígado	DDE (nd-0,629), PCB (nd-0,414)	Naso <i>et al.</i> (2004)	Italia
	Grasa	Sigma-DDT (0,053), Sigma-HCH (0,015), HCB (0,011), PCB (0,015)	Falandysz y Centkowska (1989)	Polonia
	Grasa	PCB (0,018±0,013)	Przybycin y Juskiewicz (1993)	Polonia
	Grasa	PCB (0,002-0,008)	Zasadowski <i>et al.</i> (2003)	Polonia

	Grasa	Sigma-DDT (0,063), Sigma-HCH (0,012), HCB (0,006)	Rodziewicz y Hajduk (1991)	Polonia
	Grasa	Sigma-DDT (0,057), Sigma-HCH (0,005), HCB (0,005)	Rodziewicz y Hajduk (1995)	Polonia
	Hígado Riñón	Aflatoxina B1: hígado (0,696±0,59)* y riñón (0,794±0,48)*	Bukovjan <i>et al.</i> (1992)	Rep. Checa
Conejo	Músculo	DDE (0,072), PCBs (0,320)	Jansson <i>et al.</i> (1993)	Suecia
	Músculo Hígado	Músculo: DDT (0,007), DDE (0,037), PCB (0,059) Hígado: DDT (0,023), DDE (0,073), PCB (0,111)	Hernández <i>et al.</i> (1985)	España (PN Doñana)
Liebre	Músculo Hígado	Músculo: DDT (0,008), DDE (0,029), PCB (0,047) Hígado: DDT (0,010), DDE (0,050), PCB (0,067)	Hernández <i>et al.</i> (1985)	España (PN Doñana)
	Músculo	PCBs (0,8-8,5)	Brunn <i>et al.</i> (1985)	Alemania
	Hígado Riñón	Aflatoxina B1: hígado (0,407±0,29)* y riñón (0,658±0,60)*	Bukovjan <i>et al.</i> (1992)	Rep. Checa
	Hígado	Dieldrin (0,01-2,94), Heptacloro-hepóxido (0,01-1,38)	Rimkus y Wolf (1987)	Alemania
Varias especies		Dioxinas (TCDD), Dibenzofuranos	Heida y Olie (1985)	Holanda (Ámsterdam)
Varias especies	Grasa	PCBs: zona contaminada (0,103) y zona control (0,033)	Kocan <i>et al.</i> (2001)	Eslovaquia
Varias especies	Grasa perirrenal	Niveles similares a los encontrados en ese país en los años 80	Rodziewicz y Hajduk (1989)	Polonia
Ánade real	Hígado Músculo	Hígado: DDE (0,392), PCBs (0,498) Músculo: DDE (0,184), PCBs (0,393)	Baluja <i>et al.</i> (1977)	España (PN Doñana)
	Grasa Hígado Músculo	Grasa: HCB (0,183-0,487), DDE (0,25-1,56), PCBs (0,82-2,08) Hígado: HCB (0,021-0,049), DDE (0,023-0,086), PCBs (0,086-0,237) Músculo: HCB (0,009-0,025), DDE (0,012-0,046), PCBs (0,056-0,128)	Mateo <i>et al.</i> (1998)	España (Delta del Ebro)
	Hígado Riñón	Aflatoxina B1: hígado (0,840)* y riñón (0,594)*	Bukovjan <i>et al.</i> (1992)	Rep. Checa
Varios ánades	Músculo	DDE (0,033-0,406), PCBs (0,025-0,272)	Botero <i>et al.</i> (1996)	Colombia y EE UU
	Grasa Músculo	DDE y PCB son los mayoritarios. También se detectó DDT, heptacloro-epóxido, trans-nonaclor y hexaclorobenzeno	Foley (1992)	EE UU (New York)
Faisán	Hígado, Riñón	Aflatoxina B1: hígado (0,329)* y riñón (0,676)*	Bukovjan <i>et al.</i> (1992)	Rep. Checa
Paloma	Hígado	PCB (0,45±0,90)*, DDE (0,12±0,12)*	Hoshi <i>et al.</i> (1998)	Japón
Perdiz	Grasa Músculo	Grasa: HCB (0,008±0,002), DDE (0,029±0,065) Músculo: HCB (0,003±0,003), DDE (0,014±0,038)	Herrera <i>et al.</i> (2000)	España

* Concentración expresada en µg/kg

la cadena trófica han hecho que hoy día estén prohibidos, o al menos controlados, en su uso agrícola. En general, los residuos de plaguicidas clorados en los tejidos grasos de los animales de caza son generalmente bajos (Tabla 22.10), detectándose en su momento que en aquellas áreas que estuvieron sometidas a aplicación directa de los mismos la probabilidad de exposición directa de los animales silvestres era mayor (Stickel, 1973). Existe una correlación directa entre la intensidad de la agricultura y los niveles de plaguicidas clorados en las especies cinegéticas, aunque únicamente para el caso del DDE, si bien no existe correlación con respecto a la edad de los animales (Englert, 1975).

Si bien suelen ser numerosos los plaguicidas clorados que se investigan, la prohibición de los mismos hace que la mayoría de ellos no sean detectados actualmente en las canales, siendo el DDE (metabolito del DDT) el compuesto que aparece en la práctica totalidad de las muestras en concentraciones muy variadas (Tabla 22.10). Esta situación es bastante variable y así en solo 1 de 23 jabalíes de Florida (EE UU) se detectó DDE (0,63 ppb), valor similar al observado en cerdos domésticos de la zona (Nigg *et al.*, 2000). En patos (ánade real) del Delta del Ebro se ha detectado claramente DDE y HCB, mientras que otros como β -HCH, γ -HCH, aldrín, DDT y DDD se detectaron en un número reducido de aves y a unas concentraciones de 10 a 20 veces menores (Mateo *et al.*, 1998). En un estudio reciente sobre perdices en distintas localizaciones en España se constata la distinta presencia de plaguicidas en función de la zona geográfica (ausencia de DDT en muestra de la zona central y norte de España y presencia en las de la zona sur), se detectan niveles altos de lindano, e incluso la presencia de dieldrin, mientras que no se detecta ninguno de los congéneres más frecuentes de PCBs (Herrera *et al.*, 2000). Sin embargo algunos ejemplares superan los límites máximos establecidos para estos contaminantes en aves domésticas, si bien en general su número es tan escaso que se concluye un bajo riesgo para los consumidores y su validez para el consumo.

2. PCB

El grupo de los bifenilos policlorados (PCB) consiste en un total de 209 congéneres, de los cuales 130 aparecen en productos comerciales, muy ampliamente distribuidos ya que se han utilizado frecuentemente en transformadores y acumuladores eléctricos como fluidos dieléctricos, pero también en materiales de construcción, lubricantes, adhesivos, plastificantes etc., si bien hoy día su producción está restringida o prohibida (Anónimo, 2000). Algunos de estos usos han dado lugar a una introducción directa en el medio ambiente, resultando una porción significativa de la carga ambiental consecuencia de accidentes, prácticas descuidadas de eliminación de desechos o escapes industriales y de lugares de almacenamiento de residuos químicos (Safe, 1994). Sus propiedades químicas (estabilidad química y lipofilia) han contribuido a crear problemas ambientales ya que una vez introducidos en el medio ambiente se degradan lentamente y se transportan en los diversos elementos del ecosistema global, dando lugar a fenómenos de bioacumulación y biomagnificación, entrando pues en la cadena alimentaria. A finales del siglo XX los PCB se habían detectado en casi todos los componentes del ecosistema global, desde el Ártico hasta el Antártico, lo que llevó a la prohibición de su uso a principios de los años 70 y la finalización de su producción en 1977 (Safe, 1994).

La incidencia de la contaminación en animales de caza que viven en el entorno de antiguas zonas de producción (factorías químicas) de PCB es muy evidente, debido a la contaminación del aire, agua y suelo en sus alrededores (Kocan *et al.*, 2001).

Todos los estudios iniciales sobre PCB se realizaron con técnicas analíticas que proporcionaban niveles de PCB totales. Sin embargo, a principios de los 80 era claro que algunos congéneres eran mucho más tóxicos que otros y que un ensayo más preciso de la toxicidad potencial asociada con niveles residuales requería un análisis específico de congéneres. Los congéneres de mayor interés por su toxicidad y frecuencia de aparición

son 28, 52, 101, 118, 138, 153 y 180 (Kamrin y Ringer, 1994; Naso *et al.*, 2003; Naso *et al.*, 2004; Bachour *et al.*, 1998), pareciendo que afectan más a la caza de pluma que a los ungulados (Mateo *et al.*, 1998; Rajzák *et al.*, 2001).

No hay suficientes datos que muestren claramente la tendencia de los residuos de PCB en el tiempo, aunque parece que existe una tendencia a la disminución desde los primeros años 70, debido a medidas restrictivas sobre estos compuestos, aunque no se puede determinar si esta disminución se corresponde con una disminución en los congéneres más tóxicos (Kamrin y Ringer, 1994). En un estudio en Florida (EE UU) en solo 1 de 23 jabalíes muestreados se detectó PCB-74 (0,15 ppb) y ligeramente por debajo del límite de detección (Nigg *et al.*, 2000), y en un estudio reciente en perdices españolas no se detectó ningún PCB (Herrera *et al.*, 2000).

3. Dioxinas y dibenzofuranos

El término «dioxinas» se refiere a un grupo de compuestos tricíclicos aromáticos planares policlorados de similares estructura y propiedades fisicoquímicas. Este grupo de compuestos consiste en 75 dibenzo-p-dioxinas (PCDD) y 135 dibenzofuranos (PCDF) de los cuales el 2,3,7,8-TCDD es el congénere más tóxico. Son compuestos lipofílicos que se unen al sedimento y materia orgánica en el ambiente y tienden a ser absorbidos en los tejidos grasos animales. Las dioxinas se forman durante los procesos de combustión; por ejemplo, en las incineradoras de residuos, o como producto no deseable en ciertos procesos industriales, entrando en el ambiente por su emisión en el aire, por lo que su deposición en el suelo y plantas puede ocurrir tanto cerca como muy lejos de la fuente, siendo identificados en casi todos los compartimentos ambientales. Se conoce poco sobre el destino de las dioxinas liberadas al ambiente (transporte, distribución, transformación), pero lo que sí está claro es que todos los animales domésticos o silvestres (de caza o no) se pueden ver afectados por esta contaminación y de esta forma entrar en la cadena alimentaria humana. Es por lo tanto en

los animales de caza que se sitúan más cercanos a esas posibles fuentes de emisión de dioxinas (incineradoras) los que tienen más probabilidad de contener estos compuestos, si bien es cierto que son muy escasos en la literatura científica estudios concretos sobre este tipo de animales. Se han detectado en ciervos, patos y otra carne de caza del centro de Europa (Alemania, Holanda y Suecia) (Anónimo, 2000). Cantidades detectables del más tóxico de los isómeros de las dioxinas (2,3,7,8-TCDD) así como de los dibenzofuranos más tóxicos, además de altos niveles de congéneres menos tóxicos, se encontraron en animales de caza de zonas cercanas a un basurero de Ámsterdam (Holanda) seriamente contaminado con residuos originados en la producción comercial de 2,4,5-T, diclobenil, lindano y tetraclorodifon (Heida y Olie, 1985).

4. Otros plaguicidas

Además de los plaguicidas clorados de alta persistencia citados anteriormente, la carne de caza puede verse afectada por otros plaguicidas. El hecho de que muchas especies cinegéticas tengan su hábitat en zonas de cultivo o alrededores y que se alimenten incluso de productos de esos cultivos, en los que en algún momento se usarán insecticidas, herbicidas etc., crea la posibilidad de aparición de los mismos en la carne. Incluso existe la posibilidad de aparición de residuos tras la ingestión accidental de cebos envenenados (insecticidas carbamatos, organofosforados, estricnina, etc.) colocados en el medio en la lucha contra las «alimañas», y de hecho, son numerosas las especies cinegéticas que pueden verse afectados por la colocación de estos cebos (Quidet, 1975).

Además de estos tóxicos, también suele ser habitual en algunas zonas la colocación de cebos fabricados a base de rodenticidas anticoagulantes (warfarina, bromadiolona, brodifacum, etc.), con una acción más lenta sobre los animales que los consumen que puede facilitar la captura por parte del cazador, y por lo tanto el consumo de estos residuos, que en algunos casos pueden detectarse incluso varios meses después de la colocación de los cebos (Eason *et al.*, 2001).

5. Otros compuestos (micotoxinas)

Las micotoxinas son también compuestos susceptibles de actuar como contaminantes de las canales de animales de caza. Las aflatoxinas, producidas por hongos toxigénicos del género *Aspergillus* han sido detectadas en hígado, riñón y gónadas de varios animales de caza como el corzo, liebres, faisanes y ánade real (Bukovjan *et al.*, 1992). En las liebres, las mayores concentraciones se observaron en animales que habitaban en las cercanías de ensilados, pilas de henos o abonos orgánicos líquidos.

Si bien no se ha estudiado su presencia en los tejidos animales, la presencia de micotoxinas como la ocratoxina A en los alimentos fabricados para aves de caza, particularmente correlacionada con la humedad ambiental relativa, hace suponer que se puedan presentar en las aves alimentadas con esos productos contaminados (Oberheu y Dabbert, 2001).

Bibliografía

- Ahl AS, Nganwa D, Wilson S (2002). Public health considerations in human consumption of wild game. *Ann N Y Acad Sci.* 969:48-50.
- Anónimo (1997). Polychlorinated biphenyls, dioxin, and furan levels in wild game samples from the Swan Hills, Alberta area: Interim report. Govt Reports Announcements & Index (GRA&I), Issue 24.
- Anónimo (2000). Assessment of dietary intake of dioxins and related PCBs by the population of EU Member States. European Commission. Health & consumer Protection Directorate-General, Bruselas. pp 115.
- Bachour G, Failing K, Georgii S, Elmadfa I, Brunn H (1998). Species and organ dependence of PCB contamination in fish, foxes, roe deer, and humans. *Arch Environ Contam Toxicol* 35: 666-673.
- Baluja G, Murado MA, Hernandez LM (1977). Contaminación del medio por plaguicidas organoclorados XI. Estudio de la contaminación por compuestos organoclorados en algunas comunidades de la Reserva Biológica de Doñana. *Rev Agroquim Tecnol Aliment* 17: 481-491.
- Botero JE, Meyer MW, Hurley SS, Rusch DH (1996). Residues of organochlorines in mallards and blue-winged teal collected in Colombia and Wisconsin, 1984-1989. *Arch Environ Contam Toxicol* 31: 225-231.
- Brunn H, Berlich HD, Muller FJ (1985). Residues of pesticides and polychlorinated biphenyls in game animals. *Bull Environ Contam Toxicol* 34: 527-532.
- Bukovjan K, Hallmannova A, Karpenko A, Prosek J (1992). Detection of aflatoxin B1 in tissues of free-living game animals (*Lepus europaeus*, *Phasianus colchicus*, *Capreolus capreolus*, *Anas platyrhynchos*) *Zentralbl Veterinarmed B.* 39: 695-708.
- Burger J, Gochfeld M (1993). Lead and behavioral development in young herring gulls: effects of timing of exposure on individual recognition. *Fund Appl Toxicol* 21: 187-195.
- Calonge M, García-Fernández AJ, Romero D, Ordóñez C, Reguera R, Pérez Y *et al.* (2001). Metales pesados en vísceras de ganado ovino y aviar en Castilla-León. *Rev Toxicol* 18: 175.
- Cibulka, 1991 (tomado de Kottferová y Korénéfová, 1998).
- Courtney KD (1979). Hexachlorobenzene (HCB): a review. *Environ Res* 20: 225-266.
- Dorn CR, Miller GY (1987). Use of epidemiological and toxicological observations in domestic and wild animal populations for evaluating human health risks. *ATLA* 15: 124-130.
- Eason CT, Wright GRG, Milne LM, Morriss GA (2001). Laboratory and field studies of brodifacoum residues in relation to risk of exposure to wildlife and people. *Science for Conservation* 177B: 11-23.
- Englert HK (1975). Residue analyses of chlorinated hydrocarbons in deceased wild animals and healthy hunted native wild animals. *Umweltschutz* 28 (11, Suppl.): 367-369.
- Falandysz J (1994). Some toxic and trace metals in big game hunted in the northern part of Poland in 1987-1991. *Sci Total Environ* 141: 59-73
- Falandysz J, Centkowska D (1989). Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls of adipose fat of game animals from the northern region of Poland, 1986. *Bromatol Chem Toksykol* 22:182-185.
- Falandysz J, Kannan K (1992). Organochlorine pesticide and polychlorinated biphenyl residues in slaughtered and game animal fats from the north-

- hern part of Poland. *Z Lebensm Unters Forsch* 195: 17-21.
- Fletcher TJ (1997). European perspectives on the public health risks posed by farmed game mammals. *Rev Sci Tech* 16: 571-578.
- Foley RE (1992). Organochlorine residues in New York waterfowl harvested by Hunters in 1983-1984. *Environ Monit Assess* 21: 37-48.
- García-Fernández AJ (2000). El plumbismo como causa de muerte en aves acuáticas. En: *Globalización medioambiental. Perspectivas agrosanitarias y urbanas*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 181-188.
- García-Fernández AJ (2001). Evaluación toxicológica de la exposición a metales pesados en fauna terrestre. *Rev Toxicol* 18: 138-139.
- García-Fernández AJ, Peñalver J, María-Mojica P, Motas M, Navas I, Romero D *et al.* (2003). Diferencias en la distribución orgánica de plomo en flamenco común y porrón común por ingestión de perdigones de plomo. *Rev Toxicol* 20: 104-105.
- García-Fernández AJ, Sánchez JA, Jiménez P, Luna A (1995). Lead and Cadmium in wild birds in Southeastern Spain. *Environ Toxicol Chem* 14: 2049-2058.
- Guitart R, Riu JL, Puigdemont A, Arboix M (1990). Organochlorine residues in adipose tissue of chamois from the catalan Pyrenees, Spain. *Bull Environ Contam Toxicol* 44: 555-560.
- Guitart R, Mañosa S, Thomas VG, Mateo R (1999). Perdigones y pesos de plomo: ecotoxicología y efectos para la fauna. *Rev Toxicol* 16: 3-11.
- Guitart R, Serratosa J, Thomas VG (2002). Lead-poisoned wildfowl in Spain: a significant threat for human consumers. *Int J Env Health Res* 12: 301-309.
- Heida H, Olie K (1985). TCDD and chlorinated dibenzofurans in top soil and biological samples from a contaminated refuse dump. *Chemosphere* 14: 919-924.
- Helle E (1989). Game animals as indicators of environmental pollution with special reference to baltic seals. *Finn Game Res* 0: 87-92.
- Hernández LM, González JJ, Rico MC, Fernández MA, Baluja G (1985). Presence and biomagnification of organochlorine pollutants and heavy metals in mammals of Doñana national park Spain 1982-1983. *J Environ Sci Health Part B* 20: 633-650.
- Herrera A, Arino A, Conchello MP, Lazaro R, Bayarri S, Yague C *et al.* (2000). Red-legged partridges (*Alectoris rufa*). as bioindicators for persistent chlorinated chemicals in Spain. *Arch Environ Contam Toxicol* 38: 114-20.
- Hoshi H, Minamoto N, Iwata H, Shiraki K, Tsuchikawa R, Tanabe S *et al.* (1998). Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyl congeners in wild terrestrial mammals and birds from Chubu region, Japan: interspecies comparison of the residue levels and compositions. *Chemosphere* 36: 3211-3221.
- Jansson B, Andersson R, Asplund L, Litzén K *et al.* (1993). Chlorinated and brominated persistent organic compounds in biological samples from the environment. *Environ Toxicol Chem* 12: 1163-1174.
- Johansen P, Asmund G, Riget F (2004). High human exposure to lead through consumption of birds hunted with lead shot. *Env Pollut* 127: 125-129.
- Kamrin MA, Ringer RK (1994). PCB residues in mammals: a review. *Toxicol Environ Chem* 41: 63-84.
- Kierdorf H, Kierdorf U (2000). Roe deer antlers as monitoring units for assessing temporal changes in environmental pollution by fluoride and lead in Germany forest area over a 67-year period. *Arch Environ Contam Toxicol* 39: 1-6.
- Kocan A, Petrik J, Jursa S, Chovancova J, Drobna B (2001). Environmental contamination with polychlorinated biphenyls in the area of their former manufacture in Slovakia. *Chemosphere* 43: 595-600.
- Koss G, Manz D (1976). Residues of hexachlorobenzene in wild mammals of Germany. *Bull Environ Contam Toxicol* 15: 189-191.
- Kottferová J, Korénefová B (1998). Distribution of Cd and Pb in the tissues and organs of free-living animals in the Territory of Slovakia. *Bull Environ Contam Toxicol* 60: 171-176.
- Kramer A, Dedek J, Thurkow B, Weuffen W (1993). Thiocyanate blood levels in roe deer, red deer, fallow deer and wild boar. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 106: 17-19.
- Lecocq Y (1997). An european perspective on wild game meat and public health. *Rev Sci Tech* 16: 579-85.
- López-Alonso M, Prieto F, Miranda M, Castillo C, Hernández J, Benedito JL (2003). Cadmium and lead accumulation in cattle in NW Spain. *Vet. Hum Toxicol* 45: 128-130.

- Lutz W (1985). Results of studies on roe deer *capreolus-capreolus* and hare *lepus-europaeus* for heavy metals and chlorinated hydrocarbons in North-Rhine-Westphalia West Germany. *Z Jagdwiss* 31: 153-175.
- Ma W (1996). Lead in mammals. En Beyer WN, Heinz GH, Redmon-Norwood AW (ed.). Environmental contaminants in wildlife. Lewis Publ, New York, 281-296.
- Martínez-Riera N, Gandur MJ, Soria N, Riera de Martínez-Villa N (2001). Evaluación de las alteraciones conductuales y dopaminérgicas en ratones con bajas concentraciones de plomo. *Rev Toxicol* 18: 87-91.
- Mateo R, Gámez A, Guitart R (1998). Organochlorine residues in hunted wild mallards in the Ebro delta, Spain. *Bull Environ Contam Toxicol* 60: 134-141.
- Mateo R, Guitart R (1995). Aves intoxicadas a causa de los perdigones de plomo. *Quercus* 111: 16-22.
- Melchor A (2003). *Los recursos cinegéticos de Extremadura*. Universidad de Extremadura, Servicio de Publicaciones, Cáceres. pp 205.
- NAS (National Academy of Sciences (1971). Biologic effects of atmospheric pollutants: fluorides. NAS, Washington, DC.
- Naso B, Perrone D, Ferrante MC, Zaccaroni A, Lucisano A (2003). Persistent organochlorine pollutants in liver of birds of different trophic levels from coastal areas of Campania, Italy. *Arch Environ Contam Toxicol* 45: 407-414.
- Naso B, Zaccaroni A, Perrone D, Ferrante MC, Severino L, Stracciari GL *et al.* (2004). Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in European roe deer *Capreolus capreolus* resident in a protected area in Northern Italy. *Sci Total Environ* (en prensa).
- Nasreddine L, Parent-Massin D (2002). Food contamination by metals and pesticides in the European Union. Should we worry? *Toxicol Lett* 127: 29-41.
- Nigg HN, Elliot PM, Brock JW, Sampson EJ, Szanyi DN, Weems K *et al.* (2000). Organochlorine compounds in Florida feral pigs (*Sus scrofa*). *Bull Environ Contam Toxicol* 64: 347-353.
- OMS (1993). Evaluation of certain food additives and contaminants (41st Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) WHO Technical Report Series, no. 387. World Health Organization, Geneva.
- Oberheu DT, Dabbert CB (2001). Exposure of game birds to ochratoxin A through supplemental feeds. *J Zoo Wildl Med* 32: 136-8.
- Peñalver J (2004). Uso de los cadáveres de aves acuáticas en la monitorización de la exposición a plomo en el Parque Natural de «El Hondo». Aspectos en salud animal y salud pública. *Tesis Doctoral*. Universidad de Murcia.
- Pokorny B, Ribaric-Lasnik C (2000). Lead cadmium and zinc in tissues of roe deer (*Capreolus capreolus*) near the lead smelter in the Koroska Region (Northern Slovenia). *Bull Environ Contam Toxicol* 64: 20-26.
- Pokorny B, Ribaric-Lasnik C (2002). Seasonal variability of mercury and heavy metals in roe deer (*Capreolus capreolus*) kidney. *Environ Pollut* 117: 35-46.
- Przybycin J, Juszkiwicz T (1993). Residues of polychlorinated biphenyls in game animals. *Med Weter* 49: 318-319.
- Quidet P (1975). Results of investigations made in France in 1972, 1973, 1974 on the causes of mortality in game species. Influence of pesticides and evaluation of the risks respect to the nature of the products. *Phytoma* 269: 26-32.
- Rajzák P, Magic D, Ko_utzk_ J, Breyl I (2001). Foreign substances in small and hoofed game in the Slovak Republic during 1995-2000. *Slovak Veterinary J* 26: 276-282.
- Rimkus G, Wolf M (1987). Contamination of game in Schleswig-Holstein. 2. Residues of dieldrin, heptachlor epoxide and other cyclodiene insecticides in the liver fat of hares (*Lepus europaeus* L.). *Z Lebensm Unters Forsch* 184: 308-312.
- Rodziewicz L, Hajduk A (1989). Residues of organic chlorinated pesticides in the fat of game from eastern Poland. *Rocz Panstw Zakl Hig* 40: 26-28.
- Rodziewicz L, Hajduk A (1991). Residues of chloro-organic pesticides in the fat of game hunted in the eastern part of Poland in 1986-1989. *Medycyna Weterynaryjna* 47: 102-103.
- Rodziewicz L, Hajduk A (1995). Residues of chloro-organic pesticides in the fat of game from eastern Poland in 1990-1993. *Medycyna Weterynaryjna* 51: 199-200.
- Safe SH (1994). Polychlorinated biphenyls (PCBs): environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. *Crit Rev Toxicol* 24: 87-149.
- Santiago D, Motas-Guzmán M, Reja A, María-Mojica P, Rodero B, García-Fernández AJ

- (1998). Lead and cadmium in red deer and wild boar from Sierra Morena Mountains (Andalucía, Spain). *Bull Environ Contam Toxicol* 61: 730-737
- Soler-Rodríguez F, Oropesa-Jiménez AL, García-Camero JP, Pérez-López M (2004). Lead exposition by gunshot ingestion in red-legged partridge (*Alectoris rufa*). *Vet Hum Toxicol* 46: 133-134.
- Stickel LF (1973). Pesticide residues in birds and mammals. En: *Environmental pollution by pesticides*. Plenum Press, London. pp. 254-312.
- Swiergosz R, Perzanowski K, Makosz U, Bilek I (1993). The incidence of heavy metals and other toxic elements in big game tissues. *Sci Total Environ. Suppl Pt 1*: 225-231.
- Urieta I, Jalón M, Eguilero I (1996). Estimation of the dietary intake of organochlorine pesticides, heavy metals, arsenic, aflatoxin M1, iron, zinc through the total diet study, 1990/91. *Food Addit Contam* 13: 29-52.
- Vahteristo L, Lyytikäinen T, Venalainen ER, Eskola M, Lindfors E, Pohjanvirta R *et al* (2003). Cadmium intake of moose hunters in Finland from consumption of moose meta, liver and kidney. *Food Addit Contam* 20: 453-463.
- Zasadowski A, Amarowicz R, Terlecka A (1988). Residues of polychlorinated pesticides in fat and brain of game wild boars roes stags from Varmia and Mazuria region Poland. *Bromatol Chem Toksykol* 21: 125-130.
- Zasadowski A, Wyszynska A, Wysocki A (2003). Evaluation of the contamination degree of roe-deer with cadmium and polychlorinated biphenyls in Warmia and Mazury district. *Pol J Vet Sci* 6: 93-97.
- Zmudzki J, Niewiadowska A, Szkoda J, Semeniuk S. Organochlorine hydrocarbons and toxic elements in animal tissues. Proceedings of the 6th EAVPT Congress. 1994, pg 127-128.

Silvia Pichardo, Isabel M.^a Moreno, Angeles M.^a Jos, Ana M.^a Cameán

Introducción. Constituyentes de los plásticos. Migración. Ensayos de migración. Efectos de los procesos técnicos en el embalaje. Aspectos reguladores. Principales componentes plásticos migrantes. Bibliografía.

I. Introducción

Envasar los alimentos proporciona una eficaz barrera frente a agentes que puedan deteriorarlos como son los microorganismos, el oxígeno y la luz. Los materiales que se emplean para envasar alimentos son de naturaleza muy variada: madera, vidrio, cerámica, metales, tejidos, plásticos, etc., predominando el papel, cartón, vidrio y plásticos (Figura 23.1).

El contacto de distintos materiales con los alimentos se puede producir inicialmente durante la cosecha y el transporte. Sin embargo, es durante el empaquetamiento final donde se origina el contacto más importante entre el material y el alimento, lo que puede derivar, por ejemplo, en una migración de los constituyentes del embalaje al mismo.

Además de hacer mención de algunos desastres tóxicos producidos por cesión de los componentes de ciertos materiales en contacto con ali-

mentos, tales como la intoxicación parálitica por la mantequilla en EE UU en la década de los 60 (Repetto, 1997), consecuente al empleo de un papel plastificado con cresil-o-fosfato como envolvente, que fue absorbido por el alimento; no hay que descuidar los posibles efectos tóxicos que se pueden producir a largo plazo, como consecuencia de la exposición a pequeñas cantidades de ciertos componentes de estos materiales.

Veamos a continuación algunas de las características de los materiales más usualmente empleados en el embalaje de los productos alimenticios.

1. Papel

Se utiliza tanto en el embalaje primario (en contacto directo con el alimento) como en el secundario (cartonaje, envoltorio, etc.). El auge del empleo de papel y cartón reciclado como contenedores de alimentos, hace que se planteen nuevas posibilidades de migración, ya que además de contener mayor cantidad de metales pesados

que el papel normal, puede ceder sustancias provenientes de residuos (tintas de impresión, formaldehído, hidrocarburos aromáticos, volátiles) y de contaminantes (dibenzo-p-dioxinas policloradas (PCDD), dibenzofuranos policlorados (PCDF), aldehídos, alcanos, cetonas, ftalatos, hidrocarburos y elementos trazas) (Vasileios *et al.*, 2002). Hasta el momento, no existe un simulante de alimentos recomendado para poder estudiar la migración de elementos traza a partir del papel y cartón a los alimentos (Parry y Aston, 2004).

2. Vidrio

Es uno de los materiales de embalaje más empleados, ya que posee una buena estabilidad química, además de proporcionar una estructura tipo «barrera» impermeable a los gases, líquidos, vapores, olores y microorganismos.

Uno de los mayores problemas radica en la posible lixiviación de plomo en vidrios de alta calidad, que pueden contener hasta 30% de óxido de plomo (Barlow, 1999), ya que este material le confiere al vidrio su brillo, densidad y sonoridad.

Las disoluciones básicas contenidas en el vidrio provocan que este se destruya lentamente, incluso hasta su totalidad. En el caso del agua o agua acidulada las migraciones son del orden de partes por millón (ppm) a temperatura normal, mientras que a temperaturas superiores las migraciones se ven aumentadas por un factor de 10 o superior. Esto ocurre de forma general, de modo que siempre que aumenta la temperatura, aumenta la posibilidad de que el vidrio ceda alguno de sus componentes al alimento.

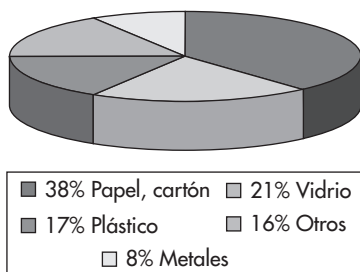


Figura 23.1. Naturaleza de los materiales de embalaje en Europa Occidental.

3. Cerámica

El contacto con los alimentos de este material puede dar lugar a la cesión de metales pesados solubles del esmalte, siendo el plomo y el cadmio los más frecuentemente implicados. Esta cesión ocurre principalmente en bebidas ácidas, como zumos de frutas o sidra (Deshpande, 2001).

La Directiva comunitaria de 15 de octubre de 1984 (82/74/CEE) fijó los máximos niveles permitidos de plomo y de cadmio, y también reflejó unas reglas básicas para la determinación de la liberación de estos metales tóxicos, empleándose como simulante el ácido acético al 4% en solución acuosa, y realizándose el ensayo a una temperatura de 22 ± 2 °C durante $24 \pm 0,5$ horas.

4. Textiles

Se han encontrado pocos problemas directos relacionados con el uso de textiles, que se emplean para embalar por ejemplo, arroz, legumbres, azúcar y harina. Pueden existir residuos de fibras en los alimentos, aunque de más interés puede ser la contaminación ocasional del alimento por contacto con productos químicos en superficies adyacentes.

5. Madera

El contacto con la madera es poco frecuente, se limita al contacto con materiales domésticos y agrícolas. Sin embargo, en algunas industrias, como la enológica, se persigue un contacto prolongado de vinos y alcoholes con este material, para conseguir su envejecimiento. Durante este proceso la madera cede al vino una cantidad importante de taninos, y a su vez el ácido tartárico y algunos colorantes procedentes del vino se fijan a las paredes del tonel contribuyendo a afinar el mismo.

6. Metales

Existe una gran variedad de metales constituyentes de materiales que se emplean para envasar alimentos.

Hojalata: es lámina de hierro cubierta de estaño; ha sido frecuentemente empleada para

conservar alimentos, especialmente en latas. El estaño, debido a baja toxicidad de sus especies inorgánicas ha sido utilizado para evitar los fenómenos de oxidación y corrosión del hierro. Los niveles de plomo y de arsénico contenidos en estos envases de estaño son muy bajos, ya que se emplea estaño fino que contiene menos de 0,5 partes por 100 de plomo y menos de 3/10.000 de arsénico. Gracias a los avances tecnológicos se ha conseguido reducir la ingesta de plomo a través de esta fuente de exposición.

De todas formas, por su toxicidad, se ha ido abandonando progresivamente la lata de hojalata, decantándose hacia las latas barnizadas por el interior.

También se utilizan latas de acero con revestimiento de cromo y de óxidos de cromo.

En estudios realizados por Schaefer *et al.*, (2004) se ha observado migración de ciertos componentes empleados en la fabricación de diversas aleaciones constituyentes de latas, principalmente epóxidos, además de metales, cuando estas son sometidas a 1.000 Da de presión.

Acero: no es un material muy utilizado en la industria de empaquetamiento de alimentos, aunque existen recipientes y toneles de acero inoxidable. La resistencia de los aceros a la corrosión se incrementa fuertemente cuando se disminuye el porcentaje de carbono y se incorporan, a niveles relativamente elevados, algunos metales como cobre, níquel, cromo, manganeso, molibdeno o vanadio. En la industria alimentaria, una fórmula de acero inoxidable muy utilizada es la que contiene 18/100 de cromo, 8/100 de níquel y 1,25 partes de molibdeno. Para los alimentos especialmente corrosivos debe utilizarse un acero más rico en molibdeno.

Hierro: la cesión de hierro a los alimentos se puede producir por contacto con las latas de conserva durante su almacenamiento o durante la preparación de los mismos en recipientes metálicos. Usualmente, el hierro no plantea problemas toxicológicos a las concentraciones que se alcanzan por estos fenómenos de cesión.

Aluminio: el contacto con el alimento puede darse por envoltorios (papel y cajas de aluminio, conservas) o utensilios de cocina. La capa

de alúmina que protege al metal es muy fina y tiene un carácter anfótero, por lo que se disuelve en los productos de tipo ácido y en los alcalinos, formando sales en el primer caso y aluminatos en el segundo. Actualmente esta capa de aluminio se ha sustituido por papel de estaño.

La cesión de aluminio al alimento es importante en el caso de las conservas ya que pueden contener hasta 20 mg del metal por kg. Posteriormente, gracias a los barnizados interiores de las latas de conservas, esa cantidad no excede de 50 mg/kg. Aunque no puede hablarse de una inocuidad total del aluminio por vía oral, estos niveles deberían tenerse en cuenta en el caso de que existiera otra vía de ingestión del metal; además, ha de ser objeto de especial atención en enfermos con determinadas patologías renales, habida cuenta de que está bien establecido que el aluminio es un elemento potencialmente neurotóxico y de que pueda estar implicado en la etiología y patogénesis de algunas enfermedades neurodegenerativas progresivas, como la enfermedad de Alzheimer (Domingo, 2000).

7. Plásticos

Son materiales resistentes y esenciales para embalaje. A pesar de los posibles problemas de cesión de materiales al alimento y de la preocupación de grupos ecologistas, su uso continúa creciendo, ya que sus beneficios compensan con creces sus aspectos negativos.

En realidad son pocos los polímeros que se usan en embalaje, siendo generalmente materiales de alto peso molecular (polímeros superiores) como polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS) y politereftalato de etileno (PET), además de otros materiales especializados como alcohol vinílico-etileno (VEO), polinaftalato de etileno (PEN), nylon y policarbonato (PC).

Así los podemos clasificar en:

- *Polímeros superiores*: se caracterizan por su inercia química y su insolubilidad, que se manifiestan claramente en el tubo digestivo animal y humano, determinando consecuentemente la ausencia de absorción intestinal y la eliminación total del polímero. Los enzimas gástricos

Tabla 23.1. Ejemplo de polímeros empleados en industria alimentaria como materiales de embalaje. (Tomado de *Handbook of food toxicology*, Deshpande 2001).

Polímeros	Ejemplos
Polietileno	Comonómeros de alquenos
Polipropileno	Comonómeros de etileno
Copolímero de acetato de vinilo y etileno	—
Copolímero de alcohol vinílico y etileno	—
Copolímero de acrilato de metilo y etileno	—
Ionómero	Etileno, acetato de vinilo, acrilato de isobutilo
Copolímero de acrilonitrilo	Comonómeros de estireno, butadieno, metilmecacrilato
Poliestireno	Comonómeros de butadieno, anhídrido maleico
Poli (acetato de vinilo)	Poli (acetato de vinilo)
Poli (cloruro de vinilo)	Etileno, propileno, comonómeros de acetato de vinilo
Poli (cloruro de vinilideno)	Cloruro de vinilo, acrilonitrilo, comonómeros de metacrilato
Poliisobutileno	Poliisobutileno
Poli (p-metil estireno)	Poli (p-metil estireno)
Poliamidas	Nylon 6:6, 6:10; Nylons (6, 11 y 12)
Poli (tereftalato de etileno)	—
Poli (éter sulfotato)	—
Polisulfona	Polisulfona
Policarbonato	Policarbonato
Poliuretano	Poliuretano
Poliésteres insaturados	Poliésteres insaturados
Poliacetal	Poliacetal

no pueden atacar las largas cadenas macromoleculares y, por tanto, no pueden fragmentar este material en fracciones digeribles.

- *Polímeros de bajo peso molecular*: frecuentemente carecen de inercia química y pueden ser solubles y, por tanto, absorberse. Sin embargo, cada gama de polímeros tiene su propia toxicidad, que no solo depende de su solubilidad.

Algunos ejemplos de los polímeros más empleados en la industria alimentaria se recogen en la Tabla 23.1.

Contituyentes de los plásticos

Ya que son los plásticos los materiales más ampliamente usados en la actualidad para el empaquetado, dedicaremos un apartado para estudiar brevemente la composición de los mismos.

Según el RD 118/2003, de 31 de enero, se entiende por materia plástica a todo compuesto macromolecular orgánico obtenido por polimerización, policondensación, poliadición u otro pro-

cedimiento similar a partir de *moléculas de peso molecular inferior* o por modificación química de macromoléculas naturales. Esas *moléculas de pesos moleculares inferiores* son monómeros (para las materias termoplásticas) y materiales base (para las resinas termoendurecidas).

La Directiva del Consejo del 18 de octubre de 1982 (Diario Oficial de las Comunidades Europeas del 23 de octubre de 1982) también consideraba materias plásticas las siliconas y otros compuestos macromoleculares lineales. Sin embargo, el Real Decreto 118/2003 excluye las siliconas de la definición de materiales plásticos, ya que son materiales elastoméricos, los cuales no están dentro del ámbito de aplicación de dicho Real Decreto.

Los elastómeros forman un importante grupo de la química macromolecular que se caracteriza por su gran elasticidad. Junto al prototipo de elastómero, que es el caucho natural, se encuentran una serie de polímeros orgánicos de elevado pH como son los cauchos sintéticos (polibutadieno, polisobutileno, polisulfuros orgánicos,

poliuretano) y los cauchos de siliconas. Todos ellos son sometidos a un procedimiento de vulcanización. También se les añaden varios coadyuvantes como: agentes vulcanizantes (azufre, peróxidos), aceleradores de vulcanización, activadores, antioxidantes, desactivadores.

Las materias plásticas se clasifican en las siguientes grandes familias:

- Resinas termoendurecidas.
- Derivados celulósicos.
- Derivados polivinílicos y polivinilidénicos.
- Derivados poliacrílicos.
- Poliestirenos y copolímeros.
- Poliolefinas y copolímeros.
- Poliamidas.
- Poliuretanos.
- Resinas epoxi.
- Poliésteres saturados e insaturados.

Las principales bases de polímeros para la formación de plásticos son los derivados de la industria del petróleo, tales como el estireno o el cloruro de vinilo. Existen otras numerosas sustancias que se emplean como aditivos de plásticos o coadyuvantes en alguno de los procesos de fabricación, como son: plastificantes, estabilizadores, coloides protectores, sustancias absorbentes de los rayos ultravioleta, lubricantes externos y/o internos, antiestáticos, etc.

Todos los componentes de los plásticos pueden ser fuente de migración y ser cedidos al alimento:

1. Residuos de la polimerización: incluyendo monómeros y oligómeros, catalizadores, disolventes, emulsionantes, humectantes, impurezas de la materia prima, contaminantes de plantas, inhibidores, etc.
2. Coadyuvantes del proceso: antioxidantes, agentes antiestáticos, estabilizadores de luz y de calor, plastificantes, lubricantes, pigmentos, fungicidas, etc.

Migración

La migración consiste en la cesión por parte del material que contiene al alimento de determina-

das sustancias, que pasan así a dicho alimento. El fundamento fisicoquímico de la migración consiste en que al unir varios sistemas químicos inicialmente separados, en este caso, el alimento, el envase y el aire, los componentes tienden a distribuirse en todas las fases. Pasan compuestos del envase al alimento, pero también del alimento al envase y de este al aire. Es un sistema en movimiento hasta que se alcanza el equilibrio.

La migración de sustancias hacia el alimento puede tener dos consecuencias adversas: puede conferir sabores y olores indeseables al alimento y puede hacer que el alimento sea potencialmente tóxico, siendo esto último más importante desde un punto de vista toxicológico. Hay casos en los que la sustancia migrante no llega a alcanzar niveles tóxicos pero sí puede dar lugar a un detrimento de las características organolépticas del alimento. Por ejemplo, el monómero plástico estireno puede ser detectado organolépticamente por una proporción sustancial de la población a niveles menores de los actuales límites reguladores de migración específica (Barlow, 1999).

Los esfuerzos tanto internacionales como nacionales se concentran en estudiar la toxicidad potencial de las sustancias migrantes. La valoración del riesgo de migración de sustancias depende varios factores como la toxicidad inherente de la sustancia y el nivel de exposición del individuo conocido o previsto. Aunque la composición inicial de cualquier envase puede ser conocida, el comportamiento de sus constituyentes ya en contacto con el alimento puede variar.

La migración depende de varios factores generales:

- La concentración del residuo o contaminante en el material de envase.
- El grado en el que se mueven por la matriz del material.
- El grosor del envase.
- La naturaleza del alimento que está en contacto con el material de envase.
- La solubilidad de la sustancia en el alimento.
- La duración y la temperatura a la que se produce el contacto.

Los valores de los niveles de migración pueden obtenerse directamente por análisis del alimento o indirectamente por el uso de los simuladores de alimentos. La rapidez con la que se produce la migración viene determinada por las propiedades del migrante, del polímero, de la temperatura y el simulador del alimento. Debido a que el migrante pasa a través de huecos entre las moléculas del polímero, la velocidad de la migración depende del tamaño y forma del migrante y del tamaño y número de huecos.

También depende de las propiedades del polímero como la densidad, cristalinidad y grado de reticulación y ramificación. Asimismo, es importante la temperatura de transmisión del cristal del polímero (T_g) que determina la flexibilidad de sus moléculas. Por debajo de T_g , las moléculas del polímero están rígidas (estado cristalino) y la probabilidad de que un migrante encuentre un hueco lo suficientemente grande es limitada. Por encima de T_g , las moléculas del polímero son altamente flexibles (estado elástico), aumentando la probabilidad de migración. Por lo tanto, en general, mientras más baja sea la T_g del polímero, más alta será la velocidad de

migración en este. Sin tener en cuenta la T_g , a mayor temperatura, mayor flexibilidad de las moléculas del polímero y por tanto, mayor velocidad de migración (Brydson, 1995).

Las propiedades termodinámicas como la polaridad y la solubilidad influyen en la migración debido a las interacciones entre el polímero, el migrante y el simulador de alimento. Por ejemplo, si el migrante tiene una solubilidad baja en el simulador de alimento, este permanecerá en el polímero en vez de migrar hacia el simulador de alimento. Este es, a menudo, el caso de aditivos apolares que se encuentran en polímeros apolares, como los polietilenos de baja densidad (LDPE), polipropileno (PP) y poliestireno (PS) en contacto con simuladores de alimento, como agua o ácido acético al 3%.

Existe una gran variedad de sustancias que migran desde el envase hasta el alimento que envuelven. Las más estudiadas, debido al auge de su empleo y a los problemas de toxicidad que conllevan, son aquellos migrantes procedentes de envases plásticos.

En la Tabla 23.2 se exponen algunos polímeros encontrados en envases de alimentos, y sus aplicaciones.

Tabla 23.2. Polímeros comúnmente encontrados en envases de alimentos incluyendo sus T_g y ejemplos de migrantes. (Tomado de Helmroth *et al.*, 2002).

Polímero	T_g (°C)	Posibles migrantes	Aplicación en alimentación
LDPE (Polietileno de baja densidad)	-20	Antioxidantes ^a , antiestáticos ^a , pigmentos ^a , lubricantes ^a , antideslizantes ^a .	Películas, bolsas de charcutería y envoltorios.
HDPE (Polietileno de alta densidad)	-20	Igual que el anterior.	Botellas, tapaderas y tapones, bolsas de charcutería, envases de cereales.
PP (Polipropileno)	+5	Antioxidantes ^a , pigmentos ^a , absorbentes UV ^a .	Envoltorios de caramelos, bolsas de aperitivos, tapas, botes de margarina, tapones.
PS (Poliestireno)	+90 - +100	Estireno ^b , absorbentes UV ^a , modificadores de alto impacto ^a .	Bandejas de carne y galletas, contenedores de comida rápida, botellas.
APET (Tereftalato de poliestireno)	+67	Ácido tereftálico ^b , trímeros de PET ^b , catalizadores ^a .	Botellas, bandejas para horno.
PVC (Cloruro de polivinilo)	+80	Estabilizadores ^a , plastificantes ^a , pigmentos ^a , cloruro de vinilo ^b .	Película para carne y queso.
PC (Policarbonato)	149	Bisfenol A ^a , emulsionante ^a , antioxidante ^a .	Botellas, envoltorios, bandejas para horno.

a Aditivos. b. Monómeros.

Ensayos de migración

La evaluación toxicológica de los componentes de los plásticos se basa en el estudio de la migración de dichos componentes y de otros materiales que puedan pasar al alimento, y la posterior evaluación de su toxicidad, siendo por ello fundamental realizar los estudios de la potencial migración.

Existen dos tipos de ensayos de migración: la migración global y la migración específica.

Las normas de la UE, y consecuentemente las españolas, exigen que se mida primero la migración global, es decir, ver cuál es la cantidad total de compuestos que migran en las condiciones de peor uso. Una vez superado este ensayo, el material debe pasar los ensayos de migración de compuestos específicos, de nuevo, en las condiciones de peor uso.

Migración global: nos ofrece un aspecto cuantitativo del problema, que resulta útil para apreciar la compatibilidad del material.

La Directiva del Consejo del 18 octubre 1982 (82/711/CEE) establece las bases necesarias para la verificación de la migración de los constituyentes de los materiales y objetos de plástico en contacto con los alimentos.

Para realizar la prueba se utilizan los siguientes simuladores, en función de la naturaleza del alimento:

- Agua destilada o de calidad equivalente.
- Ácido acético al 3% (p/v) en disolución acuosa.
- Etanol al 15% (v/v) en disolución acuosa.
- Aceite de oliva refinado, o de girasol, o triglicéridos sintéticos con las especificaciones precisas.

También se especifican en esta directiva los distintos tiempos y temperaturas que se deben emplear en función de las condiciones de contacto derivados del uso real.

Migración específica: el mejor conocimiento de la composición de los plásticos, unido al desarrollo de métodos analíticos de determinación de componentes de los mismos, han hecho

posible que se realicen ensayos de migración específica sobre los diversos coadyuvantes de las materias plásticas y de sus monómeros y oligómeros residuales.

Las técnicas analíticas más empleadas son: la Cromatografía Gaseosa (CG) y la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) para valorar niveles de migración de diversos constituyentes o la espectrometría de absorción atómica (EAA) para la evaluación de cantidades trazas de metales.

En los experimentos de migración específica, el plástico se pone en contacto con simuladores de alimentos y se someten a condiciones de tiempo y temperaturas definidos.

La migración de aditivos o contaminantes del envase polimérico al alimento puede separarse en 3 fases interrelacionadas:

1. Difusión desde el interior del polímero.
2. Solvatación en la interfase del polímero.
3. Dispersión en la masa alimentaria.

1. *Difusión desde el interior del polímero.*

La migración de sustancias está controlada por la difusión, que sigue un movimiento browniano de las moléculas desde la matriz polimérica. Se ha demostrado que en muchos casos este modo de transporte molecular sigue las leyes de Fick (Lau y Wong, 2000).

Primera ley de Fick: $F = - D_p \delta C_p / \delta x$

Segunda ley de Fick: $\delta t / \delta C_p = D_p \delta^2 C_p / \delta x^2$

F = velocidad de transporte por unidad de área del polímero.

D_p = coeficiente de difusión del migrante en el polímero.

C_p = concentración del migrante en el polímero.

x = espacio de la interfase.

t = tiempo transcurrido.

2. *Solvatación en la interfase del polímero.*

En esta etapa, los migrantes se mueven debido al fenómeno de solvatación por el alimento. Si el migrante se reparte bien en el alimento, por ejemplo, es más soluble en el alimento que en el polí-

mero, el perfil de la concentración del migrante es uniforme y continuo, lo que facilita la velocidad de migración hacia el alimento. Por contraste, si el migrante se reparte poco en el alimento, el perfil de concentración puede ser discontinuo, lo que retrasa la velocidad de migración hacia el alimento. Ello justifica los serios problemas de contaminación en alimentos grasos, ya que la mayoría de los polímeros son solubles en grasa. Por ejemplo, la migración de sustancias adiposas desde películas de PVC hacia el queso varía exponencialmente con el contenido de grasa en el mismo (Lau y Wong, 1996).

3. *Dispersión en la masa alimentaria*: en esta fase, las moléculas de migrante solvado se difunden fuera de la interfase y pasan al alimento. La migración en esta fase, al igual que en las dos anteriores, está conducida por la entropía. Limm y Hollifield (1995) demostraron que el mezclado puede aumentar la migración hacia el alimento. La solubilidad del migrante y el coeficiente de difusión son los principales factores que gobiernan la dispersión del migrante hacia el alimento, afectando así a la velocidad de migración en general.

Los ensayos de migración tienen como inconvenientes principales el tiempo de ejecución y su elevado coste.

Para superar estas dificultades diversos investigadores han propuesto el uso de modelos predictivos de migración. En Europa se debate sobre la posibilidad de basar la aprobación de materiales de envasado en dichos modelos predictivos. En la Directiva de la Comisión 90/128/EEC se recoge el uso de «modelos de difusión generalmente reconocidos» como una alternativa al método de ensayo. Existen varios modelos matemáticos, de forma que los resultados de una aproximación se dan como una probabilidad de distribución que muestra aquellos valores de migración que son los que más probablemente ocurran en una combinación dada de envase/alimento y bajo condiciones dadas de tiempo y temperatura (Chatwin y Katan, 1989; Lum Wan *et al.*, 1995; Petersen, 2000).

Los valores de los niveles de migración pueden obtenerse directamente por análisis directo

del alimento o indirectamente por el uso de los simuladores de alimentos, ya mencionados.

El uso de simuladores de alimentos para determinar niveles de migración potencial desde el envase tiene una gran aplicación, particularmente en el contexto de la toxicología reguladora. Suelen aplicarse factores de corrección a los resultados, sobre todo en el caso de simuladores de alimentos grasos, ya que estos tienen una mayor capacidad de extracción que el propio alimento. Tanto en EE UU como en la Unión Europea, las condiciones de todos los ensayos tales como el tiempo de contacto o la temperatura, están especificados para cada caso, intentando que se acerquen lo más posible a las condiciones de contacto reales.

La información obtenida de los ensayos de migración debe ser utilizada para estimar la exposición dietética. La ingesta diaria admisible (IDA) se calcula multiplicando el valor de migración de los simuladores de alimentos por los factores de consumo, dando lugar a la concentración total en la dieta.

En términos generales, un número considerable de sustancias migran hacia el alimento superando los 5 mg/kg de alimento. Esto es particularmente cierto en el caso de aditivos de plásticos solubles en grasas. Algunos datos de estudios realizados en el Reino Unido han revelado que la migración de algunos plastificantes hacia alimentos grasos como queso, carne, pasteles, sándwiches y dulces puede alcanzar niveles superiores a 5 mg/kg de alimento (MAFF, 1987; MAFF, 1990).

La extensión de los estudios toxicológicos, como hemos comentado, depende del grado de exposición, asumiendo que 1 kg de alimento está en contacto con 600 cm² de superficie de plástico y que un adulto de 60 kg consume 1 kg del alimento al día.

En función de la migración, superior a 5 mg/kg, entre 0,05 – 5 mg/kg (lo cual equivale a una ingesta máxima de 0,1 mg/kg/día), e inferior a 0,05 mg/kg (ingesta máxima de 1 µg/kg/día) los requerimientos de los estudios toxicológicos son inferiores. Por analogía a las IDA de los aditivos, se establecen la ingesta diaria tolerable (TDI),

que son transformadas en valores límite de migración específicos (valores SML).

Efectos de los procesos técnicos en el embalaje

Se están empleando nuevas técnicas en la industria alimentaria para mejorar la seguridad de los productos alimentarios, como son: el tratamiento con alta presión, radiaciones, luz y campos eléctricos de alta intensidad. Algunos de estos procesos, como el tratamiento con altas presiones, radiaciones y ozono, necesitan que el alimento sea tratado dentro del envase. Además, algunas de estas técnicas podrían ser utilizadas en la desinfección o esterilización del envase. La exposición a las condiciones de los distintos procesos puede alterar las propiedades físicas o químicas del embalaje, y estas modificaciones podrían tener un efecto en la calidad de los productos alimenticios envasados.

Microondas: el tratamiento con microondas proporciona una gran reducción del número de microorganismos en películas de PET, aunque no consiga la esterilización. Las microondas son radiaciones no-iónicas, y no tienen energía suficiente para romper ningún enlace químico.

La mayoría de las investigaciones en este área están encaminadas a la determinación de la migración de aditivos del material de embalaje cuando se utiliza un tratamiento de microondas. Este interés por el estudio de la migración se debe a las altas temperaturas que se alcanzan durante el cocinado. Los materiales más frecuentemente usados en embalaje que son tratados con microondas son: PET (politereftalato de etileno) PP (polipropileno), EVOH (etilenvinilalcohol), PVdC (policloruro de vinilideno) y PE (polietileno). La extensión de migración de estos compuestos depende de la temperatura obtenida durante el cocinado, del tiempo de exposición y contacto con el alimento y de la naturaleza de la superficie del mismo. La migración de estos compuestos depende de la tempe-

ratura obtenida durante el cocinado, del tiempo de exposición y contacto con el alimento y de la naturaleza de la superficie de contacto (Ozen y Floros, 2001).

Radiaciones ionizantes: aunque las radiaciones son un método muy efectivo para reducir la población de microorganismos, inhibir su proliferación y controlar la infestación por insectos, sus aplicaciones comerciales han sido limitadas debido a la desconfianza del consumidor acerca de la seguridad de los alimentos irradiados. Sin embargo, el Comité Mixto de Expertos FAO/IAEA/WHO aprobó el uso del tratamiento de los alimentos con radiaciones de hasta 10 kGy en 1980. Después de esta fecha, nuevas regulaciones permiten el uso de radiaciones en alimentos, lo cual no estaba permitido anteriormente en EE UU. Hoy en día, más de 40 países permiten el uso de radiaciones en más de 60 productos alimentarios. El tratamiento con radiaciones se está convirtiendo en un procedimiento común para esterilizar envases en procesos asepticos de alimentos y medicamentos (Deshpande, 2002). (Véase capítulo Irradiación de alimentos).

Luz UV y tratamiento con ozono: el ozono es un poderoso oxidante/desinfectante empleado en el tratamiento de alimentos y materiales de envasado, por ser efectivo frente a un amplio rango de microorganismos, incluyendo bacterias, virus, hongos y esporas. Otra área de aplicación del ozono es la esterilización de materiales de envasado de alimentos. Se ha observado una reducción en la carga bacteriana de películas plásticas tratadas con agua ionizada (Khadre *et al.*, 1999). El ozono reacciona principalmente con la superficie de los polímeros y causa modificaciones en las propiedades de la superficie del mismo como la polaridad y la tensión superficial, debido a la formación de especies reactivas de oxígeno y a la degradación de cadenas de polímeros.

La luz ultravioleta es también uno de los métodos más utilizados en la esterilización de envases en procesamientos estériles, y es muy efectiva en el rango de 250-280 nm frente a microorganismos (Robertson, 1993).

Como el polipropileno (PP) es transparente para la luz UV, el tratamiento únicamente con ozono para este determinado polímero es más efectivo como tratamiento de superficie en comparación con la radiación UV. Sin embargo, el tratamiento con UV es más efectivo para el politereftalato de etileno (PET) (Strobel, 1995; Walzak *et al.*, 1995). Los polímeros tienen diferente mecanismo de oxidación durante el tratamiento con luz UV y ozono. Mientras la oxidación debida a la exposición con UV ocurre por un mecanismo en cadena, la oxidación por ozono tiene un carácter local (Karpova *et al.*, 1991).

Alta presión: este proceso es un método para el tratamiento de alimentos con mínimas pérdidas de calidad. Los alimentos que se tratan con este proceso se envasan y después se colocan en una cámara de presión. La presión que se alcanza supera los 400 MPa y se mantiene durante 5-20 minutos. La presión de vapor y la permeabilidad de oxígeno de varias películas plásticas laminadas, entre los que se encuentra PP/EVOH/PP, no se vieron afectadas a altas presiones entre 400 y 600 MPa (Ochiai *et al.* 1992). En ensayos con 8 películas laminadas (PET/SiO_x/PU adh/LDPE, PET/Al₂O₃/PU, adh/LDPE, PET/PVdC/Nylon/HDPE/PP, PE/Nylon/EVOH/PE, PE/Nylon/PE, PET/EVA/PP) después de un proceso de alta presión a 600-800 MPa, el PET metalizado fue la única película con un aumento significativo de la permeabilidad al oxígeno, dióxido de carbono y vapor de agua (Caner *et al.*, 2000).

Otros procesos: el dióxido de cloro es un gas oxidante, efectivo frente a un amplio rango de organismos, incluyendo bacterias, hongos y virus. Hay varios ejemplos del tratamiento con dióxido de cloro de diversos alimentos: verduras, pescados, carnes, aves (Costilow, 1984; Lin, 1996; Cutre, 1995; Tsai, 1995). Este gas también se utiliza en la desinfección de equipos de procesado, dispositivos médicos y envases de alimentos. Han *et al.* (1999), concluyeron que el dióxido de cloro puede inactivar eficazmente los organismos que quedan en la superficie de los tanques de fabricación, como desperdicios de la fabricación de zumos. En otro estudio se consiguió reducir la población de

Escherichia coli de una superficie de acero inoxidable en 4 minutos con un tratamiento de dióxido de cloro de 14 mg/L.

El tratamiento con ultrasonidos se ha empleado para detectar pérdidas de contenido en el envase y para controlar la calidad microbiana de algunos alimentos (Ahvenainen *et al.*, 1989). Banerjee *et al.*, (1996), comprobaron que la aplicación de dicho tratamiento en películas comestibles de caseinato sódico, aumentaba de forma considerable la fuerza tensil y la resistencia al pinchazo de estas películas, mientras que otras propiedades no se afectaron.

Las modificaciones en las propiedades de los materiales de embalaje debido a estos procesos no tienen necesariamente que conllevar implicaciones negativas. Algunos de estos procedimientos pueden utilizarse para añadir propiedades deseables a los materiales, como aumentar la adherencia de algunos plásticos después de un tratamiento con ozono.

Aspectos reguladores

La situación a escala mundial de estos productos se caracteriza por una gran abundancia de normativas legales, regidas por dos principios fundamentales: principio de nocividad y principio de inercia.

Las diferentes reglamentaciones se han preocupado de:

1. Autorizar o prohibir el empleo de los productos o materias que intervienen en la composición o en la elaboración de los plásticos.
2. Buscar sistemas simuladores representativos de los alimentos.
3. Determinar condiciones convencionales de tiempo y temperatura representativas de las condiciones reales del contacto alimento/embalaje.
4. Fijar límites de migración global y migraciones específicas.
5. Definir los métodos de ensayo y analíticos.

En la UE, los materiales plásticos en contacto con los alimentos están regulados a nivel comunitario, emitiéndose varias directrices sobre definición de los materiales y objetos en materia plástica, simulantes, condiciones de ensayo, etc., modificándose la Directiva 90/128/CEE relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios (Directiva 2002/72/CEE).

El Real Decreto 1425/1988, de 25 de noviembre, incorporó al ordenamiento jurídico nacional las directivas comunitarias relativas a los materiales y envases destinados a entrar en contacto con los alimentos. Posteriormente, se aprobó la lista de sustancias permitidas para la fabricación de materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos y se regularon determinadas condiciones de ensayo, en el Real Decreto 2207/1994, de 16 de noviembre. Este último Real Decreto se fusiona junto a otros dos (1752/1998 y 442/2001) en un único texto para mayor simplificación y claridad en el Real Decreto 118/2003, en el que se aprueba la lista de sustancias permitidas para la fabricación de materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos y se regulan determinadas condiciones de ensayo.

El RD 118/2003 establece los límites de migración global y específica para todos los materiales y objetos plásticos permitidos en la industria alimentaria, como se ilustra en la Tabla 23.3.

Siendo:

- *LME*: límite de migración específica en alimentos o simulantes alimenticios. A efectos de dicho RD «LME» significa que la migración específica de la sustancia se determinará por un método analítico validado que posea un límite de detección acorde con lo exigido por su LME. Se expresa en miligramos (mg) de constituyentes liberados por kilogramo (kg) de producto alimenticio.
- *LD*: límite de detección del método de análisis.
- *CM*: cantidad máxima permitida de sustancia «residual» en el material u objeto.

Principales componentes plásticos migrantes

Los monómeros y otros componentes empleados para la fabricación de plásticos son sustancias generalmente tóxicas, por lo que conviene eliminar al máximo su presencia en los alimentos. Sería complicado desarrollar los aspectos toxicológicos particulares de cada sustancia incluida en la lista infinita de compuestos migrantes potencialmente tóxicos. Por lo cual, intentaremos remarcar los aspectos principales basándonos en algunos ejemplos concretos.

Tabla 23.3. Algunos ejemplos de la lista autorizada de monómeros y otras sustancias de partida, RD 118/2003.

Número CAS	Nombre	Restricciones y/o especificaciones
000108-05-4	Acetato de vinilo	LME = 12 mg/kg.
000107-13-1	Acilonitrilo	LME = no detectable (LD = 0,020 mg/kg, tolerancia analítica incluida).
000106-99-0	Butadieno	CM = 1 mg/kg en PT o LME = no detectable (LD = 0,02 mg/kg, tolerancia analítica incluida).
000079-39-0	Metacrilamida	LME = no detectable (LD = 0,02 mg/kg, tolerancia analítica incluida).
000075-01-4	Cloruro de vinilo	CM = 1 mg/kg en PT. LME = 0,01 mg/kg.
000075-35-4	Cloruro de vinilideno	CM = 5 mg/kg en PT o LME = ND (LD = 0,05 mg/kg).

1. Cloruro de vinilo (PVC)

Es un monómero gaseoso a temperatura ambiente, ligeramente soluble en agua, soluble en etanol y en sustancias grasas.

El PVC flexible se emplea en películas plásticas para envolver alimentos y tapones de botellas. Las láminas semirígidas de PVC se emplean con el objeto de fabricar envoltorios de uso alimentario y el PVC rígido se utiliza para botellas.

Fue en 1965 cuando se comprobaron por primera vez sus efectos tóxicos, demostrándose su acción anestésica, y posteriormente en 1966 se descubrió un síndrome que presentaban los obreros que limpiaban manualmente los autoclaves de polimerización de cloruro de vinilo. En 1971 se observaron sus efectos cancerígenos, especialmente en ratas Wistar expuestas durante un año a una atmósfera con 30.000 ppm de este monómero (Lefaux, 1999). La Agencia Internacional de Investigación del Cáncer, IARC, revisó en 1973 los estudios observados de seguridad en humanos del cloruro de vinilo, siendo los principales efectos tóxicos las lesiones óseas, fundamentalmente en la última articulación de los dedos, así como cambios histopatológicos en hígado y bazo. De hecho, este compuesto se encuentra clasificado por la IARC en el grupo 1 (carcinógeno con evidencia suficiente).

A partir de estos estudios, a los que se sumaron otros posteriores, se empezaron a tomar medidas, principalmente en toxicología alimentaria, para disminuir al máximo las cantidades de polímero residual en los objetos de cloruro de polivinilo o de copolímero de vinilo.

Así, la Directiva del 30 de enero 1978 (DO de las Comunidades Europeas de febrero 1978) exige que los materiales y objetos preparados con polímeros o copolímeros de cloruro de vinilo no contengan más de 1mg de este por kg de material final. Los materiales y objetos de este material no deben liberar monómeros a los alimentos.

Según el Real Decreto 118/2003 la cantidad máxima permitida del cloruro de vinilo residual en el material u objeto es de 1 mg/kg y el límite

de migración específica en alimentos o en simulantes alimenticios es 0,01 mg/kg.

2. Formol

El formaldehído es la materia base de las resinas termoendurecidas. Las disoluciones de formol son irritantes de la mucosa bucal, garganta y estómago. Es muy tóxico por vía oral y tiene acción necrótica sobre los tejidos (Repetto, 1997).

En 1983, Mestres *et al.*, investigaron los residuos de barnices epoxifenólicos para el revestimiento interior de las latas de conserva metálicas, ya que durante la cocción de la mezcla de las resinas epoxi y los agentes endurecedores (resina formofenólica) se libera formaldehído.

El formaldehído pertenece al grupo 2B de la IARC. Así mismo, está comprobada la acción teratogénica del formaldehído, ya que atraviesa la placenta y el tejido fetal, causando daños en embriones y fetos de ratas (Thrasher, 2001).

3. Acrilonitrilo

Los copolímeros que contienen baja cantidad de acrilonitrilo (30%), como acrilonitrilo/butadieno/estireno (ABS), se emplean para el embalaje de tartas, tubos de margarina, productos lácteos y ensaladas.

Los copolímeros con 70% de acrilonitrilo, al tener una buena barrera para gases, se utilizan para fabricar botellas para bebidas carbonatadas y alimentos sensibles al oxígeno como aceites vegetales.

El acrilonitrilo tiene una dosis letal (DL₅₀) de 80-90 mg/kg de peso en rata y 27 mg/kg en ratón. Se convierte en un mutágeno tras ser activado por enzimas hepáticas. Además, existen evidencias de carcinogenicidad en animales y posiblemente en humanos, encontrándose en el grupo 2B (IARC, <http://www.iarc.fr/>).

4. Cloruro de vinilideno

La DL₅₀ para ratas es de 1.500 mg/kg y 200 mg/kg en ratón. Este monómero afecta a la

actividad de varias enzimas hepáticas y disminuye los niveles de glutatión reducido. Se ha observado la producción de tumores en animales de experimentación tras exposiciones prolongadas, aunque no se han producido efectos teratogénicos. La principal vía de excreción es la pulmonar, y algunos metabolitos se excretan por vía renal. Es un compuesto muy peligroso, pertenece al grupo 1 de la IARC (IARC, <http://www.iarc.fr/>).

5. Estireno

Es de los monómeros de más amplio uso. Concentraciones elevadas de estireno en alimentos debida a la migración desde el embalaje, afectan a los niveles de dopamina sanguíneos, y por tanto a las funciones hipotalámicas y de la pituitaria. Está clasificado por la IARC en el grupo 2B, posiblemente carcinógeno en humanos. La DL_{50} para ratas es 5 g/kg. Se metaboliza a óxido de estireno (estireno-7,8-óxido), que es un potente mutágeno, ya que se une covalentemente al ADN.

6. Di (2-etilhexil)ftalato (DEHP)

Es un plastificante que forma parte de la composición de compuestos flexibles de PVC. Posee una toxicidad aguda por vía oral baja. Su DL_{50} es aproximadamente 30 g/kg de peso corporal. Ha demostrado ser hepatocarcinógeno en rata y ratón, produciendo adenomas y carcinomas hepáticos. Un estudio concluyó que altas dosis de DEHP causan perturbaciones del metabolismo lipídico en hígado de rata.

El comité JECFA en la revisión en 1984 sobre esta sustancia recomendó que los niveles de DEHP en contacto con el alimento y las migraciones que de este se deriven deben mantenerse en los mínimos niveles que la tecnología lo permita.

El DEHP, y en general, todos los ftalatos orgánicos, son solubles en las materias grasas y productos alcohólicos. Por ello, las materias plastificadas con ftalatos no deben estar en contacto con este tipo de alimentos.

7. Dibutiril ftalato

Es un líquido oleoso incoloro de baja toxicidad aguda empleado como plastificante que produce cierta proliferación de peroxisomas en roedores. Además, existe evidencia de daño testicular por este compuesto.

8. Difetil cresil fosfato y tricresil fosfato

Son mezclas líquidas de cresilderivados. Se fabrican y utilizan como una mezcla de isómeros. El contenido esterificado de o-cresol depende del proceso de producción, y este es metabolizado a fenilsaligenin fosfato, un compuesto neurotóxico (Löser y Stropp, 1999).

9. Di(2-etilhexil)adipato (DEHA)

Esta sustancia plastificante posee una baja toxicidad aguda en animales de experimentación por vía oral y dérmica. En estudios de administración de dosis repetidas se observó que induce la proliferación de peroxisomas. La hepatocarcinogenicidad ha quedado demostrada en ratón pero no en rata (IARC, 2000). Un estudio realizado en Dinamarca demostró que los consumidores de quesos podían estar expuestos a niveles próximos a la ingesta diaria tolerable de 0,3 mg/kg peso corporal de DEHA establecida por el Comité Científico de Alimentos de la UE (Food Research Institute, 1996).

La exposición ocupacional al DEHA ocurre durante su producción y sus usos como plastificante y lubricante. Su presencia como plastificante en películas de cloruro de polivinilo para envolver numerosos alimentos hace que la población esté expuesta frecuentemente a dicho compuesto (IARC, 2000).

10. Antioxidantes

El butilhidroxianisol y butilhidroxitolueno (BHA y BHT, respectivamente) son fenoles que se utilizan por sus propiedades antioxidantes en la fabricación de plásticos. Se han detectado cesiones de BHA y BHT en aceites durante el almacenado (Tawfit *et al.*, 1997). El BHT posee una toxicidad

aguda baja que consiste en una leve irritación ocular y dérmica. Sin embargo, altas dosis repetidas de BHT en animales de experimentación producen daño tisular en hígado, pulmón y riñón. Por acción antagónica del BHT con la vitamina K se puede producir hemorragia diatéctica.

Los estudios sobre el BHA han llegado a conclusiones tan dispares como que se considere sustancia anticarcinógena, carcinógena o promotora de tumores. Dosis superiores a 3.000 ppm inducen carcinoma en el estómago anterior de roedores. Los humanos no poseen estómago anterior, por lo cual se prevé que sean menos sensibles al BHA que los roedores; a pesar de todo el BHA está clasificado en el grupo 2B por la IARC (IARC, <http://www.iarc.fr/>).

11. Aceleradores de la vulcanización

Son compuestos que se utilizan en la obtención del caucho tanto natural como sintético. Algunos de estos compuestos son las nitrosaminas que migran del caucho que las contiene en objetos como tetinas, chupetes, etc. Debido a la conocida toxicidad de las nitrosaminas (son sustancias mutagénicas y probablemente o posiblemente carcinógenas), esto supone un problema toxicológico importante. Actualmente existen otras fórmulas de silicona que siguen procedimientos de fabricación cuyo resultado son objetos libres de posibles derivados aminados y de nitrosaminas.

12. Otros tipos de plásticos que pueden ceder sustancias tóxicas

- Los contenedores de agua mineral de polietileno de baja densidad (LDPE) pueden ceder componentes, con ayuda de la exposición a la luz, como butil vinilcetona, benzofenona y algunos butilftalatos derivados de la tinta, que confieren mal olor al agua. Aditivos utilizados en plásticos PVC y LDPE migran en simulantes de grasas, como es el caso de amidas de ácidos grasos. También se ha detectado naftaleno en bebidas lácteas empaquetadas en contenedores de LDPE.

- Diversos aceites minerales presentes en plásticos pueden migrar a alimentos lácteos y margarina.
- Disolventes residuales de la tinta de impresión de los contenedores de alimentos también pueden migrar, siendo el tolueno el disolvente con mayor grado de migración.
- En los papeles reciclados que se emplean en contenedores de alimentos, pueden quedar componentes químicos que no se destruyen y son potenciales migrantes como diisopropilnaftalenos o terpenilos hidrogenados.
- Se han encontrados sustancias como las denominadas BADGE (bisfenol A diglicidil éter) que poseen actividad estrogénica. Estas sustancias se emplean como aditivos para plásticos de revestimiento que se emplean en el embalaje de alimentos. También se estudia su teratogenia y su potencial como disruptor endocrino (Nakazawa *et al.*, 2002).
- Un estudio en Noruega, sobre la migración desde cañerías de plástico hacia el agua de bebida, demuestra que algunos componentes orgánicos volátiles migran de plásticos como HDPE o PVC, los cuales forman parte de las cañerías empleadas en la red de distribución de agua de bebida, con el consiguiente riesgo toxicológico (Skjevraak *et al.*, 2002).

Bibliografía

- Ahvenainen R, Wirtanen G, Manninen M (1989). Ultrasound imaging a non-destructive method for control of the microbiological quality of aseptically packed foodstuffs. *Lebensmittel-Wiss* 22: 273-278.
- Banerjee R, Chen H, Wu J (1996). Milk protein-based edible film mechanical strength changes due to ultrasound process. *J Food S* 61: 824-828.
- Barlow SM (1999). Safety assessment of food-packaging materials. En: Van der Heijden K, Younes M, Fishbein L, Miller S, *International food safety*

- handbook*, eds. Marcel Dekker, New York, pp. 273-285.
- Brydson JA (1995). *Plastic materials*. Butterworth Heinemann, 6.^a edición, Oxford.
- Caner C, Hernández RJ, Pascall MA, Buchanan J (2000). Effect of high pressure processing on high barrier multi-layered flexible packaging materials: mechanical properties and permeability to oxygen, carbon dioxide and water vapour. Presented at *Ann. Mtg. Inst. of Food Technologist*, Dallas, Texas, 10-14 Junio.
- Chatwin PC, Katan LL (1989). The role of mathematics and physics in migration predictions. *Packaging Technology Science* 2: 75-84.
- Costilow RN, Uebersax MA, Ward PJ (1984). Use of chlorine dioxide for controlling microorganisms during handling and storage of fresh cucumbers. *J Food Sci* 49: 396-401.
- Cutter CN, Dorsa WJ (1995). Chlorine dioxide spray washes for reducing fecal contamination of beef. *Food Protection* 58: 1294-1296.
- Deshpande SS (2002). *Handbook of food toxicology*, New York, Marcel Dekker.
- Directiva 2002/72/CEE de la comisión, de 6 de agosto de 2002, relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios.
- Domingo JL (2000). El aluminio como posible factor etiopatogénico en la enfermedad de Alzheimer. *Revista de Toxicología* 17: 3-11.
- Food Research Institute. Food Safety, 1996, Marcel Dekker. New York,
- Han Y, Guentert AM, Smith RS, Linton RH, Nelson PE (1999). Efficacy of chlorine dioxide gas as a sanitizer for tanks used for aseptic juice storage. *Food Microbiology* 16: 53-61.
- Helmroth E, Rijk R, Dekker M, Jongen W (2002). Predictive modelling of migration from packaging material into food products for regulatory purposes. *Trends Food Sci Technol* 13: 102-109.
- Karpova SG, Popov AA, Zaikov GY, Barabash K, Mesko M (1991). Influence of external effects on the structure and molecular dynamics of oriented copolymers and blends on the basis of Polypropylene and polyethylene. *Polym Sci* 33: 2435-2444.
- Khadre M, Yousef AE (1999). Usability of ozone for decontamination of food-contact surfaces of plastic packaging material. Presentado en el *Ann. Mtg of Inst. of Food Technologists*, Chicago.
- Kirpatrick DC, Ripley RA, Pelletier MA (1989). Food packaging materials: Health implications
- En: Hathcock JN (ed.). *Nutritional toxicology* (volume III), San Diego, Academy Press.
- Lambert Y, Demazeau G, Largeteau A, Bouvier JM, Laborde-Croubit S, Cabannes M (2000). Packaging for high-pressure treatments in the food industry. *Packag Technol Science* 13: 63-71.
- Lau O, Wong S (1996). The migration of plastiziers in food by gas chromatography-mass spectrometry with ion-trap mass detection. *Packag Technol Science* 9: 19-27.
- Lau O, Wong S (2000). Contamination in food from packaging material. *J Chromat A* 882: 255-270.
- Lefaux R (1999). El problema de los materiales en contacto con el alimento. En: Derache R (ed.). *Toxicología y seguridad de los alimentos*. Ediciones Omega, Barcelona.
- Limm W, Hollifield HC (1995). Effects of temperature and mixing on a polymer adjuvant migration to corn oil and water. *Food Addit. Contam* 12: 609-624.
- Lin W, Huang T, Cornell JA, Lin C, Wei C (1996). Chlorine dioxide solution in a fish model system. *J Food Sci* 61: 1030-1034.
- Löser E, Stropp G (1999). Polymers. En: *Toxicology*, Academy Press, San Diego.
- Lum Wan JA, Chatwin PC, Katan LL (1995). Migration from plastic packages into their contents. I. The role of mathematical models. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A* 350: 379-406.
- MAFF (1982). Survey of arsenic in food: The 8th Report of the steering group on food surveillance; the working party on the monitoring of foodstuffs for heavy metals. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London.
- MAFF (1990). Plasticizers: continuing surveillance. Food Surveillance Paper No. 30. Ministry of Agriculture, Fisheries, and Food, Her Majesty's Stationary Office, London.
- Masuda M, Saito Y, Iwanami T, Hirai Y (1992). Effects of hydrostatic pressure on packaging materials for food. En: *High pressure and biotechnology*. John Libbey Eurotext, London. pp 554-547.
- Mestres JP, Brun S, Joly M (1983). Recherche des résidus de formaldéhyde dans les vernis pour revêtement intérieur des boîtes de conserve. En : *Les matériaux en contact avec les aliments*. Technique et Documentation. Lavoisier. pp 293-298.
- Nakazawa H, Yamaguchi A, Inoue K, Yamazaki T, Kato K, Yoshimura Y *et al* (2002). In vitro assay

- of hydrolysis and chlorohydroxy derivatives of bisphenol A diglycidyl ether for estrogenic activity. *Food Chem Toxicol* 40: 1827-1832.
- Ochiai S, Nakagawa Y (1992). Packaging for high pressure food processing. En: *High pressure and biotechnology*. John Libbey Eurotext, London. pp 515-519.
- Ozen BF, Floros JD (2001). Effects of emerging food processing techniques on the packaging materials. *Food Sci Technol* 12: 60-67.
- Parry SJ, Aston DSJ (2004). Migration of inorganic contaminants into dry foods from packaging made from recycled paper and board. *Food Additives Contam.* 21: 506-511.
- Petersen BJ (2000). Probabilistic modelling: theory and practice. *Food Additives Contaminants* 17: 591-599.
- Real Decreto 118/2003, de 31 de enero, por el que se aprueba la lista de sustancias permitidas para la fabricación de materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos y se regulan determinadas condiciones de ensayo. BOE núm. 36.
- Repetto M (1997). *Toxicología fundamental*. Editorial Díaz de Santos (3.^a edición), Madrid.
- Robertson GL (1993). *Principles and practice in food packaging*. Marcel Dekker. New York.
- Schaefer A, Ohm VA, Simat TJ (2004). Migration from can coatings: Part 2. Identification and quantification of migrating cyclic oligoesters below 1000 Da. *Food Additives Contaminants* 21: 377-389.
- Strobel M, Walzak MJ, Hill JM, Lin A, Karbeshewski E, Lyons CS (1995). A Comparison of Gas-Phase Methods of Modifying Polymer Surfaces. *J Adh Sci Tech* 9: 365-383.
- Skjevraak I, Due A, Gjerstad KO, Herikstad H (2002). Volatile organic components migrating from plastic pipes (HDPE, PEX and PVC) into drinking water. *Water Research* 37: 1912-1920.
- Tawfik MS, Huyghebaert A (1999). Interaction of packaging materials and vegetable oils: oil stability. *Food Chemistry*, 64: 451-459.
- Thrasher JD, Kilburn KH (2001). Embryo toxicity and teratogenicity of formaldehyde. *Arch Environ Health*, 56(4): 300-311.
- Triantafyllou VI, Akrida-Demertzi K, Demertzis PG (2002). Migration studies from recycled paper packaging materials: development of an analytical method for rapid testing. *Anal Chim Acta*, 467: 253-260.
- Tsai L, Higby R, Schade J (1995). Disinfection of poultry chiller water with chlorine dioxide: consumption and byproduct formation. *J Agric Food Chem* 43: 2768-2773.
- Walzak MJ, Flynn S, Foerch R, Hill J.M, Karbeshewski E, Lin A *et al* (1995). UV and ozone treatment of polypropylene and poly(ethylene terephthalate). *J Adh Sci Tech* 9: 1229-1248. <http://www-cie.iarc.fr> Última visita: 04/05/2004.

M.^a Soledad Fernández-Pachón, M.^a del Carmen García, M.^a Lourdes Morales, Ana M.^a Troncoso

Generalidades. Clasificación. Evaluación de la seguridad. Manifestaciones tóxicas de los aditivos alimentarios. Evaluación de algunos aditivos. Bibliografía.

Generalidades

Se entiende por aditivo alimentario cualquier sustancia que, sin constituir por sí misma un alimento, es añadida de forma intencionada a los alimentos en pequeña cantidad (regulada por la legislación) con el fin de modificar sus características, técnica de elaboración y conservación o para mejorar la adaptación al uso al que son destinados. Su utilización debe ser necesaria y útil. Además, deben ser seguros para el consumidor. La definición legal considera que un aditivo alimentario es «cualquier sustancia que, normalmente, no se consume como alimento en sí, ni se use como ingrediente característico en la alimentación, independientemente de que tenga o no valor nutritivo, y cuya adición intencionada a los productos alimenticios, con un propósito tecnológico en la fase de su fabricación, transformación, preparación, tratamiento, envase, transporte o almacenamiento tenga, o pueda esperarse razonablemente que tenga, directa o

indirectamente, como resultado que el propio aditivo o sus subproductos se conviertan en un componente de dichos productos alimenticios». (Directiva 89/107/CEE del Consejo).

Existen aproximadamente 2.800 compuestos aprobados como aditivos para uso en los alimentos en EE UU. Aproximadamente 1.300 de los 2.800 son aromatizantes que se usan en muy pequeña cantidad. En Europa hay admitidos alrededor de 400. Los aditivos alimentarios realizan funciones tecnológicas muy diversas en los alimentos (conservación, textura, aspecto,...).

La permanencia del aditivo en el alimento o bebida lo diferencia de un coadyuvante tecnológico (disolventes orgánicos tipo hexano o clarificantes, por ejemplo). Su empleo, independiente del hecho de poseer o no valor nutritivo, lo diferencia de una sustancia enriquecedora (vitaminas, minerales, etc.) y su incorporación intencionada lo diferencia de un contaminante (pesticidas, residuos de medicamentos de uso veterinario, metales pesados, etc).

Los aditivos alimentarios pueden ser productos químicos obtenidos por síntesis, productos

naturales o productos idénticos a los naturales obtenidos por otras vías (incluyendo procesos biotecnológicos) (Mariné, Vidal, Hernández, 1999). Muchos aditivos se extraen de fuentes naturales (plantas, animales, del mar o de la tierra). Otros no se encuentran en la naturaleza y son obtenidos por síntesis química en el laboratorio.

El empleo de aditivos alimentarios es en la actualidad un hecho indiscutible; gracias a ellos disponemos de alimentos más saludables, estables, con mejor presentación, más económicos y variados (Aztí, 2001). De todas maneras, su utilización no está exenta de polémica, ya que al ser componentes extraños al alimento generan cierta desconfianza en el consumidor.

Los aditivos alimentarios, aunque hablamos de miles de sustancias que a lo largo del año se consumen en gran cantidad, están en la cola de los compuestos menos seguros presentes en los alimentos, por detrás de los pesticidas, tóxicos naturales, contaminantes ambientales y toxinas microbianas.

Los aditivos alimentarios pueden utilizarse solo tras su autorización por los organismos sanitarios competentes. Además, para poder ser utilizados en un alimento en concreto tienen que estar incluidos en las denominadas «listas positivas». Los factores a tener en cuenta para su inclusión en las listas son:

- Necesidad.
- Eficacia tecnológica.
- Seguridad de uso.

La necesidad hace referencia a que su uso debe estar justificado, es decir, que sería imposible obtener el alimento en esa forma sin la aplicación del aditivo, y además el aditivo debe representar una sensible mejora sobre los ya existentes.

En cuanto a la eficacia tecnológica, las razones que justifican su uso (Comisión del Codex Alimentarius FAO/OMS) son las siguientes:

1. Conservar la calidad nutritiva del alimento.
2. Proporcionar componentes esenciales a alimentos destinados a grupos de consu-

midores con necesidades nutritivas especiales.

3. Aumentar o mejorar la conservación, estabilidad o caracteres organolépticos de un alimento, sin que se altere su calidad.
4. Ayudar a la fabricación, transformación, preparación, tratamiento, envasado, transporte o almacenamiento de los alimentos, con la condición de que no se empleen para ocultar defectos.

La legislación vigente en nuestro país se armoniza con las directivas de la Unión Europea (89/107/CEE, modificada por 94/34/CEE).

Clasificación

Atendiendo a su origen, podemos clasificar a los aditivos alimentarios en:

- Naturales, obtenidos a partir de organismos animales o vegetales mediante procedimientos físicos, químicos o enzimáticos, como los extractos ricos en tocoferoles con función antioxidante obtenidos a partir de aceites vegetales.
- Idénticos a los naturales, que se producen por síntesis química o biológica en el laboratorio, como colorantes tipo carotenoides presentes de forma natural en vegetales.
- Modificados, compuestos de origen natural levemente modificados en su composición o estructura, para hacerlos utilizables en la industria alimentaria, como almidones modificados, celulosas modificadas (metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa).
- Artificiales, compuestos no presentes en la naturaleza, obtenidos por síntesis, como muchos edulcorantes y antioxidantes.

Según la función que realizan en los alimentos, existe una gran diversidad de aditivos alimentarios:

Antiagregantes.

Antioxidantes.
 Blanqueantes y agentes antipardeamiento.
 Conservantes.
 Colorantes.
 Agentes de curado.
 Acondicionares de masa panaria.
 Agentes desecantes.
 Emulsionantes.
 Enzimas.
 Agentes reafirmantes.
 Aromatizantes.
 Modificadores del sabor.
 Agentes dispersantes.
 Mejorantes de harinas.
 Humectantes.
 Lubricantes.
 Acidulantes.
 Clarificantes, floculantes, catalizadores, en general coaduyantes tecnológicos.
 Gases y agentes propelentes.
 Secuestradores de metales.

Evaluación de la seguridad

Todos los aditivos alimentarios deben tener un propósito útil demostrado y han de someterse a una valoración científica rigurosa y completa para garantizar su seguridad, antes de que se autorice su uso. El comité que se encarga de evaluar la seguridad de los aditivos en Europa es el Comité Científico para la Alimentación Humana de la UE (Scientific Committee for Food, SCF). Además, a nivel internacional hay un Comité Conjunto de Expertos en Aditivos Alimentarios (Joint Expert Committee on Food Additives, JECFA) que trabaja bajo los auspicios de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), y la Organización Mundial de la Salud (OMS). Sus valoraciones se basan en la revisión de todos los datos toxicológicos disponibles, incluidos los resultados de las pruebas efectuadas en humanos y animales. A partir del análisis de los datos de los que disponen, se

determina un nivel dietético máximo del aditivo, que no tenga efectos tóxicos demostrables. Dicho contenido es denominado el «nivel sin efecto adverso observado» («no-observed-adverse-effect level» o NOAEL) y se emplea para determinar la cantidad de «ingesta diaria admisible» (IDA) para cada aditivo. La IDA, que se calcula con un amplio margen de seguridad, es la cantidad de un aditivo alimentario que puede ser consumida en la dieta diariamente.

Así, la ingesta diaria admisible (IDA) se define como la cantidad aproximada de un aditivo alimentario, expresada en relación con el peso corporal, que se puede ingerir diariamente, durante toda la vida, sin que represente un riesgo apreciable para la salud. «Sin que represente un riesgo apreciable» se refiere a la certeza real, de acuerdo con la información con la que se cuenta, de que la exposición durante toda la vida a un aditivo químico determinado no provocará daño alguno. La IDA se representa normalmente como un nivel de 0-x miligramos al día por kilogramo de peso corporal.

La IDA sirve para proteger la salud de los consumidores y para facilitar el comercio internacional de alimentos. La IDA es una manera práctica de determinar la seguridad de los aditivos alimentarios y se utiliza como instrumento para armonizar su control regulatorio. La ventaja de que estos organismos internacionales establezcan las IDA de los aditivos alimentarios es que se pueden aplicar universalmente en todos los países y a todos los sectores de la población.

1. ¿Quién establece la IDA?

Básicamente, son los comités científicos de expertos los que asesoran a las autoridades reguladoras nacionales e internacionales. Las evaluaciones sobre la seguridad de los aditivos alimentarios se han desarrollado de forma similar en los diferentes estados miembros de la Unión Europea y en la comunidad internacional. El principal organismo internacional que se encarga de la seguridad de los aditivos alimentarios es

el Comité Conjunto de Expertos en Aditivos Alimentarios (Joint Expert Committee on Food Additives, JECFA) de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), y la Organización Mundial de la Salud (OMS). El establecimiento de normas internacionales se ha convertido en un tema de creciente importancia en los últimos años, ya que las disposiciones de la Organización Mundial del Comercio especifican que las normas de la Comisión Conjunta FAO/OMS del *Codex Alimentarius*, en cuanto a la seguridad y composición de los alimentos, se aplicarán en todo el mundo. En estos momentos, el Codex está preparando una nueva Normativa General sobre Aditivos Alimentarios (*General Standard for Food Additives*, GSFA) con el propósito de desarrollar unas normas internacionales armonizadas, factibles e incuestionables para el comercio en todo el mundo. Solo se incluyen los aditivos que han sido evaluados por el Comité Conjunto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios, y que cumplen las normas necesarias para su uso en alimentos.

En la UE, los aditivos cuyo uso está autorizado según la legislación actual, y que se han incluido en las Directivas de la Comisión Europea, son todos aquellos que han sido evaluados por el Comité Científico de la Alimentación Humana (SCF), y todos los países miembros han acordado que sean incluidos en la correspondiente Directiva. Este comité consultivo de expertos establece normalmente una IDA, o en su ausencia, estipula otras limitaciones sobre el uso de los aditivos. Solo tienen un número E aquellos aditivos que han sido evaluados por la SCF, lo cual indica que la Unión Europea los autoriza y los considera seguros. El concepto de la IDA y las evaluaciones, en cuanto a seguridad del JECFA, han sido en su mayoría adoptados por el Comité Científico para la Alimentación Humana de la UE, el Organismo para el Control de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) y por otros organismos en todo el mundo.

El criterio general para el uso de aditivos alimentarios, establecido en las Directivas de la

UE, es que los aditivos solo pueden ser autorizados si no representan riesgo alguno para la salud humana, según el nivel de utilización que se establece basándose en las pruebas científicas disponibles. Esta evaluación sobre la seguridad de los aditivos alimentarios se basa en la revisión de todos los datos toxicológicos correspondientes del aditivo en cuestión —que provienen de observaciones realizadas en humanos y las correspondientes pruebas en animales. En la UE, todas las pruebas son revisadas por el Comité Científico para la Alimentación Humana. Entre las pruebas toxicológicas exigidas por las autoridades reguladoras, están los estudios que se basan en la observación de la alimentación durante todo el ciclo de vida, y los estudios multigeneracionales, que determinan qué consecuencias tiene el aditivo en el cuerpo humano, para establecer si dicho aditivo o sus derivados pueden tener efectos perjudiciales.

El margen de seguridad es necesario por varios motivos. En primer lugar, el NOAEL se determina en animales y no en humanos. Por ello es prudente ajustar las posibles diferencias, y suponer que el hombre es más sensible que el más sensible de los animales sometidos a prueba. En segundo lugar, la fiabilidad de las pruebas de toxicidad se ve limitada por el número de animales sometidos a las mismas. Dichas pruebas no pueden representar a la diversidad de la población humana, en la que algunos grupos podrían mostrar diferentes sensibilidades (por ejemplo, niños, ancianos y enfermos). Por eso, es prudente tener en cuenta todas estas diferencias.

Tradicionalmente, la Organización Mundial de la Salud ha utilizado un factor de seguridad o incertidumbre de 100, que se basa en un factor multiplicado por 10, que refleja las diferencias entre los animales y la mayoría de los humanos, y otro factor multiplicado por 10, que refleja las diferencias entre el promedio de los humanos y los grupos sensibles (mujeres embarazadas, ancianos). No obstante, esto puede variar según las características del aditivo, el alcance de los datos toxicológicos y las condiciones de uso.

Si ocasionalmente la ingesta diaria sobrepasa la IDA, no hay que preocuparse, ya que su factor de seguridad tiene un amplio margen y en la práctica un consumo superior a la ingesta diaria admisible durante solo un día, se compensa con creces con un consumo habitual inferior. No obstante, si una de las cifras referentes al consumo señalase que los niveles habituales de ingesta de determinados sectores de la población sobrepasan la IDA, entonces el SCF podría considerar necesario reducir los niveles existentes del aditivo en los alimentos o limitar la gama de alimentos en que este esté permitido. Aún así, al ser tan amplio el margen de seguridad utilizado para fijar la IDA, lo más probable es que hubiera que sobrepasar con creces el límite de IDA, para que esto supusiera un riesgo o un perjuicio para la salud humana.

Cada estado miembro, con el asesoramiento del SCF, se encarga de controlar los aditivos alimentarios. La IDA se compara con las estimaciones «medias» y «extremas» del consumo del conjunto de la población o de un determinado subgrupo. Si la ingesta de los consumidores medios y extremos está dentro de los límites de la IDA, es improbable que esto pueda suponer algún daño, ya que la IDA está basada en un «nivel sin efecto adverso observado», al que se le ha aplicado un amplio margen de seguridad. Para asegurarse de que los consumidores no ingieren una cantidad excesiva de productos que contengan un determinado aditivo, que les lleve a sobrepasar los límites establecidos, la legislación europea exige que se realicen estudios para investigar los niveles de ingesta en la población y cualquier variación que se presente en los modelos de consumo.

Muchos de ellos se han utilizado durante largo tiempo y están considerados como sustancias seguras (GRAS); pero las intoxicaciones crónicas que se han producido por la presencia en múltiples alimentos, los fenómenos de hipersensibilidad y el riesgo de cancerogénesis hacen que se revisen continuamente, tanto sus mecanismos de toxicidad como las dosis más seguras. Es necesario evaluar cuidadosamente su seguridad, y establecer los límites máximos para cada alimento.

La evaluación de la seguridad de un aditivo alimentario tendrá en cuenta:

1. Los aspectos fisicoquímicos y biológicos de las sustancias, así como sus analogías con otros productos para los cuales existen datos cinéticos y toxicológicos.
2. Tipo de alimentos en los que eventualmente se empleará.
3. Frecuencia previsible de exposición (consumo) por seres humanos.
4. Evaluación toxicológica del aditivo, a través de los diferentes estudios de toxicidad.
5. Posibles problemas de toxicidad que pudieran derivarse del uso normal del aditivo.

En la evaluación toxicológica de un aditivo cabe considerar dos etapas:

- Obtención de datos toxicológicos.
- Evaluación de los mismos.

La evaluación incluye el establecimiento de la dosis sin efecto adverso observable en animales de experimentación, seguida del establecimiento de la IDA (ingesta diaria admisible) como resultado de la utilización de un factor de seguridad, que suele ser de 100.

Los estudios de toxicidad se realizan en el laboratorio y con animales de experimentación e incluyen:

1. Estudios de cinética y biotransformación bioquímicos: velocidad y grado de absorción, distribución y metabolización, eliminación.
2. Toxicidad aguda, subcrónica y crónica.
3. Efectos sobre reproducción.
4. Mutagénesis.
5. Cancerogénesis.
6. Efecto sobre el comportamiento.

Estos datos son valorados por expertos de organismos internacionales (Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios, JECFA).

Para aceptar un aditivo alimentario, es imprescindible la especificación de su identidad y pureza, ya que generalmente son sustancias

complejas (sintéticas o naturales) y se requieren métodos analíticos sensibles para su segura identificación y cuantificación, y para determinar las posibles impurezas (en especial las tóxicas). Estas especificaciones tienen valor reglamentario para limitar la presencia de posibles contaminantes a niveles de tolerancia aceptables, y de manera particular valor toxicológico, pues pequeñas diferencias en la composición pueden alterar los resultados de los diferentes ensayos de toxicidad.

Los aditivos autorizados aparecen en las listas positivas de cada país para cada alimento o grupo de alimentos. La presencia de un aditivo en concreto en múltiples alimentos, las dietas monótonas y las posibles potenciaciones de los aditivos entre sí, son factores de riesgo a tener en cuenta en su evaluación toxicológica.

Otros factores que pueden modificar la toxicidad de estas sustancias y que dan lugar a la existencia de grupos con mayor riesgo son: enfermedades preexistentes (insuficiencia renal, hepática), embarazo, hipersensibilidad (alergia) y la edad (niños, ancianos).

Sigue siendo un problema real la estimación de la exposición a los aditivos, sobre todo para los grupos de alto consumo. La exactitud de los resultados obtenidos tras realizar estimaciones sobre la ingesta diaria de cada aditivo se halla limitada por varios factores: diferentes hábitos alimentarios de la población, deficiencia de los datos sobre frecuencia de consumo de alimentos, etc. Esto puede explicar las divergencias existentes en las autorizaciones por los distintos países (Cameán y Repetto, 1995).

Los principales comités encargados de la evaluación de los aditivos son: el Comité Mixto de Expertos de la FAO/OMS (JECFA) (<http://www.fao.org/es/ESN/jecfa>) y el Comité del Codex Alimentarius sobre aditivos (CCFA). El Comité Mixto (JECFA) dispone de una base de datos on-line (http://apps3.fao.org/jecfa/additive_specs/foodad-q.jsp?language=es). Esta base de datos contiene las especificaciones más recientes para aditivos alimentarios, con excepción de los utilizados como aromatizantes, realizadas por el JECFA desde su primera reunión.

Sería imposible que existiera un verdadero mercado único de productos alimenticios, si no hubiera normas armonizadas, que autorizaran y establecieran las condiciones del uso de aditivos. En 1989, la Unión Europea adoptó una Directiva Marco (89/107/CEE), que establecía los criterios para la evaluación de aditivos y preveía la adopción de tres directivas técnicas específicas: la Directiva 94/35/CE, relativa a los edulcorantes; la Directiva 94/36/CE, relativa a los colorantes y la Directiva 95/2/CE, relativa a los aditivos alimentarios distintos de los colorantes y edulcorantes. Estas tres directivas establecen la relación de aditivos que se pueden utilizar (excluyendo otros), los alimentos a los que se podrían añadir y los contenidos máximos admisibles. La pureza exigida en estos aditivos se determina en directivas que definen los criterios específicos.

Manifestaciones tóxicas de los aditivos alimentarios

1. Manifestaciones funcionales

Peso.
Efectos laxantes.
Alteraciones comportamiento y SNC.

2. Alteraciones inmunitarias

Sintomatología variada: síntomas cutáneos, oculares (conjuntivitis), respiratorios, digestivos, nerviosos (cefaleas), articulares, renales, shock anafiláctico.

Aditivos implicados:

Colorantes: tartrazina.
Edulcorantes artificiales: sacarina, aspartame y ciclamato (urticaria y asma).
Antioxidantes: BHA y BHT (urticaria y asma).
Conservantes: nitrito sódico (urticaria crónica).
Benzoatos, sulfitos (asma, urticaria, shock anafiláctico).

Espesantes y gelificantes (shock anafiláctico, angioedema).

3. Manifestaciones orgánicas no neoplásicas

Hepatomegalia.
Cálculos urinarios-tumores de vejiga.
Agrandamiento del ciego.
Ligeras alteraciones hematológicas.

4. Alteraciones neoplásicas

Colorantes, nitrosaminas.

De cualquier modo, los aditivos alimentarios parecen más exacerbar una condición preexistente que inducirla. Los mecanismos alérgicos están raramente involucrados, aunque la IgE pueda estar implicada en algunos asmáticos sensibles a los sulfitos. Cobra cada vez más importancia el estudio de las posibles biotransformaciones de los aditivos en el alimento, durante la preparación y almacenamiento e incluso en el interior del organismo, así como las interacciones entre aditivos e impurezas.

Evaluación de algunos aditivos

1. Aspartame

Es el éster metílico del L-aspartil-L-fenil alanina, muy utilizado como edulcorante desde su introducción en la década de los 80, hasta tal punto que su IDA se suele exceder en muchas dietas. Como resultado de la hidrólisis en el tracto digestivo, se producen metanol y ácido aspártico, que no son preocupantes a nivel toxicológico. Otros productos como fenilalanina, pueden presentar efectos tóxicos. Los efectos en el SNC, que incluyen dolor de cabeza, vértigo, ataques, se han relacionado con elevados niveles de fenilalanina en el cerebro. Se produce una inhibición de la síntesis de catecolaminas por la fenilalanina. Los pacientes afectados de fenilcetonuria deben evitar el uso de aspartame.

2. Ciclamato

Los ciclamatos de Na y Ca se introdujeron como edulcorantes no calóricos en el año 1950 tras 5 años de ensayos que no mostraron efectos significativos en animales de experimentación a niveles elevados. En principio esta sustancia gozó de estatus GRAS. El Comité Mixto FAO/OMS estableció el IDA en 50 mg/kg. Posteriormente una serie de estudios usando una implantación de píldoras de colesterol que contenían ciclamato en la vejiga de ratones mostró efectos cancerígenos. Fueron retirados de las listas GRAS y suspendido su uso en EE UU. Se sabe que en determinadas personas puede metabolizarse a ciclohexilamina (amina vasopresora que induce atrofia testicular en ratas) por acción de la flora intestinal.

De hecho la JECFA (Comité Mixto FAO/OMS de expertos en aditivos alimentarios) ha reconocido recientemente la necesidad de estudios de metabolismo que incluyan las variaciones de la flora intestinal, que puede jugar un importante papel en la biotransformación de algunos aditivos.

3. Nitratos, nitritos

Se utilizan para curar carnes y contribuyen al desarrollo de un aroma y color rosa característico en las carnes, la prevención del enranciamiento y la prevención del desarrollo de las esporas de *Clostridium botulinum* en las carnes. Otras fuentes naturales de nitratos y nitritos incluyen: agua de bebida, secreciones endógenas, y tabaco. Los nitratos pueden reducirse endógenamente por los sistemas microbianos a nitritos que oxidan la hemoglobina a metahemoglobina (el hierro hemo pasa de ferroso a férrico). Si se forma metahemoglobina en cantidad importante, al ser incapaz de combinarse con el oxígeno, puede conducir a anoxia.

Otro aspecto de los nitratos y nitritos es la reacción de los nitritos con las aminas secundarias para formar nitrosaminas. Las nitrosaminas se convierten en especies electrofílicas tras una hidroxilación, formándose a continuación compuestos hidroxialquilo e iones alquilcarbonio activos.

Las nitrosaminas son sustancias de acusada toxicidad que causan necrosis hepática en animales y humanos, oclusión fibrosa de las venas y hemorragia pleural y peritoneal en animales. La intoxicación crónica produce fibrosis hepática, proliferación de conductos biliares, hiperplasia hepática. Las nitrosaminas son mutágenos y carcinógenos en roedores y producen cáncer en una serie de órganos que incluyen el hígado, tracto respiratorio, riñón, vejiga urinaria, esófago, estómago, páncreas.

Los niveles permitidos de nitritos en carnes curadas han bajado de 200 a 120 ppm. Además, la adición conjunta de ácido ascórbico previene la formación de nitrosaminas. Debido al peligro del crecimiento de *Clostridium botulinum* en completa ausencia de nitritos, una prohibición total de estas sustancias no se contempla todavía.

4. Glutamato monosódico

Estaba en la lista GRAS desde 1958 y se utiliza como condimento y exaltador del sabor. Su implicación en el conocido síndrome del restaurante chino o enfermedad de Kwok, conjuntamente con la demostración de lesiones en la retina de ratas y ratones recién nacidos, llevó a un establecimiento del IDA en 120 mg/kg de peso corporal y su desestimación para uso en alimentos infantiles. Estudios más recientes ponen en duda el papel del glutamato monosódico en el síndrome del restaurante chino.

5. Colorantes

Se utilizan en los alimentos con diversos fines (NAS, 1971):

1. Para recuperar la apariencia original del alimento cuando los colores naturales se han destruido por el calor y almacenamiento posterior.
2. Para asegurar uniformidad de color debido a las variaciones naturales en la intensidad del color.
3. Para intensificar los colores naturales de los alimentos.

4. Para suministrar una apariencia agradable a los alimentos (quizás lo más controvertido).
5. Para servir de indicación visual de buena calidad.

Los alimentos que contienen colorantes incluyen productos de confitería y golosinas, productos de pastelería, bebidas refrescantes, productos lácteos, snacks, mermeladas y jaleas y postres.

Uno de los colorantes más estudiados ha sido la tartrazina.

6. Tartrazina

Es un colorante azoico de color amarillo que se obtiene por síntesis. Produce reacciones alérgicas en individuos sensibilizados. También se ha relacionado con la inducción del asma. Además, los colorantes azoicos, en particular la tartracina, han sido implicados en reacciones adversas, produciendo urticaria. Todos los síntomas aparecen con mayor frecuencia en alérgicos asmáticos y en individuos intolerantes a la aspirina que en la población normal.

La tartrazina no inhibe la acción de la ciclooxigenasa y no tiene efecto en la formación de prostaglandinas. Después de los estudios toxicológicos efectuados se puede concluir que no es carcinogénico ni genotóxico.

7. Sulfitos

Los sulfitos son aditivos alimentarios de uso común, que cumplen una serie de funciones técnicas diferentes: conservantes, antioxidantes, inhibidores del pardeamiento. La exposición a estos aditivos puede producirse a través de numerosos alimentos comunes, como vinos, almidón de maíz, frutas y hortalizas deshidratadas, y muchos otros.

El asma provocada por los sulfitos constituye un buen ejemplo de reacción idiosincrática establecida a un cierto alimento. El papel de los sulfitos como causa de asma en una pequeña proporción de la población asmática (según se

estima, un 1-2% de los aquejados por esta enfermedad) se ha documentado adecuadamente mediante ensayos clínicos de doble anonimato, con controles tratados con placebo. Sin embargo, aún no se conoce el mecanismo de la enfermedad. No se ha demostrado la relación de otros síntomas con la ingestión de sulfitos, que sin embargo se menciona en algunos informes. Las personas sensibles a los sulfitos deben evitar ciertos alimentos y bebidas que los contienen, ya que la reacción puede ser grave e incluso fatal. Sin embargo, estas personas pueden tolerar pequeñas cantidades de sulfitos en la dieta, aunque el umbral varía de una persona a otra. En EE UU y en varios otros países las autoridades reglamentarias han impuesto la obligación de indicar la presencia de sulfitos en la etiqueta cuando los niveles de residuos de SO₂ son superiores a 10 ppm. Esta estrategia de etiquetado parece proteger al sector de la población que es sensible a los sulfitos.

8. BHA, BHT

El BHA (hidroxianisol butilado) y el BHT (hidroxitolueno butilado) son antioxidantes o agentes que previenen la absorción de oxígeno. El BHA y el BHT se usan principalmente en alimentos que contienen grasas y aceites, derivados de cereales y otros productos de grano. El BHA y el BHT pueden causar urticaria y otras reacciones en la piel de personas sensibles, aunque las reacciones alérgicas verdaderas son raras.

Se ha demostrado en estudios con animales de laboratorio que son inductores enzimáticos (citocromo P-450). Existen evidencias de que el BHT presenta efectos tumorígenos en pulmón y hepatotoxicidad. Tiene efectos sobre la reproducción al igual que el BHA (aumento de mortalidad y disminución del ritmo de crecimiento). No es carcinógeno, pero aumenta el efecto de ciertos carcinógenos (uretano, N-fluorenilacetamida).

El BHA no es mutagénico en sistemas *in vivo* e *in vitro*, pero puede inducir enzimas que alteren el metabolismo de algunos compuestos mutagénicos (aflatoxina B₁).

Bibliografía

- Azti Difusión Tecnológica (2001) Servicio de Información Alimentaria. Información sobre aditivos alimentarios. AZTI 2000.
- Calvo M (1991). *Aditivos. Propiedades, aplicaciones y efectos sobre la salud*. Mira Editores, Zaragoza.
- Cameán AM, Repetto M (1995). Estado actual de la toxicología alimentaria. En: Repetto M (ed.). *Toxicología avanzada*, Madrid, Diaz de Santos.
- Concon JM (1988). *Food toxicology*. Part A, B. New York, Marcel Dekker.
- Directiva 94/35/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de junio de 1994, relativa a los edulcorantes utilizados en los productos alimenticios.
- Diario Oficial n.º L 237 de 10/09/1994 p. 0003-0012. Directiva 94/36/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de junio de 1994, relativa a los colorantes utilizados en los productos alimenticios.
- Diario Oficial n.º L 237 de 10/09/1994 p. 0013-0029. Directiva 95/2/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de febrero de 1995 relativa a aditivos alimentarios distintos de los colorantes y edulcorantes.
- Diario Oficial n.º L 061 de 18/03/1995 p. 0001-0040. Principles for the Safety Assessment of Food Additives and Contaminants in Food. *Environmental Health Criteria* 70. International Programme on Chemical Safety (IPCS) in cooperation with the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). World Health Organisation, Geneva, 1987.
- Fondu M, Zegers de Beyl H, Bronkers G, Stein A, Verbiess N, Monnoye M (1988). *Food additives tables*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Furia TS (1977). *Handbook of food Additives*. Vol. I. CRC Press Inc, Cleveland.
- Furia TS (1980). *Handbook of food Additives*. Vol. II. CRC Press Inc., Cleveland.
- Hayes AW (1994). *Principles and methods of toxicology*. 3rd ed, Raven Press, New York.
- Hughes C (1994). *Guía de aditivos*. Acirbia, Zaragoza.
- International Life Sciences Institute (ILSI), Europe (1999). Workshop on the significance of excursions of intake above the Accepted Daily Intake (ADI). Editors: Barlow S, Pascal G, Larsen JC,

- Richold M. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 30 (No. 2, Part 2).
- Luetzow M (2003). Harmonization of exposure assessment for food chemicals: the international perspective. *Toxicology Letters* 140-141, 419-425.
- Mariné Font A, Vidal Carou MC, Hernández Jover T (1999). Aditivos alimentarios. En: Hernández Rodríguez M, Sastre Gallego, A (eds.). *Tratado de nutrición*. Díaz de Santos, Madrid.
- Ministerio de Sanidad y Consumo (1994). *Compendio de datos toxicológicos y de identidad y pureza de los aditivos alimentarios*. Secretaría General Técnica. M.S.C., Madrid
- NAS (1971) *Food colours*. National Academy of Sciences/National Research Council, Washington, D.C.
- Saltmarsh M (2000). *Essential guide to food additives*. Leatherhead Food RA Publishing, pp. 1-322.
- Vidal Carou MC (1992). Aditivos alimentarios. Evaluación toxicológica, riesgos y seguridad. *Alimentación, Equipos y Tecnología*. Sept., 141-150.

ASPECTOS BROMATOLÓGICOS Y TOXICOLÓGICOS DE COLORANTES Y CONSERVANTES

M.^a Fátima Olea Serrano, M.^a Carmen López Martínez, Herminia López G.^a de la Serrana

Introducción. Colorantes. Conservantes. Bibliografía.

Introducción

Los aditivos alimentarios presentan gran variedad de efectos positivos. Se pueden lograr alimentos procedentes de todo el mundo en cualquier época del año, se puede disponer de alimentos más baratos, los alimentos presentan mayor aceptación por el consumidor al tener colores más apetecibles, etc. Como inconvenientes se podrían enumerar, entre otros, presentar casi exclusivamente un interés estético como el empleo de colorantes o aromatizantes, esto si se olvida todo placer en la comida y se reduce el concepto al estrictamente nutricional. De otra parte, se ha relacionado el empleo de aditivos con todo tipo de problemas toxicológicos o bien se incide en trastornos del comportamiento como insomnio, hiperactividad, jaquecas, etc. No obstante, y aunque la controversia sobre el valor de los aditivos continuará por bastantes años, la realidad es que los aditivos se someten a más controles que cualquier otro componente de los alimentos. Los datos actuales indican que los

aditivos alimentarios presentan para la salud más efectos beneficiosos que perjudiciales.

Las listas positivas de aditivos permitidos son abiertas, lo que quiere decir que están en continua revisión y control. La evaluación toxicológica debe proporcionar información sobre la inocuidad o seguridad de uso de una sustancia de acuerdo a una experta valoración de todos los datos disponibles. Ello constituye una labor muy compleja y de gran trascendencia, en la que están implicados tanto organismos nacionales como internacionales entre los que se encuentran la FAO/OMS. Paralelamente al concepto de aditivo alimentario se debe recordar el concepto introducido por la FDA de Sustancias GRAS (Generally Recognized as Safe). Se supone que aproximadamente 1.800 aditivos son utilizados de forma rutinaria. Y los criterios para aceptar una sustancia en esta categoría son:

1. Uso habitual en los alimentos antes de 1958 sin que se hayan determinado efectos adversos en la salud.
2. Determinación de su inocuidad por métodos científicos apropiados.

3. Determinación de la inocuidad bajo los criterios anteriores por científicos cualificados y con experiencia para evaluar la inocuidad de sustancias adicionadas directamente o indirectamente a los alimentos.
4. Ejercer una función apropiada en el alimento en que se encuentra.
5. Utilizar a un nivel no tan alto que haga necesario señalar el propósito en el alimento.

El estatus GRAS de una sustancia requiere respetar el juicio científico. Así expertos en toxicología, farmacología, patología y bioquímica, recomendados por la Academia Nacional de Ciencias Americana, juzgan a partir de los datos publicados, y si no hay suficiente, recomiendan nuevos test. La información requerida es: a) datos de toxicidad aguda en algunas especies animales incluyendo no roedores; b) datos de toxicidad crónica en dos especies animales, incluyendo datos a corto término (90 días) y a largo término (toda la vida del animal); c) datos de carcinogenicidad, mutagenicidad, teratogenicidad, efectos reproductivos, y cualquier otro efecto evaluado.

El estatus GRAS está sujeto a limitaciones específicas:

- Forma y condiciones de uso.
- Tipo de alimentos en que van a ser usados estos aditivos.
- Función y nivel de uso.
- Cualquier cambio en las especificaciones que permitieron la clasificación de GRAS invalida este estatus.

En el ámbito europeo, las legislaciones estatales son el marco legal para el control de los aditivos alimentarios en cada estado miembro. Los gobiernos basan sus disposiciones en el consejo de sus propios expertos del Comité Científico para la Alimentación (SCF). El SCF fue creado por la Comisión Europea en 1974 y se compone de científicos de los estados miembros que cubren una amplia gama de disciplinas.

Sus conclusiones se publican en las series de informes SCF. Tiene en cuenta al Comité mixto de expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) de la FAO/OMS.

El planteamiento básico para la evaluación de la inocuidad de cualquier sustancia, incluidos los aditivos alimentarios, implica la realización de pruebas toxicológicas.

Se utilizan diversos métodos para valorar los riesgos, en concreto, estudios de alimentación animal cuyas conclusiones y resultados se extrapolan al hombre.

En conclusión, tanto con una denominación u otra (sustancia GRAS o aditivo alimentario), el control toxicológico es similar (Ferrando *et al.*, 1980; Truhaut, 1978; Barros, 1986).

Colorantes

Los colorantes alimentarios son un grupo bien delimitado, lo que hace su estudio toxicológico fácil, además como no son indispensables se puede exigir más seguridad toxicológica que a otros aditivos.

El color es tan normal a nuestro alrededor como el aire para respirar. Tanto que nos olvidamos que vivimos en un mundo de color.

Hasta la mitad del siglo XIX los colorantes usados en alimentos, drogas y cosméticos eran materiales obtenidos más o menos fácilmente de fuentes naturales: animales, vegetales y minerales. En 1856 Sir WH Perkin descubrió el primer colorante sintético, malva, y pronto se añadieron nuevos colorantes. El uso de algunos de ellos se extendió rápidamente en los alimentos, así como a los medicamentos y cosméticos. La proliferación del uso de colorantes como aditivos se consideró pronto un problema sanitario, ya sea porque eran tóxicos *per se* o bien por enmascarar alimentos de baja calidad, sin olvidar que en ocasiones los colorantes podían ser vehículo de sustancias tóxicas como arsénico o mercurio, empleados en la fabricación de estos colorantes.

El color se asocia a veces con la calidad de los alimentos. La calidad de los alimentos se basa, además de en sus características microbiológicas, en el color, aroma, textura y valor nutritivo. Dependiendo de cada alimento estos factores pesan en diverso grado a la hora de evaluar la calidad global.

Colorante es una designación general que se refiere a cualquier compuesto químico que imparte color. Según la normativa española se define colorante como: *a*) sustancias que añaden o devuelven color a un alimento e incluyen componentes naturales de sustancias alimenticias y otras fuentes naturales que no son normalmente consumidas como alimento y no son habitualmente utilizadas como ingredientes característicos en alimentación; *b*) los preparados obtenidos a partir de los alimentos y otras materias naturales obtenidas mediante extracción física o química que ocasione una selección de los pigmentos que se usan como componentes nutritivos o aromáticos (RD 2001/1995).

Desde 1900 se inicia un control cada vez más completo en el uso de estos y otros aditivos. En EEUU los colorantes admitidos se dividen en dos grupos: 1) certificados, son todos sintéticos, 2) sin certificar, son los naturales, y algunos sintéticos correspondientes a estructuras químicas que se encuentran en la naturaleza. La clase más importante exenta de certificación es la de los carotenoides.

La FDA establece el término «inocuo» en el sentido de no producir daño en ninguna especie en ninguna cantidad y bajo ningunas condiciones.

En España, la lista positiva de los colorantes autorizados se ha publicado por Real Decreto 2001/1995 de 7 de diciembre de 1995 (BOE n.º 19 de de 22 de enero de 1996). Decretos posteriores puntualizan o actualizan el uso de los colorantes. Son los aditivos que con mayor frecuencia se han asociado a patología alérgica. Su función es, fundamentalmente, la modificación de caracteres organolépticos de los alimentos. Son prescindibles y su utilización es casi tan antigua como la humanidad.

Se pueden clasificar atendiendo a la composición química:

1. Colorantes orgánicos naturales

- Derivados isoprénicos: Carotenoides y Xantofilas.
- Derivados del benzopireno: antocianinas y flavonoides.
- Derivados de hidratos de Carbono: Caramelos.
- Derivados tetrapirrólicos: Clorofilas.
- Otras estructuras.

2. Colorantes orgánicos sintéticos

- Derivados de alquitrán de hulla.

3. Colorantes inorgánicos

- Pigmentos y lacas.

1. Colorantes orgánicos naturales

Derivados isoprénicos: carotenoides y xantofilas

Son fundamentalmente productos naturales y como tales, en principio se consideran exentos de toxicidad. Para ellos no se ha definido IDA, y de igual modo se incluyen como sustancias GRAS.

β -caroteno E-160 a

Pigmento responsable del color en numerosos alimentos como mantequilla, queso, zanahorias, alfalfa, granos de cereales. Presenta cierto valor nutricional, es provitamina A. Fue el primer colorante natural obtenido por síntesis a escala comercial. Se presenta con un color rojo-violáceo metalizado. Insoluble en agua y otros disolventes polares. Solo parcialmente soluble en disolventes orgánicos. Se altera por acción de álcalis del aire y la luz, sobre todo a altas temperaturas.

El β -caroteno se comercializa como cristales secos bajo atmósfera de N_2 , como suspensiones semisólidas en aceites comestibles, como perlas dispersables en agua, compuestas por el colorante más aceites vegetales, azúcar gelatina e hidratos de carbono en emulsión. Se utiliza en concentraciones de 2-50 ppm de colorante puro en margarinas, mantequillas, quesos, dulces, zumos y bebidas.

Annato. Bixina y norbixina E-160 b

El componente principal de las semillas de annato es el carotenoide bixina. El colorante mayoritario de la solución acuosa alcalina es la norbixina. El extracto de annato contienen entre 1-15% de materia colorante expresada en bixina. Se emplea en concentraciones de 0,5 a 10 ppm presentando un rango de tonalidades desde el amarillo manteca al melocotón. Se utiliza en alimentos como mantequilla, margarina, aceites de freír, condimentos de ensaladas, cereales, helados y especias.

 β -apo-8'-carotenal E-160 e

Es un aldehído ampliamente distribuido en la naturaleza. Se encuentra en numerosos productos: espinacas, naranjas, césped, mandarinas, caléndulas etc. Se obtiene por síntesis como un trans isomero. Polvo púrpura-negro, presenta actividad de provitamina A. Como todos los carotenoides se altera al aire por oxidación. Las soluciones oleosas presentan coloración rojo-naranja. La concentración de uso oscila entre 1-20 ppm de colorante puro.

Cantaxantina (β -caroteno-4-4'diona). (E-161 g)

Desconocido hasta 1950 en que F. Haxo lo aisló de un hongo comestible (*Cantharellus cinnabarinus*). Se ha encontrado también en truchas marinas, algas, salmón, y en algunas especies de flamencos. El producto cristalizado se obtiene a partir de la β -ionona. Tiene una coloración marrón-violáceo. Como los demás carotenoides, es sensible a la luz y al oxígeno cuando se calienta en disolución o se expone a la luz UV. No tiene actividad de provitamina A. Se usa a concentraciones de 5-60 ppm de colorante puro para lograr el color rojo del tomate. Se utiliza para sopas de tomate, salsas de espagueti, salsa de pizzas y bebidas de frutas. También es efectivo para productos asados, generalmente aves, para suplementar los carotenoides naturales.

Derivados del benzopireno**Antocianinas (E-163)**

Es uno de los grupos más importantes de colorantes, solubles en agua y ampliamente distribuidos en la naturaleza. Son los responsables de los colores rojo, púrpura o azul de la mayoría de las flores, frutos y vegetales. Se han identificado más de 200 moléculas diferentes, de las cuales unas 20 están presentes en las uvas negras, que son la mayor fuente comercial de antocianinas para la coloración de alimentos.

Desde el punto de vista químico son glucósidos de antocianidinas. Las seis antocianidinas más comunes son: pelargonidina, cianidina, delphinidina, petunidina, peonidina, malvidina.

Las antocianinas se comportan como indicadores de pH naturales. En medio ácido son rojos pero cambian a azul a pH alcalino. Son más estables a pH entre 2 y 5. Forman complejos con metales, dando coloraciones azuladas. Forman complejos con proteínas y precipitan, lo cual ha de tenerse en cuenta en los alimentos que tengan gelatina. Se emplea a concentraciones de 10-40 ppm referidos a pigmento puro. Se añaden a bebidas refrescantes, alcohólicas, productos de confitería, alimentos enlatados o congelados, alimentos desecados, etc.

Derivados de hidratos de carbono**Caramelo (E-150)**

Es el producto líquido o sólido marrón oscuro obtenido por calentamiento controlado a que se someten hidratos de carbono de calidad alimentaria: dextrosa, azúcar invertido, lactosa, jarabe de malta, hidrolizados de almidón o de sacarosa. Es habitual deshidratar el producto y se presenta como polvo colorante.

Es soluble en agua e insoluble en la mayoría de los disolventes orgánicos. La solubilidad en soluciones hidroalcohólicas, con 50-70% de alcohol, varía según el tipo de caramelo. El colorante concentrado tiene un sabor característico a quemado que no se manifiesta en las condiciones de uso como colorante. El pH óptimo del

colorante para ser usado en bebidas carbonatadas y soluciones acidificadas es normalmente de 2,8 a 3. El uso mayoritario de este colorante es en bebidas espumosas como cerveza de raíces y colas. También se usa en mezclas de wiskys y cervezas, así como en dulces, jarabes, alimentos para animales domésticos, alimentos cárnicos envasados, productos farmacéuticos etc. Los niveles medios de empleo están entre 1.000-5.000 ppm.

Otras estructuras

Clorofilas Complejos cúpricos de clorofilas y clorofilinas. E-140 E-141

Las clorofilas son los pigmentos responsables del color verde de las hojas de los vegetales. La sustitución del magnesio por cobre origina el colorante E-141, mucho más estable. Las clorofilas se utilizan poco como aditivos alimentarios, solo ocasionalmente en aceites, chicle, helados y bebidas refrescantes, en sopas preparadas y en productos lácteos. No se ha establecido IDA, ya que esta cantidad es despreciable frente a la ingerida a partir de fuentes naturales. Sin embargo, la IDA para el derivado cúprico es de 15 mg/kg de peso y día, debido a su contenido en cobre (4-6% del peso de colorante).

Ácido carmínico. Cochinila (E-120)

El principio activo es la carmina. El extracto de cochinilla se obtiene por extracción hidroalcohólica de la cochinilla, que son los cuerpos desecados de un insecto (femenino) *Coccus Cacti*. (Vigueras *et al.*, 1995; Vigueras *et al.*, 1998). El colorante principal del extracto es el ácido carmínico y su estructura química corresponde a una antraquinona. La carmina es una laca de hidróxido de aluminio o aluminio y calcio y contiene aproximadamente un 50% de ácido carmínico.

El extracto de cochinilla presenta un pH de 5-5.3. El color va desde naranja a rojo, dependiendo del pH. Puede dispersarse en agua. Presenta buena estabilidad frente a la luz y el oxígeno. Su poder tintorial es moderado, se usa

en un rango de 25-1.000 ppm. Se utiliza para obtener tonalidades rosas en alimentos proteicos, pastelería, confección, cosméticos y formas farmacéuticas. Individuos sensibilizados presentan respuesta alérgica.

Curcumina (E-100)

Es el colorante de la cúrcuma, una planta procedente de la India. Se utiliza, además del colorante, la especia completa y la oleorresina, en cuyo caso presenta un efecto aromatizante. La especia es un componente fundamental del curry, al que comunica su coloración amarilla característica. Se utiliza también como colorante de mostazas, sopas y derivados cárnicos.

Se elimina rápidamente por vía biliar. Pero la especia completa induce efectos teratogénicos en ensayos con animales. La dosis diaria admisible fijada por la OMS es, provisionalmente, de 0,1 mg /kg para el colorante y 0,3 mg /kg para la oleorresina. Se puede utilizar sin más límite que la buena práctica de fabricación en muchas aplicaciones.

Betalainas (E-162)

Son extractos de la familia botánica *Centrosepmae*, plantas tales como remolacha, acelgas, higo chumbo, hierba carmín, buganvillas. Desde el punto de vista químico son glucósidos; se han identificado 70 betalainas diferentes. El más representativo es el aglicón de la remolacha, la betacianina.

Se obtienen mediante extracción acuosa, se degradan por calor, luz y oxígeno, estable a pH 4-6. Se utilizan para colorear productos de pastelería, bebidas, salsas y derivados cárnicos.

Riboflavina (E-101)

Se obtiene por síntesis química o por procedimientos biotecnológicos. Es estable frente al calentamiento. Es relativamente poco utilizado como aditivo; el color amarillo es débil, y comunica sabor amargo a las concentraciones a las que se debe utilizar, pero presenta la ventaja de ser fluorescente, lo que da un cierto brillo al

medio al que se añade. Si se emplea como colorante no pueden hacerse referencia del enriquecimiento vitamínico.

2. Colorantes orgánicos sintéticos

Este grupo de colorantes presentan ciertas ventajas frente a los naturales; en general se puede observar que presentan colores más persistentes y uniformes, menor coste y se pueden obtener en grandes cantidades. Habitualmente debido al alto poder tintóreo se emplean en bajas concentraciones. Sin embargo, no son bien aceptados por el consumidor al desconfiar de su inocuidad a pesar de haber sido ensayados a nivel toxicológico. Estos colorantes se presentan en forma soluble, como sales de sodio, potasio, y en ocasiones sales amónicas; y en forma insoluble aparecen las sales de calcio o aluminio, o bien se adsorben sobre hidróxido de aluminio, formando una laca.

Se usan en productos de confitería, panadería, preparados para ensaladas y sustitutos de chocolate, en los cuales no se desea la presencia de agua.

De acuerdo con la estructura química del grupo cromóforo, se pueden clasificar en varias categorías.

Colorantes azoicos

Estos colorantes forman parte de derivados del grupo azo (-N=N-) unido a anillos aromáticos. Todos tienen un origen sintético. El número de los colorantes de este grupo autorizados es pequeño en comparación con la disponibilidad química. Se están cuestionando los colorantes sintéticos de tipo azoico y en la actualidad se intentan sustituir por colorantes naturales, aunque tecnológicamente no se consiguen los mismos efectos, y además son más caros y menos potentes.

Actualmente se encuentran aceptados los siguientes.

Tartrazina (E-102)

Derivado trisódico del ácido pirazol carboxílico. Es uno de los colorantes más ampliamente utili-

zado. Es el colorante habitualmente empleado sustituyendo al azafrán. Se utiliza en pastelería, postres, confitería, licores, quesos (corteza).

Causante de reacciones alérgicas. Aparecen respuestas de asma a dosis de 0,15 mg y además urticaria y reacciones de sensibilización cruzadas con aspirina. Se estima que el 15% de la población sensible a aspirina lo es también a tartrazina.

Ensayos experimentales en ratas han mostrado que esta molécula se metaboliza por acción de la enzima nitrorreductasa apareciendo en orina a las 48 horas el 95% del colorante ingerido en la siguiente forma: 1% de tartrazina, 22% de ácido p-acetamido bencenosulfónico y 74% conjugado como derivado sulfónico.

Estudios de carcinogenicidad en perros, ratones y ratas han resultado en todos los casos negativos.

Amarillo anaranjado S (E-110)

Sal disódica del ácido naftol sulfónico. Estable a temperaturas elevadas (130 °C).

Las aplicaciones son muy similares a la tartrazina.

Azorubina (E-122)

Sal disódica del ácido naftol sulfónico. Colorante rojo no usado solo en alimentación. También en industria textil. Empleado en confitería, bebidas y jarabes.

Amaranto (E-123)

Sal trisódica del ácido naftol trisulfónico. Coloración rojo Burdeos.

Se han planteado algunos problemas con él ya que un grupo de investigadores en los años 70 mostró un efecto cancerígeno en ensayos con ratones. Posteriormente se demostró que no era el amaranto el causante de estos efectos sino las impurezas debidas a determinadas formas de fabricación, lo que ha hecho que se vuelva a admitir en la lista positiva. Utilizado en la coloración del «caviar» y en la bebida de granadina.

Rojo cochinilla A (E-124)

Es la sal trisódica del ácido naftol, lo que demuestra que no existe relación química entre él y el rojo cochinilla natural que es el ácido carmínico, ya visto. Tiene la misma aplicación que la tartrazina.

Negro brillante BN (E-151)

Sal tetrasódica del ácido tetrasulfónico. Presenta iguales aplicaciones que la tartrazina

En resumen, el estudio toxicológico de los colorantes azoicos plantea las siguientes conclusiones, los colorantes son metabolizados por la flora intestinal del siguiente modo:

$R-N=N-R + \text{enzima nitrorreductasa} \rightarrow \text{aminas cíclicas}$

- Si los metabolitos son apolares serán fácilmente absorbidos y estos colorantes **NO SON ACEPTADOS**.
- Si los metabolitos son polares serán fácilmente excretados y estos colorantes **SON ACEPTADOS**.

Colorantes trifenil metánicos

Es el segundo grupo de colorantes sintéticos, actualmente en uso hay solamente tres.

Azul patentado V (E-131)

Sal cálcica de un derivado de trifenil metano. Tiene aplicaciones semejantes a la tartrazina. Además se emplea en medicina y en cosmética.

Azul brillante FCF (E-133)

Utilizado en pastelería, confitería, jarabes y conservas.

Verde ácido brillante BS

(Verde lisamina) (E-142). Sal sódica de un derivado de la fucsina. Utilizado en confitería, jarabes y bebida.

Colorantes xanténicos

Solo se encuentra uno en la lista positiva.

Eritrosina (E-127)

Sal disódica de la tetraiodofluoresceína. Presenta cierta fluorescencia, lo cual la hace agradable en su aplicación a alimentos. Aplicaciones similares a la tartrazina.

Colorantes quinoleínicos**Amarillo de quinoleína (E-104)**

Es una mezcla de sales sódicas de ácidos monosulfónicos y disulfónicos de quinoftaleína y de quinolil indanodiona. Aplicaciones similares a la tartrazina.

Colorantes indigoides**Indigoína o carmín de indigo (E-132)**

Sal disódica del ácido indigotin disulfónico. Utilización en pastelería, confitería, helados y frutas confitadas.

3. Mecanismos detoxificación de colorantes

Tanto los colorantes azo como los no azo están presentes en las dietas de los países más desarrollados, existiendo controversias sobre su posible toxicidad.

4. Reacciones de reducción

Numerosos grupos funcionales como nitro, diazo, carbonilos, disulfuros, sulfóxidos y alquenos se pueden reducir. A veces no está clara la intervención de enzimas, o solo es por causa de agentes reductores como NADPH, NADH o FAD.

- a) *Nitrorreducción*. En los mamíferos tiene lugar a través de sistemas nitrorreductasas que se han encontrado en homogenados hepáticos; también aparecen en riñón, pulmón, corazón y cerebro. La reacción utiliza NADPH y NADH y requiere condiciones anaerobias

b) *Azo reducción*. Requiere condiciones anaerobias, NADPH y flavinas reducidas.

En resumen en relación con la toxicidad de los colorantes, tomando como prototipo la tartrazina, las reacciones de urticaria asociadas a esta molécula y a otros colorantes muestran que los estudios publicados hasta el momento no son definitivos. Pero las conclusiones a que se pueden llegar son: la tartrazina y algunos otros colorantes sintéticos pueden provocar urticaria de forma ocasional en pacientes que padecen urticaria de forma crónica.

Las manifestaciones de hiperquinesia asociadas a colorantes sintéticos no han sido demostradas suficientemente. Las conclusiones deducidas de diversos trabajos realizados no son claras y no se puede afirmar nada en este sentido.

5. Colorantes inorgánicos

Solo unas pocas sales y elementos puros se encuentran en este grupo. Se utilizan fundamentalmente como colorantes de cubiertas. Son sustancias muy estables y solo alguna de ellas solubles en agua. La relación de estas moléculas es la siguiente:

Dióxido de Titanio (Ti O₂) E-171.

Óxido de Fe rojo (Fe-2O₃, anhidro) E-172.

Óxido de Fe Blanco (Óxido ferroso férrico) E-172.

Óxido de Fe amarillo (Fe-2O₃ hidratado) E-172.

Carbonato cálcico (Ca CO₃) E-170.

Plata (láminas o polvo) (Ag) E-174.

Oro en láminas (Au) E-175.

Aluminio (láminas o polvo) Al E-173.

Conservantes

Se entiende por conservación al conjunto de medidas para evitar la descomposición de un alimento. En un sentido estricto serían los procedimientos dirigidos al ataque de los microorganismos.

Los conservantes se han definido como sustancias que, por separado o mezcladas entre sí, son capaces de inhibir, retardar o detener los procesos de fermentación, enmohecimiento, putrefacción y otras alteraciones biológicas de los alimentos y bebidas.

La acción antimicrobiana de los conservantes se debe a que inhiben el metabolismo y crecimiento de bacterias, mohos y levaduras. Que la acción sea bacteriostática o fungistática y bactericida o fungicida depende de la dosis del conservante. La muerte de los microorganismos depende de una serie de factores altamente selectivos tales como mecanismos físicos, mecanismos fisicoquímicos y reacciones bioquímicas (inhibición enzimática). La acción se ejerce sobre la pared y/o membrana celular o bien en estructuras del protoplasma o sobre la actividad enzimática.

Por todos estos motivos los mecanismos de acción de los conservantes son variados y dependientes de la estructura química del conservador. Pueden actuar por diversos mecanismos:

1. Óxido-reducción enzimática en aquellas enzimas con grupos -SH o bien puentes disulfuro; y sobre citocromos.
2. Reacciones de adición enzimática o bien sobre el sustrato.
3. Modificación del pH del medio, lo que produce desnaturalización de proteínas del alimento y de las células de los microorganismos, impidiendo la proliferación de estos.
4. Saturación del medio con productos del metabolismo de los microorganismos. Es el caso del ácido láctico o propiónico, entre otros. Se produce una inhibición del crecimiento celular.
5. Actuación sobre la pared/membrana celular, habitualmente impidiendo la síntesis de estas estructuras.
6. Incorporación como ligando; impiden de este modo la utilización de determinados microelementos por los microorganismos actuando sobre la capacidad proliferativa.

Aunque los conservantes podrían inhibir los mismos procesos en células del organismo

humano, no por ello serán perjudiciales para el hombre. Depende de la concentración de inhibición que siempre se alcanzará antes en organismos monocelulares (célula microbiana) que en el ser humano.

No todos los conservantes actúan con la misma intensidad frente a mohos, levaduras y bacterias, de forma que no existe un espectro completo frente a todos los microorganismos capaces de alterar los alimentos. La mayoría actúan frente a levaduras y mohos y son poco activos frente a bacterias, en muchos casos porque el pH óptimo de actuación del conservante es la zona ácida, mientras que el pH óptimo para el desarrollo de las bacterias suele ser la zona neutra.

Además de la flora contaminante del alimento y del comportamiento intrínseco de la molécula establecida como conservante es preciso conocer los factores del alimento que influyen en la actividad de los conservantes. Estos son fundamentalmente: 1) pH del alimento; 2) coeficiente de reparto entre los componentes del alimento y la afinidad del conservante por los distintos constituyentes; 3) actividad del agua, ya que este factor modula la capacidad de alteración del alimento; 4) potencial re-dox y presión parcial de O_2 , factores que modifican tanto la composición del conservante como la posibilidad de desarrollo de determinados microorganismos contaminantes; y por último 5) otros componentes naturales de los alimentos tales como la presencia de azúcares o vitaminas, que modifican la posibilidad de desarrollo de microorganismos en el medio.

Se pueden clasificar en varios grupos:

1. Conservantes orgánicos

Ácido sórbico y sorbatos (E-200 a E-203).

Ácido benzoico y benzoatos (E-210 a E-213).

Ésteres del ácido p-hidroxibenzoico (E-214 a E-219).

Ácidos orgánicos: ácido láctico, propiónico, acético y derivados (E-270; E-280; E-260).

2. Conservantes inorgánicos

Dióxido de azufre y derivados (E-220 a E-228).

Nitratos y nitritos (E-249 a E-252).

3. Antibióticos

Natamicina o pimaricina (E-235).

Nisina (E-234).

1. Conservantes orgánicos

Ácido sórbico y sorbatos (E-200 a E-203) $CH_3-CH=CH-CH=CH-COOH$

Es un ácido débil ($K_{ab} = 1,73 \times 10^{-5}$) lo que determina un pH óptimo de acción de 3,5.

El mecanismo de acción conservadora, suele ser por inhibición de enzimas, tales como enolasas, lactato deshidrogenasas y enzimas del ciclo de Krebs. Actúa formando enlaces covalentes con funciones $-SH$ de las enzimas. Son activos frente a mohos, levaduras, bacterias catalasas (+) y aerobias estrictas. Suelen utilizarse a concentraciones de 0,05 a 0,1% o menor. No comunican sabor a los alimentos a los que se adicionan.

La toxicidad escasa, en el hombre se elimina por beta oxidación, en humanos la concentración a metabolizar es pequeña.

Ensayos realizados en animales de experimentación a concentraciones elevadas ocasiona hipertrofia hepática y renal. No se ha demostrado acción cancerígena.

La dosis diaria sin efecto es 750 mg/kg/día y la dosis diaria admisible es 25 mg/Kg/día.

En los alimentos es posible reacciones entre el ácido sórbico y sulfitos o bien nitritos, algunos estudios han mostrado respuesta genotóxica, en estos casos.

En conclusión, el ácido sórbico y sus sales presentan:

- 1) Muy baja potencialidad tóxica.
- 2) Posible formación en alimentos de compuestos de adición con nitritos y sulfitos.
- 3) Potencialidad genotóxica del sorbato sódico.

Por tanto, se aconseja: 1) no utilizar sorbato sódico, de otra parte, por su inestabilidad posee poco interés tecnológico, 2) no utilizar en el mismo alimento ácido sórbico, sulfitos o nitritos.

Ácido benzoico y benzoatos (E-210 a E-213)

Se comportan como ácidos débiles ($K_{ab} = 6,64 \times 10^{-5}$) y el pH óptimo de actuación entre 4-4,5.

Su comportamiento como conservador se debe a que inhibe enzimas catalizadoras de la fosforilación oxidativa, del metabolismo del ácido acético y enzimas del ciclo de Krebs. Además actúan sobre la pared celular. Son activos frente a mohos, levaduras, y poco activos frente bacteria lácticas y *Clostridium*. Se utilizan a concentración de 0,05 a 0,1% o menor. Comunica sabor a los alimentos a los que se adicionan.

Ensayos de toxicidad crónica muestran que la adición de un 5% en peso al alimento de ratas resulta altamente tóxico, mientras que concentraciones de 1% no presentan riesgo alguno ni para el crecimiento ni la reproducción.

Se absorbe fácilmente en el intestino, no se liga a proteínas, no se oxida.

Se une a la coenzima A originando benzoil CoA, a glicocola generando ácido hipúrico y al ácido glucurónico formando glucurónidos, estos dos conjugados se eliminan por orina.

Ésteres del ácido p-hidroxibenzoico (E-214 a E-219)

Presentan acción anestésica local. Se eliminan tras hidrólisis del éster, y posterior conjugación. La acción conservadora se debe a la desnaturalización de proteínas; establecen competencia con coenzimas celulares y además pueden actuar sobre la membrana celular provocando su destrucción. Son activos frente a hongos y bacterias Gram (+). Se utilizan a concentraciones de entre 0,05 a 0,1 % o menores. Comunican sabor desagradable a los alimentos. Es recomendable no superar 0,8 g/kg de producto terminado a fin de no generar sabores extraños. Toxicidad aguda, mayor a más longitud de cadena alcohólica y no aumenta al mezclar con otros conservadores. Toxicidad crónica, estudios a 2 años no dan lugar a lesiones específicas en órganos, ni cambios histológicos ni respuestas cancerígeno.

Se absorbe rápidamente en el tracto digestivo y se elimina como ácido p-hidroxi benzoico y ácido p-hidroxi hipúrico.

Ácidos orgánicos: Ácido láctico, propionico, acético y derivados (E-270; E-280; E-260)

Actúan como conservadores porque modifican el pH del medio, impidiendo por tanto el desarrollo de los microorganismos. Este comportamiento implica modificaciones organolépticas importantes en el alimento y además es preciso adicionarlos al medio en concentraciones superiores al 1%. No presentan riesgo tóxico en las condiciones de empleo. En concentraciones elevadas son cáusticos para la piel. Forman parte de sistemas metabólicos degradativos.

2. Conservantes inorgánicos

Dióxido de azufre y derivados (E-220 a E-228)

Se incluye SO_2 , sulfito, bisulfito y metasulfito. La proporción de cada especie química que se produce está en función del pH, a 4,5 es alta la cantidad de bisulfito y a medida que se reduce el pH se favorece la forma no disociada del ácido sulfuroso, considerado como el agente activo frente a los microorganismos.

Se emplean en zumos de frutas, jarabes, frutas secas y vinos. Son efectivos contra levaduras, hongos y bacterias. Su uso está limitado a 500 mg/kg ya que son desagradables al paladar. No deberían añadirse a alimentos que fuesen fuente de tiamina (vitamina B1) ya que la destruyen.

Además de su efecto estrictamente conservador, presentan otros efectos de interés en los alimentos: a) inhiben las reacciones de pardeamiento de Maillard al reaccionar con los grupos carbonilo libres de los azúcares y evitan que estos interaccionen con otros aminoácidos, y además, presentan efecto decolorante sobre los pigmentos melanoidinas, productos finales de estas transformaciones; b) evitan las reacciones de pardeamiento enzimático por su capacidad reductora; y c) inhiben la síntesis de quinonas además de ejercer posiblemente acción inhibitoria sobre la enzima.

Estos aditivos tienen una gran aplicación en la industria vitivinícola por sus diferentes acciones en el vino: a) son blanqueadores y eliminan los colores pardos indeseables; b) actúan como antioxidantes al reaccionar con el peróxido de hidrógeno y con los fenoles y aldehídos oxidados, transformándolos en compuestos menos activos; y c) tienen una función antimicrobiana contra levaduras indeseables y ciertas bacterias.

Como reaccionan con los azúcares reductores, una parte de los sulfitos añadidos a un alimento se pierde y no cumple su función antimicrobiana. A las concentraciones empleadas de 500 ppm máximo no generan olores indeseables ni son tóxicos para la mayoría de la población.

Administrado en la dieta a animales de experimentación en concentraciones de 29-40 a 190 mg/kg/día, se observa que no afectan a la velocidad de crecimiento y reproducción; además, no se observan alteraciones histológicas. No es teratógeno en roedores y resulta potencialmente mutagénico en ensayos con microorganismos.

En humanos, los sulfitos por acción de la enzima sulfitooxidasa se oxidan hasta sulfatos; esto ocurre en las mitocondrias de células del hígado, corazón y riñones principalmente. En individuos con menor nivel de enzimas la oxidación da lugar a la formación de tiosulfatos, S-sulfonatos y tioles que aparecen en plasma y pulmones. Esto se traduce en cuadros tales como espasmos bronquiales, broncoconstricción, urticaria, angioedema, hipotensión etc. Individuos hipersensibles presentan reacciones adversas a dosis de 3,5-350 mg/día.

Nitratos y nitritos (E-249-E-252)

La exposición a estas sustancias es variada, proceden de la agricultura, de aguas residuales (detergentes, pesticidas...) y de los vegetales que acumulan tanto nitratos como nitritos. Como aditivos conservadores se utilizan las sales sódica y potásica de nitratos y nitritos (E-249-E-252).

El efecto conservador se debe: 1) a su capacidad para unirse a grupos $-NH_2$ de deshidrogenasas microbianas; 2) a que reaccionan con hemoproteínas (citocromos); y 3) reaccionan con grupos SH de enzimas.

El pH óptimo de actuación es ácido, de forma que son activos frente a bacterias y lactobacilos. Presentan un efecto específico frente *Clostridium* e impiden por tanto la formación de toxina botulínica. Se añaden a carnes y embutidos, quesos y salazones.

Por el riesgo de toxicidad, estas moléculas presentan una dosis diaria admisible muy estricta de 3,6 mg/kg/día para nitratos y de 0,13 mg/kg/día para los nitritos.

Los nitratos no son tóxicos *per se*, solo presentan efecto diurético por ósmosis (desplaza Cl^- retiene Na^+). La transformación de nitratos en nitritos se realiza con la participación de nitrato reductasa, producida por plantas/bacterias; el pH óptimo de actuación es 6-6,4.

Los nitritos ejercen diversos efectos no deseables, son metahemoglobinizantes, precursores de nitrosaminas, antitiroideos, vasomotores, antivitaminicos (destrucción vitaminas: A y B1, B2), y producen falsas alergias alimentarias (alteraciones histamínicas, por mecanismo no inmunitario).

3. Antibióticos

Los dos antibióticos más importantes empleados en muchos países con fines conservadores de alimentos son la natamicina y nisina.

Natamicina o pimaricina E-235

Originado por *Streptomyces natalensis*; es antifúngico y está permitido en algunos países. *In vitro* inhibe el desarrollo de hongos productores de aflatoxinas en semillas almacenadas.

En embutidos, concentraciones de natamicina de unas 1.000 ppm evitan la contaminación por hongos. Puede aplicarse con salmuera, baños o en forma de *spray* para diferentes tipos de tripas (chorizo, salchichón y jamón) y para tratar la corteza del queso, tanto blando como duro, por inmersión en baños, o rociándolo con suspensiones de 500 ppm de natamicina. El antibiótico puede detectarse en la corteza. Algunos mohos, (por ejemplo, *Aspergillus flavus*) producen enzimas que inactivan la natamicina.

Nisina E-234

Producida por *Streptococcus lactis*. Se encuentra en la leche ácida y en el queso de granja. Es posible que desde siempre el hombre haya ingerido pequeñas cantidades de este antibiótico. La ingesta media diaria incondicional de 0-33.000 U/kg de peso (OMS).

En la conservación de alimentos se recomiendan de 100 a 400 unidades por gramo de alimento (o 2,5-10 ppm). Entre sus características cabe destacar un pequeño espectro antibacteriano, afecta sólo a los gérmenes Gram positivos. Es termoestable en medio ácido, de forma que con menor tratamiento térmico se mejora la calidad del alimento. La UE lo autoriza como conservante de ciertos tipos de quesos procesados, especialmente los fundidos. En algunos países se emplea como conservante de la leche y derivados lácteos. No tiene aplicaciones clínicas, por esto se puede utilizar en alimentación sin problemas secundarios. Se ha comprobado que lo produce la flora intestinal humana, no presenta toxicidad o poder alergénico, en parte porque la nisina ingerida se destruye durante la digestión y sus aminoácidos se metabolizan como los procedentes de otras proteínas.

En resumen, la presencia de un conservador en un producto alimenticio no es garantía de su calidad bacteriológica. Evita la proliferación de microorganismos, pero no impide en ocasiones que sobrevivan.

El empleo de estas sustancias no debe sustituir un buen control de calidad bacteriológica en el transcurso de la producción, transformación y distribución (un producto contaminado lo seguirá estando).

Se deberán aceptar las sustancias que se crean inofensivas, las realmente necesarias y solo a las dosis que sean útiles.

Bibliografía

Barros C (1982). Los aditivos en la alimentación y la nutrición. *Alimentaria* 129: 39-50.

Barros C (1986). *Los aditivos alimentarios, sistemas para garantizar su inocuidad y empleo*. Ed. Sid-Alimentaria. Madrid.

Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) Base de datos sobre aditivos alimentarios (con excepción de los utilizados como aromatizantes) http://apps3.fao.org/jecfa/additive_specs/.

Ferrando R, Truhaut R (1980). Problems which are essential to resolve in order to obtain significant results in experimental studies on nutrition and toxicology in laboratory animals. *Bull Acad Natl Med*. 164:183-8.

Real Decreto 2001/1995 del Ministerio de sanidad y consumo, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos colorantes autorizados para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización (BOE n 19 de enero de 1995).

Real Decreto 3177/1983 de Presidencia de Gobierno de 16 de noviembre por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria de aditivos alimentarios.

Real Decreto 1339/1988, de 28 de octubre, por el que se modifica la reglamentación técnico-sanitaria de aditivos alimentarios, aprobada por el Real Decreto 3177/1983.

Real Decreto 1111/1991, de 12 de julio, por el que se modifica la reglamentación técnico-sanitaria de aditivos alimentarios, aprobada por Real Decreto 3177/1983, de 16 de noviembre, y modificada por Real Decreto 1339/1988, de 28 de octubre.

Truhaut R (1980). Criteria for determining priorities in the evaluation of ecotoxic effects of chemical products. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. 84:487-93.

Truhaut R (1986). Principles of toxicological evaluation of food additives. En: Barros, C. (ed.). *Los aditivos alimentarios, sistemas para garantizar su inocuidad y empleo*. Sid-Alimentaria, Madrid.

Vigueras GAL, Portillo M (1995). La grana cochinitilla: Un recurso natural. *Agroicultura*, año 6, 35: 24-25. México.

Vigueras G. A. L., Llanderal C. C., Soto H. M. L. Portillo M. (1998). Manejo postcosecha y extracción del pigmento de la «cochinilla» del nopal. En: *Memorias del XXXIII Congreso Nacional de Entomología*. Acapulco, Gro., México, pp. 398-400.

ASPECTOS BROMATOLÓGICOS Y TOXICOLÓGICOS DE LOS EDULCORANTES

Miguel Navarro

Introducción. Conceptos y clasificación. Bases moleculares y estructurales del sabor dulce. Azúcares alimenticios como edulcorantes naturales. Edulcorantes intensos no nutritivos y bajos en calorías. Edulcorantes voluminosos o de sustitución (polioles). Bibliografía.

Introducción

El abuso del consumo de los hidratos de carbono, principalmente los refinados, ha sido relacionado con enfermedades de hipernutrición como la obesidad, diabetes mellitus y enfermedades cardiovasculares. En estudios epidemiológicos se ha observado la relación entre el consumo de azúcares sencillos (monosacáridos y disacáridos) y el aumento de la incidencia de caries dentales. Todo esto ha contribuido a la búsqueda y desarrollo de nuevas sustancias con la capacidad de conferir sabor dulce a los alimentos y que, a diferencia de los de forma tradicional usados, no supongan un aporte calórico, o que lo tengan en restringido, para ser empleados con fines dietéticos en la elaboración de productos alimenticios de bajo aporte calórico para obesos, para diabéticos, o no cariogénicos.

La sacarosa constituye el edulcorante clásico natural por antonomasia de los alimentos, y al

ser metabolizada aporta 4 kcal/g. En la búsqueda de sustancias sustitutas de la sacarosa, estas han de presentar las características generales siguientes: sabor y propiedades funcionales semejantes sin regustos anómalos desagradables, nula o menor densidad calórica que el azúcar, no ser cariogénicas y que su metabolización se realice por vías normales o incluso sean excretadas sin metabolización previa, no ser inductoras de manifestaciones toxicológicas (mutagénicas, carcinogénicas, teratogénicas, alergénicas, etc.), ser estables desde el punto de vista químico en el alimento vehículo (durante su tratamiento tecnológico y en su almacenamiento) y que sean viables económicamente como edulcorantes alternativos.

En los últimos años ha aumentado el conocimiento de la fisiología y bases moleculares de los receptores del sabor dulce, lo que ha permitido el desarrollo de múltiples sustancias sintéticas con un poder edulcorante (PE) muy superior al de la sacarosa. La química orgánica de síntesis ha permitido, de acuerdo a modificaciones

moleculares de sustancias con efecto edulcorante, el diseño de otras nuevas en las que se ha producido un aumento considerable en varios cientos o millares de veces el PE, con la simple eliminación o inserción de un grupo en la misma. Este diseño no ha estado exento de controversia, principalmente desde el punto de vista toxicológico.

Se pueden combinar dos o más edulcorantes en el mismo producto, lo que mejora la seguridad de su empleo, al reducirse la cantidad necesaria de cada una de las sustancias de la mezcla, por el efecto sinérgico establecido entre ellas, que aumenta mutuamente su PE. Además, se puede reducir el regusto desagradable asociado al empleo individual de un edulcorante. En productos donde se requiere un efecto texturizante y un aporte calórico bajo, la cantidad de edulcorante puede reducirse por mezcla de un polialcohol y un edulcorante intenso.

En este capítulo vamos a estudiar los edulcorantes alimentarios considerando su estructura, propiedades, estabilidad, condiciones de uso y aplicaciones según la reglamentación vigente, metabolización y aspectos toxicológicos.

En España, la regulación legislativa de los edulcorantes se recoge en el Real Decreto (RD) 2027/1997, de 26 de diciembre, por el que se modifica el RD 2002/1995, que aprobaba la lista positiva de aditivos edulcorantes autorizados para uso en productos alimenticios; y en el RD 1116/1999, de 25 de junio, por el que se modifica el RD 2106/1996, de 20 de septiembre, que se establecía las normas de identidad y pureza de edulcorantes utilizados en productos alimenticios.

Conceptos y clasificación

Según establece el Real Decreto 2106/1996 de 20 de septiembre, se entiende por *edulcorantes*: «aquellos aditivos utilizados para dar sabor dulce a los productos alimenticios y/o que son utilizados por sus propiedades edulcorantes».

Según indica el CAE (Código Alimentario Español), los *edulcorantes artificiales* son «sustancias sápidas sintéticas, que sin tener cualidades nutritivas, poseen un poder edulcorante superior al de la caña de azúcar, remolacha o cualquier hidrato de carbono al que tratan de sustituir». A su vez, se entiende por *poder edulcorante* «los gramos de sacarosa que hay que disolver en agua para obtener un líquido con igual sabor que la disolución de 1 gramo de edulcorante en el mismo volumen».

Existen muchas sustancias con sabor dulce, edulcorantes que dividimos en:

a) *Los azúcares alimenticios*, de origen natural, con valor nutritivo y poder edulcorante inferior o vecino a la sacarosa. Incluyen la sacarosa, fructosa, glucosa, isoglucosa, etc.

b) *Los edulcorantes intensos*, de origen sintético normalmente o natural, sin valor nutritivo o valor nutritivo reducido y de PE desde decenas a millares de veces superior a la sacarosa. Estas sustancias son consideradas como aditivos, al suponer una carga ponderal mínima en el producto alimenticio al que se incorporan. Incluye dos subgrupos de sustancias: a) *sustancias químicas sintéticas* como la sacarina y sus sales, el ácido ciclámico y sus sales, el acesulfamo, aspartamo, alitamo y sucralosa, entre otros; b) *sustancias de origen vegetal* de naturaleza glicosídica (glicirricina, dihidrochalconas y esteviósido) y de naturaleza proteica (taumatinas, monelina y miraculina).

c) *Los polioles o polialcoholes o azúcares-alcohol*, de origen natural y/o semisintético, con valor nutritivo y bajo PE, inferior a la sacarosa. Tienen efecto texturizante, confirmando volumen o cuerpo a los alimentos. Incluyen el manitol, lactitol, isomaltitol, xilitol, sorbitol y maltitol.

Bases moleculares y estructurales del sabor dulce

De todos los sabores básicos, el sabor dulce es el de mayor complejidad, ya que cambios peque-

ños en las moléculas pueden originar modificaciones muy dispares en el sabor: en el siglo pasado se desarrolló una teoría que relacionaba la estructura molecular con el sabor dulce. Shallenbergeer y Acree (1971), propusieron la presencia en todas las sustancias edulcorantes de una estructura común denominada *estructura glicófora*, que se une a los receptores proteicos. Este glicóforo tiene:

a) *Un sistema donador/aceptor de protones (sistema AH_s/B_s)*, y que la distancia entre AH_s y B_s esté comprendida entre 2,5 y 4 Å. La *unidad AH* es un grupo formado por un átomo de oxígeno o nitrógeno al que se encuentra unido otro de hidrógeno, como -OH, -NH- o -NH₂. La *unidad B* es un grupo con oxígeno, nitrógeno o cualquier otro átomo electronegativo (el cloro) que sea capaz de formar puentes de hidrógeno.

Este sistema se acopla, con condicionantes estéricos, en otro complementario presente en el receptor por puentes de hidrógeno (Figura 26.1).

b) *La unidad gamma (γ_s)*, introducida por Kier (1972) de carácter hidrófobo, que influye en las diferencias de PE (tiempo e intensidad), y en el gran PE de los edulcorantes intensos. Son generalmente grupos -CH₂-, -CH₃- o -C₆H₅. Esta unidad facilita el acceso de ciertas moléculas al receptor gustativo y está relacionada con alguna de las interacciones existentes entre el dulzor y amargor en ciertas sustancias. Es una estructura triangular que contacta sus unidades activas (AH_s, B_s y γ_s) con las moléculas del receptor, lo que constituye la base racional de la estructura tripartita de la teoría del dulzor (Figura 26.2).

Azúcares alimenticios como edulcorantes naturales

Son componentes naturales del alimento mismo o se agregan como azúcares en edulcorantes de maíz o en jarabes (sobre todo la sacarosa y la fructosa), que presentan valor nutritivo y energético, por lo que no pueden ser considerados

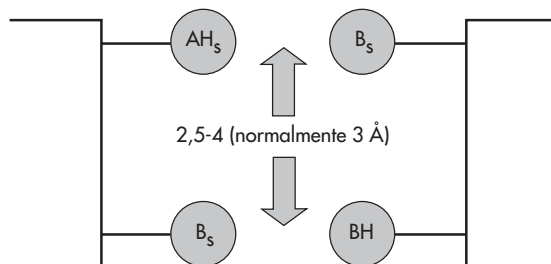


Figura 26.1. AH_s = grupo nucleofílico de la sustancia edulcorante. AH_r = grupo nucleofílico del receptor, unido a un hidrógeno. BH = grupo o átomo electrofílico, unido a un hidrógeno. B_s, B_r = grupos electrofílicos del edulcorante o del receptor.

como aditivos. En los alimentos facilitan una serie de propiedades funcionales: sensoriales por el sabor de las melazas, físicas al influir en la cristalización y viscosidad, control de microorganismos en procesos de fermentación y preservación de contaminación, y químicas, al influir en procesos de caramelización.

Se usan en alimentación también por su carácter edulcorante, fin con el que se emplean con mayor frecuencia la sacarosa, glucosa, lactosa y el azúcar invertido.

La *sacarosa* se obtiene industrialmente de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) y de la remolacha azucarera (*Beta vulgaris* var. *Rapa*), y es el más utilizado. Proporciona 4

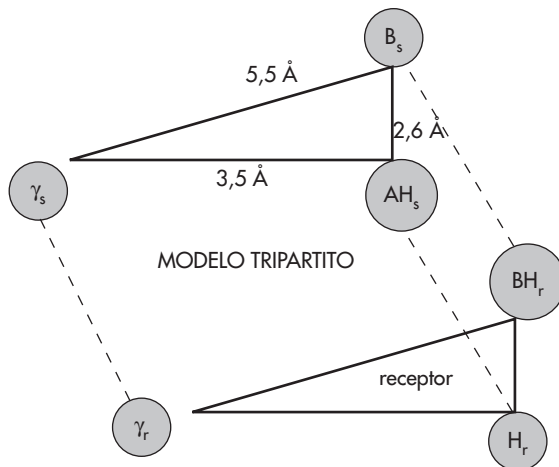


Figura 26.2. γ_s = grupo hidrófobo del edulcorante. γ_r = resto hidrófobo del receptor.

kcal/g. La refinación facilita la obtención de cristales blancos típicos del azúcar de mesa, con extracción de los pigmentos amarillentos y marrones presentes. Su forma menos refinada es la melaza.

La *glucosa* se emplea principalmente en la elaboración de helados (hasta un 25% del total de los azúcares presentes). Tiene un PE = 0,5-0,8.

La *fructosa* también proporciona 4 kcal/g y es un componente de la sacarosa presente en las frutas, pero que también puede adicionarse a los alimentos y bebidas en forma cristalina o como jarabe de maíz de alta fructosa. Se emplea como sustituto de la sacarosa en muchos alimentos y bebidas por su mayor PE (PE = 1,2-1,5), por sus propiedades funcionales que realzan el sabor, color y estabilidad del producto, y porque produce una elevación más lenta de los niveles de glucemia. También se utiliza como edulcorante sinérgico con la sacarosa y otros edulcorantes intensos.

El *azúcar invertido* se obtiene por hidrólisis de la sacarosa mediante la enzima invertasa o en condiciones poco ácidas, originándose cantidades equimoleculares libres de glucosa y de fructosa. Este proceso origina la inversión por cambio de rotación óptica, desde una dextrorrotatoria a la levorrotatoria, del azúcar invertido. Se usa como sustituto del azúcar en confitería al aportar menos calorías por su mayor PE.

Edulcorantes intensos no nutritivos y bajos en calorías

1. Edulcorantes de origen sintético y no sintético

Sacarina y sales de sodio, potasio y calcio

La sacarina fue el edulcorante intenso acalórico empleado en primer lugar, descubierto en 1879

por Fahlberg and Remsen. Su síntesis se establece por:

- a) *El método de Remsen/Fahlberg*, a partir del toluol, que origina hasta 31 impurezas distintas en el producto final (la principal es el o-tolueno sulfonamida).
- b) *Método de Maumee*, parte de anhídrido ftálico, obteniendo un producto final con hasta 23 impurezas distintas, pero exento de o-tolueno sulfonamida.

Tiene la denominación química de 3-oxo-2,3-dihidrobenzo(d)isotiazol-1,1-dióxido y la fórmula empírica $C_7H_5NO_3S$. Es un polvo blanco cristalino anhidro, no higroscópico poco hidrosoluble.

Es el edulcorante artificial E-954 más empleado en la actualidad por su alta estabilidad y bajo costo, y presenta un PE = 300-500. Tiene un sabor azucarado franco y origina un cierto gusto amargo y/o metálico a elevadas dosis.

Las ventajas asociadas a su empleo son: reducción considerable del contenido calórico en alimentos y bebidas al usarse como sustituto del azúcar; elevada estabilidad [en almacenamiento, a tratamientos térmicos intensos (estable hasta 500 °C), horneado y gama amplia de pH entre 2-9]; no ser cariogénica y prevención de caries dental; indicación para diabéticos; y sinergismo con otros edulcorantes bajos en calorías.

Su empleo es principalmente como sal sódica, aunque también como sales cálcicas y potásicas, por la baja solubilidad de la forma ácida en agua (solubilidad de sacarina: 3,4 g/l de agua a 25 °C; de sacarinato sódico: 667 g/l de agua a 25 °C).

La sacarina se usa en mezclas con otras sustancias para enmascarar su gusto desagradable y/o el proporcionarle volumen o cuerpo como edulcorante y/o como sinérgico con otros edulcorantes. Destacan las establecidas con ciclamato y aspartamo.

También se usa como edulcorante de mesa en forma de pastillas o en disolución. Es de destacar su empleo en productos de higiene bucal como pastas dentífricas y enjuagues bucales, por su efecto anticariogénico, o en productos farmacéuticos y preparados multivitamínicos.

La sacarina es absorbida lentamente y no se metaboliza en el organismo humano, siendo excretada rápidamente en la orina sin modificar. Solamente en casos extremos ($\text{pH} < 2$) el producto de descomposición es el ácido o-sulfo-benzoato de amonio.

La toxicidad de la sacarina es muy débil. A pesar de ello, su consumo no ha estado exento de cierta controversia al haber sido asociado este con un aumento de la incidencia de tumores de vejiga en animales de experimentación como las ratas, cosa que sin embargo no ha sido puesta de manifiesto en estudios realizados en humanos. En la década de los 70 varios grupos de investigación indicaron que dosis altas de sacarina (5% de la dieta en peso) eran capaces de inducir la aparición de cáncer de vejiga al considerarse varias generaciones de animales. La FDA (*Food and Drug Administration*) empleó dosis superiores de hasta el 7,5% de sacarina respecto al peso total de la dieta, originando un incremento en el número de tumores de vejiga detectados. Como consecuencia, la FDA inició una campaña para la retirada del producto como aditivo alimentario, cosa que no se produjo ya que el Congreso Americano en 1977, ante las protestas de las empresas afectadas y de algunas asociaciones, entre ellas las de los diabéticos, motivaron que se estableciera una moratoria a la prohibición, indicando la necesidad de ejecución de estudios experimentales complementarios.

La sacarina *per sé* no tiene efectos mutágenos ni cancerígenos. Se está discutiendo que el efecto apuntado sobre la vejiga en animales experimentales se relaciona con las dosis extremadamente altas usadas y con la presencia de ciertas impurezas en la misma (o-tolueno sulfonamida). Además, parece ser que el efecto de la sacarina en la vejiga de las ratas, se produce mediante irritación continuada en la misma originada por cambios en la composición global de la orina, con cambios de pH y formación de precipitados minerales, sobre todo de Na, cuyo ataque continuado originaría la aparición del tumor. Sin embargo, las concentraciones de sacarina presentes y usadas en la dieta de los humanos están muy por debajo de la utilizada

en los estudios con ratas, por lo que no existe ninguna posibilidad de que se produzca esta agresión.

En animales como el mono, se vio que la sacarina atravesaba la barrera placentaria, aunque las numerosas investigaciones realizadas han manifestado que no presenta efectos teratógenos en animales como la rata, ratón o conejo. Solamente tras la administración diaria de 6 mg/kg de sacarina a ratas gestantes se observó que aparecían anomalías en el cristalino. Esta embriotoxicidad parece ser que está relacionada con las impurezas presentes en la sacarina (o-tolueno sulfonamida).

A la sacarina, el Comité Mixto FAO/WHO JECFA (*Food and Drug Administration and World Health Organization Joint Expert Committee on Food Additives*, 1993) le asignó una ingesta diaria admisible (IDA) temporal de 5 mg/kg peso y día, que fue adoptada por el SCF EC-ECC (*Scientific Committee for Food of the European Commission of the Economic Communities*) en 1995.

Ácido ciclámico y sales de sodio y calcio

El ciclamato fue descubierto en 1937 por Sveda. Su síntesis consiste en una sulfonación de la ciclohexilamina (derivada del benceno del alquitrán de hulla o petróleo) con ácido cloro-sulfónico. Las impurezas que origina son ciclohexilamina, diciticlohexilamina y anilina.

El ácido ciclámico tiene la denominación química de ácido ciclohexil-aminosulfónico y una fórmula química de $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_3\text{S}$. Es un polvo blanco cristalino inodoro y muy estable en el almacenamiento.

Es un edulcorante artificial (E-952) con PE = 30-40. Su intenso empleo se relaciona con su elevada solubilidad en agua, sobre todo en forma salina (210 g/l), y con su gran estabilidad en solución frente a amplios rangos de pH ($\text{pH} = 2-8$) o elevadas temperaturas (resiste hasta 500 °C).

Tiene un sabor azucarado agradable sin resabio amargo y similar al de la sacarosa, que se alcanza más lentamente y mantiene por un

periodo de tiempo superior. Tiene las ventajas de: ser acalórico; elevada estabilidad en almacenamiento, tratamientos térmicos intensos y amplio margen de pH; no ser cariogénico; indicado para diabéticos; sinérgico con otros edulcorantes; ser barato; y gusto agradable.

La forma más usada es sal sódica. También pueden usarse las sales cálcicas o incluso la forma ácida directamente, esta última de menor solubilidad en agua.

El ciclamato se emplea en combinaciones con la sacarina (proporción 10:1) originando un dulzor más adecuado y enmascarando el regusto amargo de esta, además de que el PE del ciclamato (10 veces inferior al de la sacarina) se ve potenciado por el sinergismo establecido. También se combina con aspartamo, y con aspartamo y sacarina juntos, mezclas que aumentan la estabilidad y originan buenos perfiles de sabor en edulcorantes de mesa, bebidas dietéticas, gomas de mascar, aderezos y productos farmacéuticos. Otra mezcla sinérgica ha sido con la sacarosa.

Aproximadamente el 40% del ciclamato ingerido es absorbido en el intestino, eliminándose sin ser metabolizado en la orina. De la cantidad no absorbida, el 30% es metabolizada por la flora microbiana intestinal (principalmente los enterococos en humanos) hasta ciclohexilamina, ciclohexanol y ciclohexanona. Algunos estudios en ratas, donde se usaron dosis extremadamente altas de edulcorante, han indicado a la ciclohexilamina como inductor de cáncer de vejiga, aunque estudios posteriores no han demostrado efectos carcinogénicos ni teratógenos en el ser humano.

Por estos problemas de toxicidad, en 1969 la FDA prohibió su uso como aditivo alimentario, no subsistiendo actualmente más que en farmacia. Los estudios experimentales realizados posteriormente no han corroborado toxicidad alguna en humanos, por lo que se permite su empleo en 41 países en alimentos acalóricos.

Su mayor riesgo potencial se manifiesta en mujeres embarazadas y sobre todo en niños a los que están destinados muchos productos que lo

contienen, ya que ellos, al ser más pequeños, la dosis por unidad de peso es evidentemente mayor.

La JECFA ha fijado una IDA temporal para el ciclamato de 11 mg/kg de peso (como ácido ciclámico), mientras que el SCF (2000) la fijó en 7 mg/kg de peso.

Acesulfamo y su sal potásica

El acesulfamo fue descubierto en 1967 por Claus y Jensen. Su síntesis se establece a partir del fluorsulfoilisocianato y el éster butílico del ácido acetoacético. Los productos secundarios que pueden acompañarlo como impurezas son la acetoacetamida y su derivado N-sulfonado.

El acesulfamo K es la sal potásica del 3,4-dihidro-6-metil-1,2,3-oxatiazin-4-ona-2,2-dióxido y tiene la fórmula de $C_4H_4KNO_4SK$. Su estructura presenta cierta similitud con la de la sacarina, y tiene también ciertas propiedades ácidas, por lo que su forma comercial es la sal de potasio. Es un polvo blanco cristalino inodoro y no higroscópico.

Es el edulcorante artificial E-950 con un $PE \cong 200$. Su empleo se relaciona con su alta solubilidad en agua (270 g/l a 20 °C); buena estabilidad en solución en el rango habitual de pH de las bebidas (pH = 2-8) o frente a la elevada temperatura de los tratamientos tecnológicos usuales en confitería y pastelería; y con su sabor azucarado agradable.

El acesulfamo K facilita un sabor azucarado limpio de aparición rápida, con un ligero sabor residual amargo a altas concentraciones. Para evitarlo se suele usar en mezclas con otros edulcorantes bajos en calorías, como el aspartamo o los polioles.

Las ventajas asociadas a su empleo son semejantes a las indicadas para el ciclamato, aunque además realza y/o intensifica ciertos aromas.

El acesulfamo K se emplea en mezclas por sinergismo y mejora del perfil de sabor dulce obtenido. Se usa en combinaciones con edulcorantes voluminosos (azúcares y polioles): con sacarosa, con fructosa, con sorbitol, con isomaltitol, y con maltitol. En la mezclas acesulfamo

K-ciclamato Na (1:5 por peso) o acesulfamo K-aspartamo (1:1 por peso), por su efecto sinérgico eleva la intensidad endulzante en un 30%. De la mezcla del acesulfame K con la taumatina, derivan beneficios al producirse un sabor similar en algunos productos al del aspartamo, que es más costoso.

Dada la buena solubilidad y estabilidad en medio acuoso, el acesulfamo K es muy apropiado para endulzar bebidas refrescantes (particularmente las ácidas), para polvos de disolución instantánea, para edulcorantes de mesa (en forma de soluciones, gránulos desecados por sistemas de spray, polvo, comprimidos o comprimidos efervescentes), para mermeladas y compotas sin azúcar combinado con sorbitol, para conservas de bajo contenido calórico combinado con pectinas, para productos de panadería como sustituto del azúcar mezclado con sorbitol, isomaltitol y lactitol, para productos farmacéuticos, y para pastas y enjuagues bucales.

El acesulfamo K es absorbido a nivel intestinal y se excreta por vía urinaria sin metabolización previa. Se ha indicado la presencia como productos de descomposición el ácido acetona-mida N-sulfónico y la acetona-mida, que finalmente originan acetona, sulfato amónico y dióxido de carbono. Sin embargo, estas sustancias no influyen más que en condiciones extremas que no se dan habitualmente.

Los múltiples estudios experimentales realizados han demostrado que el acesulfamo K no se combina con los ácidos nucleicos, no habiendo manifestado mutagenicidad. Tampoco presenta actividad cancerígena en los estudios a largo plazo realizados, para dosis del 3% del peso de la dieta. El JECFA ha fijado una IDA temporal para el ser humano de 15 mg/kg de peso corporal. En Europa el SCF (2000) estableció una IDA de 9 mg/kg de peso corporal.

Aspartamo

El aspartamo fue descubierto por Schlatter y Searle en 1965. Sus aminoácidos (aa) constitutivos están en las proteínas de las carnes, productos lácteos y vegetales.

Se sintetiza química y enzimáticamente desde los 2 aa que lo constituyen [ácido *L*-aspártico (Asp) y la *L*-fenilalanina (Phe)]. También puede obtenerse por la reacción de la plasteína con un derivado en el N del Asp y el éster metílico de la Phe o por manipulación genética de la síntesis bacteriana de un polímero Asp-Phe. La impureza presente asociada es la dicetopiperacina (ácido acético 5-bencil-3,6-dioxo-2-piperacina).

El aspartamo es el éster 1-metílico de N-*L*-aspartil-*L*-fenilalanina y tiene la fórmula empírica C₁₄H₁₈N₂O₅. Es un polvo blanco cristalino e inodoro poco soluble en agua.

El aspartamo es el edulcorante E-951 con un PE \approx 200. Aunque a igualdad de peso aporta más o menos las mismas calorías que la sacarosa, en las concentraciones usadas como edulcorante, su aporte energético es prácticamente despreciable.

Su empleo como edulcorante se encuentra limitado por su baja solubilidad en agua (60 g/l a 20 °C); su inestabilidad en condiciones neutras y alcalinas, y al someterse a temperatura elevada; su elevado coste; y el aporte adicional de Phe libre en fenilcetonúricos.

Su estabilidad en disolución depende del efecto conjugado de la temperatura del pH y del tiempo de almacenamiento: es buena entre 20-25 °C para pH = 3-5. Valores de pH fuera del rango descrito y sobre todo los pH neutro y alcalino, conjugados con una elevada temperatura provocan un degradación por hidrólisis del aspartamo y una pérdida de PE significativa. Adicionalmente, principalmente a alta temperatura, el aspartamo sufre con facilidad un condensación intramolecular originando la dicetopiperacina. También a pH alcalino se facilitan los procesos de pardeamiento químico por interacción amino (del aspartamo) con restos carbonilo (de la glucosa y/o de la vainillina), que originan pérdida de PE y del sabor asociado a la vainillina como aromatizante.

El aspartamo proporciona un sabor azucarado próximo al azúcar sin sabor residual desagradable y al estar compuesto por 2 aa, se metaboliza como las proteínas. Además, realza e intensifica los aromas, sobre todo de los cítricos y otras frutas.

Su empleo en mezclas con otros edulcorantes mejora su estabilidad durante el procesado, facilita un sabor más equilibrado y disminuye el coste de su producción, por su sinergismo con acesulfamo K, sacarina Na, ciclamato Na, glucosa o sacarosa.

El aspartamo, al utilizarse en mezclas con otros aromatizantes presentes en los productos, no debe hacerlo como sustituto de la sacarosa, ya que reacciona con ellos de forma distinta a esta.

El aspartamo se emplea en refrescos carbonatados, jugos, budines, rellenos y jaleas, cereales para desayuno, postres y agregados, edulcorantes de mesa, polvos para preparar refrescos, chicles, conservas de frutas, aderezos, untables para el pan, postres congelados, productos lácteos, dulces y mermeladas, confituras, bebidas calientes chocolateadas, multivitaminas, pastillas de menta y productos farmacéuticos.

El aspartamo se metaboliza en el organismo humano en los aa constituyentes (Asp y Phe) más metanol. La Phe es un aa esencial, a pesar de lo cual en sujetos fenilcetonúricos por la carencia de la enzima 4-monooxigenasa implicada en su metabolismo, se produce una elevación de las concentraciones de Phe en la sangre, asociadas a retraso mental severo característico de esta enfermedad congénita rara. Por este motivo, los productos alimenticios edulcorados con aspartamo deben etiquetarse de forma que quede bien visible su contenido en Phe.

El metanol es un producto tóxico, aunque la cantidad formada en el organismo por el uso del aspartamo es muy inferior a la que representa riesgos para la salud y, en su uso normal, inferior incluso a la presente de forma natural en muchos alimentos.

De los productos de descomposición del aspartamo en el organismo humano es la dicetopiperazina la más interesante para los toxicólogos, aunque es inocuo.

Las evaluaciones toxicológicas ejecutadas por el JECFA (1981) y el SCF (1984) han establecido su inocuidad, fijando una IDA de 40 mg/kg de peso corporal para el aspartamo y de 7,5 mg/kg de peso corporal para la dicetopiperazina.

Alitamo

El alitamo fue descubierto en los laboratorios *Pfizer* a principios de los noventa. Se sintetiza a partir del aa *L-Asp*, y la *D-Ala* y una nueva amina.

El alitamo es el [*L*-a-aspartil-N-(2,2,4,4-tetrametil-3-tietanil)-*D*-alaninamida] cuya fórmula empírica es $C_{14}H_{25}N_3O_4S$.

El alitamo presenta un PE = 2.000 y un sabor dulce semejante a la sacarosa. Es soluble en agua y estable frente a la temperatura o almacenamiento largos, durante los cuales, sobre todo si son en forma de soluciones ácidas, puede originar sabores desagradables.

Tiene la ventaja respecto al aspartamo, de mayor estabilidad y posibilidad de empleo en alimentos para fenilcetonúricos. No obstante, en almacenamientos largos, algunos refrescos endulzados con este pueden sufrir pérdida de sabor.

El alitamo se emplea en productos horneados y mezclas para hornear, polvos para preparar bebidas, postres congelados y polvos para prepararlos, goma de mascar y caramelos, bebidas calientes y frías, preparaciones con frutas, edulcorantes de mesa, pasta dental y enjuague bucal y productos farmacéuticos, lácteos y de panadería. En España no está permitido.

La metabolización del alitamo se establece a nivel del Asp constituyente al ser un aa (a pesar de ello por su gran PE su aporte calórico es insignificante); sin embargo, la alanina amida componente atraviesa el organismo sin cambios metabólicos.

Los estudios experimentales con alitamo indican su seguridad para consumo humano. La JECFA estableció una IDA de 0-1 mg/kg peso, que coincide con la de SCF en Europa. Se permite su uso en México, China, Nueva Zelanda y Australia.

Sucralosa

La sucralosa es un derivado sintético de la sacarosa descubierto por Hough de Tate y Lyle en 1979. Su síntesis se establece por cloración selectiva de 3 hidroxilos de la sacarosa con modificación adicional de la configuración tipo gluco por la tipo galacto.

La sucralosa es el 1,6-dicloro-1,6-didesoxi-b-fructofuranosil-4-cloro-a-D-galactopiranosido con una fórmula de $C_{13}H_{18}Cl_2O_8$. Es un polvo blanco cristalino, no higroscópico, muy estable en almacenamientos a sequedad y temperatura de refrigeración.

La sucralosa tiene un PE = 600, con una alta solubilidad en agua (260 g/l a 20 °C) y gran estabilidad en disolución en amplios márgenes de pH (3-7) y a temperatura ambiente. También es estable frente a alta temperatura, como la de cocción y horneado. Su perfil edulcorante (en tiempo e intensidad) es similar al de la sacarosa, sin resabios desagradables.

Tiene las ventajas de ser acalórico; excelente estabilidad en almacenamiento, tratamientos térmicos intensos y amplio margen de pH (solo se hidroliza en solución tras almacenamiento largo tiempo en condiciones extremas de acidez y temperatura); no ser cariogénico; indicado para diabéticos; y sinergismo con otros edulcorantes bajos en calorías.

La sucralosa se usa en productos de panadería, pastelería y bizcochería, bebidas no alcohólicas carbonatadas y no carbonatadas, productos lácteos, alimentos congelados, gomas de mascar, jarabes, frutas exprimidas, edulcorantes de mesa, postres congelados y aderezos para ensalada. En España no está permitido.

Su absorción intestinal oscila entre el 11-27%, y se elimina en orina sin metabolizar. La mayoría de la sucralosa ingerida se elimina por las heces sin modificar.

Los estudios experimentales manifiestan su seguridad a los niveles de empleo: sin efectos carcinogénicos, teratogénicos o mutagénicos. Por tanto, la IDA para la sucralosa ha sido establecida en 15 mg/kg (JECFA, 1990; SCF, 2000).

2. Edulcorantes de origen vegetal

Sustancias de naturaleza glicosídica

Glicirricina amoniaca

La glicirricina es una sustancia dulce natural presente en el rizoma del regaliz (*Glycyrriza gla-*

bra L.), mezclada con sales cálcicas y potásicas del ácido glicirrónico.

La glicirricina se obtiene por extracción desde el rizoma de regaliz en forma de sal amoniacal, constituyendo el glicirricinato amónico. Este es un polvo pardo, soluble en agua y estable en disolución hasta 105 °C, que precipita a pH inferior a 4,5. También se puede fabricar el glicirricinato monoamónico, que es un polvo cristalino y blanco, poco soluble en agua y alcohol, pero estable en amplios márgenes de pH.

La glicirricina es un glicósido triterpénico con 2 unidades de ácido glucurónico (como unidad glicosídica) y un resto de ácido glicirrético (como unidad aglicona).

Como edulcorante intenso, tiene un PE = 50, aunque no se utiliza como tal en los productos alimenticios, sino como aromatizante por el regusto a regaliz que deja. Su PE por el sinergismo establecido con sacarosa se multiplica por 100. Tiene un sabor particular, ligeramente mentolado, con sabor residual a regaliz. Su uso está permitido como aromatizante o surfactante en el tabaco, algunos productos de confitería, ciertas bebidas y preparaciones farmacéuticas.

La glicirricina es una sustancia cara, que presenta en el organismo humano tras consumo durante varios meses en grandes cantidades (> 500 mg/d) unos efectos secundarios semejantes a los corticoides, tales como edemas, dificultad de eliminación, hipocalemia, hipertensión, etc. Por todo ello existe una dosis máxima cotidiana fijada por la *Japan Medical Gazzete* en 1978 de 200 mg. Aparece en la lista de aditivos aceptados por la FDA. En España no se recoge en dicha lista.

Dihidrochalconas

Las dihidrochalconas son derivados de flavononas con sabor amargo, presentes en las frutas cítricas, como la neohesperidina, cuya presencia en la piel de la naranja de Sevilla (*Citrus aurantium*) fue descubierta por Horowitz y Gentili en 1950. Son edulcorantes derivados semisintéticos de las flavonas de naranja y pomelo, como la naringina de la piel del pomelo.

En su proceso semisintético de obtención, por modificación química la naringina y la neohesperidina se convierten (por hidrólisis en medio alcalino y precipitación posterior en medio ácido, seguida de hidrogenación) en dihidrochalconas con sabor dulce.

Destaca la neohesperidina dihidrochalcona (NHDC), en la que el disacárido unido al grupo 7 hidroxilo de la aglicona es la neohesperidosa (2'-O-a-L-ramnopiranosil-D-glucosa). Su denominación química es 2-O-a-L-ramnopiranosil-hesperetina dihidrochalcona y su fórmula empírica $C_{28}H_{36}O_{15}$. Es un polvo blanco cristalino, inodoro, poco soluble en agua (1,2 g/l). Su estabilidad se afecta en medio ácido y por la temperatura.

La NHDC es el edulcorante E-959 con un PE = 1.000-1.800. Su sabor azucarado es particular y distinto de la sacarosa: su consolidación es lenta con un regusto dulce tardío, que persiste varios minutos y se acompaña de un frescor mentolado.

El uso de la NHDC en combinaciones con la sacarina produce un dulzor sinérgico mejorando el perfil del sabor en bebidas analcohólicas. Al mezclarse con carbohidratos voluminosos o con la vainillina se elimina su regusto dulce desagradable. Su combinación con nucleótidos, aa o gluconato mejora el dulzor. También puede combinarse con los polialcoholes. Actúa más como modificador del sabor que como edulcorante, además de tener propiedades reductoras del sabor amargo.

La NHDC no es un buen sustituto de la sacarosa, y es además incompatible con otros aromatizantes en la mayor parte de los alimentos. En las bebidas, como mucho un 25% del dulzor puede ser aportado por la NHDC, porque por encima de este valor el sabor es inaceptable. Se emplea también en drogas de sabor amargo y en zumos de fruta. En combinación con otros edulcorantes intensos puede usarse en alimentos que necesiten pasteurización o higienización UHT, en goma de mascar, caramelos, bebidas carbonatadas y no carbonatadas, yogur, helados, postres, edulcorantes de mesa, pasta dental y enjuagues bucales, y productos farmacéuticos.

La NHDC no es absorbida en gran medida. Sin embargo, es metabolizada por la flora intes-

tinal, originando idénticos productos a sus análogos naturales. La NHDC es segura e inocua como edulcorante alimentario, al haberse comprobado que no es tóxica, no induce mutaciones en el ADN, ni tiene efectos cancerígenos, teratógenos ni cariogénicos. El SCF ha fijado para la NHDC una IDA de 5 mg/kg de peso.

Esteviósido

El esteviósido es un glicósido, con sabor dulce, cuya fracción aglicona está representada por un diterpenoide, el esteviol, asociado a 3 unidades de glucosa (fracción glucídica). Su aislamiento se produjo en 1931 por Bridel y Lavieille a partir de una planta sudamericana autóctona de Paraguay la *Stevia Rebaudiana* o «Yerba dulce».

Se obtiene por disolución alcohólica de las hojas de dicha planta, y suele aparecer en una mezcla de glicósidos, donde también hay rebaudiósidos, glicósidos que también tienen sabor dulce con incluso mejor perfil edulcorante que el esteviósido. Es un polvo blanco cristalino, de muy elevada pureza, aunque higroscópico. Tiene una buena estabilidad en disolución frente al calor y a valores de $pH \leq 4$.

Es un edulcorante natural con un PE = 300 que proporciona un sabor azucarado de buena calidad, aunque a altas concentraciones deja un regusto amargo e indeseable.

Normalmente se usa en combinaciones con otros edulcorantes: mezclado con la fructosa en bebidas refrescantes de contenido calórico reducido; o con polioles en chicles sin azúcar; o con la sacarosa en terrones de azúcar de contenido calórico bajo; o en mezclas sinérgicas con aspartamo, glicirricina, ciclamato y acesulfamo K.

En Paraguay y Brasil se ha utilizado durante siglos la planta stevia para endulzar alimentos y bebidas. El esteviósido podría ser usado en refrescos, productos vegetales al estilo japonés, edulcorantes de mesa, repostería, productos frutales, pescados y mariscos. En Japón se ha usado en edulcorantes de mesa, zumos, etc., como modificador del flavor y para suprimir aromas pungentes de algunos alimentos.

Los estudios experimentales han manifestado que carece de actividad mutagénica o genotóxica, siendo los extractos con esta sustancia inocuos para el consumo humano. Su hidrólisis enzimática, que parece ser se establece en el colon, genera el esteviol que se cree que tiene un efecto antiandrógeno, por su similitud estructural con las hormonas esteroídicas.

En junio de 1999 el SCF reiteró su previa opinión de que «la sustancia (esteviósido) no es aceptable como edulcorante de acuerdo con los datos disponibles al momento», no fijando su IDA, en virtud de los datos inadecuados sobre la composición y seguridad del esteviósido. Tampoco está autorizada por la FDA.

Sustancias de naturaleza proteica

Taumatinas (I y II)

Las taumatinas fueron aisladas por Van der Weel, en 1972 del fruto de una planta tropical del Oeste de África (*Thaumatococcus Daniellii*). En UK se encuentra como talín.

Se obtienen por extracción acuosa (pH = 2,5-4,0) del fruto denominado «katemfe» de la planta indicada y consiste básicamente en las proteínas taumatina I y II, junto con cantidades menores de constituyentes vegetales. Las taumatinas son proteínas alcalinas (pI= 12) de una sola cadena polipeptídica, un peso molecular de 20.000 daltons, y en el caso de la taumatina I, formada por 207 restos de aa de secuencia conocida, así como su estructura terciaria.

Son inestables si el medio de conservación no es estéril. En disolución, tienen una estabilidad muy variable, desnaturizándose por el calor: resisten bien la temperatura de 100 °C a un pH= 5,5 aunque se desnaturizan irreversiblemente a 55 °C a pH= 3,2.

Son el edulcorante natural E-957 con un PE = 2.000-3.000, un sabor azucarado tardío muy persistente (dura varios minutos) y, a veces, un sabor residual alicorado.

Las ventajas de su empleo son: el ser un edulcorante natural acalórico y de dulzura intensa; el ser estable en forma seca y congelada, y frente al calor y la acidez; el ser soluble en agua

y en alcohol acuoso; el tener efectivas propiedades enmascarantes; el no provocar caries dentales; el ser sinérgico al combinarse con otros edulcorantes bajos en calorías; y el agregar sensación bucal.

Es un edulcorante sinérgico con la sacarina, esteviósido y acesulfamo K. Usada a bajos niveles, con la sacarina enmascara su sabor residual. Mezclada con el acesulfamo K es un edulcorante alternativo de menor coste y parecido sabor al aspartamo.

La taumatina se usa como edulcorante en bebidas y postres, y como edulcorante parcial, mezclado como otros edulcorantes que facilitan la aparición del sabor dulce con mayor rapidez. Adicionalmente, es un poderoso potenciador de del aroma, elevando hasta en diez veces el aroma a menta, canela o pimienta, por lo que se emplea en pastas de dientes y enjuagues bucales, goma de mascar, o incluso como enmascarador o potenciador de los sabores de las medicinas. También se usa para mejorar y estimular el aroma del café y los productos lácteos.

No tiene efecto mutagénico ni teratogénico. Dada su naturaleza proteica se podría pensar en una cierta capacidad alergénica, aunque los estudios experimentales desarrollados no han manifestado sensibilización alguna a esta. Además, la taumatina presenta un digestibilidad similar a la albúmina de huevo. El riesgo de su empleo es prácticamente inexistente debido a su elevado PE, por lo que su consumo es muy bajo (<2 mg/día), y a las limitaciones tecnológicas de las posibilidades de aplicación. Por todo ello el JECFA en 1985 declaró una IDA «no especificada» para ella, permitiéndose su empleo de acuerdo con las buenas prácticas de fabricación. También, en Europa, el SCF emitió un informe temporal favorable en 1985, para posteriormente ser aceptada.

Monelina

La monelina es una proteína dulce, constituida por dos cadenas polipeptídicas unidas por enlaces no covalentes, con un peso molecular de 15.000 daltons. Se obtiene de la pulpa de un

fruto tropical de la planta del África Occidental *Dioscoreophyllum cumminsii*. Las subunidades A y B contienen 50 y 42 aa respectivamente, y solo presentan un grupo –SH localizado en la subunidad BI. Solo es dulce en estado no disociado y con el resto –SH libre.

La monelina es un edulcorante natural que se extrae de la pulpa del fruto comentado. En el laboratorio, por clonación de un gen sintético en *Escherichia coli* y en levaduras, se ha obtenido una proteína sintética de monelina, tan dulce como la monelina natural, aunque más estable a temperatura ambiente y frente al calor.

La monelina es muy inestable, conservándose mal a temperatura ambiente, en la que ha de mantenerse en condiciones estériles. Aunque resiste temperaturas de 60-65 °C, al incrementarse desde 70 a 100 °C va perdiendo su sabor dulce, hasta desaparecer. El calentamiento en medio ácido acelera su destrucción, así como un pH extremo < 2.

Tiene un PE = 3.000 y proporciona un sabor azucarado agradable similar al de los monosacáridos y disacáridos, aunque la lenta percepción del sabor dulce y el regusto dulce muy persistente final limitan su uso, unido a su elevada inestabilidad y alto precio. Su aporte calórico es prácticamente despreciable debido a su intenso PE.

En Europa el SCF no ha procedido todavía a su evaluación toxicológica.

Miraculina

La miraculina es una glicoproteína constituida por varios cientos de aa y con un peso molecular de 40.000 daltons. Se extrae del fruto de una planta de África Ecuatorial, la *Synsepalum dulcificum*. El grupo prostético incluye distintos azúcares.

La miraculina es insípida por sí misma, pero en medio ácido presenta un sabor azucarado natural. Se ha calculado que el PE inducido, en una disolución de ácido cítrico 0,1 M tras adicionarle una solución de miraculina, es de 400.000. Como otros edulcorantes proteicos, la miraculina es termolábil y se inactiva a pH ácidos extremos.

La miraculina como edulcorante en medio ácido tiene el inconveniente de que su sabor azucarado persiste mucho tiempo (> 24 horas) cuando se coloca en la boca, lo que limita su uso potencial. Además, acarrea el riesgo de confusión en los niños, al tener un poder modificador del sabor transcurridas varias horas tras su ingestión. Aunque la miraculina fue comercializada momentáneamente en Estados Unidos, la FDA no ha aceptado jamás su empleo, a pesar de las numerosas investigaciones toxicológicas realizadas. Asimismo, el SCF no ha podido tampoco determinar su seguridad ante la falta incluso de datos sobre su identidad exacta.

Edulcorantes voluminosos o de sustitución (polioles)

1. Generalidades

Los polioles son azúcares alcohol que funcionalmente se comportan de forma semejante a la sacarosa, aportando cuerpo o volumen a los alimentos a los que se incorporan. Incluyen al sorbitol, manitol, xilitol, maltitol, isomaltitol, jara-be de azúcar hidrogenada y lactitol.

Algunos de ellos están presentes de forma natural en pequeñas cantidades en el reino vegetal (sorbitol, manitol y xilitol), pero para su uso alimentario se obtienen por síntesis, previa reducción catalítica en presencia de Ni e hidrógeno a partir de los monosacáridos y disacáridos naturales de procedencia.

Como edulcorantes de carga, tienen un PE inferior o igual al de la sacarosa, aunque todos presentan perfiles de sabor dulce agradable sin regusto adicional. Su empleo proporciona beneficios técnicos, ya que elevan la estabilidad y afinidad por el agua (son higroscópicos y humectantes) sin alteración del PE, disminuyen la tendencia a cristalizar y confieren textura al alimento. También aporta beneficios fisiológicos dada su baja cariogenicidad (al ser difícilmente fermentables por los microorganismos de

la placa dental); ser adecuados para incluirse en productos para diabéticos, al presentar un metabolismo independiente de la insulina; y ser de aporte calórico reducido (2,4 kcal/g), por lo que se utilizan como sustitutos de la sacarosa en productos bajos en calorías. Todos excepto el isomaltitol contribuyen a una agradable sensación fría en la boca, son refrescantes, debido a su reacción endotérmica en disolución.

Desde el punto de vista toxicológico, la similitud estructural de los polioles con los carbohidratos, el que aparezcan de forma natural en algunos alimentos, y el que las moléculas que los componen son moléculas que las encontramos en el organismo formadas a partir de glúcidos e incorporadas en las vías metabólicas fisiológicas de los mismos, han facilitado su autorización para uso alimentario. Únicamente cuando algunos de ellos son consumidos en grandes cantidades pueden tener un efecto laxante: dada la digestión parcial en el intestino delgado, los polioles son posteriormente fermentados por la microflora del colon, produciendo gases y ácidos orgánicos, lo que conduce a acidificación y aumento de la hidratación y de volumen del contenido del colon, aumentando el volumen de las heces, que como consecuencia incrementa el peristaltismo intestinal, provocando flatulencia, efecto laxante y diarrea. Por todo esto la JECFA facilitó una IDA para los polioles «no especificada». Recientemente se han empezado a utilizar los polioles complejos (glucosas hidrogenadas con elevado contenido de maltitol, lactitol e isomaltitol), cuya digestibilidad parece un factor primordial en el poder laxante que presentan.

Sus aplicaciones se establecen en productos de confitería y gomas de mascar sin azúcar, productos dietéticos para diabéticos y en la prevención de caries dentales. En diabetología, se ha apreciado la importancia que en el diabético obeso tiene la reducción de peso, por lo que estos polioles se usan en diabéticos a dosis de 30 a 80 g/d en dietas con una proporción reducida de glúcidos. En prevención de caries, es de destacar que los microorganismos de la placa dental fermentan los glúcidos con producción de ácidos orgánicos que agreden el esmalte mineral

del diente (la solubilización de este se establece a $\text{pH} \leq 5,3-5,4$); por eso resultan beneficiosos, ya que al ser difícilmente fermentados no provocan una disminución tan acusada de pH.

En España, en el RD 2027/1997 se incluyen los alimentos en los que los polioles pueden ser usados, no pudiéndolo ser en los ingeridos en forma líquida.

2. Manitol

El manitol está muy distribuido en la naturaleza, apareciendo en numerosas verduras y frutas, en las exudaciones azucaradas de árboles como el fresno, el olivo o la higuera, o en ciertos hongos y algas. Se fabrica por hidrogenación de la fructosa, y es un isómero del sorbitol.

Tiene la denominación química de *D*-manitol y una fórmula empírica de $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$. Es un polvo cristalino, inodoro, blanco, de baja higroscopicidad, de sabor dulce y solubilidad intermedia en agua (180 g/l a temperatura ambiente). Es muy estable químicamente y al calor.

El manitol es el edulcorante E-421 cuyo PE= 0,6. Presenta un bajo poder refrescante, un aporte calórico <4 kcal/g, un potencial cariogénico bajo, una idoneidad baja para productos para diabéticos, efectos laxantes a niveles de consumo de 20 g/d, y no es un sustrato adecuado para la reacción de pardeamiento químico.

Es un edulcorante caro debido al proceso de purificación necesario para separarlo del sorbitol y otras impurezas. Se utiliza en elaboración de chicles sin azúcar y productos farmacéuticos masticables. Es útil como agente antiadhesión, por lo que se emplea como poliol de superficie para espolvorear en la confitería sin azúcar.

En su metabolización el manitol se excreta en su mayor parte y el resto se metaboliza por la vía de la fructosa, como el sorbitol. Estudios preliminares a largo plazo en rata indicaron una mayor incidencia de tumores benignos de timo asociados al consumo de manitol en los animales hembra, lo que llevó al JECFA a establecer una IDA temporal de 50 mg/d (1966-1976). Sin embargo, investigaciones exhaustivas realizadas posteriormente en Estados Unidos en ratas y

ratones, evidenciaron que el manitol no era cancerígeno en estos dos tipos de animales ni en los 2 sexos de los mismos. El SCF indicó que el concepto de IDA para el manitol resulta inapropiado y no pone ninguna objeción a su empleo.

3. Lactitol

El lactitol es un disacárido hidrogenado con sabor dulce obtenido por hidrogenación de la lactosa y cuya hidrólisis origina *D*-galactosa y *D*-sorbitol.

Su denominación química es 4-O-*b*-*D*-galactopiranosil-*D*-glucitol y su fórmula empírica es $C_{12}H_{24}O_{11}$. Es un polvo cristalino (en forma anhidra, monohidratada o dihidratada) o solución incolora de sabor dulce. Es bastante soluble en agua (580 g/l a 25 °C), poco higroscópico, y con puntos de fusión de 122 °C para el monohidrato y 77 °C para el dihidrato. El lactitol presenta en disolución una viscosidad igual a la sacarosa, y disminuye el punto de congelación de las soluciones de la misma manera que esta, hecho de gran importancia en la elaboración de helados. Su descomposición es función de la temperatura y de la acidez (sus disoluciones son muy estables durante la conservación en un rango de pH = 3,0-7,5 y a temperatura de hasta 60 °C).

El lactitol es el edulcorante E-966 con un PE= 0,35 y un sabor azucarado agradable sin regusto. Su aporte calórico en el organismo es de 2 kcal/g, carece de potencial cariogénico, su idoneidad en alimentos para diabéticos es alta, sus efectos laxantes aparecen a consumos entre 70-80 g/d y no sufre pardeamiento químico.

El lactitol se emplea principalmente en productos de chocolate y confitería sin azúcar, en mezclas con edulcorantes intensos como el aspartamo o acesulfamo K. Puede reemplazar a la sacarosa como agente texturizante en una gran variedad de aplicaciones con igual palatabilidad y sin sabor residual, usándose en productos horneados, de diseño, helados, mermeladas, confituras, como agente texturizante en los edulcorantes de mesa, galletas crujientes, chi-

cles, polvo en superficie de alimentos de diseño inhibiendo la cristalización, gominolas de fruta y pastillas, chocolates y bebidas instantáneas.

El lactitol es fermentado por las enzimas del colon, pues parece ser que las lactasas intestinales no son tan eficaces en su hidrólisis. La JECFA estableció en 1983 una IDA no especificada para el lactitol. Sin embargo, SCF autoriza su utilización.

4. Isomaltitol

El isomaltitol está formado por la mezcla equimolecular de monosacáridos y disacáridos hidrogenados cuyos principales componentes son los disacáridos 6-0-*a*-*D*-glucopiranosil-*D*-sorbitol y dihidrato de 1-0-*a*-*D*-glucopiranosil-*D*-manitol, cuyas fórmulas químicas son $C_{12}H_{24}O_{11}$ y $C_{12}H_{24}O_{11} \cdot 2H_2O$, respectivamente. Es una sustancia inodora, blanca, cristalina, ligeramente higroscópica, soluble en agua (250 g/l a temperatura ambiente), siendo bastante estable a los tratamientos térmicos, y frente a la hidrólisis química y microbiana. El isomaltitol presenta en disolución una viscosidad igual a la sacarosa.

Se obtiene, en un primer paso, por reordenación molecular por vía enzimática de la sacarosa para dar la isomaltulosa (más estable); y en un segundo paso la isomaltulosa se hidrogena para dar isomaltitol.

Es el polialcohol E-953 con un PE= 0,45 y un sabor azucarado agradable sin regusto. No tiene efecto refrescante en la boca, facilita un aporte calórico de 2 kcal/g, carece de potencial cariogénico, su idoneidad para productos alimenticios para diabéticos es alta, sus efectos laxantes aparecen a rangos de consumo entre 20-30 g/d, y no sufre pardeamiento químico.

El isomaltitol se emplea en mezclas sinérgicas con otros polioles (sorbitol, xilitol y jarabes de glucosa hidrogenados) y con los edulcorantes intensos (sacarina y el aspartamo) a los que les enmascara los regustos metálicos. También puede mezclarse con agentes voluminosos de bajo aporte calórico como la polidextrosa en la producción de alimentos de contenido calórico

reducido. También puede utilizarse en alimentos de diseño, en productos de horneado y bebidas refrescantes, en confites masticables recubiertos, en caramelos blandos y chicles.

El isomaltitol se hidroliza muy lentamente en el organismo y se excreta más del 50%. La JECFA fijó en 1983 una IDA no especificada para este, aunque el SCF autoriza su uso.

5. Xilitol

El xilitol está presente en frutas como fresas, ciruelas, etc., u hortalizas como la coliflor, y además es un metabolito endógeno hepático. El xilitol es un poliol de 5 átomos de carbono (pentosa) que se fabrica industrialmente por hidrogenación de la *D*-xilosa, obtenida por hidrólisis del xilano, que abunda en las virutas de madera duras, restos de mazorcas de maíz tras su desgranado y en el bagazo de la caña de azúcar.

Tiene la denominación química de *D*-xilitol y su fórmula empírica es $C_5H_{12}O_5$. Es un polvo prácticamente inodoro, blanco, cristalino, de sabor dulce, poco higroscópico, muy soluble en agua (630 g/l a temperatura ambiente), con una estabilidad intermedia a los tratamientos térmicos (punto de fusión entre 93-94,5 °C), y estable químicamente. El isomaltitol presenta en solución una viscosidad igual a la sacarosa.

Es el poliol E-967 con un PE = 1, y un sabor azucarado agradable sin regusto. El xilitol tiene un efecto refrescante en la boca alto, un aporte calórico de <4 kcal/g, ningún potencial cariogénico, alta idoneidad para productos alimenticios para diabéticos, sus efectos laxantes aparecen a rangos de consumo entre 50-70 g/d, y no sufre el pardeamiento químico.

El uso principal del xilitol es como agente de carga en diabéticos y en formulaciones contra caries dentales, en productos de confitería y chicles sin azúcar. En Europa se emplea él solo o con otros polioles o con povidona en la elaboración de productos de diseño sin azúcar. También en la obtención de tabletas de vitaminas masticables para niños, como sustituto del azúcar en el chocolate, aunque su coste elevado limita este uso.

En el organismo el xilitol tiene una lenta digestión y absorción, oxidándose posteriormente a xilulosa y metabolizándose siguiendo la ruta del ciclo de las pentosas fosfato. La parte no absorbida es fermentada por la microflora del colon. En un estudio toxicológico se observó que en los machos alimentados con una dieta con entre el 10-20% de xilitol aparecían tumores de vejiga, como consecuencia de la formación de cálculos de oxalato. También se ha indicado que en las ratas se apreciaban lesiones proliferativas en la médula suprarrenal. Por todo ello la JECFA le adjudicó una IDA no especificada. El SCF, previa evaluación toxicológica, lo considera inocuo y de uso aceptable con limitaciones semejantes a las de otros polioles.

6. Sorbitol y jarabe de sorbitol

Es el poliol más usado y conocido de todos. Aparece en el metabolismo de los glúcidos en animales y plantas, encontrándose en un gran número de frutas de consumo habitual. Se obtiene a nivel industrial por hidrogenación de la *D*-glucosa.

Su denominación química es la de *D*-glucitol y su fórmula empírica $C_6H_{14}O_6$. Son polvos cristalinos o bien copos o gránulos, blancos e higroscópicos (la higroscopicidad es muy alta al aparecer en solución), de sabor dulce y de muy elevada solubilidad en agua (750 g/l a temperatura ambiente). Tiene una estabilidad intermedia frente al calor (intervalo de fusión entre 88-102 °C), y no es reactivo químicamente. Es una sustancia de elevada viscosidad, humectancia y formación de cristales.

El jarabe de sorbitol se obtiene por hidrogenación del jarabe de glucosa y está compuesto por *D*-sorbitol, *D*-manitol, y sacáridos hidrogenados. También puede presentar pequeñas cantidades de glicoles en los que $n \leq 4$.

Es el edulcorante E-940 cuyo PE = 0,60. Presenta un alto poder refrescante, un aporte calórico de 4 kcal/g, baja cariogenicidad, idoneidad alta en productos para diabéticos, efectos laxantes para consumos de 50-75 g/d y no sufre pardeamiento químico.

Sus aplicaciones son los productos de confitería, chicles sin azúcar, helados, chocolate, mermeladas y edulcorantes de mesa, así como en la fabricación de comprimidos de compresión directa. En las gomas de mascar está presente el sorbitol y/o manitol como sustitutos del azúcar, suplementados con edulcorantes intensos. También se combina con edulcorantes intensos en la elaboración de productos para diabéticos, como gelatinas, edulcorantes de mesa o productos de diseño.

El sorbitol es absorbido a la circulación sanguínea desde el intestino delgado y llega al hígado donde entra en el hepatocito mediante la enzima fructoquinasa (como la fructosa) oxidándose hasta fructosa, siguiendo una metabolización completa que en su primera fase es independiente de la insulina. La parte de sorbitol no digerida y absorbida, llega hasta el colon donde es fermentada, produciendo los efectos antes indicados. El sorbitol, de acuerdo a su no toxicidad tiene una IDA no especificada de la JECFA. El SCF permite su uso en alimentación.

7. Maltitol y jarabe de maltitol

El maltitol se obtiene por hidrogenación de la D-maltosa o por hidrólisis enzimática del almidón. Tiene la denominación química de α -D-glucopiranosil-1,4-D-glucitol y fórmula $C_{14}H_{24}O_{11}$. Es un polvo blanco cristalino de sabor dulce, muy soluble en agua. Es muy estable químicamente y frente al calor, no perdiendo color durante su cocción, muy higroscópico y actúa como agente inhibidor de la cristalización.

Los jarabes de maltitol se generan por hidrogenación de los jarabes de glucosa de alto contenido en maltosa. Están constituidos por glucosa y sorbitol que se unen formando maltitol, y oligosacáridos y polisacáridos hidrogenados. Son productos de muy alta solubilidad en agua.

El maltitol es el edulcorante E-965 cuyo PE = 0,60-0,90. Presenta un bajo poder refrescante, un aporte calórico de 2 kcal/g, carece de potencial cariogénico, una idoneidad baja para productos para diabéticos, manifiestos efectos

laxantes a consumos de 50 g/d y no es un sustrato adecuado para el pardeamiento químico.

El maltitol está indicado en la elaboración de chocolate sin azúcar, ayuda a retener la humedad en los productos horneados, en las bebidas carbónicas, frutas enlatadas y alimentos de diseño. Los jarabes de maltitol están indicados en la elaboración de productos de confitería y chicles sin azúcar.

La JECFA le atribuyó al maltitol y a sus jarabes una IDA de 25 mg/kg, si bien el SFC consideró su utilización como aceptable en la alimentación.

Bibliografía

- Belitz HD, Grosh W (1997). Aditivos. En: Belitz HD, Grosh W (eds.). *Química de los Alimentos*, 2.^a edición. Acribia, S. A. Zaragoza, 459-501.
- Doucet J (2000). Edulcorantes de alto poder edulcorante. En: Multon JL (ed.). *Aditivos y auxiliares de fabricación en las industrias agroalimentarias*, 2.^a edición. Acribia, S. A. Zaragoza, 315-341.
- Leroy P (1990). Los edulcorantes. En: Derache R (ed.). *Toxicología y seguridad de los alimentos*. Omega, S. A. Barcelona, 373-387.
- Lidsay RC (2000). Flavores. En: Fennema OR (ed.). *Química de los alimentos*, 2.^a edición. Acribia, S. A. Zaragoza, 856-904.
- Madrid A (1992). Funciones y características generales de los aditivos alimentarios: edulcorantes. En: Madrid A (ed.). *Los aditivos en los alimentos*. Mundi-Prensa Libros, S. A. Madrid, 23-25.
- Marie S (1991). Sweeteners. En: Smith J (ed.). *Food additive user's handbook*. Blackie and Son Ltd. London, 45-74.
- Primo Yúfera E (1998). Aditivos. En: Primo Yúfera E (ed.). *Química de los alimentos*. Síntesis. Madrid, 413-448.
- Real Decreto (RD) 2027/1997, del Ministerio de Sanidad y Consumo, de 26 de diciembre, por el que se modifica el RD 2002/1995, que aprueba la lista positiva de aditivos edulcorantes autorizados para uso en la elaboración de productos alimenticios. BOE n.º 15, de 17 de enero de 1998.

Real Decreto 1116/1999, de 25 de junio, por el que se modifica el RD 2106/1996, de 20 de septiembre, que establece las normas de identidad y pureza de edulcorantes utilizados en productos alimenticios. BOE n.º 162, de 8 de julio de 1999.

Wong DWS (1995). Edulcorantes. En: Wong DWS

(ed.). *Química de los alimentos: mecanismos y teoría*. Acribia, S. A. Zaragoza, 295-315.

Zimmerman M (2000). Polioles. En: Multon JL (ed.). *Aditivos y auxiliares de fabricación en las industrias agroalimentarias*, 2.ª edición. Acribia, S. A. Zaragoza, 295-306.

TÓXICOS FORMADOS DURANTE EL PROCESADO, PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LOS ALIMENTOS

Ana M.^a Cameán, Ángeles Jos, Isabel M.^a Moreno, Silvia Pichardo, Manuel Repetto

Introducción. Compuestos pirorgánicos. Compuestos no pirolíticos derivados de aminoácidos y azúcares. Compuestos formados por tratamiento alcalino. Compuestos producidos por reacciones de contaminación o degradación. Compuestos originados por el calentamiento y oxidación de grasas y aceites. Bibliografía.

Introducción

Si definimos como «tóxicos derivados» a cualquier sustancia tóxica o potencialmente tóxica que pueda formarse química o enzimáticamente en los alimentos durante el procesado, preparación o almacenamiento, nos podemos dar cuenta del gran número de ejemplos que ilustran este capítulo (Concon, 1988). En los alimentos pueden existir componentes endógenos reactivos y otros de origen exógeno que pueden dar lugar a compuestos derivados, muchos de los cuales han sido identificados y estudiados desde el punto de vista toxicológico, pero aún son muy numerosos los que no han sido analizados en este sentido. Un alimento, tal como se consume finalmente, puede contener una mezcla de sus componentes originales y un gran número de derivados. No solo es esencial que tales compuestos se identifiquen, sino también que se

establezcan las propiedades toxicológicas de cada uno de ellos y de la mezcla de todos, pues pueden existir fenómenos de sinergia aditiva, potenciación y/o antagonismo (Cameán y Repetto, 1995).

Los tóxicos derivados pueden clasificarse (Tabla 27.1) en diferentes categorías (Concon, 1988).

En el presente capítulo nos vamos a dedicar fundamentalmente a los apartados 1-4, ya que los productos originados por calentamiento y oxidación de grasas y los productos derivados del tratamiento de alimentos por irradiación se tratan en capítulos aparte.

Compuestos pirorgánicos

Son producidos a las elevadas temperaturas de carbonización (alrededor de 300 °C o superiores) por un proceso complejo que difiere de otros

Tabla 27.1. Principales tóxicos derivados formados en alimentos.

1. Compuestos pirorgánicos:
 - Hidrocarburos aromáticos policíclicos.
 - Aminas heterocíclicas, derivadas de aminoácidos.
 - Acroleína.
2. Compuestos no pirolíticos derivados de aminoácidos y azúcares:
 - Melanoidinas.
3. Compuestos formados por tratamiento alcalino de proteínas:
 - Lisinoalanina y otros.
 - Aminas vasopresoras.
4. Compuestos producidos por degradación o reacción de contaminantes:
 - Nitritos y N-nitroso.
 - Etilenebistiourea.
5. Compuestos originados en el calentamiento y oxidación de grasas y aceites.
6. Productos de radiolisis producidos durante la irradiación de los alimentos.

inducidos por el calor; está precedido por una ruptura inicial de la estructura molecular de compuestos orgánicos hacia otras más simples, fragmentos reactivos, que por combinación dan otros compuestos más estables, dado que las condiciones impiden la rápida formación de CO o CO₂.

1. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)

Destacamos en primer lugar la formación de HAP, constituyentes del alquitrán, y producidos por combustión incompleta de la materia orgánica. Están ampliamente distribuidos en el medio ambiente, siendo inevitable la exposición humana a los mismos.

La población, en general, puede estar expuesta a ellos a través del humo del tabaco, inhalación de aire contaminado e ingestión de aguas y alimentos contaminados con efluentes de combustión y por procesos de cocinado y tecnológicos que los produzcan. Existen, por tanto, dos fuentes importantes de exposición a HAP a través de los alimentos: a) la debida a deposición y absorción de estos compuestos a partir del aire contaminado, y por ello, cereales, vegetales, frutas y semillas contribuyen de forma

mayoritaria a la ingesta de estos hidrocarburos; b) la derivada de su propia formación y deposición en los alimentos a través de tratamientos como son el tostado, ahumado y el asado (Guillén *et al.*, 1996), y que es lo que nos ocupa en este capítulo.

La formación de HAP es realmente significativa a altas temperaturas ya que, a temperaturas inferiores a 400 °C se originan en pequeña proporción, mientras que su producción aumenta linealmente entre 400-1.000 °C. Es un proceso complejo, de pirosíntesis a partir de moléculas orgánicas pequeñas liberadas, que pueden ser unidades de dos o cuatro átomos de carbono, como los radicales etileno o butadieno, de gran reactividad, que se unen entre sí formando moléculas de varios anillos aromáticos (Figura 27.1).

Los HAP están constituidos por 2 a 4 núcleos aromáticos, y la mayoría contienen en su composición solo átomos de H y C (Ellenhorn y Barceloux, 1988), aunque algunos pueden contener nitrógeno, oxígeno o azufre; entre ellos se encuentran: antraceno, fenantreno, benzo (ghi) perileno, benzo(a)antraceno, dibenzo(a,h)antraceno, dibenzo(a,j)antraceno, dibenzo(a,h)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, criseno, 6-metilcriseno, 3-metilcolantreno, benzo(e)pireno, y principalmente benzo(a)pireno (3,4-benzopireno). Este último compuesto es del que se dispone de más datos toxicológicos y está clasificado por la IARC como probable carcinógeno (grupo 2A) (Figura 27.2).

Existe una enorme variedad de estos compuestos, de forma que se considera que en el pescado ahumado están presentes más de 100 HAP diferentes (Simko, 2002).

La presencia de 3,4-benzopireno ha sido reiteradamente demostrada en muy diversos tipos de alimentos (Kazerouni *et al.*, 2001), como:

- alimentos asados y fritos: carnes y pescados a la brasa y a la parrilla;
- alimentos ahumados (carnes, tocino, pescados);
- alimentos tostados (pan, café, productos de repostería), etc.;
- cereales, vegetales, bebidas, etc.;

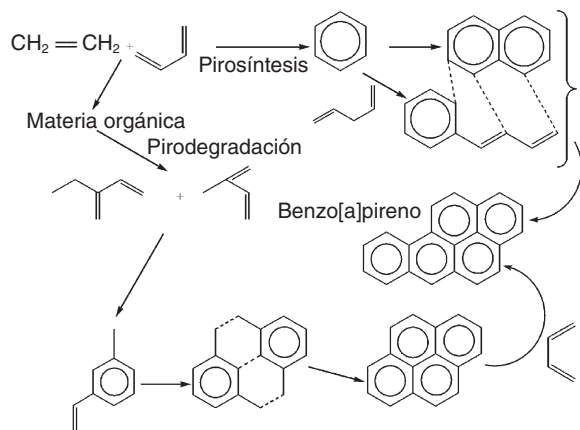


Figura 27.1. Posibles vías de formación de HAP, como benzo[a]pireno (tomado de Concon, 1988).

En la Tabla 27.2 se exponen los niveles de benzo(a)pireno obtenidos por diferentes autores en diversos grupos de alimentos.

Varios estudios llevados a cabo para determinar los niveles de exposición a los HAP a través

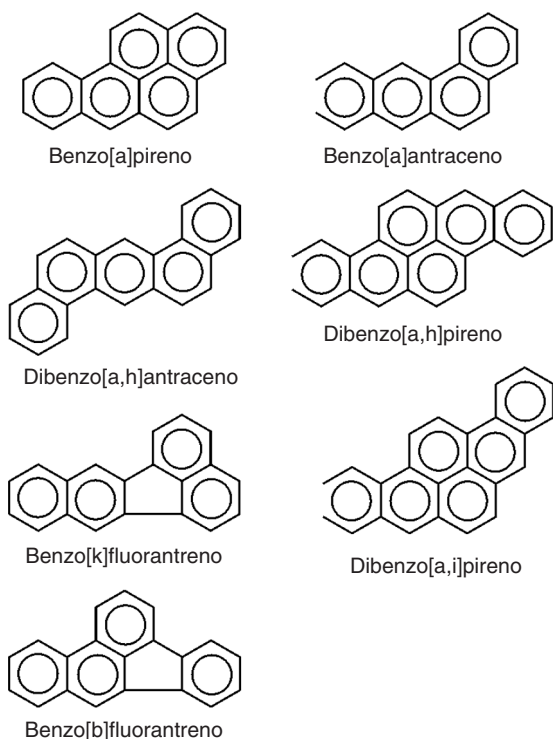


Figura 27.2. Hidrocarburos aromáticos policíclicos más frecuentes encontrados en alimentos producidos por pirólisis.

Tabla 27.2. Niveles de benzo(a)pireno por grupos de alimentos.

Alimento	Niveles benzo(a)pireno (ppb)	Referencias
Vegetales frescos	2,85-24,5	http://toxnet.nlm.nih.gov
Vegetales y frutas	0,01-0,48	Kazerouni <i>et al.</i> 2001
Espinacas	7,4	IARC (1973)
Tomates	9,5	Rojo y Toledo 2003
Peras	3,87	Rojo y Toledo 2003
Pescados ahumados	0,8-6,6	Concon, 1988
Salmón ahumado	9,3-86,6	Gomaa <i>et al.</i> 1993
	ND-2,46	García Falcón <i>et al.</i> 1999
	1,57-2,76	Ova <i>et al.</i> 1998
Carnes ahumadas	0,7-55	Concon, 1988
	2,6-29,8	Gomaa <i>et al.</i> 1993
	0,13	Kazerouni <i>et al.</i> 2001
Pescados	1,18	Saeed <i>et al.</i> 1995
	ND-45	Al-Saleh, Al-Doush, 2002
Mejillones Enlatados	13-190	http://toxnet.nlm.nih.gov/
	0,43 - 29	http://toxnet.nlm.nih.gov/
	0,3-1,7	
Almejas	28,4	Mostafa 2002
Carnes a la brasa		
Hamburguesas	11,2	Concon, 1988
	0,02-1,75	Kazerouni <i>et al.</i> 2001
Pollo	3,7	Concon, 1988
	0,01	Kazerouni <i>et al.</i> 2001
Cordero	17,4	Nakano <i>et al.</i> 1994
Ternera	0,12-1,62	Kazerouni <i>et al.</i> 2001
Cerdo	13,6	Lodovici <i>et al.</i> 1995
Cereales, granos	25-38	Tuominen <i>et al.</i> 1988
	0,2-4,1	Concon, 1988
	0,1-0,56	Kazerouni <i>et al.</i> 2001
Pan	< 0,1	Dennis <i>et al.</i> 1991
Aceites y grasas	ND-0,12	Kazerouni <i>et al.</i> 2001
Animales	0,6	Dennis <i>et al.</i> 1991
Vegetales	1,29	Dennis <i>et al.</i> 1991
	0,3-1,3	http://toxnet.nlm.nih.gov/
Margarina	0,12	Kazerouni <i>et al.</i> 2001
Leche y derivados	0,02-0,18	Kazerouni <i>et al.</i> 2001
	0,99-2,01	Kishikawa <i>et al.</i> 2003
Huevos	0,03	Kazerouni <i>et al.</i> 2001
Postres, galletas, chocolates	0,01-0,47	Kazerouni <i>et al.</i> 2001
Chocolate	8,95 (HAP total)	Dennis <i>et al.</i> 1991
	10,52 (HAP total)	Lodovici <i>et al.</i> 1995
Quesos	0,3-0,5	http://toxnet.nlm.nih.gov/
Bebidas	ND-0,72	Moret <i>et al.</i> 1995
Té	3,9-21,3	Concon, 1988
Café	0-15	Concon, 1988
	1,65-2,87	Kayali <i>et al.</i> 1999

de las dieta concluyen que esta es la principal fuente de exposición a este tipo de compuestos (Phillips, 1999). En ellos se hace referencia a algunos de los HAP considerados como cancerígenos, y en particular al benzo(a)pireno, ya que este compuesto era aceptado como indicador de la contaminación global por HAP. Se ha comprobado que el contenido en benzo(a)pireno es un buen marcador de la presencia de otros HAP carcinógenicos en distintos alimentos, con un coeficiente de correlación de Pearson de 0,98 (Kazerouni *et al.*, 2001). Sin embargo, con los conocimientos actuales sobre carcinogenicidad de este tipo de compuestos y el avance de las técnicas de identificación y cuantificación, parece necesario un mayor control de la presencia de diferentes HAP en alimentos que contribuyen en un porcentaje importante a la dieta y no solo de los que hasta ahora eran considerados más susceptibles de contaminación, como los productos ahumados (Guillén *et al.*, 1996).

En los alimentos ahumados, los HAP aparecen más frecuentemente como constituyentes del humo, producidos por la pirólisis de la madera; algunas plantas pueden sintetizarlos.

En términos cuantitativos, la cantidad de benzo(a)pireno y otros HAP varía en función del alimento y de los procesos a que haya sido sometido. En carnes y pescados a la brasa, la cantidad de HAP formada depende del tiempo de exposición, distancia a la fuente de calor, contenido en grasa del alimento, el que la grasa fundida caiga al interior de la fuente calorífica, etc. En el aire de las cocinas, tanto domésticas como industriales, se producen HAP, en concentraciones variables, predominando los de tipo naftaleno, y aumentando dichos niveles en función de la temperatura de cocinado (Zhu y Wang, 2003).

Por ejemplo, en carnes, las mayores concentraciones de HAP se encuentran en filetes de ternera asados o a la barbacoa, mientras que en hamburguesas las concentraciones son inferiores; en la carne de cerdo los valores obtenidos son los más bajos. Comparando diferentes métodos de cocinado, fritura en sartén, hervido o asado/barbacoa, es en éste último donde se ob-

tienen los niveles más elevados, influyendo además el tiempo y grado de cocinado.

En frutas, verduras y cereales, los contenidos dependen de la proximidad a las áreas industriales o áreas de tráfico elevado (Rojo y Toledo, 2002). En vegetales las concentraciones más elevadas de HAP se producen en las partes aéreas, llegando a ser unas 6,5 veces superiores a las encontradas en las raíces, sugiriéndose que en la parte foliar es donde se produce la primera transferencia de HAP desde el medio ambiente (Tao *et al.*, 2004).

La presencia en pescados se atribuye a la contaminación acuática, a menos que sean ahumados. En cuanto a los aceites y grasas, las derivadas de animales suelen tener contenidos más bajos que los aceites vegetales (Dennis *et al.*, 1991), siendo la margarina la principal fuente (70%) de HAP a través del consumo de este tipo de alimentos.

Respecto a los límites legales, aunque no existe legislación comunitaria que limite de forma específica el benzo(a)pireno y otros HAP en los alimentos, el gobierno español ha impuesto límites en los contenidos de este tipo de compuestos en el aceite de orujo: el límite máximo tolerable para diversos HAP [benzo(a)pireno, benzo(e)pireno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno, indeno(1,2,3-c,d)pireno] debe ser menor o igual a 2 µg/kg de aceite y la suma total de los posibles analitos cuantificados no superará los 5 µg/kg (Orden de 25 de julio de 2001, del Ministerio de la Presidencia).

En las harinas, las concentraciones de HAP son mayores en el salvado que en la harina blanca, observándose niveles más elevados en los cereales de desayuno a los que se les ha añadido salvado; esto no resulta sorprendente si se tiene en cuenta que es precisamente la parte externa de las semillas la que está más expuesta a la posible contaminación ambiental (Guillén *et al.*, 1996).

Las fórmulas infantiles también pueden presentar unos niveles de HAP superiores a otras leches en polvo, lo cual puede atribuirse a que

contienen un mayor porcentaje de grasa. Dennis *et al.* (1991) señalan que consecuentemente, es importante controlar que las grasas de partida empleadas en su preparación tengan bajos niveles de HAP.

Al igual que en el caso de otros contaminantes, no solo interesa conocer los valores individuales o totales de HAP en los diferentes grupos de alimentos, sino tener en cuenta los consumos para una población dada con el objeto de conocer el grado de exposición. Así, aunque los cereales y vegetales no superan los niveles de HAP de algunas carnes cocinadas a la barbacoa, constituyen la principal fuente de hidrocarburos en algunas poblaciones, como ocurre en Gran Bretaña (Phillips, 1999). En dicho país, otros autores (Dennis *et al.*, 1983, 1991) encuentran que los alimentos incluidos en el grupo de aceites (aceites vegetales, mantequilla, queso, margarina) son los que aportan niveles individuales más altos de HAP, seguido de cereales y vegetales; pero el mayor consumo de cereales frente a grasas y aceites hace que aquellos sean los que más contribuyan a la ingesta de HAP. Resultado totalmente análogo se ha encontrado en un estudio de dieta total en Holanda (De Vos *et al.*, 1990): los grupos de cereales y grasas y aceites son los que más contribuyeron a la ingesta de estos compuestos. En Grecia (Voutsas *et al.*, 1998) la ingesta diaria de HAP a través del consumo de vegetales se considera baja. En Italia, un estudio reveló (Lodovici *et al.*, 1995) que los cereales, particularmente el pan y la pasta, representan la primera fuente de ingestión de HAP, seguido del grupo de leche y derivados, carnes, vegetales y frutas. En Finlandia los cereales, a pesar de que los niveles individuales en HAP son bajos, por su alto consumo, pueden ser una fuente significativa de HAP para la población (Tuominen *et al.*, 1988). En EE UU se ha demostrado que el grupo de pan/cereales/granos seguido del de carnes asadas/barbacoa son los que contribuyen en mayor medida a la ingesta de benzo(a)pireno por la población; y las grasas no cocinadas, dulces y productos lácteos son los que menos aportan a la dieta (Kazerouni *et al.*, 2001). En España se han investigado los niveles

de 16 HAP en 11 grupos diferentes de alimentos a los que estaba expuesta la población catalana, comprobándose que los niveles más elevados correspondían a los cereales, seguido de carnes y productos cárnicos. La ingesta media diaria osciló entre 6,3 μ /día para mujeres adultas y ancianos, y 8,4 μ g/día en adolescentes (Falco *et al.*, 2003).

Los HAP son fuertes inductores enzimáticos, por ejemplo de hidroxilasas de hidrocarburos aromáticos y de arilaminas. Cuando los HAP se oxidan por las oxidasas microsómicas de función mixta, concretamente por la enzima arilhidrocarburo hidroxilasa (AHH), se forman epóxidos electrofílicos (diolepóxido), que reaccionan con grupos nucleofílicos de proteínas y ácidos nucleicos (ADN y ARN), dando lugar al desarrollo de mutagénesis, teratogénesis y cáncer, por lo que los HAP se consideran como procarcinógenos. Los epóxidos son transformados por la enzima epoxidohidratasa en dihidroles que, en general resultan menos tóxicos que los epóxidos, pero algunos, como 7,8-dihidro-7,8-dihidroxibenzopireno, son más fuertemente cancerígenos y mutagénicos (Repetto, 1997). El benzo(a)pireno se metaboliza dando lugar aproximadamente a 20 metabolitos oxidados y a una enorme variedad de conjugados; varios de estos metabolitos pueden inducir mutaciones, y unirse a macromoléculas celulares, pero el principal metabolito carcinógeno se considera que es el 7,8-diol-9,10-epóxido (Figura 27.3).

Los conjugados del epóxido con el ácido glucurónico no resultan ser compuestos destoxificados, porque se ha visto que su mayor hidrosolubilidad les permite una mejor distribución por el organismo, y posteriormente puede liberarse el epóxido cancerígeno bajo la acción de la β -glucuronidasa tisular. El hecho de que sean procarcinógenos, hace que su potencia esté directamente relacionada con los niveles de activación enzimáticos, de ahí que la potencia carcinógena dependa de la especie, del individuo y de condiciones específicas.

El cáncer, por tanto, es el efecto tóxico más importante de los HAP, describiéndose un incremento de la incidencia de cáncer de piel, vejiga,

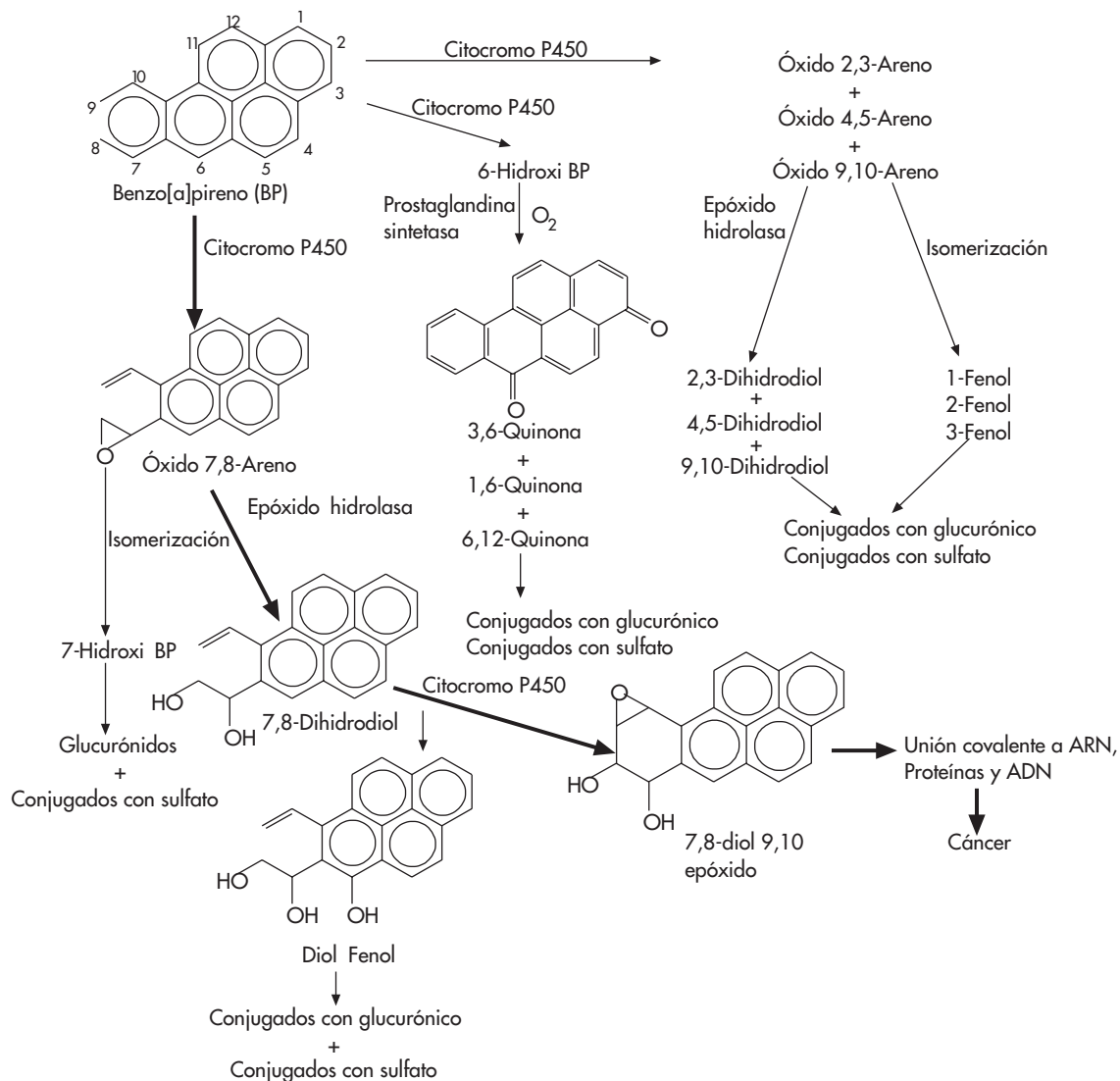


Figura 27.3. Principales vías de transformación de benzo[a]pireno.

pulmón y posiblemente de tracto gastrointestinal en trabajadores expuestos a HAP, particularmente asociados con la carbonización y gasificación del carbón. Si bien los HAP son potentes carcinógenos mamarios en roedores, su implicación en el desarrollo de cáncer de mama humano no está clara, pues Gammon *et al.* (2002) no han encontrado una elevación consistente del riesgo de este tipo de cáncer al incrementarse los niveles de aductos con el ADN, en mujeres expuestas a las dos principales fuentes de HAP: humo de

tabaco de forma pasiva o activa y el consumo de alimentos asados o ahumados.

La IARC ha clasificado a benzo[a]pireno, benzo[a]antraceno y dibenzo[a,h]antraceno en el grupo 2A, probablemente carcinógenos, mientras que otros HAP como benzo[b]fluoranteno, benzo[j]fluoranteno y diversos dibenzopirenos se encuentran clasificados como posiblemente carcinógenos (Grupo 2B). En el grupo 3 se puede encontrar el benzo[e]pireno (<http://www.iarc.fr>).

Además de los efectos cancerígenos, los HAP también producen una variedad de daños tras exposición crónica, que resumimos en la Tabla 27.3.

Los niveles de HAP en la mayoría de los alimentos son del orden de $\mu\text{g}/\text{kg}$. La determinación de HAP en alimentos ahumados y otros alimentos que los contengan en mayor proporción, como grasas y aceites comestibles (Barranco *et al.*, 2003) requiere el desarrollo de métodos analíticos aplicables para su determinación *on line*, que han sido revisados por Simko (2002).

Además de los HAP, existe un creciente interés por conocer los bajos niveles de sus derivados nitrados en alimentos, los nitro-HAP, pues algunos de ellos son potentes mutágenos y carcinógenos. Parecen permanecer cuantitativamente sobre las partículas sólidas de los alimentos, existiendo solo pérdidas significativas en el caso de nitronaftalenos, por evaporación durante el cocinado (Siegmund *et al.*, 2003)

2. Aminas heterocíclicas

Otros compuestos de gran interés son las diferentes aminas heterocíclicas (AH) que se forman al cocinar a $250\text{ }^\circ\text{C}$ o temperaturas superiores distintos alimentos ricos en proteínas, y que son

mutagénicas y potencialmente carcinógenas. Estos mutágenos se detectaron a finales de la década de los 70, cuando Nagao *et al.* (1977) comprobaron que la superficie carbonizada de pescados y carnes asados contenían mutágenos efectivos, tras activación metabólica, sobre diferentes cepas bacterianas; posteriormente estas mismas sustancias se detectaron en extracto de ternera hervido. En los últimos 30 años se han publicado aproximadamente unos 2.100 artículos sobre las AH, pero las investigaciones en este tema continúan siendo hoy un reto para científicos de distintas áreas o disciplinas (Knasmüller *et al.*, 2004).

Todas las AH mutagénicas, al menos se han descubierto 21, son químicamente similares, compuestos de nitrógeno heterocíclico con grupos metilo y amino en varias posiciones (Figura 27.4).

Su concentración en alimentos cocinados varía considerablemente (hasta cientos ng/g) y los alimentos más frecuentemente implicados son: pescados (sardinas) y carnes (ternera) asados, extractos de ternera, y pirolizados de aminoácidos (triptófano, fenilalanina, caseína, albúmina, globulina, etc.) (Tabla 27.4).

Aunque en los alimentos se encuentran como trazas, la presencia de AH es relevante por su alta potencia mutagénica, siendo de los mutágenos más potentes ensayados sobre *Salmonella*. El menos activo, Phe-P-1 es 2.000 veces más activo que la dietilnitrosamina. Todos los compuestos requieren activación metabólica para ejercer sus efectos genotóxicos.

Los mecanismos de formación de estos mutágenos aún no están totalmente clarificados. Normalmente, como resultado del calentamiento de proteínas y carbohidratos, se forman componentes del flavor, por ejemplo pirazinas, piridinas y tiazoles; algunos intermedios en la formación de estas sustancias son dihidropirizinas y dihidropiridinas, que en presencia de oxígeno forman los componentes del flavor, pero en presencia de creatinina, originan las AH (Kotsonis *et al.*, 2001). Se ha demostrado que algunos aminoácidos por pirólisis dan compuestos altamente mutagénicos. Mezclas de glicina,

Tabla 27.3. Efectos tóxicos producidos por exposición crónica a hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Sistemas afectados	Efectos crónicos
Ojos	Fotosensibilidad e irritación.
Respiratorio	Irritación con tos y bronquitis.
Piel	Lesiones precancerosas aumentadas tras exposición luz UV, eritema, quemaduras, fotosensibilidad, lesiones acneiformes, irritación.
Hígado/Riñón	Hepatotoxicidad y nefrotoxicidad media.
Genitourinario	Hematuria.
Gastrointestinal	Cáncer cavidad oral.
Hematológico	Agranulocitosis, anemia, leucopenia, pancitopenia (ratas).
Reproducción	Disminución fertilidad.

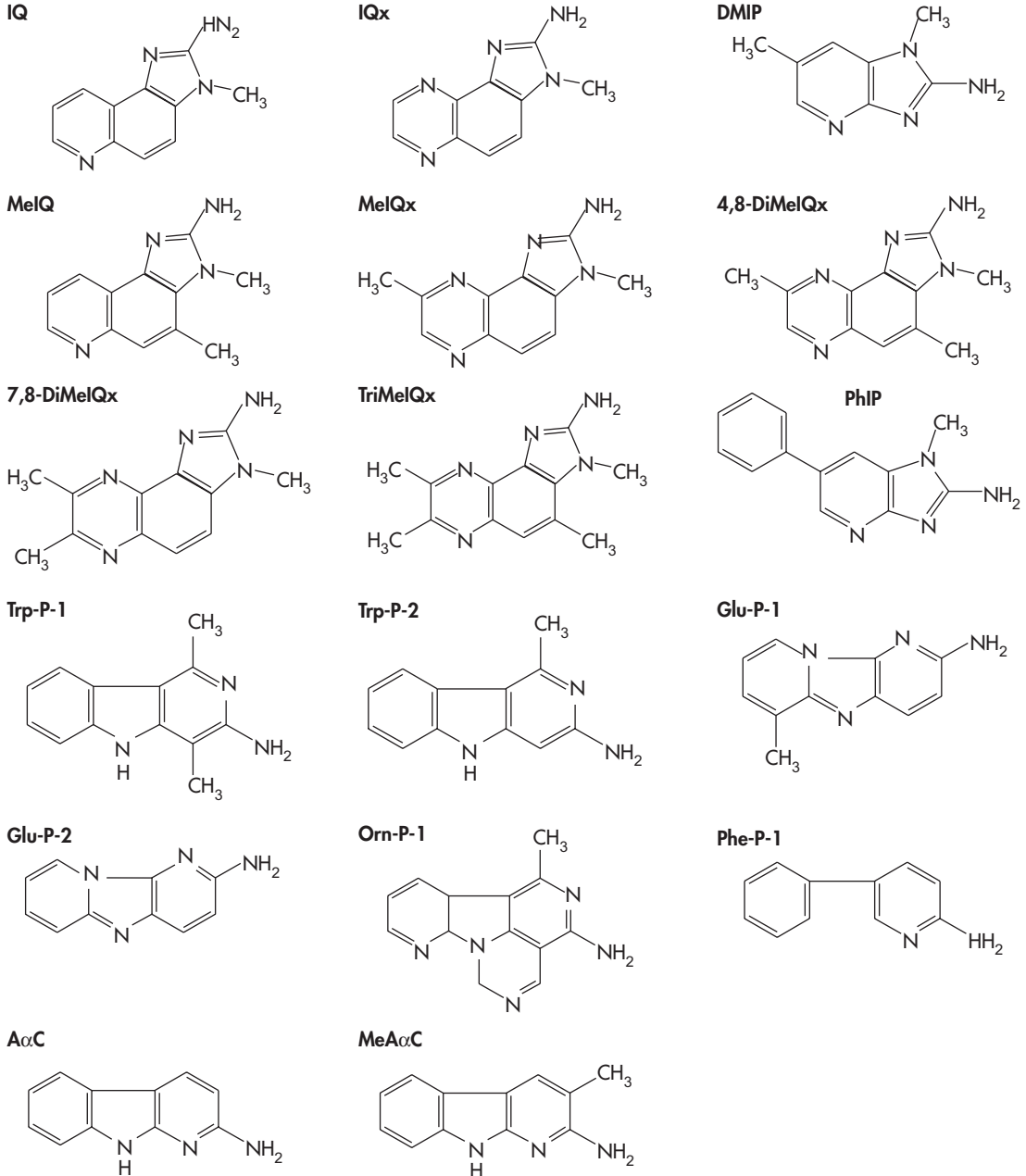


Figura 27.4. Estructuras de las aminas aromáticas heterocíclicas (AH).

glucosa y creatinina (músculo de ternera) producen DiMeIQx por reflujo a 128 °C. De hecho, se han investigado diferentes sistemas experimentales (Murkovic, 2004) para comprobar que los azúcares (glucosa, fructosa, aldehidos), aminoácidos (glicina, alanina) y creatina, cuando se

calientan a temperaturas superiores a 150 °C, son precursores de imidazoquinolinas e imidazoquinoxalin-2-aminas (Skog *et al.*, 1998). Se ha sugerido que diversos radicales libres están involucrados en la formación de varias AH (Kikugawa, 1999).

Tabla 27.4. Presencia de las principales AH en alimentos, abreviaturas y nombre químico.

Amina heterocíclica	Alimento
2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]quinolina (IQ)	Extractos de carne, pescados y carnes asados, bacon.
2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]quinoxalina	Extractos de carne, pescados y carnes asados.
2-amino-3,4-dimetilimidazo[4,5-f]quinolina (MeIQ)	Extractos de carne, pescados y carnes asados.
2-amino-6-metildipirido(1,2- α :3',2'-d)imidazol (Glu-P-1)	Pescado asado, pirolizados de caseína.
2-amino-dipirido(1,2- α :3',2'-d)imidazol (Glu-P-2)	Pescado asado, pirolizados de caseína.
3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido[4,3-b]indol (Trp-P-1)	Sardina y ternera asada, pirolizados de caseína, albúmina, etc.
3-amino-1-metil-5H-pirido[4,3-b]indol (Trp-P-2)	Sardina y ternera asada, pirolizados de caseína, albúmina, etc.
2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]quinoxalina (MeIQx)	Ternera frita.
2-amino-3,4,8-(trimetilimidazo[4,5-f]quinoxalina (diMeIQx)	
2-amino-1,7,9-trimetilimidazo[4,5-g]quinoxalina (7,9-DiMeIQx)	Extractos de ternera.
2-amino-1-metil-6-fenilimidazo [4,5-b]piridina (PhIP)	Carnes y pescados.
2-amino-5-fenilpiridina (Phe-P1)	
2-amino- α -carbolina (AaC)	Pirolizados de triptófano, caseína, gluten, albúmina, carnes, pescados.
2-amino-3-metil-- α -carbolina (MeAaC)	Pirolizados de triptófano, caseína, gluten, albúmina, carnes, pescados.

La formación de AH es dependiente del método de cocinado, tiempo y temperaturas empleados, así como del tipo de alimento, contenido en grasa, humedad del alimento, y la presencia de aditivos. Generalmente, las cantidades de AH son superiores en carnes cocinadas que en pescados, y más elevadas en productos puros que en mezclas, como albóndigas o salchichas (Skog, 2002). Se ha estudiado la distribución del material mutagénico en alimentos particulares: en el caso de una hamburguesa cocinada sobre plancha eléctrica, solo la capa más externa en contacto con la superficie caliente es mutagénica. En hamburguesas cocinadas se han llegado a cuantificar ocho AH diferentes, y dado que es un alimento cuyo consumo es cada vez más amplio, puede contribuir de forma sustancial a la ingesta diaria de AH (Klassen *et al.*, 2002).

La formación de AH mutagénicas en extracto de ternera aumenta con el tiempo de hervido y con la cantidad de agua evaporada del alimento. Se ha demostrado que la velocidad de reacción de formación de mutágenos aumenta exponencialmente a temperaturas superiores a 150 °C. La producción de mutágenos en hamburguesas, uti-

lizando diferentes técnicas de cocinado varía en el siguiente orden: Horno microondas < Hervido < Fritura sartén eléctrica < Calientaplatos eléctrico.

Murray *et al.* (1993) han determinado y cuantificado tres de estas aminas, MeIQx, DiMeIQx y Phe-P-1 simultáneamente en diversos alimentos cárnicos, encontrando las concentraciones más elevadas en filetes de ternera fritos, carnes fritas en general y a la barbacoa y extractos de carne preparados comercialmente. De nuevo, el contacto físico del alimento sobre una superficie metálica caliente es primordial para la síntesis de estos compuestos, aunque el calor por convección también conduce a niveles intermedios o más bajos de productos mutagénicos en la carne. En muestras de carnes preparadas en restaurantes y en domicilios particulares, se ha demostrado que no existen diferencias significativas en los niveles de AH en función de este factor, siendo las aminas más frecuentes PhIP y MeIQx (Zimmerli *et al.*, 2001).

Las AH se absorben por el tracto gastrointestinal, y estudios con moléculas marcadas muestran que aproximadamente el 40% se elimina

por orina. Necesitan una activación para ejercer sus efectos genotóxicos y carcinógenos, y en humanos el citocromo P4501A2 (CYP1A2) en hígado, y los citocromos CYP1A1 y 1B1 en tejidos extrahepáticos, así como la enzima N-acetiltransferasa (NAT2) son las enzimas más importantes en dicha activación (Shimada *et al.*, 1996; Turesky *et al.*, 2002). Los N-hidroderivados requieren una posterior activación a través de O-acetilación o O-sulfonación y reaccionan con el ADN, formándose aductos en diversos órganos como hígado, corazón, riñón, colon, intestino delgado, páncreas, pulmón, y parte superior del estómago (Kotsonis *et al.*, 2001). En la producción de cáncer por estos compuestos se incluye la formación de aductos con el ADN, concretamente por unión con la posición C-8 de la guanina, así como el aumento de la proliferación celular y la inducción de mutaciones en oncogenes (Food Research Institute, 1996).

Se ha comprobado que existen importantes diferencias en la actividad catalítica de diversas enzimas hepáticas humanas y de rata, respecto a las biotransformaciones sufridas por dos de las AH más comúnmente encontradas en alimentos, MeIQx y PhIP. En la Figura 27.5 se muestran, a título de ejemplo, las principales vías de transformación sufridas por MeIQx en hepatocitos humanos y de rata, y la contribución debida a CYP1A2. La formación del derivado IQx-8-COOH se lleva a cabo solo por el CYP1A2 humano, mientras que 5-HO-MeIQx parece derivar de la actividad del CYP1A2 de rata. Las enzimas de mamíferos involucradas en la formación de 7-oxo-MeIQx aún permanecen por dilucidar. Consecuentemente, algunas preparaciones de hepatocitos humanos son más activas en transformar MeIQx y PhIP en las especies activas genotóxicas, que los hepatocitos de rata, y estas diferencias interespecies pueden afectar

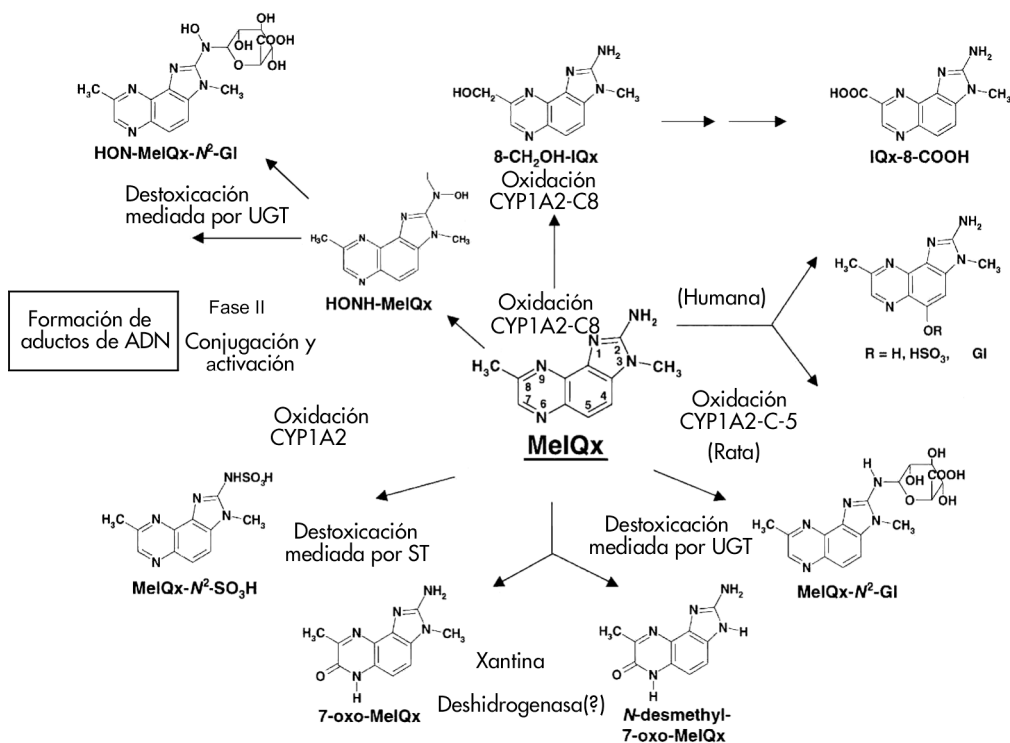


Figura 27.5. Principales reacciones de biotransformación sufridas por MeIQx en hepatocitos humanos y de rata (tomada de Turesky *et al.*, 2000).

a la actividad biológica de estos mutágenos, y deben considerarse en la evaluación del riesgo tóxico para humanos (Turesky *et al.*, 2002).

Además de las enzimas mencionadas, los hidroxil y cetoxil-AH derivados pueden constituir sustratos adecuados de otras enzimas de Fase II, tales como glutatión-S-transferasa y UDP-glucuronosil transferasa (UGT), permitiendo así la eliminación de especies reactivas por orina o bilis. La actividad de la mayoría de estas enzimas involucradas en la biotransformación de las AH pueden modificarse por factores ambientales y genéticos, ya que varios genes que las codifican son polimórficos. Se ha investigado la contribución de los polimorfismos de dichas enzimas a la diferente susceptibilidad individual al cáncer por exposición a AH, resultando que solo tienen efectos ligeros sobre los niveles de biomarcadores, sugiriéndose la existencia de otros factores desconocidos (Airoldi *et al.* 2004).

Estudios sobre el metabolismo de las AH en glándula mamaria de rata indican que las fracciones citosólicas de células mamarias de rata son capaces de activar estas AH hacia los N-hidroxil derivados; además, se ha detectado la presencia de PhIP y su hidroxil derivado en leche de ratas tratadas y su transferencia placentaria. Consecuentemente, sería de interés conocer la posible transferencia de estas aminas a niños de mujeres que consumen una dieta alta en carnes y pescados fritos.

El glutatión tiene un efecto protector frente a estas AH, ya que las GST-S-transferasas están involucradas en reacciones de detoxificación; ello puede explicar por qué PhIP es carcinógeno en colon pero no en hígado (Food Research Institute, 1996).

Estos compuestos nos interesan desde un punto de vista toxicológico por su actividad mutagénica y carcinógena. Todas las AH ensayadas hasta el momento fueron carcinógenas en animales de experimentación, representando un caso de clara extrapolación entre ensayos genotóxicos simples (*in vitro*) y carcinogénesis.

Los primeros estudios, por ejemplo, comprobaron que Trp-P-1 y Trp-P-2 fueron hepatocarcinógenos, especialmente en ratón hembra. Las

ratas macho también son más susceptibles a la inducción de hepatocarcinomas por IQ, MeIQx, Glu-P-1 y Glu-P-2. La administración crónica de IQ induce un incremento de la incidencia de tumores de hígado, estómago y pulmón en ratón, así como de glándula mamaria, hígado, páncreas, tracto GI, y vejiga urinaria en rata. Se observan múltiples tumores en ratas por Glu-P-1 y Glu-P-2. A α C y MeA α C son hepatocarcinógenos en ratón. La administración crónica de PhIP en ratas incrementa significativamente la incidencia de cáncer de mama y de colon.

Es importante en toxicología alimentaria considerar la interacción de estos productos de pirólisis con otros componentes de la dieta. Por ejemplo, los ácidos grasos insaturados han mostrado una considerable actividad inhibitoria de los efectos mutagénicos de varios productos de pirólisis. Varias sustancias presentes en el tracto GI como retinol, clorofila, o pigmentos pirolics contrarrestan la actividad mutagénica. Algunos componentes de la fibra de la dieta reducen la concentración de IQ libre, en función del pH. Productos lácteos fermentados que contienen bacterias lácticas también tienen efectos protectores, por unión a las AH y previniendo su absorción gastrointestinal y su activación. Cada vez existen más evidencias de que los antioxidantes reducen la formación de AH e interfieren en su activación metabólica; la vitamina E reduce la formación de PhIP en empanadas de ternera fritas en un porcentaje del 70%, disminuyendo asimismo los niveles de MeIQx, aunque en menor cuantía (Balogh *et al.*, 2000). El ajo y ciertos compuestos organosulfurados pueden reducir la formación de AH en empanadas de ternera no cocinadas (Shin *et al.*, 2002); el consumo de ciertas crucíferas en la dieta (coles de Bruselas, etc.) disminuye en humanos la excreción urinaria de MeIQx y PhIP (Murria *et al.*, 2001). Los mecanismos posibles de protección frente a AH pueden ser debidos a su propia inactivación y de sus metabolitos por unión directa a los mismos, inhibición de las enzimas involucradas en la activación metabólica de las aminas, inducción de las enzimas encargadas de su

destoxicación, e interacción con los procesos de reparación del ADN (Schwab *et al.*, 2000).

En conclusión, aunque los componentes de la dieta pueden variar la mutagenicidad de los productos de pirólisis, reduciéndola *in vivo*, parece establecido que estos compuestos tienen un marcado efecto carcinogénico en animales de experimentación (dietas crónicas).

La IARC ha clasificado estas sustancias globalmente en el grupo 2B (posiblemente carcinógenos para el hombre) aunque IQ está clasificado como probable carcinógeno en humanos (2A), ya que hay suficiente evidencia en animales de experimentación de su carcinogenicidad, y en humanos hay aún evidencias inadecuadas (<http://www.iarc.fr>)

También las AH están relacionadas con el desarrollo de cambios degenerativos en el sistema cardiovascular, cerebro y páncreas.

PhIP a altas concentraciones en roedores suprime la respuesta inmune humoral de forma dosis-dependiente, y se cree que las AH pueden tener efectos potencialmente inmunotóxicos. Experimentos *in vitro* confirmaron que Trp-P-1 y Trp-P-2 son potentes inhibidores de enzimas relacionadas con el metabolismo de aminas, como la MAO A y triptofano y tirosin-hidroxilasas, por lo que tienen también efectos potenciales sobre la biosíntesis y catabolismo de aminas biógenas del cerebro (Food Research Institute, 1996).

Para evaluar la exposición humana a estas AH, se requieren cuestionarios adecuados sobre los métodos de cocinado, métodos analíticos que permitan su análisis en alimentos, y biomarcadores de exposición (Stillwell *et al.*, 1999; Sentellas *et al.*, 2004). La complejidad de la matriz de los alimentos, las bajas cantidades en las que se encuentran (ng/g) y la necesidad de diversas etapas para su extracción, dificulta su cuantificación exacta y precisa (Skog, 2002). Son diferentes los métodos empleados para la identificación y cuantificación de AH en alimentos (Pais y Knize, 2000), empleándose frecuentemente la cromatografía líquida (CL) en combinación con diferentes detectores (Galceran *et al.*, 1993; Ristic *et al.*, 2004)), especialmente la espectrometría de masas (Pais *et*

al., 1997), así como la electroforesis capilar y la cromatografía gaseosa, CG-MS (Reistad *et al.*, 1997).

Se ha estimado la exposición media a AH en diferentes poblaciones: 5 ng/g/día para la población suiza (Zimmerli *et al.*, 2001); 0-7 µg en Suecia, con una media de 0,1 µg (Augustsson *et al.*, 1997) y de 0,3-0,5 en EE UU. (Byrne *et al.*, 1998).

Como conclusión, la mayoría de los investigadores creen que estos compuestos están involucrados en la inducción de cáncer en humanos, particularmente en hígado y tracto GI, y así podrían explicarse las fuertes asociaciones descritas entre incidencia de algunos tipos de cáncer e ingesta de carne o pescado hervido. Sin embargo, no se ha encontrado aún una asociación entre los niveles de algunas AH (como MeIQx y DiMeIQx) y una mayor incidencia de cáncer de mama en humanos (Delfino *et al.*, 2000). Existen aún varias cuestiones por resolver en cuanto a la estimación del riesgo de cáncer, como son la potencia carcinógena de AH individuales (por falta de datos), la susceptibilidad humana (polimorfismo enzimático), exposición (exposición a AH no identificadas), así como las posibles interacciones entre las diferentes AH y otros componentes normales de la dieta (Zimmerli *et al.*, 2001).

La formación de estos mutágenos en el procesado por calentamiento de alimentos ricos en proteínas probablemente no es fácil de evitar, pero las diferentes técnicas mutagénicas pueden asistirnos en intentar optimizar estos procedimientos tecnológicos de procesado, con la meta de reducir en lo posible las concentraciones de estos potentes mutágenos en los alimentos. Algunas de las medidas a llevar a cabo para reducir la exposición a AH son las siguientes (Zimmerli *et al.*, 2001):

- 1) Hervir el pescado y estofar la ternera más menuda, aumentando el uso del horno microondas.
- 2) Asar o freír solo a bajas temperaturas (< 180 °C).
- 3) Eliminar la costra y partes quemadas de los asados de carne, aves y pescado.

De esta forma se puede reducir la exposición a AH en un factor de entre 10-50, reduciendo consecuentemente el riesgo teórico de contraer cáncer.

3. Acroleína

El aldehído insaturado acroleína ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CHO}$) se forma en la pirólisis de las grasas a partir de la glicerina, por ejemplo durante la operación de fritura. Afortunadamente, la gran reactividad de la acroleína, especialmente en presencia de la luz, y su facilidad para originar el polímero disacril, evita que en los alimentos se encuentren cantidades elevadas de esta sustancia.

La acroleína se forma también a partir de metionina o su derivado metional (formado por fotodegradación de metionina en la leche en presencia de riboflavina o por reacción con Fe(II)), homocisteína, homoserina, etc., al reaccionar con varias sustancias como glucosa, ácido ascórbico, etc., sustancias todas fisiológicas.

Es una sustancia de alta toxicidad, fuerte irritante de las mucosas nasal, ocular y bronquial, produciendo dermatitis, conjuntivitis, bronquitis (fuerte cilioestático del epitelio bronquial). Parece resultar hepatotóxico cuando se forma *in vivo* a partir del alcohol alílico o del formiato de alilo por acción de la alcohol deshidrogenasa; el efecto necrótico se concentra en la zona periportal, donde justamente es mayor la actividad de la citada enzima.

Aún no existen datos concluyentes sobre su carcinogenicidad en humanos (Grupo 3, IARC).

Compuestos no pirolíticos derivados de aminoácidos y de azúcares

Algunos alimentos, al ser calentados, especialmente a pH alcalino, experimentan un ennegrecimiento.

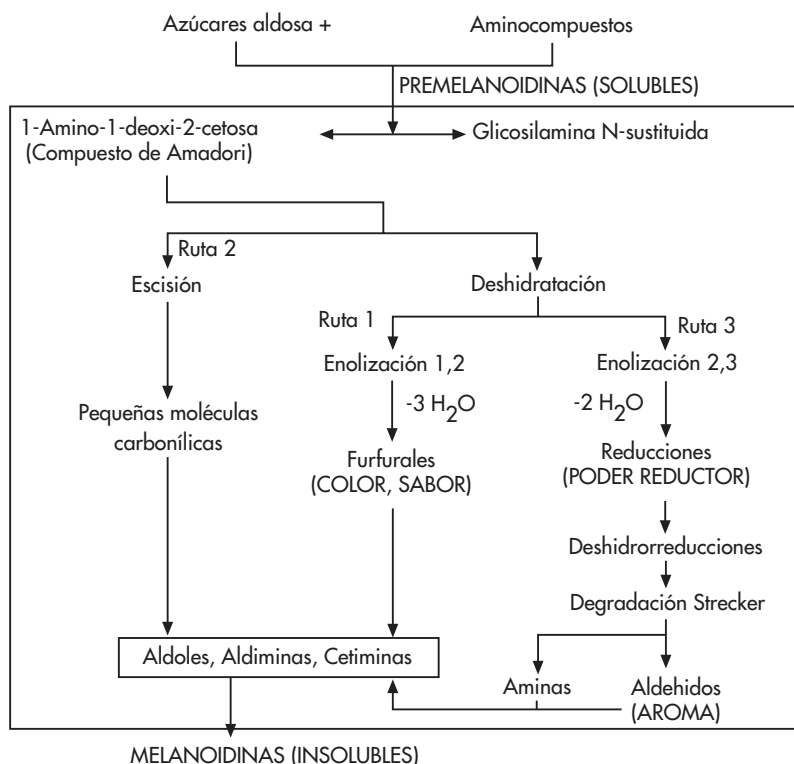


Figura 27.6. Esquema generalizado de la reacción de Maillard

cimiento y pérdida de sus propiedades nutritivas. La causa está en el desarrollo de la conocida como reacción de Maillard entre aminoácidos y grupos aldehídos pertenecientes a azúcares reductores; se originan así glicosilaminas N-sustituídas que pueden transformarse reversiblemente en los compuestos de partida por hidrólisis en solución acuosa (Figura 27.6).

Las glucosilaminas por la reestructuración de Amadori se convierten en la forma ceto. Tras una serie de reacciones en cadena, los productos finales son los polímeros pardos, llamados melanoidinas, sustancias insolubles de color marrón-oscuro. En resumen, químicamente se ha dividido dicha reacción en tres etapas: la primera transcurre sin pardeamiento, la segunda incluye la formación de compuestos solubles o volátiles, mezcla compleja de compuestos carbonílicos, sustancias aromáticas, reductonas, etc., solubles en agua, incoloras, que se denominan colectivamente como premelanoidinas, y la tercera, que concluye con la formación de melanoidinas.

Anteriormente se pensaba que el único inconveniente de esta reacción era la consecuente pérdida de aminoácidos; esta consecuencia nutricional era más significativa si el aminoácido dañado limita realmente el valor biológico del alimento, y este constituye un alimento básico para un grupo de edad determinado, como la infancia. Como el aminoácido mayormente implicado es la lisina, abundante en la leche, la calidad nutritiva del producto puede ser deficiente y puede plantear problemas nutricionales en el niño. De hecho, se ha observado en animales de experimentación alimentados con leche desecada por calentamiento, un retraso en el crecimiento, que se recuperaba por administración de lisina.

La toxicidad potencial de los productos de la reacción de Maillard (MRP) tempranos no está clara, ya que es difícil discriminar los efectos tóxicos *per se* de aquellos debidos a una dieta inadecuada resultante de esta pérdida de nutrientes o bloqueo. Se ha observado que las premelanoidinas inhiben enzimas digestivos y que los productos de reacción de Maillard administrados a ratas preñadas reducen la ganancia de

peso, y originan una menor supervivencia de los fetos, causando alargamiento hepático (ligero), del ciego y de los riñones (más pronunciado). Los pigmentos formados son hepatotóxicos, produciendo no solo hipertrofia hepática en animales de experimentación, sino también lesiones necróticas y cirrosis. Están también implicados en ciertos tipos de reacciones alérgicas. Parece que inducen la formación de depósitos de lipofucsina en el SNC.

En las primeras etapas de la reacción se han detectado radicales libres, radicales N, N, disustituídos, presumiblemente formados inmediatamente después de la base de Schiff. La posibilidad de formación de nitrosaminas, por ejemplo con aminas secundarias, añade otra dimensión a la toxicidad de las premelanoidinas (mutagénicas y cancerígenas). Se ha demostrado que las glucosilaminas y principalmente los compuestos Amadori pueden nitrosarse, y los derivados nitrosados N-nitrosofructosa del triptófano, histidina y treonina son mutágenos sobre *S. typhimurium* (Pool, 1984).

También se ha visto que estos productos pueden conducir a nefrocalcinosis y desequilibrios electrolíticos en animales de experimentación, como aumento de la absorción intestinal y excreción urinaria de Ca y Mg y excreción elevada de Cu, Zn y Na. O'Brien *et al.* (1988) han demostrado que ratas alimentadas con MRP de dietas de glucosa-ácido glutámico (abundante como aminoácido libre en alimentos y como glutamato sódico en alimentos procesados) durante 5 semanas presentaron:

- a) Nefrocalcinosis corticomedular, dosis dependiente.
- b) Aumento de la excreción urinaria de Ca, Mg, Na, Zn y Cu, no afectándose la de P y K. Sugieren una mayor tendencia del fosfato cálcico a precipitar en los riñones y tracto urinario, lo que explicaría la mayor incidencia de nefrocalcinosis.

Stegink *et al.* (1981) evidenciaron un incremento de la excreción urinaria de Zn, Cu, Fe en sujetos (humanos) perfundidos con una solución de MRP, y Johnson *et al.* (1983) informaron de

una reducción de la retención de Zn en individuos sujetos a dietas con MRP.

Esta reacción de glicosilación está perfectamente demostrada *in vivo* y hay teorías que proponen que precisamente la glicosilación no enzimática de ciertas proteínas desencadena en el organismo una serie de reacciones químicas que culminan en la formación y acumulación final de enlaces cruzados irreversibles entre moléculas proteicas adyacentes, que explicaría algunos procesos adversos relacionados con ciertas enfermedades (diabetes) y la edad.

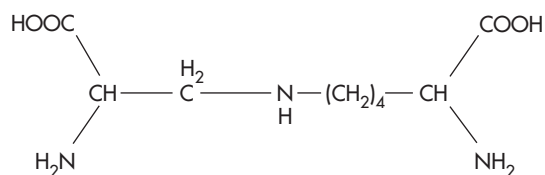
Compuestos formados por tratamiento alcalino

Un procedimiento para hacer digeribles ciertas fracciones vegetales (extractos de levadura, soja, algodón, colza) o de animales (pieles, plumas de ave, pezuñas) consiste en el tratamiento de los mismos con disoluciones alcalinas. Se consiguen así los lisados proteicos, utilizados en la alimentación animal y humana. En la etapa de tratamiento alcalino ocurre una serie de cambios químicos como racemización y destrucción de aminoácidos y formación de enlaces covalentes intra e intermoleculares, pero también se forman derivados de carácter tóxico, como LAL (lisinoalanina), ornitinoalanina (OAL) y lantionina.

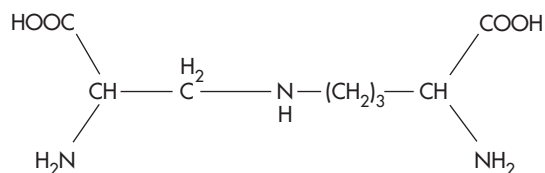
De ellos, el más estudiado es LAL (Figura 27.7), del que se sospecha nefrotoxicidad.

La lisinoalanina (N⁻-(DL-2-mino-2-carboxietil)-L-lisina) se forma por condensación de la lisina, a través de su grupo amino en posición épsilon, con la dehidroalanina, que se origina a su vez por β-eliminación de cistina, fosfoserina o residuos de serina en presencia de álcali y calor (aunque se ha visto que LAL puede ocurrir simplemente por calentamiento de proteínas a 100-120 °C, sin condiciones alcalinas).

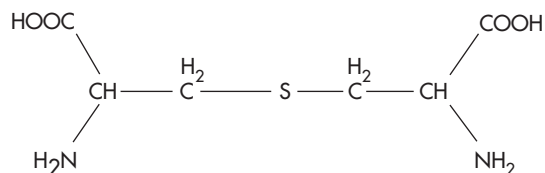
Cuantitativamente, la formación de LAL depende de la naturaleza de la proteína, el tiempo de calentamiento y la concentración de álcali. Sus precursores están presentes fundamen-



Lisinoalanina



Ornitinoalanina



Lantionina

Figura 27.7. Estructura química de lisinoalanina, ornitinoalanina y lantionina.

almente en las proteínas de la leche, y otros alimentos implicados de tipo proteico son: carne de pollo, huevo hervido, legumbres, etc. Todas las legumbres producen LAL a 80 °C tras exposición de solo 30 minutos, aunque parece que LAL es poco estable al calor y su concentración disminuye si el calentamiento es prolongado. Durante el cocinado se ha comprobado que la carne de pollo que no contenía al estado fresco LAL, llegaba a alcanzar los 200 ug/g cuando se cocinó en horno microondas. Los huevos hervidos, pueden contener LAL tras hervido de 10-30 minutos, y más cantidad cuando se fríen a 150 °C.

Uno de los alimentos más problemáticos por su contenido en LAL son los caseinatos obtenidos por precipitación ácida de la leche y neutralización posterior con base fuerte. La caseína es rica en fosfoserina, existiendo caseinatos con contenidos en LAL dos veces superiores a los de proteínas de soja, etc, y recordemos que el casei-

nato alcalino tiene una amplia difusión de aplicaciones en la industria alimentaria. La determinación de LAL parece constituir un indicador sensible de los tratamientos por calor de la leche, y de la adición de sustitutos lácteos ricos en LAL, tales como caseinatos (Faist *et al.*, 2000). Las fórmulas para nutrición enteral, en cuya composición entran a formar parte los caseinatos, contienen niveles elevados de LAL (Boschin *et al.*, 2003).

La administración de LAL a varias especies animales (conejo, hamster, ratón) no produjo patologías, pero la rata es muy sensible y presenta una importante nefropatía con cambios citomegálicos en la porción descendente de los túbulos proximales, hiper celularidad glomerular, necrosis epitelial, adelgazamiento de la cápsula de Bowman, etc. No se sabe si la resistencia de las otras especies animales es solo una cuestión de dosis (falta de absorción de LAL).

Parece que estas lesiones también están producidas por ornitinoalanina, fructosalisina, D-serina, incluso por otros productos aún no identificados (Concon, 1988).

En humanos no está definido si representa un peligro tóxico, puesto que no es fácil la extrapolación de los resultados obtenidos con los animales de experimentación.

Compuestos producidos por reacciones de contaminación o degradación

Los nitritos se producen en los alimentos por reducción bacteriana de nitratos, presentes como contaminantes en alimentos, o como consecuencia de su uso como aditivos. De hecho, el riesgo toxicológico de los nitratos reside en su fácil conversión a nitritos por bacterias nitrificantes, que pueden estar presentes en alimentos, saliva y tracto gastrointestinal.

Las fuentes de nitratos en alimentos y aguas de bebida, y consecuentemente de nitritos, deri-

van (excluyendo su presencia natural como consecuencia del ciclo del nitrógeno) del empleo de fertilizantes nitrogenados, excretas de animales agrícolas, descargas de desechos municipales e industriales, y del uso como aditivos alimentarios (conservas de pescado y carne); los nitritos como tóxicos derivados de nitratos se encuentran en vegetales (espinacas, zanahorias, aumentando durante el almacenamiento), tubérculos, carnes curadas, etc.

Los vegetales de hojas verdes, particularmente lechugas y espinacas, contienen naturalmente altos niveles de nitratos, dependiendo de la especie de planta y variedad, intensidad de luz, temperatura, niveles de fertilizantes (European Commission, 1998; Ysart *et al.*, 1999), existiendo para estos cultivos unos límites máximos en el ámbito europeo (European Community, 1997). La temperatura de almacenamiento y conservación de estos vegetales también influye en la interconversión entre nitratos y nitritos. Así, se ha comprobado en cuatro especies de vegetales que los niveles de nitratos disminuyen de forma significativa a temperatura ambiente, mientras que los niveles de nitritos se incrementan dramáticamente. Sin embargo, a temperaturas de refrigeración las concentraciones de nitratos y nitritos permanecen inalterados durante al menos 7 días, lo cual puede prevenir la acumulación de nitritos en estos vegetales (Chung *et al.*, 2004).

La ingesta diaria estimada de nitratos, nitritos y compuestos N-nitroso a través de la dieta en varios países europeos se estima que varía entre los rangos de 31-185 mg/día, 0,7-8,7 mg/día y 36-140 µg/día, respectivamente (Food Research Institute, 1996), constituyendo los vegetales la principal fuente de nitratos (85%). La ingesta media de nitratos europea es similar a la obtenida en EE UU, de 40-100 mg/día (Mensinga *et al.*, 2003).

El Comité de Expertos mixto FAO/WHO, JECFA y el Comité científico sobre alimentos de la Comisión Europea ha establecido una ingesta diaria aceptable (IDA) de nitratos de 0-3,7 mg ión nitrato/kg de peso corporal, siendo segura para neonatos, niños y adultos; para nitri-

tos, la JECFA ha propuesto una IDA de 0 – 0,07 mg nitrito/kg de peso corporal.

Los riesgos más importantes derivados de la ingesta de nitratos y nitritos son dos:

- Producción de metahemoglobinemia, que afecta principalmente a los niños, aunque también existen otros grupos de población de riesgo (embarazadas, personas con acidez gástrica disminuida, con déficit de glucosa-6-P-deshidrogenasa, etc.)
- Formación de compuestos N-nitroso en adultos, agentes teratógenos, mutágenos y probables carcinógenos, altamente peligrosos para la salud humana.

Estos riesgos tóxicos de nitratos/nitritos han sido motivo de amplia discusión, por los altos niveles de nitratos en las aguas de bebida en algunas poblaciones (nitratos procedentes de fertilizantes nitrogenados, etc.), ya que existe una serie de factores involucrados en la susceptibilidad a los nitratos/nitritos, por ejemplo, en la población infantil:

- Acidez gástrica disminuida, que favorece la proliferación de microorganismos reductores de nitratos a nitritos antes de su total absorción.
- La ingesta de agua en niños es casi 10 veces superior a la de los adultos por unidad de peso corporal.
- Hemoglobina fetal (60-80% en recién nacidos) se oxida más fácilmente a metahemoglobina.
- Desarrollo incompleto del sistema NADH-metahemoglobina reductasa en recién nacidos y pequeños, que salvo casos raros de deficiencia enzimática hereditaria, parece desaparecer al cabo de los 3-4 meses de vida.

La OMS recomienda que: las preparaciones de leche en polvo para lactantes se reconstituyan con agua con bajas concentraciones de nitratos; el consumo de verduras con bajo contenido en nitratos y no añadir nitratos/nitritos como conservantes a los alimentos para bebés.

Aunque los nitritos y nitratos no son directamente carcinógenos, pueden reaccionar con otros componentes de la dieta y formar mutágenos y carcinógenos. El consumo, por ejemplo, de pescado escabechado y salado en el norte de Japón está asociado con una mayor incidencia de cáncer de estómago, y aunque se ha asumido que está causado por compuestos N-nitroso formados en el alimento, también se ha detectado un nuevo compuesto, el ácido 2-cloro-4metiltiobutanoico, potente mutágeno (Food Research Institute, 1996).

Respecto al riesgo por formación de compuestos N-nitroso, los más significativos en Toxicología Alimentaria son las dialquilnitrosaminas (N-nitrosodimetilamina, N-nitrosodietilamina), de estructura cíclica (N-nitroso piperidina, N-nitroso pirrolidina) y las acilalquilnitrosaminas o nitrosamidas (nitrosoguanidina).

Los compuestos N-nitroso pueden clasificarse en dos tipos: las nitrosaminas que son derivados de aminas secundarias, y las nitrosamidas que son N-nitroso derivados de ureas sustituidas, carbamatos, guanidinas y compuestos similares (Kotsonis *et al.*, 2001).

Las dos fuentes principales de exposición humana a los compuestos N-nitroso, son de origen exógeno y endógeno (Figura 27.8).

La relevancia de la formación endógena de compuestos N-nitroso como factor de riesgo para ciertos tipos de cáncer en humanos, es aún motivo de debate (Koehl y Eisenbrand, 1999). Recordemos que los requerimientos fundamentales para su formación son un nitrógeno amino secundario o terciario y ácido nitroso, y que aunque el pH óptimo de nitrosación de aminas es 3,37, puede ser catalizada por varios aniones (cloruro, bromuro, sulfocianuro) a pH=2, o por formaldehído a pH alcalino y neutro a diferentes temperaturas, incluso la de fritura. Se observa actividad catalítica con formaldehído (por formación de ión iminio) a pH neutro, lo cual es relevante para la formación significativa de nitrosaminas a este pH en los alimentos. Las condiciones sucesivas de pH y presencia de bacterias en el tracto gastrointestinal humano, desde la boca

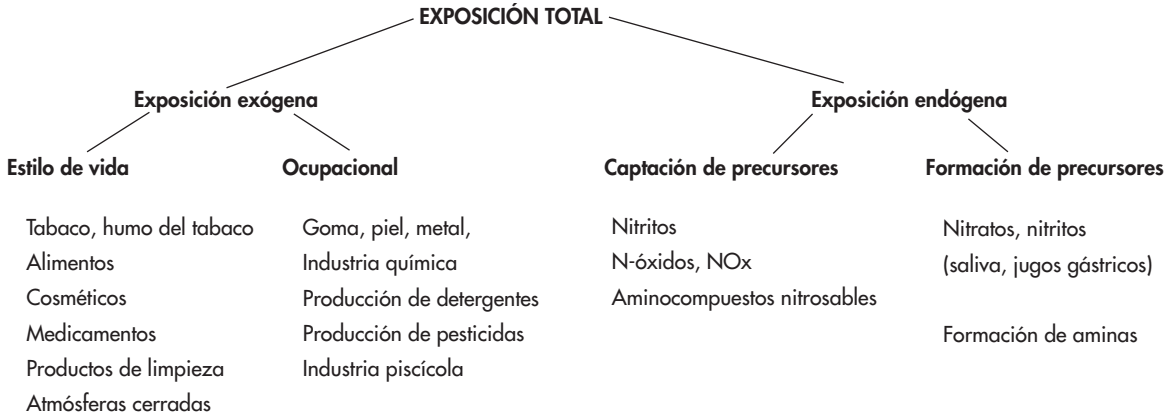


Figura 27.8. Exposición de compuestos N-nitroso.

al recto, conducen a la formación de compuestos N-nitroso, lo cual se ha demostrado *in vitro* (con aminas secundarias y jugo gástrico humano) e *in vivo* (excreción de nitrosoprolina en orina por ingesta de prolina y verduras con elevado contenido en nitratos).

La absorción de nitrosaminas puede ocurrir por diferentes vías: pulmonar (nitrosaminas volátiles), tracto gastrointestinal, y a través de la piel. La mayoría de las nitrosaminas se metabolizan eficientemente en el hígado. Aproximadamente el 60% de las N-nitrosodialquilaminas se degradan a CO₂ y se exhalan, una pequeña parte se excreta por orina y una porción insignificante por heces (Koehl y Eisenbrand, 1999).

Los aspectos más significativos de los compuestos N-nitroso son:

1) Sus precursores están ampliamente distribuidos en los alimentos. Así:

- Las aminas secundarias están presentes en muy diferentes alimentos, como pescados, huevos, quesos, y carnes.
- Son precursores inocuos y naturales en los alimentos, aminoácidos como, prolina, arginina, lisina, lecitina, colina, creatinina.
- Los alcaloides presentes en especias, cuyas mezclas se utilizan para curar carnes, como piperidina en la pimienta negra, pueden dar lugar a la formación de compuestos N-nitroso.

- Otros precursores aparecen en los alimentos como contaminantes. Es el caso de plaguicidas (ziram, atrazina, simazina), aditivos, medicamentos, etc.

Este proceso se incrementa con el almacenamiento, incluso a bajas temperaturas. La refrigeración no parece impedir la formación de nitritos, que sólo es inhibida por la congelación.

- Otros precursores se forman en el cocinado: como las pirrolizidinas y piperidinas presentes en el olor de la carne asada, o por descarboxilación de la prolina a pirrolidina a alta temperatura (hay evidencias de formación de NPY durante la fritura por descarboxilación de N-nitrosoprolina), o como las sustancias formadas en el malteado de la cebada destinada a fabricar cerveza o whisky. La cerveza puede ser una fuente de riesgo por N-nitrosodimetilamina, sobre todo en el caso de bebedores crónicos, pues contiene niveles del orden de 5-10 µg/L (Likinski, 1999).

La actividad microbiana conduce a la formación de nitrosaminas por: a) reducción de nitratos a nitritos, b) catalizando la reacción de nitrosación a pH a los que la reacción química es baja, y c) algunas de las aminas precursoras se generan por actividad microbiana (prolina a pirrolidina). Recordemos como posibles precursores de

compuestos N-nitroso en alimentos los derivados de glucosilaminas.

Por grupos de alimentos, las carnes curadas (especialmente el bacon frito), seguida del pescado y el queso, representan las principales fuentes de nitrosaminas en la dieta (Deshpande, 2002). La formación de nitrosaminas no se inhibe por la salazón, y se incrementa con la temperatura de cocinado de las carnes, bacon, etc.. Parece que el calentamiento con microondas origina menos proporción de nitrosaminas. En general, los niveles de nitrosaminas tienden a incrementarse con la temperatura de cocinado.

2) Se ha demostrado su formación en el hombre, pudiéndose controlar la excreción urinaria de algunos compuestos N-nitroso formados, y estudiar la influencia de distintos factores de la dieta sobre su formación.

Así, Bellander *et al.* (1988) han estudiado la excreción urinaria de N-mononitroso piperazina (formada *in vivo* en estómago humano) y cómo se puede afectar por consumo de alimentos ricos en nitratos (espinacas) y en qué extensión los cítricos y vegetales abundantes en ácido ascórbico reducen la reacción de N-nitrosación. Stich *et al.* (1984) estudiaron el efecto de factores dietéticos, café, té, y carnes curadas, sobre los niveles de nitrosoprolina en orina humana, y la contribución relativa de compuestos N-nitroso ya preformados. Las reacciones de nitrosación pueden inhibirse por neutralización del nitrito con vitamina C, vitamina E, y antioxidantes como BHT, BHA, ácido gálico, y algunos aminoácidos o proteínas (Kotsonis *et al.*, 2001). Las vitaminas C y E son agentes protectores de los efectos genotóxicos de algunos compuestos N-nitroso, como N-nitrosomorfolina y N-Me-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (Robichova y Slamenova, 2002).

3) La mayoría de los compuestos N-nitroso de interés en toxicología alimentaria son probables o posibles carcinógenos humanos. En animales de experimentación son potentes carcinógenos, en todas las especies ensayadas, y tienen una amplia organotropidad, según donde se

biotransforman para dar radicales libres alquilantes. En los estudios epidemiológicos se ha sugerido su intervención y en especial, su formación *in vivo*, en el desarrollo del cáncer nasofaríngeo, esofágico y gástrico (Ferguson 2002; Lin *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2003).

Los compuestos N-nitroso más representativos en alimentos, tales como N-nitrosodimetilamina, N-nitrosodietilamina están clasificados por la IARC (<http://www.iarc.fr>) como probablemente carcinógenas (2A), o posiblemente carcinógenas (2B) como N-nitrosopiperidina y N-nitrosopirrolidina (Mitacek *et al.*, 1999).

Los compuestos N-nitroso están reconocidos como carcinógenos neuronales en animales experimentales. Parece soportar dicha asociación un metaanálisis sobre la posible asociación entre ingesta materna de carnes curadas (importante fuente de los mismos) durante el embarazo y el riesgo de la descendencia de sufrir tumores cerebrales, aunque las limitaciones del estudio aconsejan posteriores investigaciones al respecto (Huncharek y Kupelnick, 2004).

Respecto a las nitrosamidas, la descomposición espontánea de N-nitrosoureas conduce a la formación de agentes electrofílicos que alquilan los centros nucleofílicos de macromoléculas, tales como ADN. Como contraste, las nitrosaminas son procarcinógenos, necesitan de una activación metabólica, a través del sistema de monooxigenasas dependiente del citocromo p450, que conduce a la α -C-hidroxilación (Koehl y Eisenbrand, 1999).

Uno de los componentes del grupo más extensamente estudiados es N-nitrosodimetilamina, potente agente metilante, que se distribuye por todo el organismo, aunque dosis únicas producen necrosis hepática centrilobular, indicativa de que los procesos de biotransformación juegan un papel importante en su toxicidad. La principal vía de biotransformación es una desmetilación a monometilnitrosamina (Figura 27.9).

Esta reacción está catalizada por enzimas dependientes del citocromo P-450, existiendo dos isoenzimas involucradas en el primer paso de la oxidación. La primera especie intermedia parece ser un radical libre, que puede llevar a la produc-

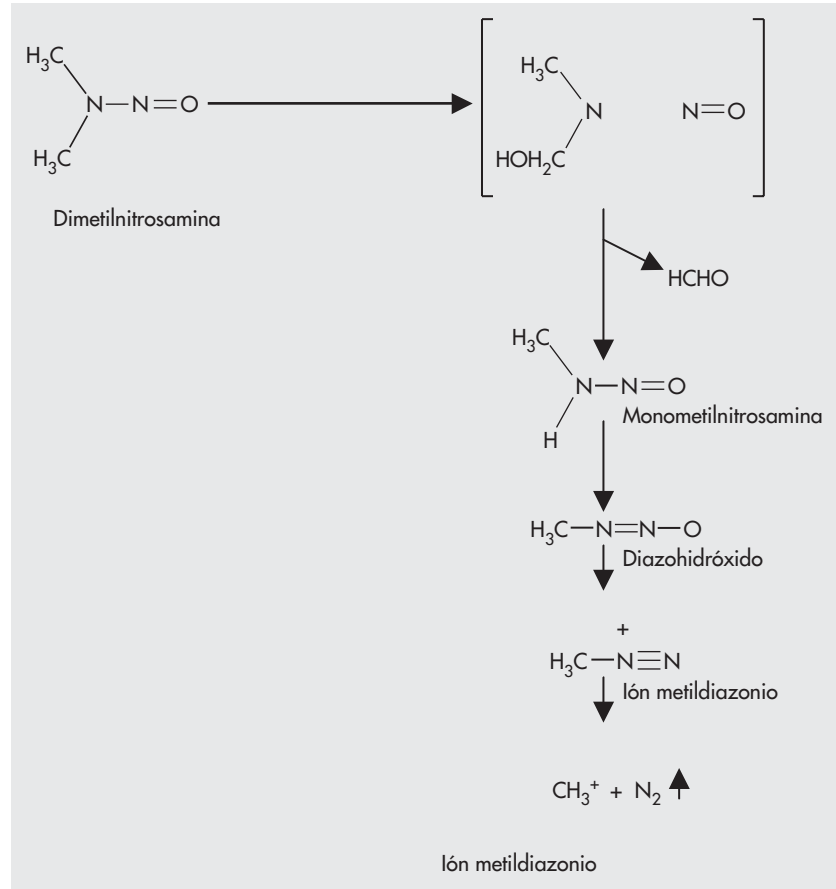


Figura 27.9. Biotransformación de N-nitroso dimetilamina en el ión intermedio carbonio, responsable de su acción carcinógena.

ción de N-hidroximetilnitrosamina, que posteriormente se reordena para dar lugar a monometilnitrosamina, y a continuación produce ión metildiazohidróxido, ión metil diazonio y por último ión metil carbonio, altamente reactivo, agente metilante de ácidos nucleicos (Timbrell, 2000).

El grado de metilación *in vivo* producido por dimetilnitrosamina en varios tejidos se correlaciona con la susceptibilidad de los mismos a la inducción de tumores. La principal posición de metilación del ADN es el N⁷ de la guanina; sin embargo, también se produce metilación en la posición O⁶ de la guanina, N-3 de la guanina, y N-1, N-3 y N-7 de la adenina. La habilidad de la célula para eliminar este error antes de la división celular es un factor crítico en la susceptibilidad de un tejido particular al desarrollo tumoral, así como la actividad metabólica del mismo.

La dieta también parece influir en la sensibilidad, ya que se ha comprobado en animales con dietas deficientes en proteínas una reducción de la toxicidad hepática y de forma concomitante un aumento de la incidencia de tumores renales, concluyéndose que la dieta baja en proteínas disminuye la biotransformación del compuesto en hígado, pero no en riñón.

La estructura química influye en la especificidad del órgano: para las nitrosaminas sustituidas de forma simétrica el principal órgano diana es el hígado, mientras que las no simétricas inducen preferentemente tumores en esófago de rata tras su administración parenteral. Las nitrosaminas cíclicas no muestran esta uniformidad, sino que inducen un amplio espectro de tumores en diferentes órganos (Koehl y Eisenbrand, 1999).

La alquilación también se ha demostrado en las proteínas, pues se ha evidenciado la formación de 5-metil cisteína en la molécula de hemoglobina, en animales tratados con N-nitrosodimetilamina (Koehl y Eisenbrand, 1999).

Ciertas N-nitrosoureas no solo son potentes carcinógenos que pueden atravesar la placenta, sino que también son teratógenos. Varias nitrosaminas son mutágenas en diferentes sistemas bacterianos y células de mamíferos.

Por todo ello, la exposición a compuestos N-nitroso y sus precursores debe mantenerse en el nivel más reducido posible, siguiendo las recomendaciones de la OMS.

En resumen, existe un riesgo potencial con estos alimentos, que no parece ser grande cuando son frescos y sometidos a operaciones normales, pero que es mayor con prácticas inapropiadas causadas por desconocimiento o despreocupación.

Compuestos originados por el calentamiento y oxidación de grasas y aceites

Desde el punto de vista de la alteración, las principales modificaciones en la composición de aceites y grasas se producen durante su almacenamiento y conservación. Pero hay otras sustancias no deseables que pueden producirse durante los diferentes procesos tecnológicos a que son sometidos los alimentos, bien a escala industrial o bien a escala doméstica. Procesos de este tipo son la refinación, la hidrogenación y la fritura (Morales, 2004).

Dedicamos el capítulo de «Grasas y aceites alimentarios» a este apartado.

Bibliografía

Airoidi L, Magagnotti C, Pastorelli R, Fanelli R (2004). Enzyme polymorphisms influencing the

metabolism of heterocyclic aromatic amines. *J Chromat B* 802: 175-181.

Al-Saleh I, Al-Doush I (2002). Gas chromatography-mass spectrometric determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in five species of fish from three sites in the Arabian Gulf. *Internat J Environ Health Res* 12: 193-200.

Augustsson K, Skog K, Jägerstad M, Steineck G (1997). Assessment of the human exposure to heterocyclic amines. *Carcinogenesis* 18: 1931-1935.

Balogh Z, Gray JI, Gomaa EA, Booren AM (2000). Formation and Inhibition of Heterocyclic aromatic amines in fried ground beef patties. *Food Chem Toxicol* 38: 395-401.

Barranco A, Alonso-Salces RM, Bakkali A, Berrueta LA, Gallo B, Vicente F, Sarobe M (2003). Solid-phase clean-up in the liquid chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils. *J Chromat A* 998: 33-40.

Boschin G, D'Agostina A, Rinaldi A, Arnoldo A (2003). Lysinoalanine content of formulas for enteral nutrition. *J Dairy Sci* 86: 2283-2287.

Byrne C, Sinha R, Platz EA, Giovannucci E, Colditz GA, Hunter DJ *et al.* (1998). Predictors of dietary heterocyclic amine intake in three prospective cohorts. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention* 7: 523-529.

Camean AM, Repetto M (1995). Estado Actual de la Toxicología Alimentaria. En: Repetto M. (eds.). *Toxicología avanzada*, Díaz de Santos, Madrid, 205-292.

Cárdenes L, Ayala JH, Afonso AM, González V (2004). Solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for the analysis of heterocyclic aromatic amines. *J Chromat A* 1030: 87-93.

Chung JC, Chou SS, Hwang DF (2004). Changes in nitrate and nitrite content of four vegetables during storage at refrigerated and ambient temperatures. *Food Additives Contaminants* 21: 317-322.

Concon JM (1988). *Food toxicology*. Part A y B, Marcel Dekker, New York.

D'Agostina A, Boschin G, Rinaldi A, Arnoldo A (2003). Updating on the lysinoalanine content of commercial infant formulae and beicost products. *Food Chemistry* 80: 483-488.

De Vos RH, Van Dokkum W, Schouten A, De Jong-Berkhout P (1990). Polycyclic aromatic hydrocarbons in Dutch total diet samples (1984-1986). *Food Chem Toxicol*, 28:263-268.

- Delfino RJ, Shinha R, Smith C, West J, White E, Lin HJ *et al* (2000). Breast cancer, heterocyclic aromatic amines from meat and N-acetyltransferase 2 genotype. *Carcinogenesis* 21: 607-615.
- Dennis MJ, Massey RC, McWeeny DJ, Knowles ME (1983). Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in UK total diets. *Food Chem Toxicol* 21: 569-574.
- Dennis MJ, Massey RC, Cripps G, Venn I, Howarth N, Lee G (1991). Factors affecting the polycyclic aromatic hydrocarbon content of cereals, fats and other food products. *Food Add Cont* 8: 517-530.
- Deshpande SS (2002). *Handbook of food toxicology*. Marcel Dekker, New York.
- Ellenhorn MJ, Barceloux DG (1988). *Medical toxicology. Diagnosis and treatment of human poisoning*. Elsevier, New York.
- European Commission (1998). Reports of the Scientific Committee for the Food (Thirty-eighth Series). Opinion on Nitrates and Nitrite (Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities), pp. 1-33.
- European Community (1997). European Commission Regulation (EC) No. 194/97 of 31 January 1997. *Official Journal of the European Communities* L31, 48-50.
- Faist V, Drusch S, Kiesner C, Elmadfa I, Erbersdobler HF (2000). Determination of lysinoalanine in foods containing milk protein by high-performance chromatography after derivatisation with dansyl chloride. *Int Dairy J* 10: 339-346.
- Falco G, Domingo JL, Llobet JM, Teixido A, Casas C, Mueller L (2003). Polycyclic aromatic hydrocarbons in foods: human exposure through the diet in Catalonia, Spain. *Journal of Food Protection* 66: 2325-2331.
- Ferguson LR (2002). Natural and human-made mutagens and carcinogens in the human diet. *Toxicology* 181-182: 79-82.
- Food Research Institute. *Food Safety* 1996 (1996). Marcel Dekker, New York.
- Gammon MD, Santella RM, Neugut AI *et al.* (2002). Environmental toxins and breast cancer on long island. I. polycyclic aromatic hydrocarbon DNA Adducts. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11: 677-685.
- García Falcon MS, González Amigo S, Lage Yusty MA, Simal Lozano J (1999). Determination of benzo(alpha)pyrene in some Spanish commercial smoked products by HPLC-FL. *Food Additives Contaminants* 16: 9-14.
- Gomaa EA, Gray JI, Rabie S, López-Bote C, Booren AM (1993). Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked food products and commercial liquid smoke flavourings. *Food Additives Contaminants* 10: 503-521.
- Huncharek M, Kupelnick B (2004). A meta-analysis of maternal cured meat consumption during pregnancy and the risk of childhood brain tumors. *Neuroepidemiology* 23: 78-84.
- Kaxerouni N, Sinha R, Hsu Ch, Greenberg A, Rothman (2001). Analysis of 200 food items for benzo[a]pyrene and estimation of its intake in an epidemiologic study. *Food Chem Toxicol* 39: 423-436.
- Kayali-Sayadi M, Rubio-Barroso S, Cuesta-Jiménez MP, Pol-Díez LM (1999). A new method for the determination of selected PAHs in coffee brew samples by HPLC with fluorimetric detection and solid-phase extraction. *Liquid Chromat Related Technol* 22: 615-627.
- Kikugawa K (1999). Involvement of free radical in the formation of heterocyclic amines and prevention in cooked foods. *Mutation Research*. 443: 149-156.
- Kishikawa N, Wada M, Kuroda N, Akiyama S, Nakashima K (2003). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in milk samples by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Chromat B* 789: 257-264.
- Klassen RD, Lewis D, Lau BPY, Sen NP (2002). Heterocyclic aromatic amines in cooked hamburgers and chicken obtained from local fast food outlets in the Ottawa region. *Food Res Int* 35: 837-847.
- Knasmüller S, Murkovic M, Pfau W, Sontag G (2004). Heterocyclic aromatic amines-still a challenge for scientists. *Chromat B* 802: 1-2.
- Koehl W, Eisenbrand G (1999). N-Nitroso Compounds. En: Marquardt H, Schäfer SG, McClellan RO, Welsch F (eds.). *Toxicology*. New York. Academic Press. 743-754.
- Kotsonis FN, Burdock GA, Flamm WG (2001). Food Toxicology. En: *Casarett and Doull's Toxicology. The basic science of poisons*, 6th Ed., New York, McGraw-Hill, pp. 1049-1088.
- Lijinski W (1999). N-nitroso compounds in the diet. *Mutation Research* 443: 129-138.
- Lin K, Shen W, Shen Z, Wu Y, Lu S (2002). Dietary exposure and urinary excretion of total N-nitroso compounds, nitrosamino acids and volatile nitrosamine in inhabitants of high- and low-risk areas

- for esophageal cancer in southern China. *Int J Cancer* 102: 207-211.
- Lin K, Shen W, Shen Z, Cai S, Wu Y (2003). Estimation of the potential for nitrosation and its inhibition in subjects from high- and low-risk areas for esophageal cancer in southern China. *Int J Cancer* 107: 891-895.
- Lodovici M, Dolara P, Casalini C, Ciappellaano S, Testolin G (1995). Polycyclic aromatic hydrocarbon contamination in the Italian diet. *Food Additives Contaminants* 12: 703-713.
- Mensinga TT, Speijers GJA, Meulenbelt J (2003). Health implications of exposure to environmental nitrogenous compounds. *Toxicol Rev* 22: 41-51.
- Mitacek EJ, Brunnemann KD, Suttajit M, Martin N, Limsila T, Ohshima H *et al.* (1999). Exposure to N-nitroso Compounds in a Population of high liver cancer regions in Thailand: Volatile Nitrosamine (VNA) levels in Thai food. *Food Chem Toxicol* 37: 297-305.
- Morales T (2004). Grasas y aceites alimentarios: Aspectos toxicológicos. En: Repetto M (eds.). *Toxicología de Postgrado-04*. CD-ROM. Área de Toxicología Universidad de Sevilla.
- Murray S, Lynch AM, Knize MG, Gooderham NJ (1993). Quantification of the carcinogens 2-amino-3,8-dimethyl and 2-amino-3,4,8-trimethylimidazo(4,5-f)quinoxaline and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-b)pyridine in food using a combined assay based on gas chromatography-negative ion mass spectrometry. *J Chromat* 616: 211-219.
- Moret S, Amici S, Bortolomeazzi R, Lercker G (1995). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water and water-based alcoholic beverages. *Zeitschrift fuer Lebensmittel-Unters. Und Forschung* 01: 322-326.
- Mostafa GA (2002). Monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in seafoods from Lake Timsah. *Int J Env. Health Res.* 12: 83-91.
- Murkovic M (2004). Formation of heterocyclic aromatic amines in model systems. *J Chromat B* 802: 3-10.
- Murray S, Lake BG, Gray S, Edwards AJ, Spingall C, Bowey EA *et al.* (2001). Effect of cruciferous vegetable consumption on heterocyclic aromatic amine metabolism in man. *Carcinogenesis* 22: 1413-1420.
- Nakano M, Fukushima M (1994). Formation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in lamb during roasting. *Food Hygienic Soc Japan* 35: 41-45.
- Orden de 25 de Julio de 2001 (BOE 26 de julio 2001) por la que se establecen límites de determinados Hidrocarburos Policíclicos en aceite de orujo de oliva.
- Ova G, Onaran S (1998). Polycyclic aromatic hydrocarbons contamination in salmon-trout and eel smoked by two different methods. *Adv Food Sci* 20: 168-172.
- Pais P, Knize MG (2000). Chromatographic and related techniques for the determination of heterocyclic amines on foods. *Chromat B* 747: 139-169.
- Pais P, Moyano E, Puignou L, Galceran MT (1997). Liquid chromatography-electrospray mass spectrometry with ion-source fragmentation and quantification of fourteen mutagenic amines in beef extracts. *Chromat A* 778: 125-136.
- Phillips DH (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutation Res* 443: 139-147.
- Reistad R, Rossland OJ, Latva-Kala KJ, Rasmusen T, Vikse B, Becher G *et al.* (1997). Heterocyclic aromatic amines in human urine following a fried meat meal. *Food Chem Toxicol* 35: 945-955.
- Repetto M (1997). *Toxicología fundamental*, 3.^a Ed., Díaz de Santos, Madrid.
- Ristic A, Cichna M, Sontag G (2004). Determination to less polar heterocyclic aromatic amines in standardized beef extracts and cooked meat consumed in Austria by liquid chromatography and fluorescence detection. *Chromat B* 802: 87-94.
- Robichova S, Slamenaova D (2002). Effects of vitamins C and E on cytotoxicity induced by N-nitroso compounds, N-nitrosomorpholine and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Caco-2 and V79 cell lines. *Cancer Letters* 182: 11-18.
- Rojo M, Toledo MCF (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons in Brazilian vegetables and fruits. *Food Control* 14: 49-53.
- Saeed T, Al-Yakoob S, Al-Hashash H, Al-Bahloul M (1995). Preliminary exposure assessment for Kuwaiti consumers to polycyclic aromatic hydrocarbons in seafood. *Environment Int* 21:255-263.
- Schwab CE, Huber WW, Parzefall W, Hietsch G, Kassie F, Schulte-Hermann R *et al.* (2000). Search for compounds that inhibit the genotoxic and carcinogenic effects of heterocyclic aromatic amines. *Critical Reviews in Toxicology* 30: 1-69.
- Sentellas S, Moyano E, Puignou L, Galceran MT (2004). optimization of a clean-up procedure for

- the determination of heterocyclic aromatic amines in urine by field-amplified samples injection-capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J Chromatography A* 1032: 193-201.
- Shimada T, Hayes C. L, Yamazaki H, Amin S, Hecht S. S, Guengerich F. P, Sutter T. R. (1996). Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. *Cancer Res* 56: 2979-2984.
- Shin IS, Rodgers WJ, Goma EA, straburg GM, Gray JI. (2002). Inhibition of heterocyclic aromatic amine formation in fried ground beef patties by garlic and selected garlic-related sulphur compounds. *J Food Protection* 65: 1766-1770.
- Siegmund B, Weiss R, Pfannhauser W (2003). Sensitive method for the determination of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons in the human diet. *Analytical Bionalytical Chem* 375: 175-181.
- Simko P (2002). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and smoke flavouring food additives. *J Chromatography B* 770: 3-18.
- Skog K (2002). Problems associated with the determination of heterocyclic amines in cooked foods and human exposure. *Food Chem Toxicol* 40: 1197-1203.
- Skoog KI, Johansson MAE, Jagerstad MI (1998). Carcinogenic heterocyclic amines in model systems and cooked foods: a review on formation, occurrence and intake. *Food Chem Toxicol* 36: 879-896.
- Stillwell WG, Turesky RJ, Sinha R, Skipper PL, Tannenbaum SR (1999). Biomonitoring of heterocyclic amine metabolites in human urine. *Cancer Letters* 143: 145-148.
- Tao S, Cui YH, Xu FL, Li BG, Liu WX, Schmitt G *et al.* (2004). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PHAs). in agricultural soil and vegetables from Tianjin. *Scie Total Environment* 320: 11-24.
- Timbrell J (2000). *Principles of biochemical toxicology*, Taylor & Francis, 3rd ed, London, pp. 394.
- Tuominen JP, Pyysalo HS, Sauri M (1988). Cereal products as a source of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Agriculture Food Chem* 36: 118-120.
- Turesky RJ, Guengerich FP, Guillouzo A, Langouët S (2002). Metabolism of heterocyclic aromatic amines by human hepatocytes and cytochrome P4501A2. *Mutation Res* 506-507: 187-195.
- Voutsas D, Samara C (1998). Dietary intake of trace elements and polycyclic aromatic hydrocarbons via vegetables grown in an industrial Greek area. *Science Total Env* 218: 203-216.
- Ysart G, Clifford R, Harrison N (1999). Monitoring for nitrate in UK-grown lettuce and spinach. *Food Add Contaminants* 16: 301-306.
- Zhu L, Wang J (2003). Sources and patterns of polycyclic aromatic hydrocarbons pollution in kitchen air, China. *Chemosphere* 50: 611-618.
- Zimmerli B, Rhyn P, Zoller O, Schlatter J (2001). Occurrence of heterocyclic aromatic amines in the Swiss diet: analytical method, exposure estimation and risk assessment. *Food Add Contaminants* 18: 533-551.

Introducción. Composición. Aspectos nutricionales. Grasas de la dieta, salud y enfermedad. Aspectos toxicológicos. Bibliografía

I. Introducción

Los lípidos son un grupo amplio de compuestos que, junto a las proteínas y los carbohidratos, constituyen los componentes estructurales principales de todas las células vivas. Se caracterizan por ser generalmente solubles en disolventes orgánicos y muy poco solubles en agua. Dentro de ellos, los triacilgliceroles o triglicéridos son los principales compuestos de reserva y constituyen hasta el 99% de los lípidos de origen vegetal o animal (Karleskind y Wolff, 1996).

Los aceites y grasas han formado parte de la dieta humana desde la prehistoria. El hombre, al ser omnívoro, consume tanto grasas procedentes de tejidos animales como vegetales. En ambos casos, la grasa puede formar parte de tejidos estructurales o de tejidos de reserva. Los alimentos pueden contener los dos tipos de grasas: grasas «visibles» que forman parte del tejido de reserva y grasas «ocultas» que forman parte de las membranas celulares de los tejidos. Como

parte de los alimentos, los lípidos se consumen o bien separados de la fuente animal o vegetal original, por ejemplo, en el caso de la mantequilla, sebo, aceites para ensaladas, o como componentes fundamentales de alimentos básicos tales como la leche, el queso o la carne. Sin embargo, a pesar de las diferencias de origen, todos contienen en los triglicéridos cantidades significativas de ácidos grasos (fundamentalmente palmítico, esteárico, oleico y linoleico), cuyas cantidades relativas influyen en sus propiedades físicas y químicas. En la Tabla 28.1 se recogen algunos ácidos grasos saturados e insaturados que forman parte de los alimentos, mostrándose la nomenclatura sistemática y común por la que suelen nombrarse así como su procedencia.

Los lípidos son componentes fundamentales de la dieta, y cumplen numerosas y variadas funciones en el organismo. Por una parte tienen un papel estructural, ya que participan en la formación de determinados órganos y en general forman parte de todas las biomembranas. Tienen, asimismo, un papel funcional como vehículo de sustancias liposolubles (ácidos grasos

Tabla 28.1. Ácidos grasos presentes en alimentos ordenados en función del número de átomos de carbono e insaturaciones.

Ácido	Nombre sistemático	Nombre común	Procedencia
4:0	Butanoico	Butírico	Leche de rumiantes.
6:0	Hexanoico	Caproico	Grasa de leche, coco, palmáceas.
8:0	Octanoico	Caprílico	Coco, mantequilla, palma.
10:0	Decanoico	Cáprico	Coco, mantequilla, palma.
12:0	Dodecanoico	Láurico	Palma, coco, babassú.
14:0	Tetradecanoico	Mirístico	Palma, coco, mantequilla.
16:0	Hexadecanoico	Palmítico	Palma, algodón, soja, sebo.
17:0	Heptadecanoico	Margárico	Trazas en muchas grasas.
18:0	Octadecanoico	Esteárico	Aceites vegetales, sebo.
20:0	Eicosanoico	Araquídico	Aceites vegetales.
22:0	Docosanoico	Behénico	Leguminosas.
16:1	<i>cis</i> -9-hexadecenoico	Palmitoleico	Mantequilla, tocino, oliva, coco.
18:1	<i>cis</i> -9-octadecenoico	Oleico	General-Aceites vegetales, sebo.
18:1	<i>trans</i> -9-octadecenoico	Elaídico	Grasa de rumiantes.
20:1	<i>cis</i> -9-eicosenoico	Gadoleico	Aceite de tiburón y arenque.
22:1	<i>cis</i> -13-docosenoico	Erúcico	Semillas de crucíferas.
18:2	<i>cis</i> -9- <i>cis</i> -12-octadecadienoico	Linoleico	General-Soja, sebo.
18:3	<i>cis</i> -9- <i>cis</i> -12- <i>cis</i> -15-octadecatrienoico	Linolénico	Linaza.
20:4	<i>cis</i> -5- <i>cis</i> -8- <i>cis</i> -11- <i>cis</i> -14-eicosatetraenoico	Araquidónico	Aceite de sardina.

esenciales, vitaminas liposolubles, esteroides precursores de hormonas, etc.) y como reguladores del transporte y permeabilidad de las membranas. Su papel fundamental consiste en que son la principal fuente energética del organismo (9 kcal/g), constituyendo un tipo de energía de utilización lenta, de forma que los organismos acumulan determinadas cantidades de grasa en tejidos especiales de reserva para utilizarla lentamente cuando sea necesario. Además, su presencia en los alimentos aumenta la palatabilidad de los mismos, siendo en muchos casos precursores responsables de su aroma y flavor (Min y Smouse, 1985; Min y Smouse, 1989).

Es esencial para la salud ingerir cantidades adecuadas de grasas alimentarias. Además de cubrir las necesidades energéticas, su consumo debe ser suficiente para satisfacer las necesidades de ácidos grasos esenciales y vitaminas liposolubles. El consumo mínimo necesario para mantener un estado de buena salud varía tanto a

lo largo de la vida de una persona como entre diferentes individuos. Es especialmente importante el consumo adecuado durante el embarazo y la lactancia y también para superar problemas de desnutrición proteica y energética. La FAO aconseja hacer una serie de recomendaciones a la población en relación con los rangos deseables del consumo de grasas y estos varían según las condiciones existentes, especialmente los patrones de alimentación y el predominio de enfermedades no transmisibles relacionadas con ellas (FAO, 1997).

A pesar de esto, en los últimos años ha habido un aumento en la producción y consumo mundial de aceites y grasas. Entre 1960 y 1990 la producción mundial aumentó de 29,14 a 80,43 millones de toneladas. Estando previsto que para principios de este siglo la producción estuviese en unos 106 millones de toneladas (Abdullah y Amiruddin, 1993). El consumo de aceites y grasas sigue aumentando a pesar de las recomendaciones en el sentido de disminuir el

porcentaje de grasa de la dieta para reducir la incidencia de las enfermedades cardiovasculares asociadas con un elevado consumo de grasas y, en particular, de grasas saturadas de origen animal. Sin embargo, durante el mismo periodo destaca una disminución muy significativa de la producción de grasas de origen animal como manteca y mantequilla en beneficio de los aceites vegetales mono y poliinsaturados de mayor valor nutricional. En el momento actual, más de la mitad de la producción total de aceites y grasas se centra en aceites vegetales (soja, palma, colza y girasol) que se comercializan después de ser sometidos al proceso de refinación y que deben ser conservados en condiciones que permitan mantener su calidad y valor nutricional hasta el momento de su consumo.

La importancia nutricional de los aceites y grasas y su elevado consumo requiere un buen conocimiento de la composición de los mismos y de los diversos cambios que pueden experimentar sus componentes, tanto en condiciones naturales como durante el procesado de los alimentos, debido a que en algunos casos pueden producirse efectos tóxicos asociados a ellos (Kitts, 1996).

Composición

Las grasas alimentarias incluyen todos los lípidos de los tejidos vegetales y animales que se ingieren como alimentos. Los aceites (líquidos) y grasas (sólidas) más frecuentes están constituidos fundamentalmente por triglicéridos o triacilglicéridos, llevando además los alimentos grasos cantidades menores de otros lípidos tales como fosfolípidos y glicolípidos. Todos los aceites y grasas (Karleskind y Wolff, 1996; Firestone, 1999; Gunstone, 2002; O'Brien, 2004), están constituidos por un elevado número de compuestos, tratándose por lo tanto de matrices complejas.

Los triacilglicéridos están constituidos por ácidos grasos esterificados en las tres posiciones de la molécula de glicerol. Diferentes tipos de

ácidos grasos, tanto saturados (SFA) como monoinsaturados (MUFA) o poliinsaturados (PUFA), pueden encontrarse esterificando estas posiciones. De hecho, existe cierta especificidad en la composición de ácidos grasos y triacilglicéridos de los distintos tipos, o variedades, de aceites y grasas. Por otra parte, cualquier alteración de una grasa (bien por ser mezclada con otras o por una manipulación industrial que favorezca la isomerización de los dobles enlaces y la transesterificación de triacilglicéridos) afecta a su composición. Los ácidos grasos insaturados suelen presentar de forma natural la configuración geométrica *cis*, pudiendo adoptar la forma *trans* como resultado de ciertas manipulaciones a las que se someten las grasas y aceites (León-Camacho, 1997). Otros componentes que forman parte de los aceites y grasas son:

- Glicéridos parciales, fundamentalmente diacilglicéridos, que pueden ser de estructura 1,2-diacilo o 1,3-diacilo dependiendo de que se trate de intermediatos en la síntesis de triacilglicéridos o que se sean productos de la hidrólisis de los triacilglicéridos respectivamente (Pérez-Camino *et al.*, 1996)
- Ésteres de ácidos grasos con alcoholes grasos saturados de cadena lineal que se conocen como ceras.
- Ésteres de esteroides y alcoholes terpénicos
- Ácidos grasos libres.

Todos los componentes mencionados previamente forman parte de lo que se conoce como «fracción saponificable de una grasa». En el caso de la fracción insaponificable, normalmente es la fracción minoritaria y todas las grasas contienen materia insaponificable en cantidades variables. La variación es generalmente del 1-2%, aunque puede alcanzar hasta el 99% en el aceite de hígado de tiburón. Debido a que la composición de la fracción minoritaria de las sustancias grasas puede ser muy variada, se usa a menudo en estudios de caracterización y autenticación de aceites y grasas (Aparicio *et al.*, 1994). Esta fracción engloba un elevado

número de sustancias de diferente naturaleza y estructura química y puede ser considerada como una huella dactilar del aceite o grasa. Los principales componentes de esta fracción, por orden creciente de polaridad, son los siguientes (Morales y León-Camacho, 2000):

- Hidrocarburos, dentro de los cuales en muchos casos el mayoritario es el escualeno, están presentes también hidrocarburos saturados de cadena lineal (parafinas), y otros hidrocarburos de estructura terpénica; pueden existir también hidrocarburos de estructura esteroidea, artefactos formados por deshidratación de determinados esteroides en la refinación y en ciertas manipulaciones a que son sometidos los aceites.
- Vitaminas como la E, A y D.
- Alcoholes con estructura triterpénica: taraxerol, dammaradienol, β -amirina, butirospermol, 24-metilen-dihidrolanosterol, cicloartenol, 24-metilen-cicloartanol, etc.
- Alcoholes lineales saturados.
- 4,4-metil-esteroides: obtusifoliol, gramisterol, cicloeucalenol, 24-etilofenol, citrostadienol.
- Esteroides, siendo el principal el colesterol cuando se trata de alimentos de origen animal y el β -sitosterol, campesterol o estigmasterol cuando son de origen vegetal.
- Dialcoholes terpénicos, como el eritrodilol y el uvaol, compuestos muy característicos del aceite de oliva.
- Ácidos y aldehídos terpénicos.
- Compuestos fenólicos y flavonoides.
- Pigmentos, sobre todo clorofilas y carotenos.
- Compuestos volátiles que son responsables del aroma de aceites y grasas.

Esta complejidad en su composición hace que haya diferentes tipos de compuestos susceptibles de ser origen de algún tipo de efecto tóxico y que esta toxicidad se pueda deber a componentes naturales de la grasa o a compuestos que aparezcan debido a alguna manipulación de los alimentos.

Aspectos nutricionales

Los aceites y grasas juegan un variado e importante papel en la nutrición humana, de aquí que en el año 1993, invitados por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y por la Organización Mundial de la Salud (OMS) se reuniera un grupo internacional de expertos en diferentes áreas relacionadas con los aceites y grasas para elaborar un informe con los datos de que se disponía hasta ese momento. Esta «Consulta FAO/OMS de expertos sobre las grasas y aceites en la nutrición humana» elaboró una serie de recomendaciones sobre el papel de las grasas y aceites en la alimentación (FAO, 1997).

Existe una gran variedad de contribuciones nutricionales de los lípidos en los alimentos, entre ellas caben destacar (Gurr, 2000):

- *Aceptabilidad del alimento*: flavor, aroma y textura: el alimento es nutritivo solo en tanto que es bueno para comerlo, y la presencia de la grasa esencialmente contribuye a la palatabilidad y aceptabilidad del mismo.

- *Reserva y suministro de energía metabólica*: el valor de la energía de los triacilgliceroides en el cuerpo es de unos 38 kJ (9 kcal) por gramo, comparado con los 17 kJ de las proteínas y los 16 kJ de los carbohidratos. Como depósito de combustible, los triacilgliceroides tienen la ventaja de que pueden almacenarse en forma anhidra, representando más energía por cantidad de masa que en el caso de polisacáridos complejos, tales como alimentos con féculas y cuerpos glicógenos, que están altamente hidratados.

- *Suministro de lípidos estructurales*: debido a que los ácidos grasos son componentes mayoritarios de las membranas biológicas y las membranas biológicas son los componentes vitales de todas las células, podría parecer evidente que el suministro dietético de todo tipo de ácidos grasos es importante. Esto es cierto para los ácidos grasos esenciales debido a que no pueden ser fabricados por el organismo. Universalmente

parece haber sido asumido que el suministro de ácidos grasos saturados y monoinsaturados no es absolutamente necesario. Algunos autores, sin embargo, indican que además de los ácidos grasos esenciales clásicos podría haber otro tipo de ácidos grasos esenciales cuya carencia no se haya puesto nunca de manifiesto debido a la dificultad de encontrar dietas que no los contengan.

- *Provisión de ácidos grasos esenciales:* juegan un papel en la estabilización de las membranas biológicas mediante la creación de propiedades físicas que son óptimas para el transporte de sustancias a través de las membranas y para las reacciones bioquímicas que se desarrollan en ellas. El segundo papel principal de los ácidos grasos esenciales está relacionado con su conversión metabólica en compuestos oxigenados, los eicosanoides, los cuales realizan un amplio abanico de actividades fisiológicas. Hay dos rutas metabólicas básicas, una regulada por una enzima llamada ciclooxigenasa, que produce prostaglandinas, tromboxanos, y prostaciclina y la otra por una enzima llamada lipoxigenasa, que produce leucotrienos.

- *Papeles específicos de los lípidos menores:* los fosfolípidos, como moléculas intactas, generalmente no han sido consideradas como esenciales en la dieta debido a que son sintetizadas por el organismo. Los fosfolípidos de la carne son valiosos suministradores de ácido araquidónico. Los glicolípidos representan una muy pequeña parte de los lípidos de la dieta, pero sin embargo son importantes suministradores de ácido α -linolénico.

Las grasas de la dieta actúan como portadoras de vitaminas liposolubles y carotenoides. La Vitamina A es necesaria para la visión y para el mantenimiento de la diferenciación celular. Los carotenoides tienen propiedades antioxidantes. En el hígado y en los riñones, la vitamina D se convierte en derivados hidroxilados que actúan como hormonas, principalmente en la regulación del metabolismo del calcio. La actividad vitamínica E es compartida por la familia de los tocoferoles, el más activo de los cuales es el α -tocoferol. Este compuesto está presente en las

bicapas lipídicas de las membranas biológicas, y uno de sus papeles principales es el de proteger de la peroxidación a los ácidos grasos poliinsaturados que forman parte de las membranas (Garow y James, 1999).

Grasas de la dieta, salud y enfermedad

Además de las importantes funciones que juegan los lípidos desde el punto de vista nutricional, existe una relación clara entre la ingesta lipídica y determinados estados patológicos (FAO, 1997; Gurr, 2000; Belury, 2002) que se repasan de forma breve a continuación:

- *Almacenamiento lipídico:* la obesidad. Cuando la disponibilidad regular de alimentos era incierta, los depósitos grasos en el tejido adiposo eran una ventaja debido a que suministraban una fuente de energía metabólica en tiempos de escasez. Cuando aumenta la prosperidad, el valor del tejido adiposo disminuye, y el exceso de abundancia puede pasar a constituir un problema. Una cierta cantidad es indudablemente beneficiosa como capa protectora, además, ahora se sabe que el tejido adiposo segrega hormonas esteroideas. El aumento en la cantidad de tejido adiposo más allá de estos modestos requisitos se asocia, estadísticamente, con expectativas de vida reducida, aumento susceptible de la diabetes, enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cáncer, y muchos otros aspectos de una salud pobre.

- *Enfermedad cardiovascular:* la enfermedad cardiovascular implica cambios graduales en los vasos sanguíneos que producen la restricción u obstrucción del flujo sanguíneo a los órganos o a los tejidos. Hay que identificar dos etapas distintas. La primera etapa es la arteriosclerosis, en la cual las arterias se vuelven más gruesas y pierden elasticidad, debido a la acumulación de depósitos ricos en lípidos en el revestimiento interior de los vasos. El segundo

estado es la trombosis, en la cual la arteria se bloquea como resultado de la formación de agregados de plaquetas y fibrina. Entre estos dos procesos tienen lugar complejas interacciones. Cuando las venas afectadas son las arterias coronarias, se reduce la sangre que llega al corazón y podría producirse un ataque al corazón, también pueden verse afectados otros órganos, tales como el cerebro. La enfermedad cardiovascular puede afectar asimismo a los vasos sanguíneos periféricos. Las recomendaciones dietéticas diseñadas para reducir el riesgo del desarrollo de enfermedad cardiovascular están basadas en trabajos que comenzaron en los años 50 del siglo xx y continúan aún (Wijendran y Hayes, 2004). Consisten en reducir la grasa total y la ingesta de ácidos grasos saturados y reemplazar algunos ácidos grasos saturados por poliinsaturados. De forma general, estos cambios dietéticos reducen la concentración de colesterol en sangre. Algunos estudios revelan enormes diferencias entre las respuestas de distintos individuos a los cambios en la grasa de la dieta (Howell *et al.* 1997).

- *Intolerancia a la glucosa y la diabetes*: las concentraciones de glucosa en sangre se mantienen normalmente dentro de un rango debido a la acción de la insulina, la hormona que estimula la utilización de glucosa por los tejidos. La intolerancia a la glucosa resulta de la incapacidad para regular la glucosa en sangre, con el resultado de que las concentraciones de glucosa tienden a ser demasiado altas. Se llama *diabetes mellitus* al estado en que la regulación de glucosa en sangre se altera hasta el punto de que aparecen síntomas clínicos. Hay dos tipos principales, la diabetes insulino-dependiente, que se origina por un fallo en la producción de insulina y la diabetes no-insulino-dependiente, en la cual se produce insulina pero los tejidos son resistentes a ella y tienen alterada su capacidad para hacer uso de la insulina disponible. Esto conduce a una mayor producción de insulina por parte del páncreas en un intento de salvar este obstáculo, y en el desarrollo de hiperinsulinemia. Esta condición está asociada con la obesidad, altas concentraciones de triacilglicérolas como VLDL, hipertensión, y un incremento a la tendencia a

desarrollar arteriosclerosis. Mientras que antes la diabetes se consideraba como una enfermedad del metabolismo de los carbohidratos, actualmente se sabe que un metabolismo graso defectuoso es igualmente importante. La principal implicación práctica ha sido un cambio radical en el tipo de dietas para la diabetes. Las dietas extremadamente bajas en carbohidratos no son tan aconsejadas como lo fueron, aunque se enfatiza que cualquier aumento en el contenido de carbohidratos debería contener altas proporciones de carbohidratos complejos (almidón) y polisacáridos no digeribles (fibra dietética). Las principales medidas son reducir la ingesta de energía total para evitar la obesidad y aumentar las proporciones de ácidos grasos poliinsaturados para controlar la hiperlipoproteínemia.

Además de los casos citados, hay estudios (FAO, 1997; Gurr, 2000) que relacionan la presencia de determinados tipos de grasa en la dieta con otras enfermedades tales como el cáncer (Lee y Lin, 2000), enfermedades inflamatorias y alergias (Okuyama *et al.*, 1996; Hwang, 2000) y desórdenes del comportamiento (Hibbeln y Salem, 1995). Los resultados, en la mayoría de los casos no son del todo concluyentes, y se continúa trabajando en ellos.

Aspectos toxicológicos

Desde un punto de vista toxicológico se pueden considerar dos orígenes diferentes en la producción de efectos adversos por parte de los alimentos grasos:

- La presencia en el alimento de componentes naturales que sean susceptibles de originar efectos tóxicos.
- La aparición de compuestos tóxicos debido, o bien a una alteración de los componentes naturales del alimento o bien a una contaminación exógena.

En general, los lípidos no suelen producir efectos agudos o inmediatos, sino que los efectos

aparecen tras una ingestión continuada de aceites y grasas. Existen aceites y grasas naturales que pueden presentar una alta toxicidad y, como es lógico, no se consumen. Es de esperar que mediante el uso de la ingeniería genética y de nuevas tecnologías en el futuro algunos de los problemas de toxicidad relacionados con los alimentos grasos puedan ser superados y evitados mediante el desarrollo de estrategias que permitan mejorar la calidad nutricional de los alimentos (Broun *et al.*, 1999; Grusak y DellaPenna, 1999).

Los principales factores que pueden inducir toxicidad en las grasas se encuentran recogidos en la Figura 28.1.

1. Toxicidad producida por componentes naturales

Este tipo de toxicidad está producida por alguno de los componentes que forman parte del alimento de forma natural. Dentro de este grupo se pueden distinguir dos tipos, toxicidad producida por los componentes mayoritarios del alimento, como es el caso de algunos ácidos grasos, y toxicidad producida por componentes minoritarios, como sucede en el caso de algunos pigmentos y alcaloides.

Componentes mayoritarios

Dentro del grupo de componentes mayoritarios se han detectado casos de toxicidad producida por determinados ácidos grasos que, como ya se

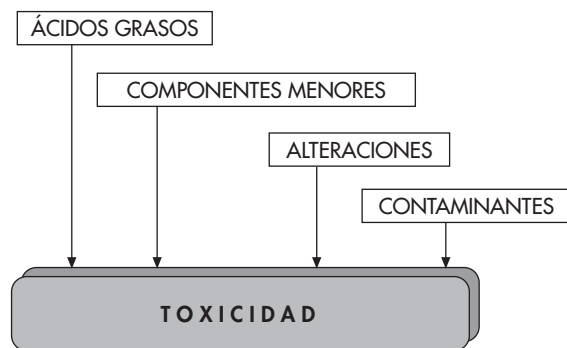


Figura 28.1. Principales factores capaces de inducir toxicidad en los alimentos grasos.

ha mencionado, constituyen los componentes mayoritarios de las grasas y aceites formando parte de los triglicéridos. Entre ellos como ejemplos cabe destacar (Ruiz Gutiérrez, 1985; Kitts, 1996):

- *Ácido erúxico (cis-13-docosenoico)* y *11-eicosenoico*: El ácido erúxico se encuentra en grandes cantidades en aceites obtenidos de especies de crucíferas (colza y mostaza). En el caso del aceite de colza, el ácido erúxico constituye entre el 20 y 55% de sus ácidos grasos que también contienen un 10% de 11-eicosenoico. Estos ácidos no se encuentran en cantidades apreciables en otros aceites. La administración de grandes cantidades de aceite de colza rico en ácido erúxico a animales de laboratorio origina una disminución del ritmo de crecimiento, y alteraciones de diversos órganos tales como hígado, riñones, bazo y corazón, y afecta también a la reproducción, pues disminuye el número de crías, su peso y vida media. Estos efectos tóxicos dieron lugar a la obtención por selección genética de variedades de colza con bajo contenido en ácido erúxico, algunas de las cuales (canola) se consumen en la actualidad.

- *Ácidos ciclopropenoicos*: son característicos de las semillas de la familia de las malváceas, entre las que destaca el algodón, en cuyo aceite representan del 1 al 3% del total de sus ácidos grasos, y de las semillas de *Sterculia foetida* y *gutata*, en cuyo aceite constituyen el 70% de sus ácidos grasos. Los ácidos más importantes son el estercúlico y el malvático. Se han descrito efectos tóxicos en animales de experimentación relacionados con la ingestión de estos ácidos, tales como retraso sexual, retraso del crecimiento, aumento de peso del hígado y disminución del peso total. El mecanismo de toxicidad está relacionado con su incorporación a los lípidos de membrana que induce una inhibición del sistema esteroil-Co A desaturasa, al inhibir la desaturación del ácido esteárico a oleico.

- *Ácido ricinoleico*: es un hidroxiácido que se encuentra en el aceite de ricino en un por-

centaje muy alto (87-90%) y en el aceite de ergot en menor proporción (40%). Posee propiedades purgantes y esto hace que el aceite de ricino no sea una fuente adecuada de aceite comestible.

1.2. Componentes menores

Los componentes menores se encuentran fundamentalmente formando parte de la fracción insaponificable de los aceites y grasas, y aunque esta constituye una fracción minoritaria, tiene una gran importancia ya que muchos de sus componentes juegan un papel importante en el metabolismo y comunican a las grasas propiedades de interés (O'Brien, 2004). Existen casos en que algunos componentes menores pueden originar efectos adversos y son eliminados antes del consumo mediante diferentes procedimientos. Como ejemplos pueden citarse (Ruiz Gutiérrez, 1986; Kitts, 1996):

- *Gosipol*: es un pigmento coloreado, representante de una familia de al menos 15 pigmentos, que representan del 21 al 29 % del peso total de las glándulas de las semillas de algodón. Durante el procesado de las semillas pueden eliminarse totalmente tratándolas con cloroformo o éter etílico durante largo tiempo. En el caso de la obtención del aceite, se usa hexano como disolvente, y durante un corto periodo de tiempo, por lo que entre un 0,1 y un 0,75% de los pigmentos pasan al aceite bruto, este porcentaje puede rebajarse posteriormente mediante purificación. Los efectos tóxicos son insuficiencia cardiaca, con hipertrofia del corazón, edema pulmonar y estasis circulatorio en el hígado y región abdominal, pudiendo producirse también lesiones hepáticas graves.

- *Dihidroxisanguinarina*: es un alcaloide presente en semillas de papaveráceas. Algunos aceites de semillas de papaveráceas se han usado en la fabricación de pan y pasteles. La dihidroxisanguinarina produce edema ocular y constituye un 90% de los alcaloides del aceite de argemon (*Papaver argemon*). Otros alcaloides presentes en la semilla elevan también la presión intraocular.

2. Toxicidad producida por compuestos de alteración

Desde el punto de vista de la alteración de las grasas, las principales modificaciones en la composición de aceites y grasas se producen durante el almacenamiento y conservación de los alimentos. Pero hay otras sustancias no deseables que pueden producirse durante los diferentes procesos tecnológicos a que son sometidos los alimentos, bien a escala industrial o bien a escala doméstica. Procesos de este tipo son la refinación, la hidrogenación y la fritura.

2.1. Alteración de aceites y grasas

Los principales procesos que conducen a la alteración de los aceites y grasas alimentarios se recogen en la Figura 28.2.

De ellos, los más importantes son la rancidez hidrolítica, o lipólisis, y la rancidez oxidativa u oxidación. Aunque la rancidez hidrolítica, que se produce por la liberación de los ácidos grasos de los glicéridos, es extremadamente importante para determinar cómo sabe un producto, es improbable que tenga alguna importancia nutricional o tóxica porque las grasas son hidrolizadas mediante enzimas en el intestino delgado antes de ser absorbidas. En algunos casos, es incluso deseable que se produzca la rancidez hidrolítica. La rancidez oxidativa, sin embargo, conduce a la formación de compuestos tanto incomedibles como tóxicos, lo que es inaceptable desde el punto de vista nutricional (Sanders, 1994).

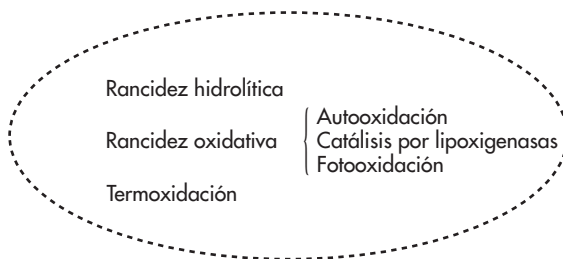


Figura 28.2. Principales causas de alteración de la fracción lipídica.

La alteración oxidativa que se produce como consecuencia de la acción del oxígeno atmosférico sobre las grasas (fundamentalmente las insaturadas) de forma espontánea (autooxidación) es la principal vía de modificación de aceites, grasas y alimentos lipídicos, ya que se producen una serie de reacciones en cadena, que tienen lugar a través de radicales libres, dando lugar a una variada gama de nuevos compuestos que se diferencian tanto en sus pesos moleculares como en sus polaridades.

La oxidación es la causa más importante de la pérdida de calidad del alimento desde el punto de vista nutricional, esto se debe fundamentalmente a la formación de nuevos compuestos (principalmente compuestos oxidados y poliméricos) por modificación de los ácidos grasos insaturados constituyentes de los lípidos, a la interacción de los lípidos oxidados con las proteínas (Figura 28.3), a la oxidación paralela de vitaminas con actividad antioxidante, etc., que disminuyen sensiblemente su valor nutritivo, incluso en alimentos de bajo contenido graso. Por otra parte, desde el punto de vista biológico, la oxidación de lípidos se traduce en daños a membranas, hormonas y vitaminas, que son componentes vitales para la actividad celular (Martin Polvillo, 2000).

Otro aspecto al que afecta este tipo de alteración es a la calidad sensorial, la oxidación tiene como consecuencia la formación de componentes volátiles que determinan la aparición de características organolépticas indeseables, que disminuyen la aceptación de los alimentos (Morales *et al.*, 1997), entre las cuales la más conocida es la rancidez. Por último, desde el punto de vista económico, el control de la oxidación es de gran interés para la industria alimentaria, necesitada de aceites y grasas de estabilidad elevada que garanticen periodos de comercialización superiores a un año y resistan las condiciones drásticas de los principales procesos de preparación de alimentos que, como la fritura y el horneado, tienen lugar a temperatura elevada.

Como se muestra en la Figura 28.3 cuando los lípidos se oxidan forman hidroperóxidos,

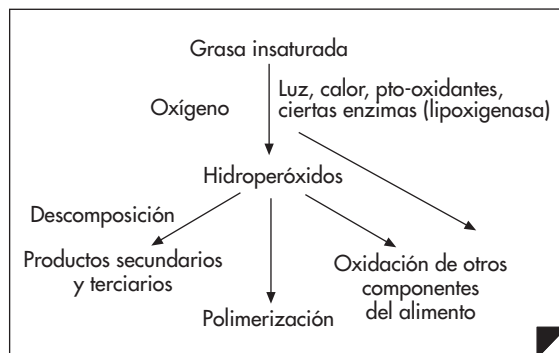


Figura 28.3. Efecto del proceso oxidativo sobre la grasa de los alimentos.

que son susceptibles de sufrir una oxidación posterior o una descomposición en productos secundarios de la reacción, tales como aldehídos, cetonas, ácidos y alcoholes. En muchos casos, estos compuestos afectan negativamente al flavor, aroma, sabor, valor nutricional y calidad sensorial global del alimento (Vercellotti *et al.*, 1992). Existen muchos sistemas catalíticos que pueden acelerar la oxidación de los lípidos, entre ellos se pueden destacar la luz, la temperatura, la presencia de enzimas, los metales, las metaloproteínas, los pigmentos y los microorganismos. La mayor parte de estas reacciones necesitan de algún tipo de radical libre y/o especie oxigenada. La oxidación se puede producir tanto en la oscuridad (autooxidación) como en presencia de luz (fotooxidación).

Las principales variables que afectan a la oxidación de los alimentos grasos se pueden dividir en dos grupos, las relacionadas con la propia constitución de la grasa y las relacionadas con las condiciones de almacenamiento (Figura 28.4).

Durante las últimas décadas se han escrito muchas revisiones detalladas sobre el mecanismo y cinética del proceso de oxidación de los lípidos (Labuza, 1971; Frankel, 1985a; Frankel, 1985b; Pokorny, 1987; Frankel, 1991; Kochhar, 1993; St. Angelo, 1996). La autooxidación es el mecanismo principal de oxidación de los lípidos de los alimentos y es un proceso autocatalítico de reacciones en cadena, que transcurre a través de la

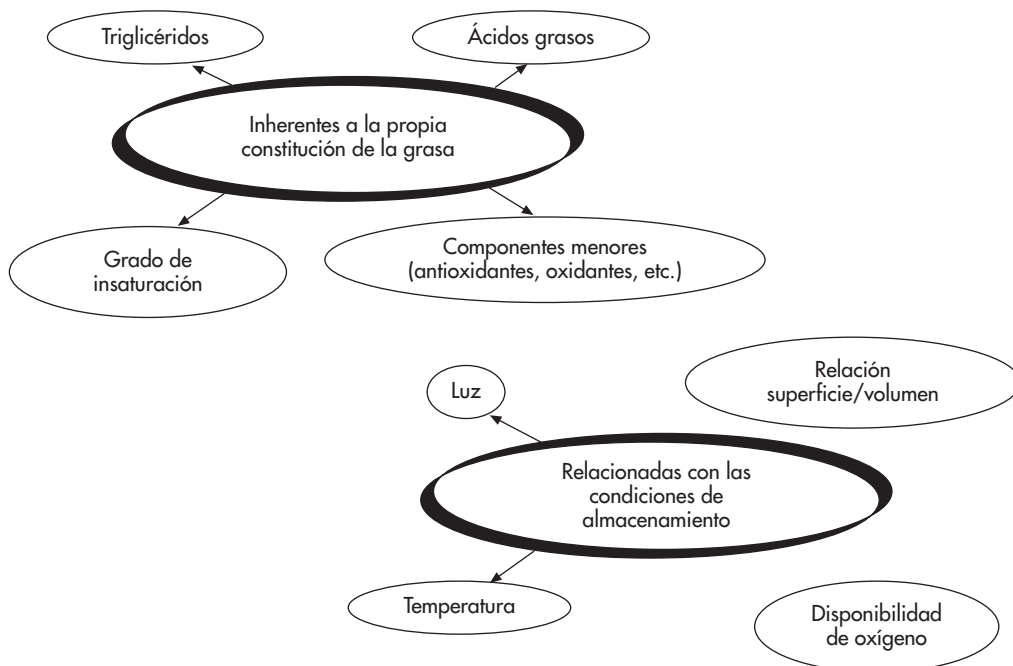


Figura 28.4. Variables que afectan a la oxidación de los alimentos grasos.

formación de radicales libres. En estas reacciones están involucrados muchos radicales libres y/o especies oxigenadas, tales como el singulete de oxígeno. Los principales substratos de estas reacciones son los ácidos grasos insaturados y el oxígeno. El mecanismo consta de cuatro fases: iniciación, propagación, ramificación y terminación (Figura 28.5).

En la etapa de iniciación, los radicales se forman directamente a partir de los componentes lipídicos. Los iniciadores que están involucrados en esta etapa son la temperatura, la luz y otros radicales o metales. En esta fase (1) se produce la abstracción de un hidrógeno H^\bullet de un grupo metileno adyacente al doble enlace de una molécula insaturada RH , por exposición a energía luminosa, calorífica o catálisis metálica. Es la reacción menos conocida de todo el proceso.

En la etapa de propagación el radical formado R^\bullet reacciona con el oxígeno atmosférico para formar un radical peroxilo ROO^\bullet (2) y posteriormente se produce la reacción de estos con nuevas moléculas insaturadas para originar

hidroperóxidos $ROOH$ y nuevos radicales libres R^\bullet (3) que repiten la secuencia de reacciones con otra molécula insaturada. Los radicales alílicos se forman un orden de magnitud más lentamente que los bialílicos por la mayor estabilización por resonancia de estos últimos. La reacción limitante de esta fase es la (3) que depende de la fuerza del enlace $C-H$, siendo más lábil en la posición alílica.

Simultáneamente se produce la ramificación, que consiste en la descomposición de hidroperóxidos y puede producirse de forma monomolecular (4) o bimolecular (5), incrementando la concentración de radicales libres. La descomposición bimolecular (5) es más probable, pues requiere menor energía de activación. Esto causa que el proceso de oxidación llegue a ser autoinducido, y que tenga lugar autocatálisis. La susceptibilidad de los ácidos grasos insaturados a la oxidación depende de su facilidad en donar un átomo de hidrógeno. Los hidroperóxidos formados no son estables y se descomponen para producir un conjunto de productos no volátiles y

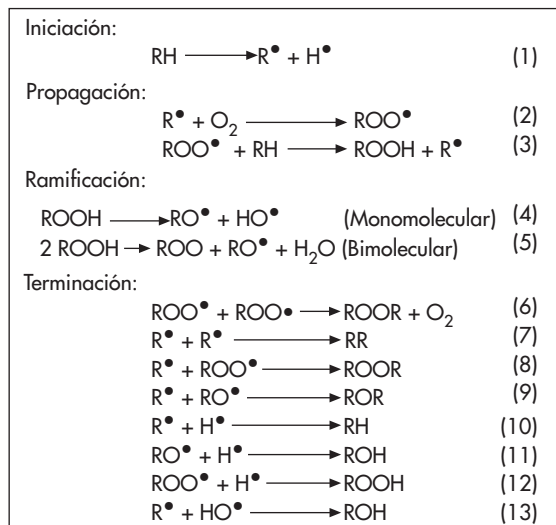


Figura 28.5. Mecanismo de oxidación de las grasas donde se muestran las cuatro fases que lo integran.

volátiles. Entre estos productos están también radicales, que pueden estimular el proceso de oxidación. Está demostrado que los productos volátiles y no volátiles formados son inestables y pueden ser oxidados y/o descomponerse para producir un amplio grupo de nuevos productos.

La terminación es la eliminación de radicales del sistema (peroxilo, alcóxilo, acilo, hidroxilo e hidrógeno) para formar compuestos estables (6-13). La interacción de dos radicales peroxilo (6) es la más importante de las reacciones de terminación porque predomina a presiones parciales de oxígeno normales. Durante esta etapa de finalización, los radicales reaccionan entre sí y forman productos no radicales. Cualquier reacción que evite la propagación de la peroxidación o elimine los radicales libres del sistema juega un papel clave en el mecanismo de terminación. Antioxidantes de rotura de cadena, como los compuestos fenólicos, tocoferoles, galato de propilo, etc., reaccionan con los radicales lipídicos para formar radicales no reactivos que detienen la cadena de propagación.

La proporción relativa de oxidación, basada en la formación de peróxidos, del oleato:linoleato:linolenato es del orden de 1:12:25. Se ha observado que la descomposición de los hidro-

peróxidos está relacionada con el número de dobles enlaces del ácido graso. Los hidroperóxidos del linolenato se descomponen más rápidamente que los del linoleato y el oleato, y pueden propagar la oxidación de otros ácidos grasos.

En la autooxidación se forman tanto productos primarios como secundarios; dentro de estos productos se encuentran:

- *Productos primarios de oxidación:* los hidroperóxidos son los productos primarios de oxidación que se forman a partir de los ácidos grasos insaturados. La formación de diferentes isómeros de hidroperóxidos depende del número de dobles enlaces y del mecanismo de oxidación. Se pueden formar tanto por reacciones de propagación como de terminación. Son compuestos inestables, y se descomponen fácilmente para formar productos secundarios de oxidación; en condiciones de temperaturas bajas y moderadas constituyen una fracción muy importante de los compuestos de oxidación. Se ha descubierto que la fotooxidación es la forma más eficiente de oxidación, especialmente para el ácido linolénico, donde se forma el mayor número de isómeros. Durante la descomposición de los hidroperóxidos es cuando se forman los diferentes compuestos químicos específicos del flavor desagradable, y es en ese momento cuando se produce el desarrollo del flavor rancio (Morales *et al.*, 1997; Przybylski y Eskin 1995).

- *Productos secundarios de oxidación:* se forman a partir de los hidroperóxidos a través de distintos tipos de reacciones, y se pueden agrupar en tres tipos, según el rango de peso molecular de los compuestos que se obtienen (Martín Polvillo, 2000):

- Compuestos de peso molecular menor que los lípidos no oxidados, originados por reacciones de descomposición, es la vía principal de formación de compuestos volátiles.
- Compuestos de peso molecular parecido al de los lípidos no oxidados, se diferencian de estos por la presencia en la molécula de un grupo oxigenado, que se

origina por transformación del grupo hidroperóxido.

- c) Compuestos diméricos y poliméricos de peso molecular muy superior al de los lípidos no oxidados, se originan por reacciones de condensación.

a) *Compuestos volátiles*: la descomposición de los productos primarios de oxidación (hidroperóxidos) origina productos secundarios de oxidación volátiles que dan lugar a un flavor desagradable de aceites y grasas. Estos compuestos son solo una pequeña parte del total de los productos de oxidación pero tienen una gran importancia desde el punto de vista sensorial (Morales *et al.*, 1997). La descomposición ocurre a través de la rotura del grupo hidroperóxido, se originan fundamentalmente a partir del radical alcoxilo por escisión homolítica a ambos lados del citado radical, que produce un aldehído estable (Kochhar, 1993). Se han examinado varias rutas de reacción para el desarrollo de estos productos volátiles (Frankel 1985a; Kochhar 1993). La predominancia de una ruta particular depende del estado de oxidación del aceite, así como de otros factores como la presión del oxígeno, la temperatura y la presencia de prooxidantes y antioxidantes. Los principales productos de descomposición incluyen aldehídos, cetonas, alcoholes, ácidos, hidrocarburos, lactonas, furanos y ésteres.

La formación de productos volátiles de oxidación en aceites comestibles es de gran interés para la industria de este tipo de aceites ya que el desarrollo de sabores y olores indeseables reducen el tiempo de vida útil de estos productos, o los convierte en no aptos para el consumo humano.

b) *Monómeros oxidados*: los compuestos monómeros oxidados son productos estables de oxidación secundaria, que contienen funciones epoxi, hidroxilo y ceto principalmente (Capella, 1989). Constituyen, junto a los hidroperóxidos (compuestos monoméricos de oxidación primaria), el grupo mayoritario originado por degradación oxidativa a temperatura ambiente o moderada.

Esta fracción presenta una gran complejidad, de tal forma que incluso a partir de sistemas modelo con un único doble enlace se obtienen compuestos monofuncionales y bifuncionales que pueden mantener o no el doble enlace de la molécula. La complejidad aumenta con el número de dobles enlaces, y sobre todo en el caso de los triglicéridos donde pueden existir combinaciones de restos acilo oxidados y no oxidados (Frankel, 1985b).

c) *Dímeros y polímeros*: la dimerización constituye el primer paso de la polimerización; transcurre principalmente mediante cuatro reacciones de terminación (Figura 28.6) y da lugar a dímeros no polares o dímeros puente C-C, y a dímeros oxidados de mayor polaridad, tales como los dímeros puente éter (C-O-C) y los dímeros puente peróxido (C-O-O-C).

Si en otros puntos de la molécula existen hidrógenos activos, puede continuar la reacción de polimerización, produciéndose una mezcla de compuestos de muy diferente polaridad y peso molecular. Además, en el caso particular de los triglicéridos, estas reacciones pueden ocurrir entre grupos acilo de una misma molécula o de dos moléculas distintas, lo que daría lugar a dímeros intra e intermoleculares, que tendrían pesos moleculares muy diferentes (Dobarganes y Márquez-Ruiz, 1996).

La influencia de la temperatura en la producción de compuestos de oxidación es grande. En general, al aumentar la temperatura, se aceleran todas las reacciones implicadas en el desarrollo de la oxidación, por lo que la cantidad de compuestos obtenidos es mucho mayor a temperaturas elevadas (Dobarganes, 1998). Además, el

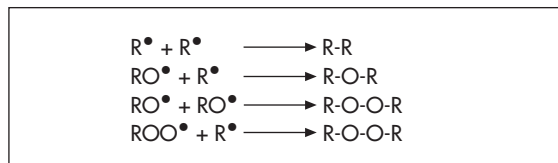


Figura 28.6. Posibles reacciones de terminación del proceso oxidativo que dan lugar a la formación de dímeros y polímeros.

aumento de temperatura disminuye la solubilidad del oxígeno en el medio, con lo que se favorecen las reacciones puramente térmicas, que no se producen a temperatura moderada. Las principales diferencias que introduce la temperatura, en relación con los compuestos obtenidos, están en que durante la fase de ramificación, a baja temperatura la velocidad de formación de hidroperóxidos es mayor que su descomposición, que tiene lugar a través de la vía monomolecular y por tanto los compuestos mayoritarios son triglicéridos monómeros oxidados. Sin embargo, a elevada temperatura, la velocidad de ramificación a través de la descomposición bimolecular es mayor que su formación, y los principales compuestos originados son dímeros y polímeros, ya que los radicales con posibilidad de interaccionar son glicéricos (Dobarganes y Márquez-Ruiz, 1996; Dobarganes, 1998). También las reacciones de terminación se ven afectadas por la temperatura, debido a su influencia en la disponibilidad de oxígeno (Labuza, 1971). Debido a ello, los dímeros con enlaces peróxidos son más frecuentes en oxidación a temperaturas bajas por la abundancia relativa de radicales peroxilo y alquilo, frente a los puentes éter y puentes C-C, encontrados mayoritariamente a temperaturas elevadas por la predominancia de radicales alquilo y alcoxilo.

Se han identificado diferentes *componentes menores* en aceites y grasas. La cantidad de estos componentes presentes en un alimento graso depende de su especie y de las condiciones de elaboración del aceite o grasa. En el caso de los aceites, normalmente la proporción es más alta en los aceites crudos que en los refinados y desodorizados porque muchos de estos compuestos se descomponen o desaparecen durante las etapas del proceso de elaboración, de forma que en los aceites refinados, decolorados y desodorizados únicamente aparecen cantidades traza. Se ha publicado que estos componentes menores afectan, mediante diferentes mecanismos, a la estabilidad oxidativa de las grasas y aceites. Sin embargo, la influencia de muchos de estos componentes menores sobre la oxidación por autooxidación o fotooxidación,

todavía se discute y no está aún clara (Morales y Przybylski, 2000).

- *Ácidos grasos libres*: se ha demostrado en algunos casos una acción prooxidante por parte de los ácidos grasos libres (Miyashita y Takagi, 1986). Este efecto prooxidante se explica debido a la presencia en su estructura del grupo carboxilo, y el probable mecanismo se atribuyó a la acción catalítica del grupo carboxilo sobre la descomposición de una pequeña cantidad de hidroperóxidos formados en las etapas iniciales de la autooxidación.

- *Fosfolípidos*: varios estudios muestran un efecto antioxidante de algunos fosfolípidos. La fosfatidiletanolamina parece ser la más efectiva. El mayor potencial como antioxidante de este fosfolípido se atribuye a un grupo amino que tiene la capacidad de complejar metales y mantenerlos en una forma activa. También parece que los fosfolípidos pueden actuar de manera sinérgica con compuestos fenólicos y tocoferoles para mejorar su eficacia (Hudson y Ghovami 1984).

- *Tocoferoles*: los tocoferoles se consideran los principales antioxidantes naturales presentes en los aceites vegetales. El isómero alfa del tocoferol es el mayor antioxidante endógeno presente, por ejemplo, en el aceite de oliva. Sus actividades antioxidantes dependen principalmente de su concentración y de la presencia de compuestos sinérgicos (Pokorny 1991). Se ha publicado que los tocoferoles actúan esencialmente eliminando radicales libres, basándose en el sistema redox de la tocoferol-tocoferil semiquinona. Los tocoferoles incrementan la estabilidad oxidativa de los aceites vegetales durante el almacenamiento con luz y cuando la clorofila está presente. La actividad antioxidante decrece desde el α -tocoferol al β - y γ -tocoferoles (Jung y Min, 1990).

- *Compuestos fenólicos*: los polifenoles naturales, tanto los compuestos simples (Ejemplo: los ácidos fenólicos o sus ésteres) como los compuestos más complejos (Ejemplo: lactonas, chalconas y flavonoides), tienen actividad antioxidante y protegen a los aceites vegetales de la oxidación. La actividad antioxidante de los com-

puestos fenólicos naturales se ha relacionado con sus propiedades eliminadoras de radicales libres, particularmente su habilidad para donar un átomo de hidrógeno a los radicales lipídicos formados durante la fase de propagación de la oxidación lipídica (Shahidi y Wanasundra, 1992). Al menos dos o tres grupos fenólicos vecinos y un grupo carbonilo en forma de éster aromático (lactona, chalcona, flavonona o flavona) se consideran como características moleculares esenciales necesarias para alcanzar un alto nivel de actividad antioxidante (Dziedzic y Hudson, 1984).

- *Clorofilas y derivados*: algunas investigaciones han mostrado el efecto prooxidante de las clorofilas y sus derivados en aceites expuestos a la luz. Estos compuestos tienen la habilidad de transferir energía desde la luz a las moléculas químicas. La adición de cantidades crecientes de clorofila a un aceite reduce de manera proporcional su estabilidad oxidativa durante su almacenamiento a la luz. También se ha publicado que durante un almacenamiento sin luz algunos derivados de la clorofila actúan como antioxidantes. Las feofitinas son las más estables cuando están presentes en el aceite, y tienen también la más alta actividad como fotosensibilizadores. Estos compuestos deben ser eliminados del aceite para mejorar su estabilidad oxidativa (Usuki *et al.*, 1984).

- *Carotenoides*: los carotenoides son pigmentos naturales constituidos por hidrocarburos conjugados, que se han descubierto como potentes protectores contra la oxidación fotosensibilizada y actúan como atenuadores del singulete de oxígeno. El mecanismo físico del atenuador de los carotenos se basa en el bajo estado energético del singulete, lo que facilita la aceptación de energía desde el oxígeno singulete. El carotenoide triplete que se forma transfiere la energía adquirida como calor y regresa a su estado original. La capacidad de atenuación del singulete de oxígeno está relacionada con el número de dobles enlaces conjugados presentes en la cadena poliénica del carotenoide, y se incrementa cuando el número de estos enlaces aumenta. La cantaxantina muestra la actividad antioxidante

mayor, seguida del β -caroteno (Lee y Ming, 1990).

- *Esteroles*: los esteroles vegetales, conocidos colectivamente como fitoesteroles, existen principalmente como esteroles libres y ésteres de esteroles de los ácidos grasos. El β -sitosterol, el campesterol, el brasicasterol y el estigmasterol son los componentes mayoritarios identificados en los aceites vegetales. Hay evidencia de que algunos fitosteroles presentes de manera natural pueden mejorar la estabilidad de los aceites de cocina durante su calentamiento. Se sospecha que el responsable de esta actividad es el grupo etilideno, que se caracteriza por un doble enlace entre los átomos de carbono C_{20} y C_{24} .

- *Metales*: muchos informes describen los efectos nocivos de cantidades traza de metales sobre la estabilidad oxidativa de los aceites. El mecanismo químico general para la catálisis del metal en la oxidación lipídica puede seguir diferentes rutas. Específicamente, el hierro, el cobre y el níquel se comportan como iniciadores directos mediante transferencia electrónica, o iniciadores indirectos mediante reacciones redox. Otra posible ruta es mediante la iniciación de la oxidación del ácido graso a través de la reacción de los metales con triplete de oxígeno. El radical anión superóxido que se produce puede o perder un electrón, y producir singulete de oxígeno, o reaccionar con un protón del componente lipídico para formar un radical hidroperoxilo. Ambos radicales tienen alta reactividad y pueden iniciar la autooxidación. Los metales de transición, que contienen dos o más estados de valencia, tienen los potenciales de oxidación más altos. Estos metales incluyen al hierro, el cobre y el níquel, y otros de menor importancia como el cobalto, el cromo y el aluminio (Labuza 1971).

Al no ser posible evitar por completo la acción del oxígeno atmosférico sobre los aceites y grasas, se hace necesario realizar una buena evaluación de su estado de oxidación. Los métodos analíticos utilizados se basan generalmente en la determinación de cambios primarios (formación de hidroperóxidos) o secundarios (productos de descomposición o polimerización

obtenidos a partir de los hidroperóxidos) que modifican las propiedades físicas y químicas de la grasa. Además, se puede distinguir entre estáticos, que pretenden la medida del estado de oxidación en un momento dado, y métodos dinámicos, que tratan de conocer la resistencia a la oxidación mediante ensayos acelerados, para predecir la vida útil del producto. Existen muchos procedimientos analíticos que se aplican hoy día en el análisis de aceites y grasas con el objeto de definir las y caracterizarlas, y están contemplados en diferentes regulaciones (IOOC, 1996; EC, 1995; EC, 1997; *Codex alimentarius* 1993; IUPAC, 1987). Dentro de ellas hay diferentes métodos encaminados a la determinación de la estabilidad oxidativa o el nivel de alteración de grasas y aceites.

2.2. Influencia de procesos tecnológicos

Como ya se ha dicho, la autooxidación puede producirse de forma espontánea, y tiene lugar principalmente durante el almacenamiento y conservación de los alimentos grasos. Existen otros procesos que pueden conducir a la formación de compuestos alterados, ejemplos de ellos son la fritura de alimentos y la hidrogenación parcial de aceites.

- *Fritura*: la fritura de los alimentos, aunque aparentemente es un proceso simple, es en realidad un proceso muy complejo en el que participan distintas reacciones (Gertz, 2000; Christie y Dobson, 2000). Además de las altas temperaturas y de la baja solubilidad del oxígeno en el medio, que favorecen la producción de compuestos secundarios debido a una rápida descomposición de los hidroperóxidos, hay que tener en cuenta la presencia del alimento en el interior de la grasa o aceite calentado. Cuando el alimento se introduce en la grasa se producen varios tipos de reacciones.

Por un lado se producen reacciones oxidativas que originan hidroperóxidos, radicales libres y toda la gama de compuestos explicados anteriormente. Se producen a su vez reacciones de hidrólisis que originan ácidos grasos libres,

diglicéridos, monoglicéridos y glicerina, la cual a su vez puede originar acroleína, sustancia volátil y tóxica. Se dan reacciones de tipo térmico y hay una vaporización de compuestos volátiles (Billek, 2000). Por último, se produce además una solubilización de parte del alimento en la grasa de fritura y una absorción de parte de esta por el alimento, de forma que los compuestos presentes en la grasa pueden pasar al alimento y ser ingeridos.

Por otra parte, se debe tener en cuenta que generalmente los aceites de fritura no se utilizan solamente una vez, sino que el mismo aceite se usa varias veces para freír nuevas porciones de alimento (Varela y Ruiz-Roso, 2000), de aquí la importancia de realizar la renovación del aceite o grasa de fritura con la suficiente frecuencia.

- Formación de isómeros de los ácidos grasos: entre las transformaciones que sufren los alimentos grasos como consecuencia de los procesos industriales, están las experimentadas por los ácidos grasos insaturados de los aceites vegetales cuando se hidrogenan parcialmente para producir grasas más plásticas, más sólidas o más estables. En condiciones de hidrogenación parcial, el doble enlace puede cambiar de configuración *cis* a *trans* (isomerización geométrica) o cambiar de posición dentro de la cadena de átomos de carbono (isomerización posicional) (Wood, 2000). Los dos tipos de isomerización se dan frecuentemente en un ácido graso sometido a hidrogenación (FAO, 1997). En el proceso de refinación de aceites vegetales, concretamente en la etapa de desodorización también pueden aparecer ciertas cantidades de ácidos grasos *trans*.

Los llamados ácidos grasos *trans* son ácidos grasos insaturados que tienen al menos un doble enlace en configuración *trans*. Los más frecuentes son los monoinsaturados, pero también pueden encontrarse isómeros diinsaturados con configuración *cis*, *trans* o *trans*, *cis*. En los ácidos grasos monoinsaturados *trans* procedentes de aceites parcialmente hidrogenados, el doble enlace suele situarse entre las posiciones 9 y 11.

Las fuentes más frecuentes de ácidos grasos isoméricos son las margarinas y grasas de reposería que contienen aceites de pescado o vegetales parcialmente hidrogenados. Los productos lácteos o la carne de los rumiantes obtienen ácidos grasos isoméricos en el proceso de hidrogenación que se produce en el rumen. Los ácidos grasos *trans* representan aproximadamente el 5% del total de ácidos grasos en productos vacunos y ovinos, mientras que en las grasas hidrogenadas industrialmente pueden representar más del 50%. La ingestión de este tipo de ácidos en algunos países es elevada.

En los primeros estudios que se realizaron sobre estos ácidos se les atribuyeron unos efectos que en realidad se debían a una deficiencia de ácidos grasos esenciales. El ácido graso poliinsaturado *trans* que más tiempo permanece en el tejido adiposo humano parece ser el ácido 9-*cis*, 12-*trans* octadecadienoico, pero se desconocen sus efectos en el metabolismo de los ácidos grasos esenciales y en los eicosanoides.

En estudios metabólicos realizados utilizando ácido oleico como referencia, los ácidos grasos *trans* procedentes de aceites parcialmente hidrogenados elevan el colesterol LDL del plasma de forma similar a lo que se observa con los ácidos grasos saturados. Sin embargo, a diferencia de ellos, los ácidos grasos *trans* no elevan el colesterol HDL del plasma, y pueden bajar esta fracción en comparación con el ácido oleico. El cociente entre colesterol total y HDL parece ser

más desfavorable con los ácidos grasos *trans* que con cantidades equivalentes, ya sea de ácido oleico o de ácidos grasos saturados.

Los ácidos grasos isoméricos de los aceites vegetales parcialmente hidrogenados parecen generar hipercolesterolemia, por lo que cuando se reduce la ingestión de ácidos grasos saturados, deberían también reducirse los ácidos grasos *trans* para mejorar el perfil de las lipoproteínas plasmáticas.

2.3. Efectos de los compuestos de alteración

La Tabla 28.2 muestra un resumen de las posibles alteraciones más importantes de aceites y grasas, los agentes que las causan y los compuestos principales que se forman mediante cada una de ellas.

Se sabe que algunos de estos compuestos son capaces de producir efectos tóxicos (Soni *et al.*, 2001; Márquez-Ruiz *et al.*, 2000). Los monómeros cíclicos en animales de experimentación provocan retraso en el crecimiento, hipertrofia y/o hiperplasia hepática, e hígado graso. Se ha demostrado que los monómeros cíclicos aislados del aceite de linaza, calentado a 275 °C, 12 horas, en atmósfera de nitrógeno, inducen enzimas metabolizantes hepáticas; dicha inducción es del tipo fenobarbital.

Los estudios toxicológicos con dímeros y polímeros son contradictorios entre sí. Algunos

Tabla 28.2. Tipos de alteraciones de aceites y grasas, agentes que las causan y productos que se originan.

Agente causante	Alteración	Productos
Humedad	Hidrolítica	Ácidos grasos Diglicéridos Monoglicéridos Glicerol
Oxígeno atmosférico	Oxidativa	Monómeros oxidados Dímeros y polímeros oxidados Dímeros y polímeros Ácidos grasos de cadena corta Compuestos volátiles
Temperatura	Térmica	Isómeros geométricos Monómeros cíclicos Dímeros y polímeros

autores indican efectos adversos como retraso en el crecimiento, hipotermia, úlceras gástricas y lesiones tisulares en corazón, hígado y riñón. Otros autores no describen efecto alguno.

Algunos autores han demostrado que los aceites de maíz, soja y cacahuete, calentados y doblemente calentados provocan en animales de experimentación (ratas) una depresión del peso y consumo de alimentos; aumento del peso relativo del hígado; diarrea, dermatitis, pérdida de pelo; lesiones histológicas en timo, hígado, médula y piel.

Tras alimentar ratas durante un año con dietas equilibradas en las que el aporte graso estaba constituido por aceite de oliva o de girasol calentados prolongadamente (Sanz *et al.*, 1984), se observó en los animales alteraciones externas (alopecia, piloerección), diarrea, disminución del crecimiento y hepatomegalia, congestión pulmonar y punteado superficial en riñón, así como proteinuria y sedimento urinario. En sangre se encontraron elevados los triglicéridos, ácidos grasos libres y urea sérica, que sugiere una nefropatía, acompañada de afectación hepática por aparecer elevada la fosfatasa alcalina sérica.

Los productos derivados del calentamiento y oxidación de grasas y aceites que presentan mayor interés son los hidroperóxidos, peróxidos y radicales libres implicados en su formación y propagación. Como se ha explicado previamente, los lípidos insaturados (linoleico, linoléico) al oxidarse forman hidroperóxidos lipídicos, que pueden formar radicales libres lipídicos que peroxidan, a su vez, a otros lípidos, entre ellos a los constituyentes de la membrana celular; como resultado de la peroxidación se produce lesión de la membrana y otros constituyentes celulares (Nwanguma *et al.*, 1999). Además, las consecuencias de las reacciones propagadas por radicales libres se conocen (Repetto, 1997): se produce la alquilación de elementos celulares (membranas celulares, retículo endoplásmico, enzimas, ADN); se origina un déficit metabólico o defensivo; puede aparecer cáncer y mutagénesis (trastorno de la reproducción celular); se produce peroxidación de lípidos celulares (fosfolí-

pidos de membranas); rotura de membranas y necrosis.

En cuanto al riesgo tóxico de los aceites calentados, se considera que en la extrapolación de los datos establecidos en animales de experimentación a la especie humana debe tenerse en cuenta que las dosis administradas con fracciones aisladas son muy elevadas, si tenemos en cuenta que la ingesta humana de aceites y grasas debe suponer aproximadamente un 30% de las calorías diarias ingeridas (aproximadamente 40% en España), y de ellas una pequeña proporción estará constituida por grasas de fritura. Si bien el consumo de estas grasas puede representar un peligro potencial, a corto plazo y con una alimentación equilibrada no representa la gravedad que podría deducirse de los estudios experimentales. De todas formas, el potencial tóxico existe, por prácticas inadecuadas en el uso de los aceites (los calentamientos y enfriamientos alternativos son más nocivos que un calentamiento prolongado único); algunos estudios epidemiológicos muestran alta incidencia de cáncer de mama y gástrico en países con alto consumo de grasas insaturadas (de más fácil peroxidación); las enfermedades arteriales coronarias pueden en parte ser causadas por consumo de productos de oxidación lipídica. Recientemente la ingestión de alimentos ricos en lípidos peroxidados se ha relacionado con efectos negativos a largo plazo, tales como la formación de ateromas y carcinomas, procesos de inflamación y envejecimiento celular, etc.

3. Toxicidad producida por contaminación

Otra de las posibles causas por las que pueden aparecer efectos tóxicos asociados al consumo de aceites y grasas es debido a la presencia de sustancias tóxicas que hayan pasado a formar parte del alimento graso a través de una contaminación. Como ejemplo de posibles contaminantes, algunos de los más importantes en el campo de las grasas son (Ruiz Gutiérrez, 1986):

- *Aflatoxinas*: existen algunos hongos contaminantes de semillas que pueden sintetizar sustancias susceptibles de producir intoxicaciones, dentro de ellas se encuentran las aflatoxinas que son compuestos que poseen uno o dos anillos lactónicos. Todas las aflatoxinas poseen grupos polares que les hacen tener una baja solubilidad en grasas, por lo que la cantidad de aflatoxinas en los aceites crudos es de 5 a 10 veces más baja que en las semillas. Se sabe que el proceso clásico de refinación de aceites destruye las aflatoxinas por rotura del enlace lactona, de aquí que los aceites refinados no contengan aflatoxinas. Pero la toxina sí puede encontrarse en aceites vírgenes, por ejemplo de cacahuete. Las aflatoxinas son venenosas por acción directa y cancerígenas por acción indirecta. Actúan inhibiendo la replicación y transcripción del DNA, y también inhiben la incorporación de H₃-citidina al RNA del núcleo de las células hepáticas.

- *Residuos de pesticidas*: algunos pesticidas utilizados para combatir insectos, hongos, ácaros y nematodos en las plantas pueden solubilizarse y contaminar los aceites y grasas finales. Actualmente la mayoría de los pesticidas que se utilizan se destruyen antes de que el alimento sea ingerido, pero un mal uso de estos pesticidas puede llevar a que se encuentren en aceites vírgenes.

- *Hidrocarburos aromáticos policíclicos*: normalmente la presencia de PAH en aceites vírgenes es prácticamente nula, aunque algunos autores han encontrado en algunos aceites cantidades del orden de µg/kg (ppb). Recientemente se detectó la presencia de benzo(a)pireno en aceites de orujo de oliva, debido a una contaminación producida en el proceso tecnológico al que se someten estos aceites, concretamente en la etapa de secado previa a la extracción del aceite.

- *Sustancias que pueden pasar al alimento desde los envases*: un ejemplo de este tipo de sustancias son los monómeros de materiales plásticos que pueden pasar desde los envases al alimento, contaminándolo.

- *Síndrome del aceite tóxico*: un ejemplo especial lo encontramos en el caso del *síndrome*

del aceite tóxico (SAT) (OMS, 1992; Gelpí, 2002; Kane, 2002). La ingestión de un aceite fraudulentamente vendido como aceite de oliva causó una epidemia de grandes dimensiones, caracterizada clínicamente por intensas mialgias incapacitantes, eosinofilia periférica marcada e infiltraciones pulmonares, que produjo centenares de muertes y miles de afectados que desarrollaron enfermedades crónicas. El vehículo de la epidemia resultó ser un aceite de uso industrial (aceite de colza desnaturalizado con anilina al 2%) derivado de forma fraudulenta al consumo humano tras ser sometido a un proceso de refinación que se cree que fue importante para el desarrollo de la toxicidad. Se encontraron más de 60 compuestos químicos diferentes en estos aceites cuya toxicidad era desconocida. Estos compuestos se agruparon en dos familias diferentes: las anilidas de ácidos grasos y los ésteres del 3-(*N*-fenilamino)-1,2-propanodiol con ácidos grasos (PAP). Los primeros se forman espontáneamente al reaccionar la anilina con los ácidos grasos libres en el aceite, mientras que los de la otra familia solo se formaron en presencia de unas condiciones críticas de refinación, siendo este grupo de compuestos los mejores candidatos a ser la causa del SAT, concretamente se ha demostrado que los derivados del dioleil-éster del PAP (OOPAP) son mejores marcadores de toxicidad que las oleil-anilidas. Si los ésteres del PAP son simplemente marcadores de la toxicidad de los aceites o tienen la capacidad de inducir la enfermedad es algo que está en estudio. Las infiltraciones de ciertos tipos de linfocitos alrededor de las principales lesiones, la activación de ARNm para ciertas interleukinas y la presencia de determinados HLA (antígenos de leucocitos humanos) asociados especialmente a los fallecidos por causas del SAT justifican la hipótesis de un mecanismo autoinmune involucrado en la patogenia. Además, la presencia de un gen que codifica enzimas que con una alta probabilidad están involucradas en el metabolismo de las sustancias químicas descritas refuerzan la idea de la susceptibilidad individual y la diferente respuesta que se ha observado en los pacientes. Este desgraciado caso puso de mani-

fiesto la necesidad de una vigilancia e inspección constante de la calidad y autenticidad de los alimentos.

Bibliografía

- Abdullah R, Amiruddin M (1993). Applications of market share analysis in determining world market potential for palm oil. *Palmas* 14: 55-61.
- Aparicio R, Alonso V, Morales MT (1994). Detailed and exhaustive study of the authentication of European virgin olive oils by SEXIA expert system. *Grasas Aceites* 45: 241-252.
- Belury MA (2002). Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. *Ann Rev Nutr* 22: 505-531.
- Billek G (2000). Health aspects of thermoxidized oils and fats. *Eur J Lipid Sci Technol* 102: 587-593.
- Broun P, Gettner S, Somerville C (1999). Genetic engineering of plant lipids. *Ann Rev Nutr* 19:197-216.
- Capella P (1989). Les produits de lévolutioun des hydroperoxydes. *Rev Fran Corps Gras* 36: 131-323.
- Christie WW, Dobson G (2000). Formation of cyclic fatty acids during the frying process. *Eur J Lipid Sci Technol* 102: 515-520.
- Dobarganes MC (1998). Formation and analysis of high-molecular weight compounds in frying fats and oils. *OCL* 5: 41-47.
- Dobarganes MC, Márquez-Ruiz G (1996). Dimeric and higher oligomeric triglycerides. En: Perkins EG, Erickson MD (eds.). *Deep frying: chemistry nutrition and practical applications*. American Oil Chemists' Society. Champaign, pp. 89-111.
- Dziedzic SZ, Hudson BJE (1984). Phenolic acids and related compounds as antioxidants for edible oils. *Food Chem* 14: 45-51.
- EC (1995). *Official Journal of the Commission of the European Communities*. Regulation No. 656/95, L69, March 29.
- EC (1997). *Official Journal of the Commission of the European Communities*. Regulation No. 2472/97, L341, December 12.
- FAO (1997). Grasas y aceites en la nutrición humana. Consulta FAO/OMS de expertos. Estudio FAO Alimentación y Nutrición – 57.
- Firestone D (1999). *Physical and chemical characteristics of oils, fats and waxes*. AOCS Press. Washington, pp. 152.
- Frankel EN (1985a). Chemistry of autoxidation: mechanism, products and flavor significance. En: Min DB, Smouse TH (eds.). *Flavor chemistry of fats and oils*. American Oil Chemists' Society. Champaign, pp. 1-37.
- Frankel EN (1985b). Chemistry of free radical and singlet oxidation of lipids. *Prog Lipid Res* 23: 197-221.
- Frankel EN (1991). Recent advances in lipid oxidation. *J Sci Food Agric* 54: 495-511.
- Garow JS, James WPT (1999). *Human nutrition and dietetics*, 10.^a ed. Churchill Livingstone. Edinburgh, pp. 912.
- Gelpí E, Posada de la Paz M, Terracini B, Abaitua I, Gómez de la Cámara A, Kilbourne EM *et al* (2002). The Spanish toxic oil syndrome 20 years after its onset: a multidisciplinary review of scientific knowledge. *Environ Health Perspect* 110: 457-464.
- Gertz C (2000). Chemical and physical properties of frying fats and oils. *Eur J Lipid Sci Technol* 102: 566-572.
- Grusak MA, DellaPenna D (1999). Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 133-161.
- Gunstone FD (2002). *Vegetable oils in food technology: Composition, properties and uses*. CRC Press. Boca Ratón, Florida, pp. 337.
- Gurr MI (2000). The role of lipids in human nutrition. En: Harwood JL, Aparicio R (eds.). *Handbook of olive oil: analysis and properties*. Aspen Publishers. Gaithersburg, pp. 159-207.
- Hibbeln JR, Salem N (1995). Dietary polyunsaturated fatty acids and depression: when cholesterol does not satisfy. *Am J Clin Nutr* 62: 1-9.
- Howell WH, McNamara DJ, Tosca MA, Smith BT, Gaines JA (1997). Plasma lipid and lipoprotein responses to dietary fat and cholesterol: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 65: 1747-1764.
- Hwang D (2000). Fatty acids and immune responses: a new perspective in searching for clues to mechanism. *Ann Rev Nutr* 20: 431-456.
- IOOC (1996). International Olive Oil Council. Trade Standard Applying to Olive Oil and Olive Pomace Oil/COI/T.15/Document No. 2/Rev. 5. Madrid, November 20.
- IUPAC (1987). International union of pure and applied chemistry. En: Paquot C, Haufenne A (eds). *Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives*. 7^{edn}. Blackwell Scientific Publications. Oxford.

- Jung MY, Min DB (1990). α -, γ -, δ -Tocopherols effects on chlorophyll photosensitized oxidation of soybean oil. *J Food Sci* 56: 807-815.
- Kane K (2002). Chemical contamination: the Spanish toxic oil syndrome 1981. *Food Safety Express* 3: 4-5.
- Karleskind A, Wolff JP (1996). *Oils and fats manual*. Lavoisier Tec. & Doc. Londres. pp. 1560.
- Kitts D (1996). Toxicity and safety of fats and oils. En: Hui Y. H. (ed.). *Bailey's Industrial oil and fat products, Volume 1, Edible oil and fat products: General applications*. Wiley & Sons. Chichester, UK. pp. 215-280.
- Kochhar SP (1993). Oxidative pathways to the formation of off-flavours. En: Saxby MJ (ed.). *Food taints and off-flavours*. Blackie Academic & Professional. Londres. pp. 150-201.
- Labuza TP (1971). Kinetics of lipid oxidation in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2: 355-395.
- Lee MM, Lin SS (2000). Dietary fat and breast cancer. *Ann Rev Nutr* 20: 221-48.
- Lee SH, Min DB (1990). Effects, quenching mechanism, and kinetics of carotenoids in chlorophyll-sensitized photooxidation of soybean oil. *J Agric Food Chem* 38: 1630-1634.
- León-Camacho M (1997). Isomerización *cis-trans* de los ácidos grasos en la desodorización de aceites comestibles. *Tesis Doctoral*, Universidad de Sevilla, España.
- Márquez-Ruiz G, Pérez-Camino MC, Dobarganes MC (2000). Digestibility of fatty acids monomers, dimers and polymers in the rat. *J Am Oil Chem Soc* 69: 930-934.
- Martin Polvillo MJ (2000). Evolución de la alteración oxidativa y formación de nuevos compuestos en sistemas modelo. Aceites y alimentos grasos. *Tesis Doctoral*. Universidad de Sevilla. pp. 197.
- Min DB, Smouse TH (1985). *Flavor chemistry of fats and oils*. American Oil Chemists' Society. Champaign, IL. pp. 309.
- Min DB, Smouse TH (1989). *Flavor chemistry of lipid foods*. American Oil Chemists' Society, Champaign, IL. pp. 462.
- Miyashita K, Takagi T (1986). Study on the oxidative rate and prooxidant activity of free fatty acids. *J Am Oil Chem Soc* 63: 1380-1384.
- Morales MT, León-Camacho M (2000). Gas and liquid chromatography: Methodology applied to olive oil. En: Harwood J. L, Aparicio R. (eds.). *Handbook of olive oil: analysis and properties*. Aspen Publishers. Gaithersburg. pp. 159-207.
- Morales MT, Przybylski R (2000). Olive oil oxidation. En: Harwood JL, Aparicio R (eds.). *Handbook of olive oil: analysis and properties*. Aspen Publishers. Gaithersburg. pp. 459-490.
- Morales MT, Rios JJ, Aparicio R (1997). Changes in the volatile composition of virgin olive oil during oxidation: flavors and off-flavors. *J Agric Food Chem* 45: 2666-2673.
- Nwanguma BC, Achebe AC, Ezeanyika LUS, Eze LC (1999). Toxicity of oxidized fats. II. Tissue levels of lipid peroxides in rats fed a thermally oxidized corn oil diet. *Food Chem Toxicol* 37: 413-416.
- O'Brien RD (2004). *Fats and oils: formulating and processing for applications*. CRC Press. Boca Raton, Florida. pp. 616.
- Okuyama H, Kobayashi T, Watanabe S (1996). Dietary fatty acids – the n-6/n-3 balance and chronic elderly diseases. Excess linoleic acid and relative n-3 deficiency syndrome seen in Japan. *Prog Lipid Res* 35: 409-457.
- OMS (1992). *El síndrome del aceite tóxico*. Conocimientos actuales y perspectivas futuras. Organización Mundial de la Salud. Oficina regional para Europa. Copenhague. pp. 157.
- Pérez-Camino MC, Moreda W, Cert A (1996). Determination of diacylglycerol isomers in vegetable oils by solid-phase extraction followed by gas chromatography on a polar phase. *J Chromatogr A* 721: 305-314.
- Pokorny J (1987). Major factors affecting the autoxidation of lipids. En: Chan HWS (ed.). *Autoxidation of unsaturated lipids*. Academic Press. Londres. pp. 141-206.
- Pokorny J (1991). Natural antioxidants for food use. *Trends Food Sci Technol* 2: 223-227.
- Przybylski R, Eskin NAM (1995). Methods to measure volatile compounds and the flavor significance of volatile compounds. En: *Methods to assess quality and stability of oils and fat-containing foods*. AOCS Press. Champaign. pp. 107-133.
- Repetto M (1997). *Toxicología fundamental*. 3.ª edición. Díaz de Santos. Madrid. pp. 406.
- Ruiz Gutiérrez V (1985). Toxicología de aceites y grasas comestibles. I. *Grasas Aceites* 36: 390-398.
- Ruiz Gutiérrez V (1986). Toxicología de aceites y grasas comestibles. II. *Grasas Aceites* 37: 97-102.
- Sanders TAB (1994). Nutritional aspects of rancidity. En: Allen JC, Hamilton RK (eds.). *Rancidity in foods*, 3.ª ed. Blackie Academic and Professional. Londres. pp. 128-139.

- Sanz P, Ruiz-Gutiérrez V, Rodríguez-Vicente MC, Villar P, Gutiérrez González-Quijano R, Repetto M (1984). Aceites termoxidados. Estudios de toxicidad crónica. III. Bioquímica hemática y tisular de ratas tratadas. *Rev Toxicol* 1: 135-146.
- Shahidi F, Wanasundra PD (1992). Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr* 32: 67-103.
- Soni MG, Kimura H, Burdock GA (2001). Chronic study of diacylglycerol oil in rats. *Food Chem Tox* 39: 317-329.
- St. Angelo AJ (1996). Lipid oxidation in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* 36: 175-224.
- Usuki R, Endo Y, Kaneda T (1984). Prooxidant activities of chlorophylls, and pheophytins on the photooxidation of edible oils. *Agric Biol Chem* 48: 991-994.
- Vercellotti JR, St. Angelo AJ, Spanier AM (1992). Lipid oxidation in food: an overview. En: St. Angelo AJ (ed.). *Lipid oxidation in foods*. American Chemical Society. Washington. pp. 1-11.
- Varela G, Ruiz-Roso B (2000). Some nutritional aspects of olive oil. En: Harwood JL, Aparicio R (eds.). *Handbook of olive oil: analysis and properties*. Aspen Publishers. Gaithersburg. pp. 459-490.
- Wijendra n V, Hayes KC (2004). Dietary n-6 and n-3 fatty acid balance and cardiovascular health. *Ann Rev Nutr* 24: 597-615.
- Wood RD (2000). Biological effects of geometrical and positional isomers of monounsaturated fatty acids in humans. *Food Sci Technol* 96: 637-665.

M.^a del Carmen López, Herminia López, M.^a Fátima Olea

Introducción. Vitaminas liposolubles. Vitaminas hidrosolubles. Bibliografía.

Introducción

Son sustancias necesarias para el funcionamiento normal del organismo, que las debe aportar la dieta, pues nuestro cuerpo no las sintetiza al menos en la cantidad requerida. Sus necesidades varían desde pocos μg , a miligramos. En la actualidad algunos autores las clasifican de acuerdo a su importancia en la dieta, por su interés en clínica, o bien por su capacidad antioxidante. En el presente capítulo se clasifican como tradicionalmente se viene haciendo, de acuerdo con su solubilidad en liposolubles e hidrosolubles con el fin de facilitar su exposición; no obstante, de cada una se resaltarán su función antioxidante si la hubiere, al igual que su interés nutricional.

Vitaminas liposolubles

1. Vitamina A

Introducción

En la actualidad, la deficiencia de vitamina A es uno de los grandes problemas de la salud pública.

La OMS estima que 250 millones de niños en edad preescolar tienen deficiencia subclínica y cerca de tres millones padecen de xerofthalmia clínica. Aproximadamente un 10% del total de niños ciegos, lo son a causa de la deficiencia de vitamina A, y cerca del 70% de estos niños mueren en el transcurso del primer año.

Estructura y propiedades

La vitamina A, es un alcohol poliénico isoprenoide que se conoce también como retinol, vitamina antixeroftálmica, etc. Del retinol derivan los ésteres de retinol (forma en la que se deposita) y, por oxidación el retinal y el ácido retinoico. El 11-cis-retinal juega un papel decisivo en el proceso visual.

En los alimentos de origen animal, la vitamina A se presenta, en su mayor proporción, en la parte lipídica como retinol esterificado con el ácido palmítico. En los vegetales encontramos los carotenoides, como el β -caroteno, pigmento amarillo constituido por dos moléculas de retinol unidas en el extremo aldehído de sus cadenas carbonadas.

La vitamina A es relativamente estable al calor y la luz, sin embargo se destruye por oxida-

ción. Por esto la cantidad de la vitamina presente en el alimento dependen del tiempo de almacenamiento y la forma de conservación.

Funciones

La vitamina A es necesaria principalmente para un crecimiento normal, una adecuada respuesta inmune, para la reproducción, para el desarrollo fetal y es fundamental para que se lleve a cabo correctamente el ciclo visual.

El ácido retinoico (forma activa del retinol en la piel) regula la queratogénesis necesaria para mantener la piel.

El 11-cis-retinal, combinado con la opsina forma un compuesto activo llamado rodopsina, que se encuentra en la retina del ojo humano. Los rayos de luz de baja intensidad descomponen la rodopsina de los bastoncillos (fotorreceptores de la retina) y por medio de una serie de reacciones químicas se produce la excitación del nervio óptico, originando en el cerebro estímulos visuales. Cuando no hay suficiente cantidad de vitamina A, se produce ceguera nocturna, ya que los bastoncillos son sensibles a la luz de baja intensidad. El β -caroteno, además de tener la característica de convertirse en vitamina A dentro del organismo (pro vitamina A), es un potente antioxidante.

En animales de laboratorio la carencia produce un cese en el crecimiento, aparición de xeroftalmia y cornificación de los epitelios. La deficiencia extrema de vitamina A en adultos es rara debido a la capacidad de reserva del hígado humano.

Absorción y metabolismo

Al ser una vitamina liposoluble, sigue el metabolismo de los lípidos. Los ésteres de retinol en la grasa de la dieta se dispersan en el intestino, con las sales biliares. Se forman micelas, que facilitan la digestión. En la última etapa se produce la hidrólisis por la lipasa pancreática, que actúa sobre las micelas. Esta enzima es la responsable de la absorción del 90% de las grasas de la dieta. La vitamina A, junto con los demás productos de la hidrólisis enzimática, entra en el enterocito. En

el intestino, el retinol se esterifica con ácidos grasos (ácido palmítico) y se incorpora a los quilomicrones linfáticos, que entran al torrente sanguíneo. El retinol es transportado a través de la sangre unido a una proteína RBP (Retinol Binding Protein), hacia los tejidos. La RBP es una proteína sensible a la deficiencia de zinc y de proteínas, por lo que si el aporte de estos nutrientes es escaso, se podría presentar un cuadro de deficiencia de vitamina A, aunque su aporte sea el adecuado. Si no existe deficiencia, los ésteres de retinilo entran en los adipocitos para formar los principales depósitos del organismo.

Fuentes

La vitamina A se encuentra en los alimentos de origen animal: hígado, huevos, mantequilla, leche entera, quesos, pescado graso. En la forma de carotenos en los alimentos de origen vegetal: espinacas, zanahoria, espárragos, calabaza, y en frutas como naranja, mango, melón, etc.

Las cantidades recomendadas de vitamina A son para el hombre 1.000 μg y para la mujer 800 μg diarios, respectivamente.

Toxicidad

Esta vitamina es la más tóxica, aunque las intoxicaciones derivadas de la ingestión de una dosis alta de origen alimentario no se presentan. De existir la hipervitaminosis, el origen es el consumo inadecuado de suplementos, pudiendo producir alteraciones en las membranas de las células, descamación de la piel, dolor abdominal, náuseas, vómitos, fatiga, debilidad, irritabilidad, hepatomegalia, alopecia, cefalea y falta de apetito. En los niños se produce hidrocefalea e hipertensión craneal.

La hipervitaminosis se da cuando la ingesta de vitamina A es por lo menos 10 veces mayor a la recomendada. Los síntomas desaparecen en semanas o meses cuando se suspende el suplemento.

Un consumo excesivo de vitamina A en embarazadas produce teratogénesis (malformaciones en el feto). Estos defectos en el nacimiento se dan cuando el suplemento que contiene altas

dosis de retinol o éster de retinilo, es ingerido diariamente durante semanas, en el primer trimestre de embarazo.

Los vegetales muy ricos en carotenos (zanahoria) pueden ingerirse en grandes cantidades sin peligro. Puede producirse hipercarotenosis por exceso de caroteno, que se deposita debajo de la piel originando un color amarillo característico en las palmas de las manos cuando se suspende la ingestión excesiva, se normaliza el color de la piel.

2. Vitamina D

Introducción

La vitamina D tiene funciones de hormona, ya que se puede sintetizar en la piel y actuar en otra parte del cuerpo (intestino delgado).

Estructura y propiedades

La vitamina D es una mezcla de varios tipos de compuestos químicos denominados esteroides. Los precursores de la vitamina D se encuentran en la fracción esteroide de los tejidos animales y plantas en forma de 7-dehidrocolesterol y ergosterol, respectivamente.

Ambos requieren de la radiación ultravioleta para convertirse en la forma de provitamina (D3-colecalciferol y D2-ergocalciferol, respectivamente), y las dos provitaminas deben convertirse en el riñón en la forma metabólicamente activa. La vitamina D2 se encuentra en las plantas, mientras que la 7-dehidrocolesterol (precursor de la D3) se encuentra en nuestra piel. Las formas metabólicamente activas, calcitriol y ercalcitriol, se producen en el riñón.

Esta vitamina es notablemente estable y no se deteriora cuando los alimentos se calientan o guardan por periodos prolongados.

Funciones

La vitamina D se ha usado para prevenir y para tratar el raquitismo. Otro problema óseo común en personas mayores, la osteomalacia, se ha relacionado también con deficiencias de vitamina D.

Su principal función es la de estimular la absorción del calcio y del fósforo en el intestino delgado. También actúa en la deposición del fosfato de calcio en huesos y dientes, y por lo tanto regula los niveles de calcio sanguíneo, siendo necesaria para el crecimiento y desarrollo del individuo.

Se requiere para el funcionamiento adecuado de la glándula paratiroidea, esencial en el control del metabolismo del calcio y del fósforo. Recientemente se ha incrementado el conocimiento del espectro de funciones de la vitamina D.

Múltiples estudios la han involucrado en la regulación y control de la proliferación y diferenciación celular, funcionamiento del sistema inmunitario, ya que se ha demostrado que la vitamina D estimula a los macrófagos en el cuerpo humano. Y en el mantenimiento del correcto funcionamiento de la membrana celular. Por todo ello, se piensa que la vitamina D es importante en la prevención de cáncer (y posiblemente en su tratamiento), en la protección y tratamiento de infecciones y en retardar el envejecimiento celular y las enfermedades vinculadas con el funcionamiento inadecuado de la membrana celular.

Absorción y metabolismo

La vitamina D ingerida se absorbe en el intestino junto con los lípidos, y con ayuda de la bilis se incorpora a los quilomicrones. La vitamina D de la piel o intestino se fija a una proteína (DBP) para su transporte a los sitios de almacenamiento, hígado, piel, cerebro, huesos y tal vez otros tejidos.

El calciferol en el hígado se hidroxila hasta 25-OH D3 (calcidiol), y es transportado en sangre por la proteína transportadora (DBP). Al llegar al riñón sufre una segunda hidroxilación, dando lugar al 1,25-OH D3 (calcitriol) verdadera forma activa presente en sangre. El calcitriol actúa como una hormona esteroidea que juega un papel importante en la homeostasis de la concentración de calcio en sangre controlada por la PTH. La hipocalcemia estimula la secreción de PTH por la glándula paratiroides, estimulando así en el riñón la formación del calcitriol. De esta forma este compuesto favorece en el intes-

tino la absorción del calcio y en el riñón la reabsorción de calcio y fósforo mediado por la PTH. Se ayuda así a mantener el nivel de calcio en sangre y, por tanto, el metabolismo del hueso.

Fuentes

En forma de colecalfiferol, se encuentra en los alimentos de origen animal. Las mejores fuentes son los aceites de hígado de pescado. También son fuentes de vitamina D, la yema de huevo, queso, mantequilla, hígado y pescado.

En forma complementaria se encuentra como vitamina D2 (ergocalciferol) ya sea en alimentos enriquecidos, en complementos o en combinación con otras vitaminas. Casi el 98% de la leche se fortifica con vitamina D2 (ergosterol irradiado).

La deficiencia produce: raquitismo en niños y osteomalacia en los adultos. Las necesidades se han establecido considerando la capacidad del organismo para sintetizar la vitamina la piel y siempre que exista una exposición al sol, en 5 $\mu\text{g}/\text{día}$, para toda la población. Para los mayores se aconseja 10 $\mu\text{g}/\text{día}$, cantidad aconsejable también en caso de deficiencia de luz solar.

Toxicidad

Se sabe que la hipervitaminosis puede causar alteraciones patológicas. Estas alteraciones, son la calcificación excesiva de los huesos y tejido, blandos, como riñones (incluyendo cálculos renales), pulmones e incluso los tímpanos, que puede dar lugar a sordera. Los lactantes pueden tener molestias gastrointestinales, fragilidad ósea, retrasos en el crecimiento y retraso mental. Los síntomas que causa la hipercalcemia son cefalea, debilidad, náuseas, vómitos, estreñimiento, poliuria y polidipsia.

3. Vitamina E

Introducción

La vitamina E es una vitamina liposoluble cuya principal función es ser antioxidante.

En 1922, Evans y Bishop demuestran por vez primera la existencia de la vitamina E, al obser-

var que las ratas hembra necesitaban un componente en la dieta no conocido entonces para tener un embarazo normal; las hembras con deficiencia presentaban ovulación y concepción normales, pero posteriormente, durante el periodo de gestación, ocurría la muerte y resorción de los fetos. También se han descrito lesiones en los testículos, por ello a la vitamina E se la conoció como la vitamina contra la esterilidad.

Evans *et al.*, (1936) aislaron la vitamina a partir del aceite de germen de trigo.

3.2. Estructura y propiedades

En la actualidad, se conocen ocho tocoferoles con actividad de vitamina E. Se considera que el α tocoferol (5,7,8-trimetil tocol) es el tocoferol de mayor importancia, puesto que constituye alrededor del 90% de los tocoferoles en tejidos de animales, y muestra la mayor actividad biológica. Se almacena en el tejido adiposo.

La vitamina E está formada por un grupo de 8 vitámeros. Su estructura consta de 2 partes primarias: un anillo complejo cromano y una larga cadena lateral. Estos 8 vitámeros se dividen en 2 grupos fundamentales: los 4 tocoferoles (TF) y los 4 tocotrienoles (TT). Dentro de cada grupo los vitámeros difieren en el número y posición de los grupos metilo en el anillo cromano, designándose como α , β , γ y δ .

Los tocoferoles son insolubles en agua, solubles en disolventes orgánicos y aceites. Sensibles a los oxidantes y a la luz, pero estables al calor a los ácidos y bases. Los alimentos procesados pierden esta vitamina, componente esencial en nutrición.

Funciones

La vitamina E se encuentra junto al colesterol, los fosfolípidos y los triglicéridos en la fracción liposoluble de las membranas celulares. Es probablemente el único antioxidante presente en las zonas del organismo donde se encuentran las grasas.

Evita la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados producida por los radicales libres, manteniendo la integridad de la membrana celular. Por ello retarda el envejecimiento celular.

Protege también contra la destrucción de la vitamina A, el selenio, los aminoácidos azufrados y la vitamina C.

Además de regular la fluidez de las membranas, modula la actividad de diversas enzimas y el sistema inmunitario. Previene la formación de coágulos sanguíneos y es esencial en la formación de fibras colágenas y elásticas del tejido conjuntivo.

El efecto prooxidante de esta vitamina no es tan importante al existir reductores como el ascorbato, el ubiquinol y el glutatión, que regeneran rápidamente α -tocoferol, impidiendo con ello la prooxidación.

Absorción y metabolismo

La absorción de la vitamina E es relativamente baja, se ingiere unida a los lípidos de la dieta. El TF esterificado es previamente hidrolizado a TF libre en el lumen del intestino y la mucosa. Su absorción se incrementa por la presencia de triglicéridos (TG) de cadena media y es inhibida por los AGPI. La absorción depende también de la capacidad de digerir y absorber las grasas. La bilis es esencial para su absorción, ya que para que la lipasa pancreática pueda hidrolizar los TG tiene que existir una secreción biliar normal que facilite su emulsión, además de una adecuada secreción pancreática. Ya que la vitamina E es transportada en las LP, la concentración plasmática depende en gran medida de los niveles de lípidos plasmáticos. Los eritrocitos también parecen ser un transporte importante, ya que hay relativamente gran cantidad de la vitamina en sus membranas, pero en términos de cantidad absoluta tienen mayor cantidad de TF el tejido adiposo, el hígado y el músculo.

Existen dos mecanismos para su incorporación hística. En primer lugar la hidrólisis de los TG de quilomicrones y VLDL por la lipasa. En segundo lugar la unión de la vitamina E a las LDL por medio de su receptor. Su retención hística es dependiente de la proteína transportadora y de su actividad biológica.

Se ha identificado una proteína transportadora de TF en el hígado. En el hombre es una pro-

teína que se encuentra en el citosol de las células y parece que funciona transportando la vitamina hacia el interior de las membranas.

En el hígado el 75 % del TF se localiza en las células parenquimatosas. En el tejido adiposo la vitamina E se encuentra en la masa lipídica del adipocito, donde pudiera mantenerse para proteger el almacenamiento de ácidos grasos insaturados de la oxidación.

Fuentes

Es abundante en frutas y vegetales como aguacate, boniato, brócoli, ciruela, espinacas, espárragos, manzana, moras, plátano, tomate, zanahoria, así como en aceites sin refinar.

Las necesidades dependen de la dieta, si disminuyen los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), que son los que se oxidan más fácilmente y se consume selenio junto con aminoácidos azufrados, las necesidades de vitamina E se verán disminuidas. Las RDA se han establecido en 8 mg para los adultos (hombre y mujer).

La deficiencia se puede presentar en personas con dificultad para absorber la grasa o bien que toman una cantidad excesiva de ella y en los bebés prematuros. Provoca la destrucción de los glóbulos rojos, degeneración muscular, algunas anemias y trastornos de la reproducción.

Toxicidad

Aún si se ingiriera el 300% de la RDA, esta vitamina tiene un índice de toxicidad mínimo, y no genera efectos secundarios. No ocurre igual para la vitamina A y D, que pueden ser tóxicas en dosis altas.

Vitaminas hidrosolubles

1. Vitamina B₁ (tiamina)

Introducción

Fue descubierta por Eijkman en el año 1887 al observar que el arroz pulido producía polineuri-

tis en pollos, y beriberi en el hombre. El beriberi es una enfermedad que se generalizó en toda Asia oriental en el siglo XIX debido a la introducción de máquinas arroceras a vapor que produjeron arroz pelado o descascarillado sin la envoltura o cáscara rica en vitamina B₁.

La causa dietética de la enfermedad fue demostrada por primera vez en 1880, cuando el Almirante Takaki redujo notablemente su ingestión en la Marina japonesa agregando pescado, carne, centeno y verduras a la dieta de arroz descascarillado de los marineros.

En 1911 Funck la aisló de la cascarilla de arroz, y la denominó «vitaminas». Con posterioridad se le llamo vitamina B₁ y recibió el Premio Nobel en 1912.

Estructura y propiedades

Desde el punto de vista químico, está formada por dos núcleos: el de la pirimidina y el del tiazol, ambos bisustituidos y unidos por un puente metileno. Su forma habitual de presentación es como clorhidrato de tiamina. Es soluble en el agua, se pierde por lixiviación, y es menos soluble en alcohol, así como insoluble en disolventes orgánicos como acetona y cloroformo.

Es termolábil, se desnaturaliza a 100 °C, en medio acuoso y alcalino, no en medio ácido, por lo que presenta el problema de su destrucción durante la preparación culinaria de los alimentos. No le afecta la congelación y se oxida fácilmente.

La conversión de la tiamina a su forma de coenzima es llevada a cabo por la tiamina difosfoquinasa; el adenosintrifosfato (ATP) es el donador de pirofosfato (PP). Se han sintetizado antimetabolitos para la tiamina que inhiben a esta enzima. Los más importantes de estos son la neopiritiamina (piritiamina) y la oxitiamina.

La transformación en primer lugar es en pirofosfato de tiamina o TPP, el cual a su vez puede transformarse en trifosfato de tiamina o TTP.

Funciones

El fosfato de tiamina (TPP), la forma fisiológicamente activa de la tiamina, funciona en el metabolismo de los carbohidratos como una

coenzima en la descarboxilación de α -cetoácidos como piruvato y α -cetoglutarato, así como en la descarboxilación oxidativa de α -cetoácidos ramificados, estado irreversible del metabolismo de leucina, isoleucina y valina; también actúa en la utilización de pentosa (ciclo de las pentosas fosfato), en la derivación de hexosa monofosfato, para aprovechar sus nutrientes; en esta última función actúa como coenzima de la transcetolasa dependiente de tiaminpirofosfato.

Como triamintrifosfato (TTP), su función es la de actuar como neurotransmisor.

Metabolismo

Cualquiera que sea la forma de ingestión de la tiamina, rápidamente se fosforila en numerosos tejidos, pero fundamentalmente en el hepático, mediante una tiamina pirofosfoquinasa y se convierte en su forma biológicamente activa que es el pirofosfato de tiamina (TPP), que a su vez puede convertirse en trifosfato de tiamina (TTP) mediante una tiamina pirofosfato ATP fosforiltransferasa, en presencia de ATP.

Su absorción es limitada, y se lleva a cabo principalmente en la parte alta del intestino delgado, según transporte activo contra gradiente de concentración mediante consumo de energía dependiente del Na y saturable. También se puede absorber por procesos de difusión pasiva cuando el transporte activo está saturado. Su absorción es limitada por consumo elevado de alcohol. Son varios los factores que influyen en la absorción y el metabolismo de esta vitamina (y que, por lo tanto, pueden alterar sus necesidades diarias). Uno de ellos es la presencia de tiaminasas en los alimentos como en el pescado fresco, las almejas, las gambas, los mejillones y algunos tejidos animales crudos.

Se encuentra en células sanguíneas (glóbulos rojos, blancos y plaquetas) y en hígado, cerebro, riñón y corazón.

Se excreta por orina bajo la forma de tiamina y disulfuro de tiamina y por heces la sintetizada por la flora intestinal, así como la no absorbida. También puede eliminarse por el sudor, aunque en pequeñas cantidades.

Fuentes

Se aporta esencialmente con los alimentos. Se encuentra mayoritariamente en la levadura de cerveza (7 mg%), en leguminosas, cereales completos, frutos secos, carne de cerdo, hígado, huevos, leche, pescados. Las frutas y verduras son pobres en tiamina. Puede sintetizarse en el colon por bacterias intestinales, aunque esto no representa una posible fuente de vitamina.

Las necesidades son mayores durante el embarazo, la lactancia, el hipermetabolismo y la fiebre. Puede ocurrir una pérdida acelerada de tiamina durante el tratamiento diurético, la hemodiálisis o la diálisis peritoneal y la diarrea. Las ingestas recomendadas son de 1 a 1,5 mg por día en el adulto. No obstante, estos requerimientos varían en función de los aportes de nutrientes, ya que se relaciona con el índice metabólico y es mayor cuando los carbohidratos constituyen la fuente de energía. Este hecho tiene importancia práctica en pacientes que tienen alimentación parenteral y que, reciben una porción sustancial de las calorías en forma de dextrosa. El adulto sano posee solo 30 mg, mayoritariamente en músculo la ausencia de almacén en el organismo justifica que el aporte diario deba ser suficiente. En general, las necesidades mínimas se cifran en 0,5mg por cada 1.000 kcal por día.

La deficiencia grave de tiamina conduce al beriberi, enfermedad que se caracteriza por la aparición de miopatías y neuropatías periféricas. En Europa y América del Norte, la deficiencia de tiamina se observa más a menudo en alcohólicos, aunque los enfermos con insuficiencia renal crónica bajo diálisis, y los que reciben alimentación parenteral total también pueden encontrarse en riesgo. También se encuentran deficiencias en los niños alimentados a pecho de madres carentes de tiamina. La enfermedad se manifiesta por afectación del sistema nervioso periférico y del sistema cardiovascular, debilidad muscular, pérdida de reflejos, confusión, coma, llegando incluso a la muerte. En los niños existe una forma fulminante, con vómitos, cianosis, convulsiones y muerte por insuficiencia cardíaca.

Si la carencia no es tan radical, se manifiesta en forma de trastornos cardiovasculares (brazos y piernas «dormidos», sensación de opresión en el pecho, etc.), alteraciones neurológicas o psíquicas (cansancio, pérdida de concentración, irritabilidad o depresión).

La afectación cerebral puede ser muy grave y se denomina encefalopatía de Wernicke y síndrome de Korsakoff.

El tabaco y el alcohol reducen la capacidad de asimilación de esta vitamina; el alcohol necesita la tiamina para ser metabolizado y en el caso concreto de hepatopatía alcohólica no hay síntesis de TPP. Por tanto, las personas que beben, fuman o consumen mucho azúcar necesitan más vitamina B₁.

Toxicidad

Esta vitamina carece de toxicidad; la ingestión de dosis elevadas se eliminan por la orina.

2. Vitamina B₂ (riboflavina)

Introducción

La riboflavina, lactoflavina o vitamina B₂ fue descubierta por Warburg y Cristian al aislar una enzima de color amarillo en la leche, a la que dieron un papel como transportador del oxígeno molecular en la respiración celular. Durante mucho tiempo fue desconocida la relación entre su actuación bioquímica y las repercusiones clínicas de su carencia. Pero el conocimiento actual de enfermedades hereditarias del metabolismo debidas a la ausencia de esta vitamina, ha posibilitado el establecimiento de sus necesidades en el organismo vivo. Fue sintetizada por Karrer en 1935.

Estructura y propiedades

La riboflavina, desde el punto de vista químico, es un derivado de un compuesto flavínico: la isoaloxacina, con un grupo ribitol. Es soluble en agua, aunque en menor proporción que sus dos coenzimas flavin mononucleotido (FMN) y fla-

vin adenin di-nucleótido (FAD). Es estable en medio ácido pero inestable en medio alcalino, sensible a la luz, que la destruye de modo irreversible, formando lumiflavina, potente agente oxidante, carente de actividad vitamínica y que a su vez destruye la vitamina C.

Se encuentra libre en la leche, y unida a proteínas en la mayoría de las fuentes alimentarias.

Funciones

Las coenzimas FMN Y FAD actúan como grupo prostético de oxidasas y deshidrogenasas. Intervienen en:

1. La cadena respiratoria del transporte de electrones.
2. β -oxidación de ácidos grasos.
3. La deshidrogenación de cinco aminoácidos esenciales (leucina, isoleucina, valina, lisina y triptófano), utilizando una Acil-CoA deshidrogenasa FAD dependiente.
4. Reoxidación del NADH, producido en las reacciones de descarboxilación oxidativa.
5. Estimula la actividad de glutathion reductasa eritrocitaria, por su capacidad para reoxidar NADPH.

Absorción y metabolismo

Se encuentra en leche libre, y en tejidos vegetales y animales como FMN y FAD. La absorción se realiza en yeyuno, mediante un sistema de transporte activo saturable, (que comprende la fosforilación de la vitamina a flavina mononucleótido), favorecida por la presencia de alimentos, ya que estos alargan el tiempo de contacto con la mucosa intestinal y propician que se segreguen sales biliares que se supone juegan un papel activo en la absorción de FMN.

En la mayoría de los tejidos, la riboflavina se convierte en flavina mononucleótido mediante la flavoquinasa, reacción sensible a la presencia de hormona tiroidea, y que se inhibe por la clorpromazina y por antidepresores tricíclicos.

Para su transporte, la FMN se une a la albúmina aunque presenta mayor afinidad por las

inmunoglobulinas. Se almacena en hígado, miocardio, músculo estriado y en el cristalino. Generalmente su almacenamiento es bajo las formas FMN y FAD.

Se excreta en forma libre por la orina y menos bajo la forma de coenzimas.

Cuando se ingiere riboflavina en cantidades que se aproximan al requerimiento diario mínimo, solo aparece en la orina alrededor del 9%. A medida que el consumo de riboflavina aumenta por encima del requerimiento mínimo, se excreta, sin cambios, una proporción más grande. El ácido bórico forma un complejo con la riboflavina y favorece su excreción urinaria. La intoxicación por dicho compuesto puede inducir a deficiencia de riboflavina. La riboflavina también se segrega por la glándula mamaria en una proporción de 300 μ g en las 24 horas.

2.5. Fuentes

Se encuentra principalmente en la leche, los huevos, carnes, pescados, legumbres. Los alimentos ricos en proteínas en general, constituyen una buena fuente.

Las necesidades se estiman en función del aporte energético y se cifran en 0,6 mg por 1.000 kcal que equivalen a alrededor de 1,6 mg/día para varones adultos jóvenes, y de 1,2 mg/día para mujeres adultas jóvenes. En las personas mayores el aporte debe ser de 1,2 mg por día, incluso cuando la ingestión de calorías disminuye por debajo de 2.000 kcal. En el embarazo y periodo de lactación su cantidad debe aumentarse en 0,3 y 0,6 mg por día, respectivamente.

La vitamina B₂ participa en los procesos de respiración celular, desintoxicación hepática, desarrollo del embrión y mantenimiento de la envoltura de los nervios. También ayuda al crecimiento y la reproducción, y mejora el estado de la piel, las uñas y el cabello. Su carencia se manifiesta como lesiones en la piel, las mucosas y los ojos. En el caso de la piel, las lesiones que se presentan suelen ser dermatitis seborreica en los lóbulos de las orejas. Las lesiones de la boca se manifiestan en forma de lengua de color rojo magenta. Los síntomas oculares consisten en

fotofobia e hipervascularización de la conjuntiva. También puede producirse opacidad de la cornea.

El problema en el reconocimiento clínico de la deficiencia de riboflavina es que algunos síntomas, como glositis y dermatitis, son manifestaciones frecuentes de otras deficiencias de vitaminas. Se han observado deficiencias de riboflavina en recién nacidos tratados con luz ultravioleta por hiperbilirrubinemia. Los lactantes alimentados al pecho materno son más sensibles a este problema debido al contenido relativamente bajo de riboflavina en la leche materna.

Suelen ser deficitarios los bebedores o fumadores crónicos y las personas que siguen una dieta vegetariana estricta (sin huevos ni leche) y no toman suplementos de levadura de cerveza o germen de trigo.

Toxicidad

Esta vitamina carece de toxicidad, por lo que no resulta peligroso en ningún caso aumentar la dosis.

3. Niacina (vitamina PP)

Introducción

En el año 1762 el médico español Gaspar Casal descubrió el «mal de la rosa» que realmente era la sintomatología que producía la deficiencia de esta vitamina. En 1937 el investigador Elvehjem fue el que descubrió que la carencia de ácido nicotínico producía la lengua negra en el perro.

Esta vitamina engloba al ácido nicotínico, la nicotinamida y todos los derivados que pueden ser compuestos biológicamente activos.

El interés biológico de esta vitamina se debe a que es la precursora de dos cofactores que intervienen en todas las reacciones de oxidoreducción del organismo que son el NAD y el NADP.

3.2. Estructura y propiedades

Desde el punto de vista químico la niacina se puede presentar como ácido nicotínico, y nicotinamida que es el compuesto fisiológicamente activo.

El NAD es una molécula de nicotinamida mononucleótido unida a una molécula de AMP. El NADP deriva del NAD por sustitución de una molécula de hidrógeno por un fosfato.

Ambas formas son solubles en agua y alcohol. Es la vitamina más resistente ya que permanece estable al calor, la luz, oxidación y diferencias de pH, tanto a la acidez como a la alcalinidad. Solo se producen pérdidas por lixiviación al ser muy soluble en agua.

Funciones

El NAD y NADP están implicados en todas las reacciones de oxidoreducción dentro del organismo, no son propiamente coenzimas sino cosustratos de enzimas a las que van asociadas.

El NAD lo utiliza el organismo en la mayoría de las reacciones de oxidación, mientras que el NADP está implicado en las reacciones de reducción.

Asimismo, la actividad fundamental del NAD es mitocondrial, actuando como aceptor de hidrógeno en la glicólisis, lipólisis y en el ciclo de Krebs, transformándose en NADH₂ que transfiere sus electrones en la cadena de fosforilación oxidativa mitocondrial, reoxidándose a NAD, generándose ATP y el oxígeno se reduce a H₂O.

Por el contrario la actividad de NADPH₂ se lleva a cabo en el citoplasma, siendo el donador de hidrógeno en las reacciones de síntesis de ácidos grasos. El NADP se regenera en la vía de las pentosas fosfato. cuando la glicólisis está saturada, es decir, cuando el individuo está bien nutrido, ya que en esa circunstancia se necesita NADPH₂ para la lipogénesis.

Es un vasodilatador que mejora la circulación sanguínea. Participa en el mantenimiento fisiológico del sistema nervioso, la piel, la lengua y el sistema digestivo.

Absorción y metabolismo

El ácido nicotínico y la nicotinamida se absorben rápidamente a lo largo del tracto intestinal, por mecanismo de difusión activa sodio dependiente a pequeñas concentraciones, ya que es saturable,

y por difusión pasiva a elevadas concentraciones. Se transporta en plasma como nicotinamida. Cuando ingresan, en las células se forman NAD y NADPH, que se encuentran la primera en forma oxidada, es decir, como NAD^+ , y la segunda en forma reducida como $\text{NADPH} + \text{H}^+$.

Se halla en todos los tejidos, tanto como NAD como NADP. El hígado posee las mayores concentraciones de ácido nicotínico cifradas en 65 mg.

Su activación como cofactor se puede realizar en casi todas las células del organismo humano.

La eliminación tiene lugar a través de la orina y como N-metilnicotinamida, que es el principal catabolito de la niacina.

Para el caso del ácido nicotínico, se debe transformar previamente en nicotinamida, que se conjuga con la glicina dando lugar al ácido nicotinúrico que se elimina en la orina.

Biosíntesis de niacina

Aunque la niacina se la considera como vitamina, puede ser sintetizada en el organismo humano y en los mamíferos a partir del triptófano, pudiendo producir 1 mg de vitamina 60 mg de triptófano.

Esta síntesis está regulada por diversos factores:

- Por la cantidad de enzima presente para la realización de la primera etapa, la triptófano oxidasa tiene un control hormonal mediante los corticosteroides, de modo que su actividad es tres veces superior en mujeres embarazadas y en mujeres que toman anticonceptivos orales.
- Por la cantidad de triptófano presente para poder llevar a cabo la reacción de oxidación.
- Por el producto final de la reacción, es decir, por la concentración en el organismo de nicotinamida.
- Por la enzima picolinato carboxilasa que deriva la reacción hacia la producción de AcetilCoA para el ciclo de Krebs, pero cuando la capacidad oxidativa de esta

enzima está saturada o cuando hay mucho triptófano, la acroleil aminofumarato acumulada se cicla espontáneamente, derivando en este caso hacia la producción de NAD.

- Por la vitamina B₆, necesaria como coenzima en la reacción.

Fuentes

Las mejores fuentes son los alimentos proteicos, como carne, pescados, huevos. Los cereales la contienen pero en la mayoría de los casos no la puede aprovechar el organismo.

Los requerimientos son de 6,6 mg por cada 1.000 kcal, debiendo aumentar en el caso del embarazo en 2 mg y en 7 durante el periodo de lactación. Su deficiencia produce pelagra o síntoma de las tres D: dermatitis, diarrea y demencia.

Los síntomas cutáneos consisten en dermatitis en zonas expuestas a la luz, los digestivos en diarreas y vómitos, que pueden dar lugar a deshidratación, y los síntomas nerviosos consisten en irritabilidad, insomnio, confusión y delirios.

Toxicidad

A dosis elevadas de 5 g/día, resulta hepatotóxica, produciendo elevación de transaminasas y de bilirrubina.

4. Vitamina B₆ (piridoxina)

Introducción

La vitamina B₆ fue descubierta en el año 1934 por Gyorgy, al observar que su deficiencia producía dermatitis en las ratas. Con posterioridad, la identificaron como tal vitamina Snell y Gun-salus.

La vitamina comprende tres factores, piridoxina, piridoxal y piridoxamina, que pueden transformarse en fosfato de piridoxal, que es la forma activa.

Su interés se debe a que se conocen ciertas enfermedades piridoxindependientes que se

curan mediante dosis adecuadas de esta vitamina.

Estructura y propiedades

Desde el punto de vista químico su estructura está formada por un anillo pirimidínico sustituido. Los compuestos difieren en cuanto a la naturaleza del sustitutivo en el átomo de carbono en la posición cuatro del núcleo piridina: un alcohol primario (piridoxina), el aldehído correspondiente (piridoxal), y un grupo aminoetil (piridoxamina). Los mamíferos pueden utilizar con facilidad cada uno de esos compuestos después de convertirlos en el hígado en piridoxal 5'-fosfato, la forma activa de la vitamina.

Se producen pérdidas por solubilidad en agua durante el cocinado que pueden ser, en el caso de frutas y verduras, entre 15-70%, en carnes entre el 50 y 70% y en cereales durante la molienda y el refinado del 50 al 90%. Es estable a los oxidantes, pero muy sensible a la luz. El precocinado y la congelación disminuyen su contenido.

Función

Está implicada en el metabolismo de los aminoácidos, que forman con el fosfato de piridoxal en primer lugar una base de Schiff, y según tenga lugar su ruptura, se pueden formar distintos compuestos:

- Una amina, por descarboxilación del aminoácido, y fosfato de piridoxal.
- Un α -cetoácido, por desaminación del aminoácido y fosfato de piridoxamina. Esta reacción constituye la primera etapa de la reacción de transaminación.

En el metabolismo catalizan reacciones de descarboxilación actuando como coenzimas de descarboxilasas, tal es el caso de la Figura 29.1.

También actúan como coenzimas de transaminasas; en este caso todos los aminoácidos aromáticos, con excepción de lisina, pueden transaminarse de modo reversible utilizando el PLP como cofactor.

Otras reacciones enzimáticas en las que intervienen son en la síntesis de cisteína a partir de metionina, y el catabolismo oxidativo del triptófano, interviniendo en la síntesis de NAD.

Absorción y metabolismo

Generalmente la piridoxina se suele encontrar en alimentos vegetales, libre o como glucósido, y el fosfato de piridoxal y de piridoxamina en alimentos animales. Una vez ingeridos dichos alimentos, precisan de la acción enzimática de fosfatasa no específicas del tracto gastrointestinal para su liberación.

Las tres formas se absorben en el intestino, concretamente en el yeyuno, mediante transporte activo seguido de fosforilación. Existen dos *pool* de PLP, uno en sangre unido a la albúmina y otro en eritrocitos por fijación a la hemoglobina mediante base de Schiff. Los tejidos más implicados en su metabolismo son el hígado, la sangre y el riñón. Se elimina por orina como ácido 4-piridóxico, metabolito del piridoxal.

Fuentes

Entre las principales fuentes de esta vitamina podemos citar hígado, carne, pescado, nueces, plátanos, aguacates, huevos.

a) Histidina	<u>Histidina descarboxilasa</u> →	Histamina
b) Ornitina	<u>Ornitina descarboxilasa</u> →	Putrescina
c) Ácido glutámico	<u>A. G. descarboxilasa</u> →	A. γ -amino butírico (GABA)

Figura 29.1.

Las necesidades dependen de la ingesta proteica. El requerimiento mínimo promedio de piridoxina en adultos es de alrededor de 1,5 mg/día en sujetos que ingieren 100 g de proteína al día. Para proporcionar un margen de seguridad razonable y permitir consumos diarios mayores de 100 g de proteína, la RDA para piridoxina en adultos se ha establecido en 2 mg/día para varones, y 1,6 mg/día para mujeres.

Los síntomas de deficiencia, se pueden dividir en:

a) *Efectos en la piel*: en el transcurso de algunas semanas de alimentación con una dieta con bajo contenido de complejo B es posible que se produzcan lesiones cutáneas parecidas a la seborrea alrededor de ojos, nariz y boca, acompañadas de glositis y estomatitis, que desaparecen con rapidez con la administración de piridoxina.

b) *Efectos en el sistema nervioso*: pueden sobrevenir crisis convulsivas con una dieta deficiente de piridoxina, y es posible evitarlas mediante la ingestión de vitamina; estas crisis convulsivas pueden depender de una concentración disminuida de ácido γ -aminobutírico, ya que la glutamato descarboxilasa, enzima que requiere PLP, sintetiza este neurotransmisor. Además, la deficiencia de piridoxina genera cifras disminuidas de otros neurotransmisores como noradrenalina y 5-hidroxitriptamina.

Puede producir interacciones con algunos fármacos como con la hidracida del ácido isonicotínico (isoniazida), así como otros compuestos carbonilos, ya que se combinan con el piridoxal o el fosfato de piridoxal para formar hidrazonas. De este modo, la isoniazida parece ejercer su efecto contra la vitamina B₆ al inhibir la formación de la coenzima a partir de la vitamina. El uso prolongado de penicilamina, agente quelante del cobre, utilizada en la enfermedad de Wilson, puede causar deficiencia de vitamina B₆. Los compuestos cicloserina e hidralazina también son antagonistas de la vitamina, y la administración de vitamina B₆ reduce las acciones adversas neurológicas vinculadas con el suministro de

esos compuestos. La vitamina B₆ aumenta la descarboxilación periférica de levodopa, y reduce su eficacia para tratar la enfermedad de Parkinson.

Toxicidad

La piridoxina tiene toxicidad aguda baja y no desencadena efectos farmacodinámicos notorios después de suministro por vía oral o intravenosa. Aun así, es posible que sobrevenga nefrotoxicidad después de consumo prolongado de 200 mg de piridoxina al día, y se han notado síntomas de dependencia en adultos.

El síndrome del restaurante chino, descubierto por Kwok en 1968, se debe a la ingestión de 1,5 g de L-glutamato monosódico, que se elimina por transaminación, y necesita de esta vitamina.

5. Vitamina C

Introducción

El escorbuto, consecuencia de la deficiencia de vitamina C, se describió ya durante las cruzadas, pero la relación entre el escorbuto y el consumo de cítricos (ricos en vitamina C) se descubrió en el siglo XX. En los largos viajes en barco que se realizaban a comienzos del siglo, los marineros ingleses, llamados «limoneros», sabían que debían consumir limones a diario para no padecer de escorbuto. Zilva en 1923 aisló una sustancia del jugo de limón, que prevenía el escorbuto. Más tarde, en 1928, Szentz-Gyorgyi aisló la vitamina C del tejido suprarrenal, de las naranjas y la col, y la denominó ácido hexurónico.

Estructura y propiedades

Su estructura química recuerda a la de la glucosa (en muchos mamíferos y plantas, esta vitamina se sintetiza a partir de la glucosa y galactosa). El ácido dehidroascórbico posee también actividad biológica, debido a que en el cuerpo se reduce para formar ácido ascórbico. La vitamina C corresponde al grupo de las vitaminas hidrosolubles, y como la gran mayoría de ellas no se almacena en el cuerpo por un largo periodo de

tiempo y se elimina en pequeñas cantidades a través de la orina. Por este motivo, es importante su administración diaria, ya que es más fácil que se agoten sus reservas que las de otras vitaminas.

Es una sustancia de color blanco, estable en su forma seca, pero en disolución se oxida con facilidad, más aún si se expone al calor. Un pH alcalino (mayor a 7), el cobre y el hierro, también aceleran su oxidación.

Funciones

Sus funciones son diversas, pero todavía no se sabe si actúa como coenzima o como cofactor. Al tener gran capacidad de captar y liberar hidrógeno (óxido-reducción), su papel en el metabolismo es de gran importancia. Es importante su función como reductora del Fe^{+3} a Fe^{+2} , lo que asegura una mayor absorción en el intestino. Facilita a la vez la liberación del hierro de la transferrina (proteína que transporta el hierro en sangre) y también de la ferritina (una de las principales formas de almacenamiento del hierro).

Es importante su participación en la formación del colágeno y mucopolisacáridos, ya que es necesaria, junto con el O_2 y el Fe^{+2} , para formar hidroxiprolina e hidroxilisina (componentes del colágeno). El colágeno es una sustancia de la cual depende la integridad de todos los tejidos fibrosos, como son la piel, el tejido conjuntivo, la dentina, matriz ósea, cartílago y los tendones; en la formación de esta proteína radica su importancia como cicatrizante de heridas y fracturas.

Participa también en la formación de ciertos neurotransmisores como la serotonina, en la conversión de dopamina a noradrenalina, y en otras reacciones de hidroxilación que incluyen a los aminoácidos aromáticos y a los corticoides. Su concentración disminuye bajo situaciones de estrés cuando hay mucha actividad de las hormonas de la corteza suprarrenal.

La vitamina C cumple una función importante en el sistema inmunitario, en la lucha contra las infecciones y contra las células cancerosas. Esto es gracias a la actividad de los leucocitos, la estimulación de anticuerpos, neutrófilos y fagocitos, la producción de interferón,

el proceso de la reacción inflamatoria o la integridad de las mucosas.

Comúnmente se le atribuyen a la vitamina C poderes curativos, sobre el resfriado, y hasta enfermedades como el cáncer, pero aunque se ha demostrado que reduce los síntomas y la duración del resfriado, se aconseja no consumir megadosis de la vitamina por largos periodos de tiempo.

Absorción y metabolismo

Se absorbe fácilmente en el intestino delgado, concretamente en el duodeno. Pasa a la sangre por transporte activo y tal vez también por difusión. Parece ser que el mecanismo de absorción es saturable, debido a que cuando se ingieren cantidades muy grandes de la vitamina, el porcentaje que se absorbe es menor. En ingestas normales (20-120 mg) se absorbe un 90%.

La concentración de vitamina C en los leucocitos está en relación con la concentración de la vitamina en los tejidos, por lo que midiendo la concentración de la vitamina C en los leucocitos, sabemos el nivel real de la vitamina en aquellos. El *pool* de vitamina C que el ser humano posee en condiciones normales es de unos 1.500 g. Cuando este *pool* está lleno, la vitamina C se elimina en un alto porcentaje por orina, bajo la forma de ácido oxálico (catabolito) o si se ingiere en dosis muy elevadas, como ácido ascórbico.

Si hay deficiencias, la absorción es muy alta y no hay eliminación por orina. El ácido ascórbico se encuentra en altas concentraciones en varios tejidos, como por ejemplo, el tejido suprarrenal, hígado, bazo y riñones.

El consumo de alcohol disminuye la absorción de la vitamina, y el hábito de fumar disminuye los niveles de la vitamina en el organismo, por lo que se recomienda a los fumadores y consumidores regulares de alcohol, que suplementen su dieta.

La vida media del ácido ascórbico en el organismo es de aproximadamente 16 días. Por este motivo, los síntomas del escorbuto tardan meses en aparecer en sujetos con una dieta deficiente en vitamina C, como el retraso en la cicatrización de heridas, petequias, aflojamiento de dien-

tes, pérdida del cabello, piel seca pruriginosa y alteraciones neuróticas.

Fuentes

Es muy abundante en frutas: manzana, kiwi, mango, papaya, melón, sandía, frutas cítricas (naranja, limón), así como en vegetales: espárragos, coles de bruselas, coliflor, pimientos, brócoli, patata, batata. Al ser una vitamina que se destruye por oxidación fácilmente, y más aún en presencia de álcalis y calor, es muy fácil que disminuya el contenido de la misma en los alimentos. Si se cocinan en un medio acuoso, la pérdida de la vitamina es mayor, ya que es hidrosoluble.

La deficiencia por una dieta muy baja o carente en vitamina C produce el escorbuto. La mayoría de los síntomas derivan de la inadecuada formación y mantenimiento de los materiales intercelulares, y son: hemorragias subcutáneas, gingivales, y en otras áreas, así como debilidad muscular.

En el ser humano, en los primates y cobayas, entre otros, la vitamina C o ácido ascórbico no puede ser sintetizada, por lo cual debemos ingerirla a diario. Esto es debido a la ausencia de la enzima L-gulonolactona oxidasa que participa en la vía del ácido urónico.

El requerimiento mínimo de vitamina C necesario para que desaparezcan los síntomas del escorbuto es de 10 mg, mientras que la recomendación alcanza a los 75 mg y es la adecuada para mantener en forma óptima el *pool* corporal

Toxicidad

No presenta toxicidad, debido a que el exceso se elimina por orina. La vitamina C no produce toxicidad ni cuadro clínico de hipervitaminosis, esto es debido a que el organismo responde a una ingestión máxima aumentando la excreción renal. Se han observado algunos efectos adversos que dependen de la dosis; así pueden aparecer diarreas, hinchazón abdominal, también parece que incrementa los niveles séricos y urinarios de ácido úrico, la producción de ácido

oxálico, esto último podría producir litiasis renal por precipitación de cristales de oxalato.

Se ha visto que cuando se consumen cantidades masivas de vitamina C y se deja el consumo de golpe, se produce «escorbuto de rebote». Por ello deben ir descendiendo la dosis del suplemento, y no suspenderla totalmente.

Bibliografía

- Azanza JR (1999). *Guía práctica de farmacología del sistema nervioso central* 2.^a edición. Ediciones Madrid.
- Botterweck AA, van den Brandt PA, Goldbohm RA (2000). Vitamins, carotenoids, dietary fiber, and the risk of gastric carcinoma: results from a prospective study after 6.3 years of follow-up. *Cancer* 88:737-748.
- Bradford HF (1998). *Fundamentos de neuroquímica*. Editorial Labor, S. A. Barcelona.
- Chandra RK (2001). Effect of vitamin and trace-element supplementation on cognitive function in elderly subjects. *Nutrition* 17: 709-712.
- Devlin TM (1988). *Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones clínicas* (Tomos I y II) (2.^a edición). Editorial Reverté, S. A. Barcelona.
- Durante KM, Whitmore B, Jones CA, Campbell NR (2001). Use of vitamins, minerals and herbs: a survey of patients attending family practice clinics. *Clin Invest Med* 24: 242-249.
- Escotado A (1998). *Historia general de las drogas*. Editorial Espasa Calpe. Madrid.
- Goodman y Gilman (Eds.) (1996). *Las bases farmacológicas de la conducta*. (9.^a edición) (Vols. I y II). McGraw-Hill-Interamericana. Méjico.
- Herrera E (1991). *Bioquímica. Aspectos estructurales y vías metabólicas*. (Vols. I y II) (2.^a edición). Interamericana-McGraw-Hill. Madrid.
- Munnich A, Ogier H, Saudubray JM (1987). *Les vitamines*. Masson. Paris.
- Sandler RS, Halabi S, Kaplan EB, Baron JA, Paskett E, Petrelli NJ (2001). Use of vitamins, minerals, and nutritional supplements by participants in a chemoprevention trial. *Cancer* 91: 1040-1045.
- Willett WC, Stampfer MJ (2001). What vitamins should I be taking, doctor? *N Engl J Med* 20: 1819-1824.

M.^a Fátima Olea-Serrano, Nicolás Olea-Serrano

Introducción. Una forma especial de toxicidad crónica: estrogenicidad. El síndrome dietilestilbestrol (des). Fitoestrógenos. Agentes bociógenos y alimentación. Derivados organoclorados. Productos sintéticos de materiales plásticos. Materiales en contacto con alimentos. Bibliografía.

Introducción

Ciertos compuestos químicos de diferente estructura química y muy diverso origen pueden alterar la homeostasis hormonal de los seres vivos. En los últimos años se ha extendido el término de disruptores hormonales para definir al conjunto heterogéneo de compuestos químicos con actividad hormonal (COM, 1999).

Hay dos clases de sustancias que pueden causar disrupción endocrina:

1. Hormonas naturales, entre las que se incluyen estrógenos, progestágenos y testosterona, eliminados de forma natural en orina por el ser humano y animales, y los fitoestrógenos, sustancias contenidas en algunas plantas tales como brotes de alfalfa y semilla de soja, sustancias que actúan mimetizando a las hormonas naturales cuando se ingieren.

2. Sustancias sintetizadas por el hombre, entre las que se incluyen:

- a) Hormonas producidas por síntesis con interés farmacológico, tales como contraceptivos orales y algunas moléculas utilizadas en alimentación animal diseñadas para interferir o modular intencionadamente el sistema endocrino.
- b) Sustancias químicas sintetizadas por el hombre, diseñadas para usos industriales muy diversos como agentes de limpieza, en agricultura como pesticidas, en productos de uso diario, como plásticos, ya sean los monómeros constituyentes, o como aditivos para mejorar la calidad de los mismos. También se incluyen subproductos industriales tales como dioxinas, de las que se sospecha que interfieren los sistemas endocrinos de los seres humanos y de los animales en vida salvaje (COM, 1999).

Si bien en especies animales la asociación exposición-contaminación con xenobióticos hormonales y trastornos en el comportamiento, alteraciones en el desarrollo y riesgo de enfer-

medad es un hecho probado, en el hombre tal relación necesita aún ser demostrada. El incremento de ciertas patologías de nuestro tiempo, como el aumento del cáncer de dependencia hormonal —mama, próstata, testículo, ovario, etc.— el alza en la incidencia de los nuevos casos de esterilidad ligada a endometriosis en la mujer y a la azoospermia/oligospermia en el hombre, entre otras, podría estar relacionada con la exposición inadvertida a los xenobióticos hormonales. Se hace necesario, por tanto, identificar estos compuestos químicos con objeto de eliminar su presencia en el medioambiente y estudiar la extensión y profundidad de la impregnación de las poblaciones humanas y animales. Con el desarrollo de técnicas analíticas preparativas junto a tests biológicos que sirvan como marcadores de exposición, se podrá cuantificar la *carga hormonal* de muestras tomadas a individuos potencialmente expuestos a la acción de los contaminantes con actividad hormonal. Identificados los individuos en riesgo y analizada la probabilidad de enfermar será posible asociar la contaminación medio ambiental por xenobióticos estrogénicos con la mayor frecuencia en el padecimiento de los desórdenes hormonales (Olea *et al.*, 1994, 1996).

Una forma especial de toxicidad crónica: estrogenicidad

Las reuniones de expertos que tuvieron lugar en Wingspread, Racine y Wisconsin en 1991 y 1996, permitieron la redacción de dos manifiestos en los que se declara la preocupación sobre los efectos nocivos que a largo plazo tiene la exposición crónica a bajos niveles de productos químicos empleados en la agricultura y en el procesamiento de alimentos. Existe evidencia experimental de que muchos de estos compuestos pueden alterar el desarrollo del sistema endocrino y afectar a los órganos que responden a este tipo de señales (Colborn *et al.*, 1993).

Las observaciones experimentales, los estudios en distintas especies animales y los datos de laboratorio permitieron enunciar al Comité de Expertos reunidos en 1991 bajo la dirección de Theo Colborn en Wingspread (EE UU), una serie de premisas sobre las que orientar la investigación en el campo de la contaminación medio ambiental con sustancias químicas y sus efectos sobre la vida (Colborn *et al.*, 1992). Los puntos principales en los que se recogen tales orientaciones se pueden resumir de la siguiente manera: 1) estas sustancias químicas tienen diferente efecto en las etapas embrionaria, fetal, perinatal y adulta, 2) los efectos son más patentes en la descendencia que en los individuos expuestos, 3) el momento de exposición en el individuo en desarrollo es crucial para la derivación de un efecto, y 4) aunque la exposición se vea reducida a la etapa embrionaria la manifestación clara del efecto puede dilatarse hasta la etapa adulta.

La identificación de compuestos químicos con esta actividad hormonal se ve dificultada por varios motivos, de una parte la complejidad de los tests predictivos, de otra, la imposibilidad de atribuir a un compuesto una capacidad estrogénica tomando como base la simple observación de su estructura molecular. Por esta razón, la identificación de los xenobióticos de carácter estrogénico se tiene que hacer mediante la realización de tests capaces de poner de manifiesto de forma sencilla la actividad estrogénica de un compuesto químico. No obstante, llama la atención que, a pesar del gran interés terapéutico de los nuevos elementos y de la gravedad del problema, son muy pocos los bioensayos que se reconocen en la actualidad como instrumentos útiles para la identificación de sustancias químicas con potencial actividad estrogénica.

La exposición a compuestos con actividad hormonal contaminantes medio ambientales se ha asociado con muy diversas patologías observadas en distintas especies animales. Se describen: 1) alteraciones de la función tiroidea en aves y peces; 2) disminución de la fertilidad en aves, peces, moluscos y mamíferos; 3) disminución de la eficacia en el proceso de incubación en peces, aves y tortugas; 4) desmasculización y

feminización de peces machos, aves y mamíferos; 5) desfeminización y masculización de peces hembras, gasterópodos y aves; 6) alteraciones del sistema inmunitario en aves y mamíferos.

Se advierte que se trata de una teratología funcional más que de una teratología orgánica, indicándose la inutilidad de los tests actuales de predicción del riesgo para la salud para sustancias químicas que van dirigidos a detectar tan solo los efectos teratogénicos orgánicos o los carcinogénicos.

Algunos resultados de la actividad biológica de xenobióticos favorecen la necesidad de otras explicaciones, dando lugar a lo que se podría considerar una nueva línea en toxicología, usando metodologías ya disponibles.

Un gran número de señales inter e intracelulares de diferenciación celular, proliferación y función se ocasiona por la interacción de pequeñas moléculas con sus receptores. Receptores que reconocen hormonas esteroideas, tiroideas, retinoides y algunas vitaminas. Estas sustancias son factores de transcripción nuclear que implican regulación de un gen. Esta clase de genes también reconocen sustancias químicas extrañas. Así, algunos xenobióticos pueden en parte ejercer su efecto a través de una interacción con receptores nucleares y la activación de los genes que los regulan.

En el caso de las sustancias químicas que interactúan con el receptor de estrógenos su actividad está regida más por su función (estrogenicidad) que por su estructura química. Así, entender la acción del producto químico mediada por el receptor puede ayudar a definir una función de potencial importancia toxicológica. Se ha sugerido una estrategia de investigación referida a la toxicología funcional en la cual los productos químicos son definidos más por su función que por su estructura química. Como parte de esta estrategia, líneas celulares, incluyendo células humanas, pueden ser transfectadas con secuencias de ADN artificial conteniendo un sitio aceptor para el complejo receptor-hormona y un gen «reporter» para el receptor. Esto es sencillo y relativamente rápido y un camino directo no solo para la unión de

los ligandos químicos al receptor sino para la respuesta al elemento y la activación del gen.

Los análisis de funcionalidad se podrían realizar disponiendo de paneles que incluyan receptores de estrógenos, progesterona, andrógenos, glucocorticoides, retinoides, hormonas tiroideas, dioxinas, etc. Una vez aplicados se podría determinar si un producto químico presenta una función biológica cuantificable. El hecho es que para una sustancia química quedaría definida por su peso molecular, punto de fusión, solubilidad, etc., y la descripción funcional en cuanto a mimetizador hormonal. Esta información puede tener importancia en la salud pública. A pesar de toda esta estrategia no es una vía que proporcione información completa de un producto químico o que reemplace los ensayos en animales o estudios epidemiológicos. Se trata de proporcionar una información importante para una serie de problemas toxicológicos en un tiempo relativamente corto y un coste relativamente bajo. Por ejemplo, con esta estrategia se pueden determinar qué productos químicos del medioambiente actúan como DES y cuál puede ser su potencia relativa a partir de un ensayo *in vitro* de activación de genes. Con posterioridad se podrá desarrollar un plan para realizar el estudio toxicológico apropiado utilizando animales de experimentación y estudios epidemiológicos en humanos (McLachlan, 1991).

El síndrome dietilestilbestrol (DES)

Un modelo para la exposición medioambiental a compuestos químicos con actividad estrogénica es el proporcionado por el tratamiento de hembras preñadas con dietilestilbestrol (DES) un estrógeno sintético utilizado en medicina entre 1948 y 1971 para prevenir los abortos espontáneos. Así pues, los sujetos expuestos a DES sirven de modelo de estudio de los efectos de la exposición embrionaria y fetal a compuestos químicos con actividad estrogénica agonista. El modelo

primario para determinar la actividad estrogénica es la estimulación de la actividad mitótica de los tejidos del tracto genital femenino en el desarrollo ontogénico temprano, en la pubertad o en el individuo adulto, si bien el efecto de los estrógenos es patente también sobre otros tejidos masculinos y femeninos. Hijas de madres que tomaron DES (más de un millón durante el periodo 1960-70) sufren alteraciones funcionales en los órganos reproductivos, embarazos anormales, reducción de la fertilidad, desórdenes en el sistema reproductivo y periodos de depresión (Colborn *et al.*, 1993).

Cuando se convierten en adultos jóvenes presentan una mayor incidencia de cáncer de vagina de células claras; se trata de un cáncer que se encuentra generalmente en mujeres de más de 50 años y que es raro en mujeres de veinte años.

Un asunto aún más preocupante es que cuando estas mujeres, que se expusieron en la época embrionaria, alcancen la edad en que los tumores del tracto reproductivo se incrementan normalmente, mostrarán probablemente una mayor incidencia de cáncer que los sujetos no expuestos. Se manifiestan igualmente alteraciones significativas del sistema inmunitario, particularmente del sistema de células T, así como un incremento de enfermedades autoinmunes en las mujeres. Estas alteraciones a menudo no son detectadas al nacimiento ni antes de alcanzar la madurez.

Las anomalías en órganos reproductores son significativamente más frecuentes en sujetos masculinos expuestos a DES que en los controles. La exposición a DES durante el embarazo incrementa el riesgo de alteraciones como criptorquidismo, anomalías uretrales, hipoplasia testicular y la calidad seminal de los hijos expuestos a DES es inferior a la de los controles, la incidencia de cáncer testicular es el doble que en la población general (Toppari *et al.*, 1996). Hay gran cantidad de literatura que documenta los efectos nocivos de la exposición a DES durante el periodo de diferenciación orgánica en estudios experimentales en roedores. Los estudios animales corroboran los hallazgos en humanos (Colborn *et al.*, 1993).

1. Un efecto a largo plazo: criptorquidismo

La caída en la cuenta de espermatoцитos se quiere asociar a la exposición intrauterina del embrión macho a compuestos estrogénicos, tomando como ejemplo los devastadores efectos sobre los embriones de ambos sexos de la exposición intrauterina al DES (Sharpe *et al.*, 1993; Editorial, *Lancet*, 1995).

La exposición a estos compuestos químicos durante el desarrollo embrionario que resulta en alteraciones funcionales y orgánicas en el individuo adulto, además de añadir preocupación al problema por el distanciamiento causa-efecto, ha servido para hacer hincapié en la sutileza de la teratología funcional de primera o segunda generación. No se trata del descubrimiento de una malformación orgánica en un recién nacido. Es algo más sutil. Es el fracaso en una función en el individuo que finaliza su desarrollo y empieza a ser adulto. Es el pago de la factura dilatado en el tiempo.

Los datos epidemiológicos parecen demostrar que en el hombre los desórdenes de carácter reproductivo se han incrementado durante los últimos cuarenta años. Una caída significativa, próxima al 50%, del conteo espermático en el hombre, se ha descrito para el periodo 1940 y 1990 (Carlsen *et al.*, 1992 y 1995). Se trata de un estudio de revisión que incluye 14.947 individuos, de los cuales se tienen datos sobre calidad y número de espermatoцитos y que sirvió para hacer una llamada de atención sobre el significado biológico de tales cambios en vista de la incidencia creciente de trastornos tales como el cáncer de testículo, el criptorquidismo o el hipo y epispadias. Por otra parte, resulta interesante considerar que durante ese mismo periodo se ha incrementado la exposición humana a compuestos químicos muy diversos con actividad desconocida sobre los sistemas hormonales.

El criptorquidismo o no descenso testicular es la alteración en órganos reproductivos más frecuente en el hombre. En el nacimiento la prevalencia es de un 3-5% y del 1% a los tres meses.

Se asocia con cáncer de testículo y con infertilidad. Tres causas diferentes pueden encontrarse en la base etiológica de este proceso: causa hormonal, genética y traumática. Entre las razones de orden hormonal se encuentra la administración materna de fármacos conteniendo estrógenos, como pueda ser el tratamiento con anticonceptivos o con el estrógenos sintético DES, al que previamente se ha hecho referencia.

En el Hospital Clínico de Granada se estudió la distribución de la frecuencia de orquidopexia como indicativo de la incidencia de criptorquidismo en jóvenes menores de 16 años en la provincia de Granada. El objetivo de tal trabajo era el investigar si existía un patrón de distribución geográfico de los casos que pudiera hacer pensar en hábitos comunes o formas de vida similares que favorecieran la presentación de la enfermedad. Para ello se estudiaron todos los casos de orquidopexia entre los años 1980 y 1993. Los resultados experimentales demostraron que efectivamente existía una mayor incidencia en determinados municipios, fundamentalmente los costeros —Motril y Salobreña— y la capital. Lo realmente interesante del trabajo es que fue posible asociar la mayor incidencia de esta patología testicular con la actividad agrícola del área geográfica. De esta forma el estudio reveló que la mayor parte de los casos provenían de municipios dedicados a la actividad en agricultura intensiva, en los cuales el consumo de pesticidas y productos químicos agrícolas es mayor. Las tierras del interior presentaban, por otra parte, la menor incidencia de orquidopexia. En estos municipios la actividad agrícola predominante es el cereal y el olivar, y el consumo de fitosanitarios y agroquímicos es sensiblemente inferior (Olea *et al.*, 1996).

Fitoestrógenos

Los estrógenos no esteroideos en las plantas se identificaron por primera vez en los años 30 con el descubrimiento de compuestos que mimetizan o interaccionan con los estrógenos una vez

ingeridos por los animales. Plantas como la soja, el dátil, el sauce y las granadas contienen compuestos con estructura similar a los estrógenos. Sin embargo, el efecto sobre animales no se descubrió hasta que se planteó el problema en las ovejas australianas, que al consumir pasto rico en *trifolium subterraneum* presentaban lesiones en el tracto reproductivo y una disminución de la fertilidad. Se identificaron, en el trébol, tanto equol como cumestrol, que eran los responsables de estos efectos. El equol y otros fitoestrógenos como la enterolactona y enterodiol se han identificado en fluidos biológicos humanos a concentraciones hasta 5.000 veces superiores a las hormonas estrogénicas (Olea *et al.*, 1999).

Hoy día se conocen al menos 20 compuestos diferentes en unas 300 plantas procedentes de unas 16 familias botánicas. Los fitoestrógenos son estrógenos débiles que se encuentran por ejemplo en plantas utilizadas como: 1) condimentos, es el caso del ajo o el perejil; 2) granos como soja, trigo, arroz; 3) hortalizas como zanahorias y patatas; 4) frutas como dátiles, manzanas, cerezas; y 5) bebidas como té o café.

La estructura química los fitoestrógenos es muy diversa: triterpenos, estilbenos, fenantrenos, ácidos amargos, isoflavonas, lignanos, cumestanos, ácido resorcílico, lactonas y esteroides. Aunque sean estructuralmente diferentes a los estrógenos endógenos, tienen en común con ellos dos grupos fenólicos que recuerdan en cierta manera la forma molecular del estradiol. La exposición humana a fitoestrógenos es habitual y ocurre, fundamentalmente, a través de los alimentos. Los dos grupos más estudiados son los lignanos y las isoflavonas. Los primeros aparecen por acción de los microorganismos en componentes de granos vegetales, fibra, frutas, hortalizas, semillas de linaza, etc. Mientras que las isoflavonas proceden fundamentalmente de las semillas de soja y de otras leguminosas.

Se han encontrado en la orina y sangre humana fitoestrógenos, lo que demuestra su fácil absorción intestinal. De hecho, los fitoestróge-

nos pueden seguir varias vías metabólicas en el organismo: 1) ser eliminados en heces, 2) absorbidos por el organismo, y 3) transformados en otros compuestos de mayor o igual efecto etrogénico. No obstante, los fitoestrógenos difieren de otros xenoestrógenos en que pueden ser metabolizados y no se almacenan por largo tiempo en el organismo (Colborn *et al.*, 1996).

Hay diferentes opiniones sobre el papel de los fitoestrógenos sobre la salud humana. Cuando se consumen fitoestrógenos como parte de la dieta ordinaria posiblemente sean beneficiosos. De hecho, existen estudios epidemiológicos sobre la incidencia de cánceres estrógeno-dependientes que sugieren que los fitoestrógenos pueden ser protectores en humanos.

De otra parte, el consumo de elevadas cantidades de algunos fitoestrógenos puede suponer un riesgo para la salud. Problemas sobre reproducción se han puesto de manifiesto en estudios experimentales con animales, ya sea en laboratorios, granjas o animales salvajes. Incluso los humanos no deberían realizar una dieta excesivamente rica en alimentos con estos derivados, caso de vegetarianos que consumen soja cruda, bebidas y píldoras ricas en fitoestrógenos, a modo de terapia natural, puesto que puede suponer un riesgo importante para la salud, ya que algunos de estos compuestos naturales pueden ser beneficiosos o perjudiciales, dependiendo de la situación del organismo que los consume. (Barrett, 1996).

1. Posibles efectos beneficiosos

Los fitoestrógenos se han investigado como posibles agentes preventivos de cáncer y el en tratamiento de menopausia y osteoporosis. Trabajos con animales de experimentación así como estudios comparativos de poblaciones asiáticas y occidentales con diferencias marcadas en consumo de estos productos encuentran que el elevado consumo de soja se asocia con una baja incidencia de cánceres hormonodependientes (cáncer de mama y endometrio) y con una menor frecuencia de síntomas menopáusi-

cos y osteoporosis. Apoya el carácter alimentario de esta observación el hecho de que los inmigrantes asiáticos, cuando occidentalizan su dieta incrementan el riesgo de estas enfermedades, posiblemente debido al consumo de más proteína y grasa y menos fibra y soja.

Se ha sugerido que una exposición a fitoestrógenos menos prolongada también puede tener cierto carácter protector frente a cánceres como el de mama, colon, próstata, hígado y leucemia. Estos efectos se pueden deber a otras propiedades, por ejemplo la asociación con la porción de fibra, de las semillas y de los granos, como la fibra, incrementa el bolo fecal y decrece los niveles de beta-glucuronidasa, se reduce la circulación de estrógenos conjugados en el hígado y en el intestino. Por una reducción indirecta de la cantidad de hormona disponible, la fibra puede reducir el riesgo de cáncer. De otra parte Adlercreutz y su grupo de investigación presenta la evidencia de que la excreción de lignanos e isoflavonoides está relacionada con el tipo de dieta. Los que siguen dietas macrobióticas y vegetarianas tiene una excreción significativamente más elevada de lignanos que los comedores de carne y sujetos con cáncer de mama (Adlercreutz, 1995; Adlercreutz *et al.*, 1997).

En estudios con animales a los que se administra una dieta a base de soja aparecen protegidos frente a diversos tipos de cáncer e incluso se inhibe el crecimiento del tumor. Tras inyección de genisteína (isoflavona de la soja) a ratas recién nacidas expuestas a agentes cancerígenos desarrollan menos tumores que los controles (Makela *et al.*, 1995).

Estos posibles efectos beneficiosos son algo más que una simple relación entre consumo de soja y salud. Los asiáticos vienen comiendo estos compuestos de soja por siglos y posiblemente presenten una adaptación que les induzca a utilizar los fitoestrógenos en su favor. Además, algunas de estas plantas, entre ellas la soja, contienen sustancias potencialmente anticancerígenas tales como inhibidores de proteasas y antioxidantes, que podrían ser los responsables de estos efectos saludables.

En resumen: la evaluación de los efectos beneficiosos de los fitoestrógenos es difícil y depende: 1) clase y dosis de fitoestrógeno consumido; 2) edad, género y estado de salud de la persona que lo consume.

2. Posibles riesgos para la salud

Los mayores riesgos asociados con el consumo de fitoestrógenos están relacionados con la infertilidad y problemas de desarrollo. Sin embargo parece que son necesarias elevadas cantidades de fitoestrógenos para manifestar este riesgo. Los seres humanos han usado estas plantas como medicina y con propósito contraceptivo desde siempre. Hipócrates, por ejemplo, describía la zanahoria silvestre para prevenir los embarazos. Hoy día se sabe que sus semillas contienen productos que bloquean la progesterona, hormona necesaria para establecer y mantener el embarazo.

Recientemente los investigadores han comprobado que la fertilidad de los animales que comen fitoestrógenos se puede ver afectada. Esto es especialmente cierto cuando los fitoestrógenos representan la mayor parte de la dieta, hecho no frecuente en el ser humano. Existen numerosos ejemplos a nivel mundial de estos hechos. Los fitoestrógenos contenidos en la hierba seca que consumen codornices y ciervos en California reducen el número de crías (Leopold *et al.*, 1976). Las ovejas australianas frecuentemente sufren problemas reproductivos al consumir pastos ricos en trébol (*trifolium subterraneum*) (Bennets *et al.*, 1946).

Numerosos investigadores han manifestado sus dudas sobre los efectos que pueden causar los fitoestrógenos sobre las etapas del desarrollo intrauterino del individuo, ya que las hormonas están especialmente controladas en este periodo. Estudios en animales empleando cantidades relativamente elevadas de estas sustancias durante periodos críticos del desarrollo sugieren efectos adversos. Crías de ratas expuestas a altas dosis de cumestrol (en semillas y aceite de girasol, brotes de alfalfa) a través de la leche de la madre, sufren problemas reproductivos perma-

nes. Las hembras cuando crecen no ovulan y los machos no montan a las hembras, y además presentan una baja calidad seminal. Ratas inmaduras y recién nacidas expuestas al cumestrol presentan ciclos de *estrus* prematuros. El cumestrol también interrumpe los ciclos ováricos en ratas adultas. Ratas recién nacidas expuestas a genisteína (de la soja), presentan alteraciones en la secreción hormonal y la aparición de la pubertad se retrasa cuando las ratas en estado fetal fueron expuestas a estos estrógenos (Whitten *et al.*, 1993; Guillette, 1995).

Los fitoestrogenos se comportan como hormonas y como tales alteran las funciones de los tejidos hormonodependientes en los animales que los consumen. Según lo cual, estas hormonas naturales de procedencia vegetal no serían desde este punto de vista convenientes para ningún animal o humano. Por tanto, los fitoestrógenos administrados en un momento equivocado pueden presentar efectos adversos para la salud.

3. Estudios experimentales con humanos

Muchos investigadores están fascinados por el potencial de los fitoestrógenos como instrumento preventivo de cáncer y la intervención no farmacológica para los síntomas menopáusicos y la osteoporosis. Las terapias sustitutivas de estrógenos en el tratamiento de los síntomas menopáusicos pueden ayudar a prevenir problemas de salud como cánceres de mama, endometrio y osteoporosis. La ingestión diaria, durante al menos un mes, de 60 g de proteína de soja (45 mg de isoflavonas) es suficiente para alterar el ciclo menstrual por un alargamiento de la fase folicular y un retraso en la menstruación.

Trabajos con mujeres menopáusicas han sido poco concluyentes, ya que los estudios epidemiológicos demuestran que tras el consumo diario de 165 mg de isoflavonas tan solo hay una pequeña maduración del epitelio vaginal. Ningún derivado de los lignanos o de la soja ha demostrado efectos positivos en la osteoporosis

en estudios epidemiológicos retrospectivos. A pesar de ello, en estudios *in vitro* la ipriflavona, un fitoestrogeno similar a la genisteína, estimula los osteoblastos en ensayos *in vitro*.

Agentes bociógenos y alimentación

Se han descrito sustancias inhibitoras para cada uno de los procesos por los que los yoduros inorgánicos son transformados en el tiroides hasta que se incorporan al fluido extracelular como yodo hormonal, formando parte de las hormonas tiroideas T3 y T4. Las sustancias que inhiben los pasos metabólicos de los yoduros se llaman agentes antitiroideos. Muchos inhiben también las reacciones de acoplamiento, tal como la reacción de yodotironina a partir de las yodotirosinas.

Estos agentes que pueden producir la inhibición de la función tiroidea *in vivo* a dosis que no ejercen efectos adversos en otros sistemas orgánicos, cuando se administran al hombre o animales son *bociógenos*. Su administración puede causar una disminución de los niveles circulantes de hormona, por ello una activación de la secreción de TSH, y por último el aumento de la glándula tiroidea o bocio.

En el momento actual se ha relacionado la ingesta de diversos alimentos y sustancias contaminantes de los mismos de forma habitual con el bocio endémico existente en algunas regiones del mundo. Desde el punto de vista de medidas prácticas de lucha y prevención, los bociógenos se dividen en dos grupos principales: 1) los que se pueden combatir con un suplemento de yodo; 2) los que persisten a pesar de esta medida.

De otra parte, es bien conocida la presencia en alimentos de factores bociógenos de origen natural, así como agentes contaminantes de los alimentos y medio ambiente, que están causando alteraciones en la función de la glándula tiroidea. En algunas zonas del mundo donde el

aporte de yodo en la dieta es la adecuada, la endemidad parece indicar que dichos factores tienen gran importancia

El bocio que se manifiesta en diferentes zonas del mundo de forma endémica tiene una etiología multifuncional, condicionada en parte por la ingesta de cantidades insuficientes de yodo, a pesar de esto el bocio supera todas las previsiones. En los factores diversos hay que incluir sustancias capaces de interferir la utilización del yodo de la dieta.

Los datos epidemiológicos ponen de manifiesto una correlación entre la frecuencia de la enfermedad y el consumo de diversos grupos de alimentos en cuya composición entran moléculas que de algún modo interfieren los mecanismos de síntesis de las hormonas tiroideas. Los alimentos que ejercen estas funciones son generalmente de origen vegetal, tal es el caso de la familia botánica de las crucíferas, y la familia de las liliáceas a la que pertenece el género *Allium*; algunas leguminosas como la soja o el cacahuete, y en general vegetales que en su composición contienen glucósidos cianogénicos.

Gaitán propone una larga lista de sustancias con efecto antitiroideo o bociogeno entre los que cabe destacar: 1) moléculas orgánicas azufradas (tiocianoglucosidos y disulfuros); 2) polifenoles (flavonoides, polihidroxifenoles); 3) piridinas; 4) ftalatos; 5) bifenilos policlorados y bifenilos polibromados; 6) pesticidas organoclorados (DDT, DDE, Dieldrin); 7) hidrocarburos aromáticos policíclicos, y por último 8) elementos inorgánicos como litio, exceso de yodo y algunas sales inorgánicas.

Existen numerosas pruebas y trabajos demostrando los efectos de estas sustancias en diferentes puntos del metabolismo tiroideo. Una revisión actualizada y completa es la presentada en un artículo titulado oportunamente Bociógenos medioambientales (Gaitán, 1999).

Estudios recientes sobre la interferencia de los PCB en el metabolismo tiroideo en niños han mostrado como estas moléculas halogenadas modifican los niveles de hormonas tiroideas con disminución de los valores de triyodotironina

libre y un aumento de TSH, lo cual puede incidir claramente en el desarrollo y crecimiento infantil (Weisglas-Kupperus, 1998; Osius *et al.*, 1999).

Derivados organoclorados

Desde mitad de los años cuarenta más de 600 productos químicos básicos se han creado para matar insectos, malas hierbas, roedores y otros muchos organismos «perjudiciales» en agricultura. Estos productos están en el mercado con varios cientos de nombres comerciales.

La utilización de estos productos parece haber alcanzado una espiral indefinida. Desde que apareció el DDT, un proceso *in crescendo* ha surgido con la búsqueda y utilización de productos cada vez más potentes, sencillamente porque en la evolución, los insectos se van adaptando a los nuevos productos haciéndose resistentes.

La actividad estrogénica de algunos pesticidas organoclorados es conocida desde hace años cuando se describió el efecto del DDT sobre el metabolismo de los esteroides (Kupfer, 1975) y se asoció posteriormente a la exposición a tales compuestos con patología de carácter endocrino en animales y en el hombre (Bustos *et al.* 1988; Fry *et al.*, 1987; Wolff *et al.*, 1993). Otros pesticidas organoclorados también se han relacionado con alteraciones patológicas en sistemas hormonales, por ejemplo, la exposición profesional a clordecona —kepona— se ha asociado con oligospermia y esterilidad en trabajadores expuestos al pesticida (Guzelian, 1982). En modelos animales se ha demostrado igualmente que la kepona produce un estado de «estrus permanente» en ratones hembras, supresión de la espermatogénesis en ardillas e hipertrofia de los oviductos en la ardilla hembra. La clordecona compite con el estradiol para unirse al receptor estrogénico y actúa en modelos animales como un verdadero agonista al provocar el crecimiento uterino en animales ovariectomizados ex-

puestos a tratamiento prolongado con el pesticida (Hammond *et al.*, 1979).

Se ha probado la estrogénicidad *in vitro* de algunos metabolitos del metoxicloro. Aunque el metoxicloro no presenta una alta afinidad por el receptor estrogénico, incubándolo con microsomas hepáticos de rata se observa un incremento en la inhibición de la unión estradiol-receptor uterino, y en otros casos una disminución en la translocación del receptor hacia el núcleo (Ousterhout *et al.*, 1981).

Respecto al endosulfán, recientemente se ha probado su efecto estrogénico en el ensayo de estrogénicidad *in vitro* (Soto *et al.*, 1994; Valenzuela, 1995; Rivas *et al.*, 2001). Informes anteriores (Gupta *et al.*, 1979) lo relacionaban con atrofia testicular y con disminución de gonadotrofinas y testosterona en plasma de ratas macho administradas con el pesticida, y por tanto son orientativos de su interferencia en la función endocrina. Dosis orales de 10 mg/kg/día, durante 15 días, fueron suficientes para provocar la degradación de los túbulos seminíferos y disminuir el peso de los testículos de las ratas macho. (Singh *et al.*, 1990) El endosulfán es eliminado por el organismo humano, aunque un 20% del producto es retenido en el tejido adiposo, debido a su carácter lipofílico. El endosulfán se elimina fácilmente en la leche y se ha demostrado su presencia en forma de sulfato en ratas tratadas con el pesticida de igual forma se han encontrado residuos de endosulfán y metabolitos en leche humana (Gorbach *et al.* 1968; Campoy *et al.*, 2001).

1. Estudios epidemiológicos

Tras más de treinta años de uso de los plaguicidas poco se sabe de los efectos adversos para la salud humana. Ya que los plaguicidas están diseñados para interaccionar con organismos vivos, son un riesgo potencial para el hombre, la vida animal y el medio ambiente. La Organización Mundial de la Salud estima en tres millones el número de casos anuales de intoxicación aguda que acaba en más de 100.000 casos anuales de muertes por envenenamiento (Vettorazzi, 1991).

Maroni y Fait publicaron en 1993 una revisión exhaustiva de la literatura científica entre los años 1975-1991 sobre los efectos a largo plazo de la exposición prolongada a los pesticidas. Llegando a las siguientes conclusiones: 1) tanto los síndromes mieloproliferativos como los sarcomas de partes blandas se han asociado con la exposición a pesticidas, si bien entre las causas que los provocan es difícil separar razones étnicas, diferencias en los patrones de exposición y niveles de contaminantes; 2) localizaciones tumorales asociadas con la exposición a pesticidas son: cerebro, pulmón, ovario y próstata; 3) en investigaciones posteriores se aconseja una especial atención a la toxicología reproductiva. Además, se recomienda actualmente prestar atención especialmente a desórdenes reproductivos junto a trastornos inmunológicos, neurológicos y de comportamiento (Baker y Wilkinson, 1990).

En 1991 López-Abente publicó un estudio sobre la mortalidad por cáncer en España entre los trabajadores agrícolas (López-Abente, 1991). Mediante un estudio de los índices de mortalidad estandarizada, encontró una relación entre ocupación y riesgo de padecer cáncer. Los tumores cerebrales se asociaron con la exposición a compuestos químicos frecuente en ciertas prácticas agrícolas, sobre todo en los trabajadores de hortalizas y frutales, el cáncer de estómago, próstata y testículo, junto con la leucemia linfática y los linfomas no-Hodgkin.

Algunos indicios permiten asociar de forma significativa la presencia de estas sustancias en los medios biológicos con la mayor presentación de ciertas enfermedades. Así, los trabajos de Wolff *et al.* (1993) describen una asociación significativa entre niveles de pesticidas organoclorados en sangre y cáncer de mama en el área de New York. Asociación sospechada años atrás cuando los trabajos ecológicos denunciaban que la exposición a ciertos pesticidas podía conducir a la presentación del cáncer mamario (Westin *et al.*, 1990). Los estudios disponibles hasta la llegada del trabajo de Wolff estaban limitados en sus conclusiones por la cortedad del grupo de casos y controles empleados, pero ya advertían

la presencia de determinados organoclorados en aquellos casos de cáncer mamario (Mussalo-Rauhamaa *et al.*, 1990). Sin embargo, estudios posteriores al de Wolff y colaboradores (Krieger *et al.*, 1994) son contradictorios y la asociación entre contaminación por DDT y PCB y cáncer de mama no ha podido ser demostrada. (Miller *et al.*, 1998).

Productos sintéticos de materiales plásticos. Materiales en contacto con alimentos

Se define materia plástica como un compuesto macromolecular orgánico obtenido por polimerización, policondensación, poliadición u otros procedimientos similares a partir de moléculas de pesos moleculares inferiores o por modificaciones químicas de macromoléculas naturales. Se consideran también materias plásticas las siliconas y otros compuestos macromoleculares lineales. (Directiva del Consejo CE 18 octubre, 1982).

Hasta la Primera Guerra Mundial los materiales poliméricos más utilizados eran las resinas termofenólicas, baquelita, películas de celulosa regenerada (Celofán), acetato de celulosa y clorhidrato de caucho. A partir de los años 50 aparecen nuevos materiales más versátiles y quizá de mayor calidad, cabe recordar: resinas termoendurecidas, como son: formol-formol, urea-formol, melamina-formol; derivados celulósicos; derivados polivinílicos y polivinilidénicos; derivados poliacrílicos, poliestirenos y copolímeros, poliolefinas y copolímeros, poliamidas, poliuretanos, resinas epoxi, poliésteres saturados e insaturados.

Entre los envases para alimentos conservados por el calor, el de hojalata es quizá el más generalizado. Los materiales básicos para la fabricación de estos envases convencionales son: hojalata, barnices, aleación soldante y goma o compuesto de cierre. En la mayoría de sus aplicaciones los envases se protegen con

barnices o materiales plásticos. Son compuestos macromoleculares constituidos por una resina base y productos auxiliares que le dan propiedades particulares. Se aplican en forma de disoluciones o dispersiones en disolventes orgánicos, que por evaporación del mismo o bien por reacción química se transforman en una película sólida adherida al soporte metálico.

Las resinas utilizadas son poco numerosas y pertenecen a las siguientes familias químicas: óleo-resinas; resinas fenólicas; resinas epoxifenólicas; resinas acrílicas; resinas vinílicas.

Por su comportamiento biológico cabe mencionar en este capítulo especialmente los policarbonatos y las epoxiresinas. Junto con los barnices, hay que incluir los envases de materiales poliméricos, y más recientemente los envases de papel-cartón reciclado, que se está utilizando en el envase de comida rápida y en papel de cocina reciclado (Vinggaard *et al.*, 2000). Este material de acuerdo con la materia prima utilizada presenta valores importantes en su composición de bisfenol-A, otros bisfenoles y ftalatos. Estas moléculas son susceptibles de migrar desde el material polimérico hasta el medio; en estos casos la actividad biológica estrogénica de los monómeros es fácilmente demostrable en ensayos *in vitro* e *in vivo*.

Finalmente, son especialmente interesantes sus aplicaciones en el campo de la biomedicina, las epoxiresinas y policarbonatos que se utilizan como cementos en cirugía ortopédica y para la fabricación de lentes intraoculares. En el campo de la Odontología presentan usos muy diversos, desde la fabricación de prótesis y aparatología ortodóncica, hasta su utilización directa sobre el tejido dentario, tanto con fines preventivos, como los denominados selladores dentales composites dentales (Olea *et al.*, 1999; Perez *et al.*, 1998; Pulgar *et al.*, 2000).

En 1936 Dodds demostró que derivados dihidroxi fenil metanos administrados a ratas ovariectomizadas ocasionaban incremento del peso uterino (Dodds y Lawson, 1936). En el año 1993 se volvió a probar el efecto hormonal estrogénico del bisfenol-A y se demostró que era liberado por los frascos de policarbonato que se utiliza-

ban para esterilizar el medio de cultivo de levaduras (Krishnan *et al.*, 1993). Los policarbonatos son una fuente de contaminación estrogénica para humanos y animales. Así, por ejemplo, se ha demostrado la migración y efecto estrogénico del bisfenol-A procedente de barnices de latas de conserva, (Brotons *et al.*, 1995), igual comportamiento en los productos procedentes de biberones de material polimérico y, por último, la migración y efecto estrogénico del bisfenol-A procedente de composites y selladores utilizados en odontología como restauradores. Más preocupante aún es el empleo de selladores basados en bisfenol-A en la prevención de caries infantil, lo cual lleva a una exposición temprana e inadvertida del ser humano a moléculas con efecto hormonal.

1. Aditivos en materiales plásticos

Junto con los polímeros se encuentran otros componentes minoritarios, incorporados en diversas etapas de su elaboración, como son: catalizadores, tensoactivos, inhibidores de polimerización, residuos de polimerización

Generalmente son alquil fenoles, polifenoles, ésteres, aminas, hidroquinonas y compuestos organofosforados. En este grupo de sustancias cabe destacar a los alquil fenoles, que se utilizan ampliamente como surfactantes y aditivos de materiales plásticos.

En cuanto a los alquil fenoles etoxilatos, en su biodegradación desaparece el radical etoxilato, mientras que el radical fenol da origen a residuos más tóxicos y no biodegradables. Las normativas europeas se atienen a la biodegradabilidad del 80% para tensoactivos no iónicos. Ningún país ha establecido hasta el momento límites respecto al producto completo, solo respecto a su degradación. En la actualidad se sabe que los alquil fenoles desde C-4 a C-12 presentan efecto estrogénico. Este hecho se describió a partir de la identificación del nonil fenol como componente de los tubos plásticos utilizados en laboratorio para contener muestras biológicas (Soto *et al.*, 1991; Sumpter *et al.*, 1995).

En ocasiones se adicionan sustancias altamente compatibles con los termoplásticos amorfos, así se rebaja la temperatura de transición vítrea, con lo cual se obtiene mayor flexibilidad. Estas sustancias son las llamadas plastificantes. Son, quizá, los aditivos más importantes. Se incluyen ésteres de ácidos orgánicos, tales como ftalatos que son los más utilizados en material en contacto con los alimentos y material clínico. Los ftalatos fácilmente eluyen desde el material plástico al medio.

Los plastificantes se clasifican en: 1) primarios, presentan tal compatibilidad con la resina que se pueden añadir en proporción 1:1, originan materiales excesivamente pastosos y blandos; 2) secundarios, se pueden mezclar en una relación hasta 1:3 con la resina; 3) existe un tercer grupo que no son plastificantes por sí solos, pero mejoran la acción de los plastificantes cuando se utilizan conjuntamente.

El ftalato de di-2- etilhexilo es el plastificante más empleado. En estudios continuados en ratas por más de dos años han presentado un alta incidencia de tumores hepáticos, lo que parece indicar que por vía oral y a dosis relativamente elevadas es agente cancerígeno en animales de experimentación, ante la existencia de estudios parciales no concluyentes en su extrapolación al hombre y ante el hecho de ser los ftalatos liposolubles y acumulables en el tejido adiposo.

En los últimos años se han realizado algunos trabajos para poner en evidencia la posible acción tóxica de estos ftalatos, de modo que en estudios con ratas se ha puesto de manifiesto la inducción de P-450 cuando se les administran dosis crecientes de dietilhexil ftalato.

Diversos estudios realizados con ftalatos han probado *in vitro* e *in vivo* su efecto estrogénico (Jobling *et al.*, 1995). Recientemente se ha identificado y relacionado la presencia de ftalatos en suero de niñas con telarquía prematura de la población de Puerto Rico (Colon *et al.*, 2000). Ya en 1987 se estudio, este problema en Puerto Rico, analizando presencia y cantidad de DDT y PCB en muestras de suero de pacientes con telarquía. Se obtuvieron valores algo más eleva-

dos que para un grupo control, pero no una correlación estadística significativa (Hannon *et al.*, 1987).

Bibliografía

- Adlercreutz H (1995). Phytoestrogens: Epidemiology and a possible role in cancer protection. *Environ Health Perspect* 103:103-112.
- Adlercreutz H, Mazur W (1997). Phyt-oestrogens and Western diseases. *Ann Med* 29: 95-120.
- Baker SR, Wilkinson C (1990). *The effects of pesticides on human health*. Princenton Scientific Publishing, Princenton, NJ.
- Barrett J (1996). Phytoestrogens: Friends or foes? *Environ Health Persp.* 104:478-482.
- Bennetts HW, Undderwood EJ, Sheir FLA (1946). A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. *Austral Veter J.* 22:2-12.
- Brotos JA, Olea-Serrano MF, Villalobos M, Pedraza V, Oea N (1995). Xenoestrogens released from lacquer coatings in foods cans. *Environ Health Perspec.* 103(6):608-612.
- Bustos S, Denegri JC, Diaz F, Tchernitchin AN (1988). P-P' DDT is an estrogenic compound. *Bull Environ Contam Toxicol.* 41: 496-501.
- COM706. Comisión de las Comunidades Europeas. Estrategia comunitaria en materia de alteradores endocrinos (Sustancias de las que se sospecha interfieren en lo sistemas hormonales de seres humanos y animales). Bruselas. (1999).
- Campoy C, Jimenez M, Olea-Serrano MF, Moreno Frías M, Cañabate F *et al.*, (2001). Analysis of organochlorine pesticides in human milk: preliminary results. *Early Human Developp.* 65: 183-190.
- Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE (1995). Declining semen quality and increasing incidence of testicular cancer: Is there a common cause? *Environ Health Perspec.* 103: 137-139.
- Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE (1992). Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Br Med J* 305:609-613.
- Colborn T, Vom Saal FS, Soto AM (1993). Developmental effects of endocrine disrupting chemi-

- cals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* 101:378-384.
- Colborn T, Clement C (1992). *Chemically-induced alterations in sexual and functional development: The wildlife/human*. Connection Princton Scientific Publishing, Princton, N.J.
- Colborn T, Dumanoski D, Myers JP (1997). *Nuestro futuro robado*. Ed. Ecoespaña. Madrid.
- Colon I, Caro D, Bourdony CJ, Rosario O (2000). Identification of phtalate esters in the serum of young Puerto Rican girls with premature breast development. *Environ Health Perspect* 108:895-900.
- Dodds EC, Lawson W (1936). Synthetic estrogenic agents without the phenantrene nucleus *Nature*, June 13:996.
- Editorial. *The Lancet* (1995). 345 (n.º 8.955): 933-935.
- Fry MD, Toone KC, Speich SM, Peard JR (1987). Sex ratio skew and breeding patterns of gulls: Demographic and toxicological considerations. *Studies in Avian Biology* 10:26-43.
- Gaitan E (1999). Environmental goitrogens, from contemporary Endocrinology. En: *Diseases of the thyroid*. Humana Press Inc. Totowa, N.J.
- Gorbach SG, Christ OE, Kellner HM, Kloss G, Boerner E (1968). Metabolism of endosulfan in milk sheep. *J Agric Food Chem*. 16:950-953.
- Guillette LJ, Jr (1995). Endocrine disrupting environmental contaminants and developmental abnormalities in embryos. *Human Ecological Risk Assessment* 1: 25-36.
- Gupta PK, Gupta RC (1979). Pharmacology, toxicology and degradation of endosulfan *Rev Toxicol* 13:115-130.
- Guzelian PS (1982). Comparative toxicology of kepone in humans and experimental animals. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 22: 89-113.
- Hammond B, Katzenellebogen BS, Krauthammer N, Mcconnell J.(1979). Estrogenic activity of the insecticide chlordecone and interaction with uterine estrogen receptors *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 6641-6645.
- Jobling S, Reynolds T, White R, Parker MG, Sumpter JP (1995). A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ Health Perspects* 103: 113-122.
- Krieger N, Wolff MS, Hiatt RA, Rivera M, Vogelmann J, Orentreich N (1994). Breast cancer and serum organochlorines: a prospective study among white, black and Asian women. *J Natl Cancer Inst* 86: 589-599.
- Krishman AV, Stathis P, Permuth SF, Tokes L, Feldman D (1993). Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* 132:2279-2286.
- Kupfer D (1975). Effect of pesticides and related compounds on steroids metabolism and function. *Crit Rev Toxicol* 4: 83-124.
- Leopold AS, Erwin M, Oh J, Browning B (1976). Phytoestrogens adverse effects on reproduction in California quail. *Science* 191:98-100.
- López-Abente OG (1991). *Cáncer en agricultores. Mortalidad proporcional y estudios caso-control con certificados de defunción*. Fondo de Investigación Sanitaria (FIS). Madrid.
- Makela S, Santi R, Salo L, McLachlan JA (1995). Phytoestrogens are partial estrogen agonists in the adult male mouse. *Environ Health Perspec* 103 (suppl. 7):123-127.
- McLachlan JA (1993). Functional toxicology: A new approach to detect biologically active xenobiotics. *Environ Health Perspec* 101:386-387.
- Maroni M, Fait A (1993). Health effects in men from longterm exposure to pesticides. *Toxicology*. 78, 1-180.
- Miller WR, Sharpe RM (1998). Environmental oestrogens and human reproductive cancers. *Endocrine-Related Cancer* 5:69-96.
- Mussalo-Rauhamaa H, Hasanen E, Pyysalo H *et al* (1990). Occurrence of β -hexachlorocyclohexane in breast cancer patients. *Cancer*, 66: 2124-2128.
- Olea N, Olea-Serrano MF (1996). Estrogens and the environment. *Eur J Cancer Prevention*. 5, 491-496.
- Olea N, Molina MJ, García Martín M, Olea Serrano MF (1996). Modern agricultural practices: The human price. En: Soto A, Sonnenschein C, Colborn T (eds.). *Endocrine disruption and reproductive effects in wildlife and humans. Comments in Toxicology*, vol. 5, 455-474.
- Olea N, Lardelli Claret P (1996). Exposure to xenoestrogens and chryptorchidism: Geographic evidence of a possible association. *Environ. Health Perspect* 104:1090-1095
- Olea N, Pazos P, Fernández MF, Rivas A, Olea-Serrano MF, Pedraza V (1999). Phyto and mycoestrogens (Xenoestrogens) as a preventable cause of breast cancer. *Med Biol Environ Int J* 27: 55-60.

- Olea N, Olea-Serrano F, Lardelli-Claret P, Rivas A, Barba-Navarro A (1999). Inadvertent exposure to xenoestrogens in children. *Toxicol Ind Health* 15(1-2):151-158.
- Olea N, Pulgar R, Pérez P, Olea-Serrano F, Rivas A, Novillo-Fertrell A *et al* (1996). Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ Health Perspect* 104: 298-305.
- Osius N, Karmaus W, Kruse H, Witten J (1999). Exposure to polychlorinated biphenyls and levels of thyroid hormones in children. *Environ Health Perspect* 107:843-849
- Ousterhout J, Struck RF, Nelson JA (1981). Estrogenic activities of methoxychlor metabolites B. *Pharmacol* 30, 2869-2871.
- Pérez P, Pulgar R, Olea-Serrano MF, Villalobos M, Rivas A, Metzler M *et al* (1998). The estrogenicity of bisphenol-A related diphenylalkanes with various substituents at the central carbon and the hydroxy groups. *Environ Health Perspect* 106: 167-174.
- Pulgar R, Olea-Serrano MF, Novillo-Fertrell A, Rivas A, Pérez P, Olea N (2000). Determination of bisphenol-A and oligomers in dental epoxy resins by high performance liquid chromatography. *Environ Health Perspect* 108(1): 21-27.
- Rivas A, Fernández MF, Cerrillo I, Ibarluzea J, Olea-Serrano MF, Pedraza V *et al* (2001). Human exposure to endocrine disrupters: Standardisation of a marker of estrogenic exposure in adipose tissue. *APMIS* 109:1-13.
- Sharpe RM, Skakkebaek NE (1993). Are oestrogens involved in falling sperm count and disorders of the male reproductive tract. *Lancet* 341: 1392-1395.
- Singh SK, Pandey RS (1990). Effect of subchronic endosulfan exposures on plasma gonadotrophins, testosterone, testicular testosterone and enzymes of androgen biosynthesis in rat Ind. *J Exp Biol* 28: 953-956.
- Soto AM, Justicia H, Wray JW, Sonnenschein C (1991). p-Nonyl-phenol: An estrogenic xenobiotic released from «modified» polystyrene. *Environ Health Perspect* 92: 167-173.
- Soto A, Chung K, Sonnenschein C (1994). The pesticides endosulfan, toxaphene and dieldrin have estrogenic effects on human estrogen-sensitive cells *Environ. Health Perspect* 102 :380-383.
- Sumpter JP, Jobling S (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ Health Perspect* 103: 173-178.
- Toppari J, Larsen JC, Christiansen P, Giwercman A, Grandjean P *et al* (1996). Male reproductive health and environmental xenoestrogens *Env Health Persp* 104: 741-803.
- Valenzuela Sánchez B (1995). *Determinación del efecto estrogenico de plaguicidas organoclorados*. Tesis Doctoral Universidad de Granada.
- Vettorazzi G (1991). International perspectives for safety assessment of pesticide residues in food: Toxicological evaluation and dietary exposure. Resúmenes del II Seminario Internacional sobre residuos de plaguicidas, Almería.
- Vinggaard AM, Körner W, Lund KH, Bolz U, Petersen JH (2000). Identification and quantification of estrogenic compounds in recycled and virgin paper for household use as determined by in vitro yeast estrogen screen and chemical analysis. *Chem Res Toxicol*. 13(12): 1214-1222.
- Weisglas-Kupperus N (1998). Neurodevelopmental, immunological and endocrinological indices of perinatal human exposure to PCBs and dioxins. *Chemosphere* 39:1845-1853.
- Westin JB, Richter E (1990). The Israeli breast cancer anomaly. *Ann N Y Acad Sci* 609: 269-279.
- Whitten P, Lewis C, Naftolin F (1993). A Phytoestrogen diet induces the premature anovulatory syndrome in lactationally exposed female rats. *Biology Reproduction* 49:1117-1121.
- Wolff MS, Toniolo PG, Lee EW, Rivera M, Dubin N (1993). Blood levels of organochlorine residues and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 85: 648-652.

EVALUACIÓN DE LOS NUEVOS ALIMENTOS

M.^a Carmen García-Parrilla, M.^a Soledad Fernández-Pachón, Ana M.^a Troncoso

Introducción. Definición y categorías. Nuevos alimentos existentes en la actualidad. Aspectos clave para la evaluación de nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios. Procedimiento para la puesta en el mercado de nuevos alimentos. Etiquetado. Bibliografía.

Introducción

La elaboración de alimentos ha de procurar que estos sean más duraderos higiénicos, nutritivos, saludables, apetitosos y económicos de producir. Las últimas décadas han aportado cambios extraordinarios en los métodos de producción y transformación de alimentos. Las nuevas posibilidades técnicas y la aplicación de la biotecnología en distintas etapas de producción de la cadena alimentaria ha permitido que la velocidad a la que se puedan producir nuevos productos sea vertiginosa. No obstante, las innovaciones introducidas en la elaboración de alimentos han resultado desastrosas, en ocasiones por la aparición de algún agente perjudicial para la salud humana. De modo que se hace necesario desarrollar mecanismos que garanticen la inocuidad de los nuevos alimentos y la seguridad del consumidor.

Los objetivos de la legislación son: proteger la salud del consumidor, evitar fraudes y engaños y salvaguardar el medio ambiente. El concepto de nuevo alimento se definió originalmente para establecer un marco legal internacional armonizado para la evaluación de alimentos que presenten una novedad en el método de elaboración, en la materia prima o en la forma de ser consumido. Al tratarse de un reglamento, es de obligado cumplimiento en toda la Unión Europea y ya se encuentra recogido en la cuarta edición del Código Alimentario de 2001. Así pues, según el reglamento no se dará autorización de comercialización si el alimento supone algún riesgo para el consumidor, le induzca a error o implique desventajas para la salud. De modo que hay que tener en cuenta que cuando se introduzcan cambios en la comercialización, la producción o el tratamiento de un alimento o se utilicen ingredientes no tradicionales deberán considerarse las repercusiones que tiene para la salud del consumidor.

Definición y categorías

La reglamentación europea (Reglamento CE n.º 258/97) se refiere a los **Nuevos Alimentos y Nuevos Ingredientes Alimentarios** que, hasta el momento, no hayan sido utilizados en una medida importante para el consumo humano en la Comunidad o bien se engloben en una de las siguientes categorías.

- Alimentos e ingredientes alimentarios que contengan OMG (organismos modificados genéticamente) con arreglo a la directiva 90/220/CEE o que consistan en dichos organismos.
- Alimentos e ingredientes alimentarios producidos a partir de OMG con arreglo a la directiva 90/220/CEE pero que no los contengan.
- Alimentos e ingredientes alimentarios de estructura molecular nueva o modificada intencionadamente.
- Alimentos e ingredientes alimentarios consistentes en microorganismos, hongos o algas u obtenidos a partir de ellos.
- Alimentos e ingredientes alimentarios consistentes en vegetales u obtenidos a partir de ellos y los ingredientes alimentarios obtenidos a partir de animales, excepto los alimentos e ingredientes alimentarios obtenidos mediante prácticas tradicionales de multiplicación o de selección cuyo historial de uso alimentario sea seguro.
- Alimentos e ingredientes alimentarios que se hayan sometido a un proceso de producción no utilizado habitualmente, que provoca en su composición o estructura cambios significativos de su valor nutritivo, de su metabolismo o de su composición o de su contenido en sustancias indeseables.

El reglamento no se aplica a:

- aditivos,
- aromas para productos alimenticios,
- disolventes de extracción.

Nuevos alimentos existentes en la actualidad

1. Alimentos e ingredientes alimentarios que contengan OMG con arreglo a la directiva 90/220/CEE o que consistan en dichos organismos

Últimamente se ha empleado la modificación genética de plantas para conseguir que los cultivos sean más productivos. Las cualidades que se han buscado son la resistencia a herbicidas, a enfermedades o la mejora de sus características sensoriales o nutritivas. Se muestran a continuación algunos ejemplos. En EE UU se ha comercializado un mayor número de alimentos modificados genéticamente (MG) pero en la Unión Europea existen mayores restricciones.

— *Resistencia a herbicidas.* La compañía Monsanto comercializa la soja resistente y el herbicida Roundup. El herbicida bloquea la ruta del ácido shiquímico, impidiendo que se sintetizen los aminoácidos esenciales y, por tanto, matando a las plantas excepto a las modificadas genéticamente. La compañía asegura que este herbicida es amigo del medio ambiente porque los microorganismos del suelo lo destruyen con rapidez, no acumulándose en plantas o tejidos animales.

— *Plantas productoras de insecticidas.* El *Bacillus thuringiensis* es una bacteria empleada desde hace tiempo por los agricultores para combatir plagas de forma natural. La esporas de dicha bacteria contienen la toxina Bt, que se activa por acción enzimática que tiene lugar en el aparato digestivo de los insectos, provocándoles la muerte. Es una toxina natural de acción insecticida que tradicionalmente han usado los agricultores de modo esporádico cuando aparecía una plaga incipiente. Las plantas que han sido modificadas producen esta toxina de manera continua con lo que se puede predecir la aparición de tolerancias a este insecticida natural

ya que la toxina se mantiene durante mucho tiempo.

— *Plantas resistentes a enfermedades.* El primer cultivo para obtener resistencia a enfermedades víricas fue una variedad de calabaza amarilla Freedom II, que tenía resistencia a los virus mosaico del melón de agua, pepino y calabaza.

— *Mejorar las características sensoriales.* Existe un evidente interés por prolongar la vida de los alimentos. El tomate de maduración retardada Flavr Savr fue el primer alimento transgénico completo que se comercializó en EE UU. Se obtuvo mediante supresión de los genes que codificaban la producción de poligalacturonasa, enzima responsable del ablandamiento que se produce durante la maduración de los tomates. De este modo, el tomate mantenía su piel tersa durante más tiempo. Esta ventaja era beneficiosa para los distribuidores y comerciantes, pero no para los consumidores, que adquirirían tomates viejos cuyo valor nutritivo era, posiblemente, inferior al de los nuevos. Este tomate se retiró del mercado americano en 1996.

— *Modificar la composición.* Existe un tipo de colza transgénica que presenta un mayor contenido de ácido láurico. Este ácido graso se usa profusamente como ingrediente alimentario (galletas, helados, bollería, leches preparadas) así como en detergentes y cosméticos. La obtención a partir de la colza abarata su costo. Esta planta es un transgénico, ya que contiene un gen del laurel de California que expresa la síntesis de láurico y está autorizado en EE UU.

La obtención de animales transgénicos es más lenta y costosa. De este modo se intentó desarrollar cerdos con más masa muscular y mayor valor comercial, modificando los genes que codifican la hormona del crecimiento. El resultado fue que los cerdos padecían diversas disfunciones: artritis, úlceras gástricas, riñones colapsados, ya que los cerdos transgénicos produjeron la hormona en exceso. También existen salmones, carpas y peces-gato transgénicos cuyo tamaño está aumentado.

Actualmente en la Unión Europea están autorizados el maíz, la soja, la colza y la achicoria. El maíz se puede cultivar en la Unión en

tanto que está permitido la importación de la soja, aunque no su cultivo. Actualmente se calcula que en España existen unas 15.000 hectáreas de maíz transgénico. Los españoles consumimos soja y maíz transgénico importado de Estados Unidos y en España solo está autorizado el maíz en dos variedades Jordi y Compa. Esta última está diseñada para ser resistente al taladro, a los antibióticos y a los herbicidas. La principal vía de entrada de transgénicos en España es la importación (dos millones de toneladas de maíz y una de soja cada año). El 70% de este volumen se destina a la alimentación del ganado y el resto a la alimentación humana, ya que se emplea en la fabricación de diversos alimentos. En mayo del 2004, la Comisión Europea autorizó la importación de maíz enlatado y mazorcas frescas de maíz dulce procedente de la línea de maíz modificada genéticamente Bt 11.

2. Alimentos producidos a partir de OMG pero que no los contienen

Esta categoría agrupa a los alimentos procesados que no contienen el OMG pero que se producen a partir de ellos. Los casos más frecuentes son el maíz y la soja, que se emplean para elaborar:

- Grasas: margarina, aceite de mesa y el empleado en la fritura de las patatas chips.
- Maíz molido, harinas, polenta, copos de maíz.
- Almidón: chicles, bombones, pastelería y salsas.
- Edulcorantes: bebidas de frutas, muesli y helados.

3. Alimentos e ingredientes alimentarios de estructura molecular nueva o modificada intencionadamente

Como representantes de esta categoría se encuentran los sustitutos de las grasas. Estos compuestos, por sus propiedades sensoriales, son capaces de sustituir los lípidos de un alimento pero tienen un valor calórico nulo o muy reducido porque

están diseñados para no ser sustrato de la lipasa pancreática. Así se ha reemplazado el glicerol de triglicéridos convencionales por carbohidratos, alquilglicósidos o polialcoholes como la sacarosa, dando lugar a moléculas que ofrecen un impedimento estérico a la acción de la lipasa. Otra posibilidad es sustituir el ácido graso original por otro que las enzimas digestivas no sean capaces de atacar. No pueden considerarse meramente aditivos porque se añaden al alimento en cantidades mayores que la mayoría de los aditivos.

En diciembre del 2003 se autorizó la comercialización de salatrin, un triacilglicérido desarrollado para ser utilizado como grasa alternativa.

4. Alimentos e ingredientes alimentarios consistentes en microorganismos, hongos o algas u obtenidos a partir de ellos

La inclusión de microorganismos en este grupo implica que todo microorganismo nuevo, sea o no modificado, tiene que ser evaluado.

Existe un gran interés por las nuevas fuentes de proteína y por el perfil de ácidos grasos de las algas. Así se ha autorizado la comercialización de un aceite rico en ácido decosahexaenoico (DHA) procedente de la microalga *Schizochytrium sp.*

5. Alimentos e ingredientes alimentarios consistentes en vegetales u obtenidos a partir de ellos, y los ingredientes alimentarios obtenidos a partir de animales excepto los alimentos e ingredientes alimentarios obtenidos mediante prácticas tradicionales de multiplicación o de selección cuyo historial de uso alimentario sea seguro

En general, podemos considerar en el quinto apartado aquellos productos vegetales exóticos que no se han usado antes en la UE. Los kiwis hubieran merecido esta consideración hace 20 años, y la patata y el tomate cuando se descubrió el Nuevo Mundo. En el caso de los animales podríamos citar el krill o plactón antártico.

En este caso tenemos el ejemplo de una planta a la que se ha denegado su comercialización en la Unión Europea. Se trata de *Stevia Rebaudiana*, planta originaria de Brasil y Paraguay, aunque también se usa en Corea, Tailandia y China. Su uso como edulcorante natural se debe a que contiene un esteviósido (SVS) que es un glucósido diterpénico bajo en calorías pero que produce natriuresis y diuresis a pesar de su intenso poder edulcorante. Se rechazó su solicitud porque el solicitante no daba suficientes datos de seguridad.

6. Alimentos e ingredientes alimentarios que se hayan sometido a un proceso de producción no utilizado habitualmente, que provoca en su composición o estructura cambios significativos de su valor nutritivo, de su metabolismo o de su composición o de su contenido en sustancias indeseables

Y, por último, están sujetos al reglamento de nuevos alimentos los nuevos procesos de elaboración como los que combinan temperatura y alta presión, habiéndose autorizado ya preparados pasteurizados a base de frutas obtenidos por medio de un tratamiento de pasteurización a alta presión.

Aspectos claves para la evaluación de nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios

1. Problemas de la evaluación de la seguridad de los nuevos alimentos

Hasta ahora los alimentos han sido considerados seguros a pesar de que fuera conocida la presencia de tóxicos naturales, como la solanina en la patata o sustancias antinutrientes, como el fitato de la soja, ya que existe el convencimiento de

que si se consumen razonablemente no suponen riesgo para la salud del consumidor. Los esfuerzos de las autoridades en materia de seguridad se han centrado en los aditivos, la contaminación biótica y abiótica, y los coadyuvantes tecnológicos.

Para evaluar la inocuidad de plaguicidas, aditivos, sustancias farmacéuticas, sustancias químicas industriales, se recurre a estudios con animales. En la mayoría de los casos, no obstante, la sustancia a estudiar está perfectamente caracterizada, es de pureza conocida, no tiene valor nutricional y la exposición humana es relativamente baja. Así pues, resulta sencillo administrarlos a animales en distintas dosis, algunas de ellas varios órdenes de magnitud superiores a la administración prevista en humanos, a fin de poner en evidencia los efectos adversos de relevancia. De esta manera, es posible determinar, en la mayoría de los casos qué niveles de exposición no presentan efectos adversos y con ello establecer límites superiores seguros mediante la aplicación de factores de seguridad adecuados.

Sin embargo, los alimentos son mezclas más o menos complejas de compuestos caracterizadas por una gran variedad en la composición y el valor nutricional. Debido a su volumen y a su efecto en la saciedad solo pueden ofrecerse al animal en múltiples reducidos de la cantidad esperada en la dieta humana. Además, hay que tener en cuenta el posible desequilibrio de las dietas utilizadas y su valor nutritivo con el fin de evitar efectos adversos que no estén relacionados con el material en sí.

Las principales dificultades de la evaluación se pueden concretar en:

1. Los alimentos son mezclas más o menos complejas de macro y micronutrientes y los métodos de estudios metabólicos y farmacocinéticos están diseñados para sustancias individuales y singulares.
2. En segundo lugar, el método de evaluación debe contemplar la forma en la que es consumido un alimento, es decir, como

parte de una dieta normal y variada frente a los tradicionales métodos de evaluación toxicológica en que consideran una dosis elevada.

3. Se sabe, por otra parte, que los alimentos naturales presentan sustancias que pueden ser tóxicas e incluso carcinógenas. No obstante, el desarrollo de una enfermedad está vinculado en mayor grado con la dieta y los hábitos alimentarios que con el consumo de un componente aislado del alimento.
4. Además de los efectos tóxicos hay que considerar los posibles cambios en el estado nutritivo del consumidor que sustituye los alimentos tradicionales por los nuevos.

En la práctica, hay muy pocos alimentos que se sometan a estudios toxicológicos pero se acepta que son inocuos. Para desarrollar la metodología de evaluación de nuevos alimentos resulta indispensable establecer qué es un alimento inocuo. La OCDE definió que un alimento era inocuo si existía certeza razonable de que no se derivarían perjuicios por su consumo en las condiciones previstas.

En segundo lugar se desarrolló el concepto de equivalencia sustancial. Este criterio reconoce que la meta no es demostrar la inocuidad absoluta de un nuevo alimento sino que el alimento es tan inocuo como su homólogo tradicional. La evaluación de la toxicidad de los nuevos alimentos debe hacerse caso a caso.

2. Equivalencia sustancial

La equivalencia sustancial es una estrategia para comparar un alimento con su homólogo tradicional, de modo que si se descubre que el nuevo es sustancialmente equivalente al tradicional pueda ser tratado como este en términos de salubridad (Recomendación CE 97/618).

La equivalencia sustancial se puede aplicar a todo el alimento o componente alimentario o la totalidad del alimento salvo la modificación que se le ha aplicado.

El hecho de que un alimento no sea sustancialmente equivalente al existente no quiere decir que no sea saludable sino que hay que realizar una evaluación más exhaustiva. La comparación será tanto más ardua cuanto más complejos sean los alimentos. A la hora de determinar los datos toxicológicos necesarios se pueden considerar tres hipótesis:

a) *Equivalencia sustancial total*. Se puede establecer la equivalencia sustancial del nuevo alimento y el alimento tradicional, en cuyo caso no son necesarias más pruebas.

b) *Equivalencia sustancial parcial*. Se puede establecer la equivalencia sustancial excepto para un solo rasgo, en cuyo caso se requiere una evaluación complementaria específicamente de dicho rasgo.

c) *No se puede establecer equivalencia sustancial*. En cuyo caso el nuevo alimento debe ser sometido a una evaluación más exhaustiva que tenga en cuenta: identidad, estructura química, propiedades fisicoquímicas, fuente, ingesta potencial en función de su papel potencial en la dieta, la exposición de grupos de población especialmente vulnerables y los efectos probables del tratamiento. Cuanto mayor sea la exposición prevista, más extenso deberá ser el programa de pruebas toxicológicas.

De los alimentos producidos a partir de cultivos genéticamente modificados, solo el aceite muy refinado, el azúcar o los hidrolizados de fibra son considerados sustancialmente equivalentes a los homólogos tradicionales no modificados, ya que no se espera ni ADN ni proteína. El resto, como harinas y proteínas, requieren una evaluación completa.

3. Modo de establecer la equivalencia sustancial

Análisis de la composición

El primer paso consiste en analizar la composición con métodos normalizados y validados:

- Macro y micronutrientes.
- Sustancias tóxicas críticas.

- Factores antinutricionales que pudieran estar presentes como consecuencia del proceso de producción.

Ingesta

Las pautas de ingesta deben indicar los efectos de la posible sustitución de otros componentes alimentarios de importancia en la dieta.

Consideraciones nutricionales de las pruebas toxicológicas en animales

El conocimiento preciso de las propiedades nutricionales, como por ejemplo valor energético, contenido proteínico, biodisponibilidad de nutrientes, es una condición necesaria del programa de pruebas toxicológicas.

En los estudios toxicológicos de experimentación con animales la dosis más elevada ha de ser el nivel máximo que puede incorporarse a la dieta sin causar un desequilibrio nutricional, mientras que la dosis más baja debe ser comparable a su función previsible en la dieta humana. Existe una dificultad para emplear los factores de seguridad tradicionalmente empleados en los estudios toxicológicos, ya que estaríamos en unos niveles de desequilibrio nutritivo. Por eso se prevé la inclusión de estudios de metabolismo y absorción en animales.

Repercusiones de los nuevos alimentos para la alimentación humana

La evaluación general del nuevo alimento debe considerar las repercusiones que tienen para la salud tanto las ingestas habituales como los niveles máximos de consumo. Si se prevé que el nuevo alimento vaya a tener un importante uso en la alimentación humana se debe prestar atención a las características fisiológicas y necesidades metabólicas de grupos especiales tales como: embarazadas, lactantes, ancianos y grupos de población con necesidades especiales (diabéticos, malabsorción, etc.). Por ejemplo, es

preciso evaluar los efectos a corto y largo plazo, como el efecto que pueden tener el consumo de sustitutos de las grasas en el metabolismo de las vitaminas liposolubles. Esta atención a los grupos de población especiales promovió que se desaconsejara el consumo de mantequilla con ésteres de fitoesterol a embarazadas y niños menores de cinco años.

Evaluación de nuevos microorganismos utilizados en los alimentos

Por definición, los microorganismos sin uso tradicional en la producción de alimentos en Europa no pueden tener un homólogo tradicional sustancialmente equivalente, por lo que deben ser evaluados.

Los criterios que se siguen son:

- a) Confinamiento (por ejemplo, están solo presentes en el fermentador, permanecen vivos en el alimento o se destruyen en los tratamientos).
- b) Potencial de colonización del intestino de mamíferos.
- c) Potencial de toxigenicidad y patogenicidad en mamíferos.
- d) Aplicación o no de ingeniería genética y, en este punto se deben considerar: origen del material introducido (vectores, elementos reguladores, genes extraños, genes diana).

Sistema de introducción.

Homólogo: autoclonación cuando todo el material genético deriva de la misma especie taxonómica. De ser así, la equivalencia sustancial se puede establecer en la mayoría de los casos.

Heterólogo: el donante y el receptor del material genético pertenecen a distintas especies, y en este caso hay que considerar las repercusiones de la transferencia horizontal de genes en el intestino.

Potencial alergénico

La Comisión del Codex Alimentarius (FAO/OMS, 2000; 2001) ha adoptado una lista de alimentos que más comúnmente producen alergias en reacciones mediadas por IgE en todo el mundo. Entre ellos figuran: cacahuets, nueces, semillas de soja, leche, huevos, pescado, crustáceos. Las reacciones alérgicas a frutas y hortalizas frescas, el denominado síndrome de la alergia oral, son de tipo leve y, generalmente, se limita a la región orofaríngea. Los síntomas de las alergias pueden ser leves o incluso mortales, según el individuo. También es variable la dosis necesaria para desencadenar una reacción (de microgramos a miligramos).

Casi todos los alérgenos alimentarios son proteínas, aunque también cabe la posibilidad de que otros componentes alimentarios actúen como haptenos (pequeñas moléculas que pueden interactuar con proteínas del organismo o de los alimentos y hacer que estas se vuelvan alergénicas). En un proyecto de investigación se intentó producir soja con un mayor contenido de metionina introduciéndole un gen de la nuez de Brasil. Como resultado la soja obtenida era alérgica no solo para los individuos alérgicos a la soja sino también para el individuo alérgico a la nuez de Brasil con lo cual hubo que abandonar el proyecto. Ciertas clases de proteínas son alérgenos conocidos como las albúminas 2S altas en metionina que contienen las nueces de brasil, pipas de girasol, granos de mostaza. Si en el alimento existe este tipo de proteína debe estudiarse concienzudamente.

Dado que los alimentos genéticamente modificados suelen contener proteínas nuevas, la evaluación de su inocuidad debe incluir una evaluación de la alergenidad de esas nuevas proteínas. Los parámetros elegidos para evaluar la alergenidad son:

- a) Origen del material genético introducido: debe adoptarse particular atención si la fuente contiene alérgenos conocidos.
- b) Homología de secuencias: ya se dispone de la secuencia de aa de muchos alérge-

nos que se encuentran recogidas en bases de datos.

- c) Inmunorreactividad a la proteína recientemente introducida: en el caso de que uno de los dos supuestos anteriores sea positivo se determina la reactividad de esa proteína con la Ig E del plasma sanguíneo de individuos alérgicos apropiados.
- d) Efecto del pH o de la digestión: la mayoría de los alérgenos son resistentes a la acidez gástrica y a las proteasas digestivas.
- e) Estabilidad frente al calor o las técnicas de elaboración: los alérgenos son sustancias lábiles. Por ello, en alimentos que se cocinan o elaboran de alguna otra forma antes del consumo revisten menos peligro.
- f) Ensayo en modelos animales.

En el árbol de decisiones publicado en el 2001, tanto en caso de que la fuente sea alérgica como no se realiza un análisis de la secuencia. Si se demuestra que existe homología de secuencias con un alérgeno ya conocido, se considera que el nuevo alimento lo es, sin ningún otro tratamiento. Si no lo es, se aplica el análisis frente a suero específico. A diferencia de los árboles de decisión precedentes, el análisis frente a suero específico se aplica independiente de que la fuente sea alérgica o no lo sea.

El método que se utiliza actualmente para determinar *similitudes significativas de secuencias* es la comparación de al menos 8 aa contiguos idénticos. Se ha sugerido que sería mejor comparar un número más pequeño, quizá tan solo 4. El uso de una comparación de 8 aa contiguos e idénticos parece guardar cierta relación con la longitud peptídica mínima para un epítopo de células T (un epítopo es un grupo de aa dentro de una proteína que puede unirse a células T, epítopos de células T, o anticuerpos de IgE (epítopos de IgE). Los epítopos pueden ser lineales o de conformación. También se reconoce que el método no puede identificar epítopos discontinuos o de configuración que dependen de la estructura terciaria de la proteína. Sin embargo, la estabilidad de los alérgenos alimentarios

al calor sugiere que en este caso tienen más importancia los epítopos lineales y discontinuos. Debe llegarse al consenso científico internacional sobre el uso de la homología de secuencias en la evaluación de la alergenicidad de los alimentos genéticamente modificados.

Cuando se realiza un análisis de suero el grado de confianza en los resultados depende del número de sueros empleados. Así, para detectar un alérgeno mayoritario (aquel frente al cual reaccionan el 50% de la población sensible) se precisan:

Grado de confianza	Número de sueros
95%	6
99%	8
99,9%	14

En el caso de que sea minoritario (aquel frente al cual reaccionan menos del 50% de la población) se precisan:

Grado de confianza	Número se sueros
95%	17
99%	24

Si en algún caso los resultados son positivos significará la interrupción del desarrollo del producto. Si es negativo, las pruebas continuarán con sueros dirigidos, resistencia a la pepsina y modelos de animales.

Los sueros dirigidos se seleccionarán en función del tipo de proteína recombinante. Si es:

Planta monocotiledónea, se ensayarán la hierba y el arroz.

Planta dicotiledónea: los cacahuets, las nueces y el látex.

Mohos, levaduras, hongos: *Alternaria*, *Cladosporium*, *Trichophyton*.

Invertebrados: ácaros, cucaracha, seda, camarón.

Vertebrados: alérgenos a proteína de vaca, pescado, huevo.

El uso de la *estabilidad digestiva* parece un criterio bastante útil en la evaluación de la aler-

genicidad de los alimentos genéticamente modificados. Se han usado modelos de digestión gástrica e intestinal en mamíferos para evaluar la estabilidad digestiva de alérgenos alimentarios conocidos y proteínas introducidas en alimentos con modificación genética. Después de someter a la acción proteolítica de la pepsina a la proteína a 37° durante 60' la evidencia de fragmentos mayores de 3,5 kDa sugiere que esa proteína puede ser alergénica.

En cuanto a las *pruebas con animales*, se deberán usar varios modelos de experimentación:

- Administración oral e intraperitoneal.
- Se deberán estudiar los resultados en perfiles de anticuerpos.
- En las pruebas con animales se debe contrastar frente a alérgenos débiles e intensos.

Se considera que los modelos con animales no están aún suficientemente validados.

Evaluación del material genético

Es preciso comprobar que el nuevo ADN introducido no codifica ninguna sustancia nociva y hay que comprobar que la construcción final es estable. Para eso el origen y la identidad taxonómica del organismo hospedador debe ser claramente establecida porque ayuda a evaluar la capacidad potencial de producción de toxinas o los agentes virulentos y otras impurezas. Si se usan vectores es preciso establecer su seguridad en la elaboración de alimentos. En general, cuando se introduce un material genético nuevo hay que asegurarse de que:

- El fragmento introducido sea el mínimo necesario para obtener el rasgo deseado.
- Se deben escoger vectores tales que minimicen la posibilidad de producir modificaciones a otros microorganismos.
- Si el microorganismo está destinado a formar parte del alimento, el vector no debe contener genes marcadores de resistencia a antibióticos.

Los genes marcadores se emplean para comprobar que los vegetales o microorganismos han sido transformados con éxito, sirven como etiquetas para identificar y seleccionar las células vegetales. Confieren en general resistencia a los antibióticos o mayor tolerancia a los herbicidas o a los metales pesados. Normalmente no se usan genes marcadores de antibióticos importantes en medicina o fármacos con pocas alternativas de tratamiento. Se evalúan como cualquier gen extraño introducido. Hay que comprobar:

- El gen marcador y el producto que codifica.
- Los métodos para analizar y cuantificar el gen marcador y sus productos de expresión en el alimento.
- Los potenciales efectos toxicológicos y/o nutricionales relacionados con el gen marcador.
- El potencial de transferencia génica horizontal a la flora intestinal.

Todos los alimentos contienen ADN que es ingerido en cantidades significativas; se estima que la ingesta diaria de ARN y ADN está entre 0,1 y 1 g diarios. Hay que tener en cuenta que la cantidad de ADN modificado puede suponer 1/250.000 de la cantidad ingerida. La transferencia de ADN vegetal a células microbianas o de mamífero en circunstancias normales de exposición alimentaria exigiría que ocurrieran los sucesos siguientes:

- 1) Los genes de ADN vegetal habrían de ser liberados, probablemente como fragmentos lineales.
- 2) Los genes del vegetal han de sobrevivir a las nucleasas del vegetal y a las del tracto gastrointestinal.
- 3) Los genes habrían de competir con el ADN alimentario para la asimilación.
- 4) Las células bacterianas o de mamífero receptoras habrían de ser aptas para la transformación y los genes habrían de sobrevivir a sus enzimas de restricción.

- 5) Los genes habrían de ser insertados en el ADN del huésped en sucesos poco comunes de reparación o recombinación.

Se han hecho diversos ensayos para probar si se pueden introducir genes vegetales modificados en células de mamíferos y hasta la fecha no se ha conseguido transferirlos ni que se mantengan de forma estable y que después puedan ser mantenidos en ellas. Incluso se ha estudiado la flora normal de pollos y ovejas alimentados con maíz genéticamente modificado y se está estudiando su flora normal (Younes *et al.*, 1995).

Las consecuencias de la captación de ADN vegetal por células de mamífero son diferentes de las de la captación de bacterias, así pues, los datos existentes indican que ese ADN no se transmite por la vía germinal. No se conoce bien la medida en que las células con ADN extraño son fagocitadas, como tampoco que ese ADN se mantenga y replique de forma estable en las células somáticas.

No existen evidencias de que los marcadores de antibióticos usados en plantas genéticamente modificadas supongan un riesgo para la salud humana. La proliferación de células receptoras resistentes pondría en peligro la eficacia del fármaco. La importancia de este hecho viene condicionada por la importancia del antibiótico en terapéutica y por si existen alternativas a ese fármaco.

Procedimiento para la puesta en el mercado de nuevos alimentos

1. El solicitante o responsable de la puesta en el mercado de un Estado miembro de un nuevo alimento presentará una *solicitud* al estado miembro en el que el producto vaya a ser puesto en el mercado por primera vez (Reglamento (CE) n.º 258/97; Reglamento 1139/98).

La solicitud irá acompañada de una copia de los estudios que se hayan llevado a cabo con ese

alimento o ingrediente alimentario al objeto de demostrar que el nuevo alimento:

- No supone ningún riesgo para la salud del consumidor.
- No difiera de otros alimentos o ingredientes alimentarios a cuya sustitución esté destinada de tal manera que su consumo normal implique desventajas para el consumidor desde el punto de vista de la nutrición.
- No induzca a error al consumidor.
- Propuesta de presentación y etiquetado.

Esta solicitud será remitida también a la Comisión.

2. El Estado miembro realizará una *evaluación inicial* o bien notificará el nombre de organismo competente en materia de evaluación de productos alimenticios encargado de elaborar el informe de evaluación inicial o bien solicitará a la Comisión que concierte con otro Estado miembro la elaboración de dicho informe por un organismo competente en materia de evaluación de productos alimenticios.

En España, la evaluación de los nuevos alimentos y procesos es competencia de los Ministerios de Sanidad y Consumo y de Agricultura, Pesca y Alimentación. Este último es la autoridad responsable en esta materia y la que debe coordinarse con los organismos correspondientes de la Comisión Europea (Real Decreto 1998/1491 n.º 1118 5-6-98).

La Comisión cursará a todos los Estados Miembros una copia del resumen del dossier facilitado por el solicitante y el nombre del organismo competente encargado de efectuar la evaluación inicial. El informe de evaluación inicial se elaborará en un plazo de tres meses a partir de la recepción de la solicitud y se indicará si el alimento puede ponerse en el mercado o bien requiere o no una evaluación complementaria.

El Estado miembro remitirá tanto al solicitante como a la comisión el informe del organismo competente y esta lo remitirá al resto de los Estados miembros. A partir de ese momento y en un plazo de 60 días cualquier Estado miem-

bro puede presentar cuantas objeciones y observaciones considere oportunas. Las objeciones u observaciones pueden referirse también a la presentación o etiquetado.

3. Cuando sea necesaria una evaluación complementaria o se hayan presentado objeciones se tomará una *decisión de autorización*. La decisión de autorización establece:

- Denominación del alimento.
- Descripción del alimento o ingrediente alimentario.
- Condiciones de uso del alimento o ingrediente alimentario.
- Requisitos específicos del etiquetado.

La decisión se comunicará al solicitante sin demora.

Esta decisión se establecerá por mayoría en el Consejo de Alimentación. Si este comité no alcanza un acuerdo se mandará al Consejo de Ministros de la UE. Si tampoco aquí hay mayoría, la Comisión tiene la última palabra.

Para asegurar la consistencia de las leyes este procedimiento está relacionado con la directiva de liberación controlada de microorganismos 90/220/EEC y de las variedades de plantas 70/457 y 70/458/EEC para que el solicitante pase por un único procedimiento y no tenga que secundar múltiples solicitudes, como en el caso de EE UU en el que debe pasar por tres agencias diferentes.

4. Cuando, como consecuencia de una información nueva, un Estado miembro tenga la sospecha de que existen riesgos para la salud o el medio ambiente, dicho estado puede *limitar de modo temporal o suspender* la comercialización y el uso del alimento o ingrediente alimentario en cuestión dentro de su territorio aunque debe informar a los estados miembros y a la Comisión precisando los motivos de su decisión. Aplicando el principio de precaución, la UE decidió suspender la licencia para el cultivo de una variedad de maíz transgénico tras la publicación en la revista científica *Nature* de un estudio donde se demuestra que el polen de estas plantas mata las larvas de las mariposas Monarca.

Etiquetado

Además de los requisitos de la legislación alimentaria comunitaria sobre *etiquetado* este tipo de alimentos debe incluir en su etiqueta:

- a) Características alimentarias.
Composición.
Valor nutritivo.

Uso al que esté destinado el alimento en cuanto hagan que un nuevo alimento o ingrediente alimentario *deje de ser equivalente* a un alimento o ingrediente alimentario existente.

Una evaluación científica basada en un análisis de los datos existentes puede demostrar que las características estudiadas son distintas de las que presente un alimento o ingrediente alimentario convencional teniendo en cuenta los límites aceptados de las variaciones naturales de estas características. En este caso el etiquetado debe llevar mención específica de estas características así como el método por el cual se haya obtenido esta propiedad.

- b) La presencia en un nuevo alimento o ingrediente alimentario a partir de materias que no estén presentes en un producto alimenticio equivalente existente y que pueden tener consecuencias para la salud de determinados grupos de población. Ejemplo: la influencia de las grasas amarillas de untar con fitoesteroles sobre las embarazadas y niños menores de 5 años.

- c) La presencia de materias no existentes en el producto alimenticio equivalente y que planteen una reserva de tipo ético. Por ejemplo, transferir genes de cerdo a otra especie.

- d) En todos los casos si existe un OMG mediante técnicas que no figuran en la directiva 90/220/CEE se debe indicar en el etiquetado.

Durante estos años se han dictado numerosos reglamentos referentes al etiquetado de los alimentos modificados genéticamente, la última en abril de 2004 reflejo de la complejidad de regulación y de la inquietud de los consumidores.

Periódicamente se han ido revisando las reglas de etiquetado incluyendo cada vez más productos y bajando los límites de tolerancia permitidos. Se pueden consultar en la página de la Agencia de Seguridad Alimentaria Española (www.msc.es/aesa). Actualmente se debe etiquetar todo alimento o ingrediente alimentario que sea OMG o que esté producido a partir de un OMG (se incluyen aromas y aditivos) independientemente de que se detecte ADN o proteína. No quedan sujetos a estas reglas:

- Los auxiliares tecnológicos, aditivos de transferencia, soportes de aditivos y aromas y disolventes de extracción.
- Los productos de origen animal (leche, carne, huevos, grasas, etc.) procedentes de animales alimentados con alimentos MG.
- Los microorganismos MG que no estén presentes en el producto final.
- Aquellos que contengan porcentajes inferiores al umbral estipulado siempre que se demuestre que su presencia es accidental o inevitable.

Se incluirá una leyenda en la lista de ingredientes entre paréntesis e inmediatamente después del ingrediente afectado o en una nota a pie de lista de letra igual tamaño. Los términos que se deben incluir en la etiqueta son en general:.

Modificado genéticamente.

Producido a partir de... modificado genéticamente.

El umbral a partir del cual es obligatorio etiquetar estos alimentos baja del 1 al 0,9% y al 0,5% durante tres años si se trata de un OMG no aprobado pero con el visto bueno de los comités científicos. Los operadores de la cadena alimentaria deberán demostrar que sus procedimientos para garantizar la trazabilidad de los productos funcionan adecuadamente, es decir, permiten identificar de quién reciben y a quién transmiten los OMG y conservar la información para las autoridades durante 5 años.

Los requisitos de etiquetado están frenando la producción del consumo de alimentos MG ya que el consumidor experimenta un gran rechazo debido al recelo que suscitan. El público, en general,

entiende bien que se diseñen nuevos alimentos para mejorar la salud como las grasas con fitosterol o los fructooligosacáridos estando dispuesto a pagar más por ese valor añadido pero no comprende que deba exponerse a un riesgo potencial en su salud por el consumo de productos que, en definitiva, redundan en beneficio de los agricultores o en beneficio de las multinacionales.

Los elaboradores de alimentos se quejan de que los complejos trámites son lentos, costosos y le suponen una pérdida de competitividad frente a países donde no existen tantas trabas y pueden declarar los beneficios para la salud. Además de que se establecen unos criterios de seguridad en función de unas fronteras políticas que suponen un proteccionismo del mercado.

Bibliografía

- Comisión Europea Reglamento (CE) n.º 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo de 27 de enero de 1997 sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios.
- Comisión Europea Recomendación CE n.º 97/618 de 29 de Julio de 1997 relativa a los aspectos científicos y 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) 6 n.º 258/97 del Parlamento Europeo .
- FAO (2001). Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. Report of a Joint FAO/OMS Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology. Roma, Italia.
- ILSI International Food Biotechnology Committee. Nutritional and Safety Assessments of Foods and Feeds Nutritionally Improved through Biotechnology. IFT's Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. Institute of Food Technologists. Chicago. EE UU. 2004.
- Madden (1995). *Food biotechnology. An introduction* ILSI Europe Concise Monograph series. ILSI.
- OMS (2000). Aspectos relativos a la inocuidad de los alimentos de origen vegetal genéticamente modificados. Informe de una Consulta Mixta FAO/

OMS de Expertos sobre los Alimentos Obtenidos por Medios Biotecnológicos. Ginebra, Suiza.
Pedauy J, Ferro A, Pedauy V. *Alimentos transgénicos. La nueva revolución verde*. McGraw-Hill, 2000.
Rodríguez López A, López Martínez MC. Blanca Herrera R. M. Nuevos Alimentos modificados genéticamente y sociedad. *Alimentaria* 71-80 (2000).

www.cropcomposition.org
www.msc.es/aesa
www.who.int/fsf/GMfood
Younes M, Speijers JA, van der Heiden CA. Biotechnology-derived and novel foods: Safety approaches and regulations. En: Kotsonis N, Mackey M, Hjelle J (eds.). *Nutritional toxicology* Raven Press, Nueva York, 1994.

Débora Villaño, M.^a Carmen García-Parrilla, M.^a Lourdes Morales, Ana M.^a Troncoso

Introducción. Reacciones adversas a los alimentos: clasificación. Mecanismo de la reacción alérgica. Manifestaciones clínicas. Naturaleza de los alérgenos alimentarios. Diagnóstico. Tratamiento. Etiquetado de los alimentos alergénicos. Métodos de análisis de proteínas alergénicas en alimentos. Bibliografía.

Introducción

El término alergia alimentaria se ha utilizado durante mucho tiempo para describir diferentes tipos de reacciones adversas de carácter individual hacia los alimentos y sigue siendo mal utilizado y mal comprendido por el público en general. La verdadera alergia alimentaria resulta ser tan solo un tipo de reacción adversa a los alimentos, que incluye una respuesta inmunitaria.

Las reacciones adversas producidas tras el consumo de ciertos alimentos preocupan a los consumidores, a los científicos y a la industria, y representan un importante problema de salud pública en los países occidentales. Paralelamente, la prevalencia de la alergia alimentaria aumenta sin cesar en Europa, particularmente entre la población infantil. Este aumento también se ha producido en Estados Unidos (Sampson, 2004).

Nunca hasta hoy hemos podido disponer de una variedad tan grande de alimentos ni tampoco la relación existente entre dieta y salud ha despertado tanto interés. En este contexto, la alergia alimentaria, como un caso particular de reacción adversa frente al consumo de determinados alimentos, es de particular interés.

Se calcula que alrededor de un 2% de los adultos y un 8% de la población infantil padecen verdadera alergia alimentaria en el mundo occidental (Helm y Burks, 2000; Sampson, 1999). La prevalencia de la alergia alimentaria es, pues, mayor en los primeros años de vida.

Salvo excepciones, los síntomas resultantes de la alergia alimentaria son a menudo predecibles y leves. Sin embargo, en algunos casos se puede presentar de forma imprevisible y muy aguda, pudiendo incluso causar la muerte (ILSI, 2003).

Aunque la alergia se desarrolla frente a proteínas presentes en cualquier alimento, lo habitual es que los alimentos implicados se encuentren dentro de un grupo bastante restringido, que

suelen ser los causantes en la mayoría de los casos. Con la introducción de nuevos alimentos en la dieta europea se ha producido un incremento paralelo de alergias alimentarias. Así, la alergia al kiwi o las semillas de sésamo se han convertido en frecuentes en un tiempo récord. Es posible que la exposición a nuevos alérgenos alimentarios contribuya al incremento de casos de alergia alimentaria, ya que los individuos susceptibles se exponen a un número creciente de alérgenos potenciales. Pero esta no es la única causa del incremento de la alergia alimentaria en la población desarrollada.

Reacciones adversas a los alimentos: clasificación

Las reacciones adversas a los alimentos pueden dividirse en dos grandes grupos (Committee on Toxicity of Chemical in Food, 2000):

- Las que tienen lugar en cualquier individuo que consume un alimento.
- Las que tienen lugar solo en individuos susceptibles (Figura 32.1).

Las reacciones debidas a alimentos que contienen toxinas, contaminantes microbianos o sustancias con actividad farmacológica no

implican una respuesta alérgica, y aunque existe una variabilidad individual nada desdeñable en cuanto a su sintomatología, si la cantidad de alimento consumido es lo suficientemente alta, suelen aparecer en todos los individuos que consumen el alimento. Algunas de estas reacciones adversas pueden mimetizar los síntomas agudos de la alergia alimentaria. Por ejemplo, la elevada cantidad de histidina presente en el músculo de algunas especies de peces escómbridos se puede convertir *postmortem* en histamina, especialmente si las condiciones de conservación no son las adecuadas. Como consecuencia de su consumo se produce una reacción alérgica aparente debida a la histamina. Esta reacción, sin embargo, no se produce por un mecanismo de tipo alérgico y afectará a cualquiera que consuma este alimento.

Según el consenso más reciente, el término hipersensibilidad a alimentos resulta más adecuado que intolerancia a alimentos, si lo que queremos es referirnos a cualquier reacción adversa y reproducible producida por el consumo de alimentos (Johanson *et al.*, 2001). La hipersensibilidad a alimentos no mediada por mecanismos inmunitarios puede deberse a la existencia de un defecto metabólico en el individuo. En algunos casos se conoce el mecanismo, que implica ya sea la deficiencia de un enzima (intolerancia a la lactosa) o hiperreactividad

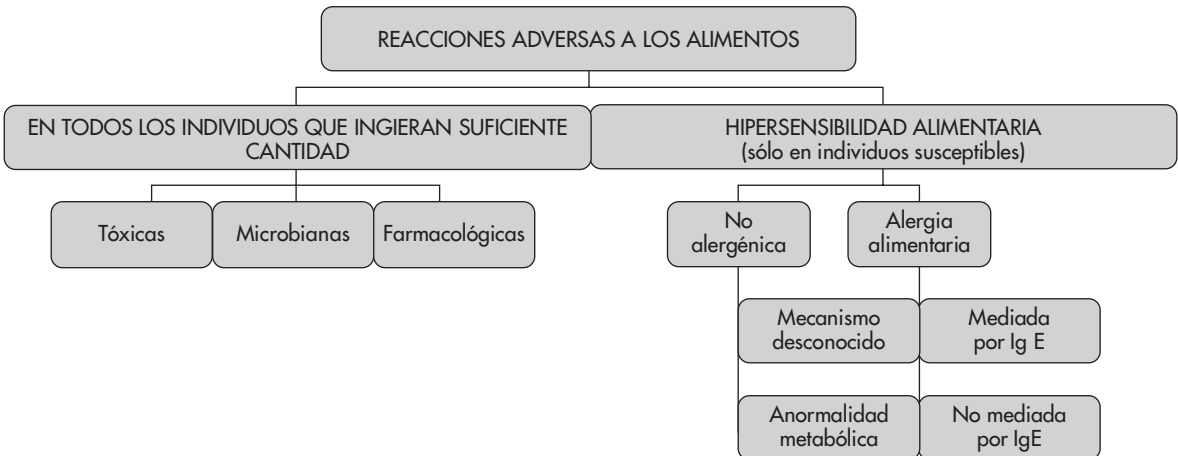


Figura 32.1. Reacciones adversas a los alimentos: clasificación (ILSI, 2003).

frente a sustancias tales como las aminas vasoactivas normalmente presentes en alimentos. En muchos casos, sin embargo, se desconoce el mecanismo de tal hipersensibilidad.

Desde un punto de vista práctico, las alergias alimentarias propiamente dichas deben distinguirse de otros tipos de sensibilidad a alimentos porque pueden suscitar reacciones negativas graves en algunas personas, y porque los individuos alérgicos toleran muy poco la presencia del alimento responsable en su dieta. Por ejemplo, es importante distinguir entre alergia a la leche e intolerancia a la lactosa. La primera puede producir reacciones sistémicas a veces graves, y los individuos alérgicos solo están en condiciones de tolerar cantidades muy pequeñas de leche en la dieta. En cambio, la intolerancia a la lactosa, que obedece a una deficiencia enzimática del intestino delgado solo provoca síntomas gastrointestinales; a menudo las personas que la sufren toleran la presencia de cantidades apreciables de leche en la dieta.

El término alergia alimentaria resulta adecuado solo cuando un mecanismo de tipo inmunitario está implicado en la reacción adversa. A su vez, la alergia alimentaria se subdivide en mediada por inmunoglobulinas E y no mediada por inmunoglobulinas E.

Mecanismos de la reacción alérgica

La alergia se define como una reacción de hipersensibilidad iniciada por mecanismos inmunitarios. Las reacciones alérgicas pueden ocurrir en el lugar de contacto entre el alérgeno y las células del sistema inmunitario (localmente) o a través del cuerpo (sistémicamente).

Un alérgeno es una sustancia extraña al organismo, que al interactuar con el sistema inmunitario provoca una reacción alérgica. Los alérgenos alimentarios son en la mayoría de los casos proteínas o glicoproteínas presentes en los alimentos.

El tracto gastrointestinal posee un elaborado sistema de barrera que incluye mecanismos inmunológicos y no inmunológicos para proteger al organismo frente a alérgenos y otros microorganismos o agentes tóxicos que puedan encontrarse. El endotelio constituye la barrera física, el peristaltismo limita el tiempo de contacto del antígeno, los ácidos del estómago y las enzimas digestivas degradan grandes moléculas en unidades más pequeñas. El componente inmunológico es el tejido linfoide asociado al intestino que incluye: placas de Peyer, macrófagos, mastocitos, células plasmáticas y linfocitos.

La toxicidad (alergenicidad) se atribuye a la anormal sensibilidad del individuo que consume el alimento. Los mecanismos reconocidos de alergia alimentaria son de dos tipos:

1. Hipersensibilidad tipo I o inmediata

También denominada hipersensibilidad mediada por inmunoglobulina E (IgE). Es una respuesta humoral a un antígeno. Las reacciones se producen por la liberación de sustancias farmacológicamente activas (sustancias vasoactivas: serotonina e histamina) a partir de ciertas células efectoras originadas por la interacción del alérgeno con una IgE específica que se adhiere a la superficie de estas células. Es la más comúnmente asociada a la alergia alimentaria y produce síntomas inmediatos. Su forma más severa es la anafilaxis. Los síntomas se manifiestan en la boca, intestino, piel y tracto respiratorio en su forma menos severa. Los antígenos de los alimentos que provocan una respuesta de IgE son principalmente proteínas o glicoproteínas.

2. Hipersensibilidad retardada o tipo IV

Es una respuesta celular a un antígeno, en oposición a las respuestas humorales. No está mediada por IgE, la interacción se produce entre células y mediadores químicos, sin participación conocida de anticuerpos. El alérgeno se une a un linfocito T sensibilizado que induce síntesis de linfoquinas, proliferación de linfocitos y genera-

ción de células citotóxicas T. La respuesta se produce frente a un grupo de alimentos y puede darse conjuntamente con reacciones de tipo inmediato o aisladamente. Los síntomas pueden ser muy variados, afectando a piel, intestino u otros órganos. Estas reacciones retardadas son más difíciles de investigar y diagnosticar que las inmediatas, aunque probablemente jueguen un importante papel en los casos de alergia alimentaria crónica.

Reacciones mediadas por IgE

Los anticuerpos (también conocidos como inmunoglobulinas) son proteínas producidas por los linfocitos B en respuesta a la presencia de proteínas o glicoproteínas extrañas al organismo (antígenos o alérgenos). La IgE producida por linfocitos B tras la exposición al alérgeno circula a través del cuerpo. Ciertas porciones terminales de la molécula de IgE poseen propiedades antígeno-específicas con afinidad por otra zona específica de la molécula del antígeno (conocida como epítipo; muchos alérgenos presentan varios epítipos). La otra porción terminal de la molécula de IgE presenta gran afinidad para unirse a la superficie de los mastocitos (células inmunes). Cuando esto ocurre, se dice que los mastocitos se han sensibilizado frente al alérgeno que provocó la producción de IgE. Una posterior exposición de los mastocitos sensibilizados al mismo alérgeno (o incluso al mismo epítipo presente en otro alérgeno) provoca una reacción alérgica inmediata. La célula libera mediadores químicos que incluyen a la histamina y otras sustancias biológicamente activas, además de sustancias proinflamatorias como leucotrienos y prostaglandinas. Esto provoca una respuesta inflamatoria inmediata, aumentando el flujo de sangre en la zona.

Los mastocitos y los linfocitos T liberan mediadores que estimulan a los linfocitos B a producir mayores cantidades de IgE. Los linfocitos T producen a su vez mediadores que estimulan a los eosinófilos a migrar a la zona afectada. Estos, una vez activados, son capaces de liberar potentes sustancias tóxicas para las células, inten-

sificando el daño. Los mastocitos están repartidos por debajo de la superficie de la piel y mucosas (boca, intestino, ojos, nariz y tracto respiratorio). Estrechamente relacionados están los basófilos, que circulan por la sangre y se pueden sensibilizar exactamente igual que los mastocitos.

Los alimentos contienen numerosas sustancias que son alérgenos potenciales, pero la alergia alimentaria parece ser menos común que la alergia frente a sustancias inhaladas. El intestino supone una barrera defensiva importante no solo para los alérgenos sino también para otras sustancias potencialmente dañinas y para los microorganismos. La pared intestinal está recubierta de una sustancia mucosa que contiene a su vez sustancias protectoras como determinadas formas de IgA e IgM que se modifican para permitir su secreción a través del mucus e impiden la entrada de alérgenos solubles. Este proceso se conoce con el nombre de exclusión inmune.

La pared intestinal es también un componente importante de este sistema defensivo, ya que contiene un elevado número de linfocitos; la mayoría de ellos se encuentran en áreas especializadas, constituyendo las denominadas placas de Peyer. Repartidas en la superficie de las placas se encuentran células especializadas presentadoras de antígenos, conocidas como células M. A través de ellas los antígenos presentes en el lumen intestinal pueden tomar contacto con el tejido linfoide de las placas de Peyer.

La respuesta generada tras la primera exposición al antígeno a través del intestino puede producir tres situaciones diferentes (ILSI, 2003):

- El individuo se hace tolerante al antígeno y no se produce respuesta inmune alguna tras sucesivas exposiciones. Este fenómeno no se comprende aún bien, pero es la situación habitual para la gran mayoría de las proteínas y glicoproteínas.
- El individuo puede desarrollar una respuesta inmunitaria con inmunidad mediada por células e inmunoglobulinas como la IgG, que pueden ser recurrentes tras sucesivas exposiciones, pero no necesariamente tienen que producir síntomas.

- El individuo se sensibiliza produciendo IgE; en sucesivas exposiciones se desencadenan los síntomas.

Algunos recién nacidos están ya sensibilizados frente a ciertos alérgenos como los cacahuetes, leche o huevo y parece ser que esta sensibilización ocurre por exposición en el útero. Así, la dieta de la madre durante el embarazo parece que puede jugar un papel importante para el desarrollo posterior de la alergia alimentaria. Los antígenos de los alimentos también pueden pasar de la madre al niño a través de la leche materna, produciendo sensibilización a edades tempranas.

Hay que tener en cuenta que la unión antígeno-anticuerpo es específica, pero implica solo al epítipo, no a la molécula completa del antígeno. Otro antígeno con un epítipo muy similar puede interactuar con el mismo anticuerpo dando lugar a lo que se conoce como reactividad o alergenidad cruzada: reacción en un individuo tras exposición a un segundo antígeno tras sensibilización frente a un primero. Como los animales y plantas descienden de troncos comunes, a mayor grado de cercanía en su evolución mayor grado de similitud en sus proteínas constitutivas. Esto explica por qué es tan frecuente la alergenidad cruzada entre diferentes clases de crustáceos (gambas, cangrejos, langosta, etc.) o para leches de diferentes animales (vaca, oveja, cabra). Asimismo, es común que la alergia al látex y a ciertas frutas y hortalizas (castaña, aguacate) se presente en ciertos individuos como otro caso más de alergenidad cruzada debido a que tienen en común la enzima quitinasa, que protege a las plantas frente a las invasiones de plagas de insectos. Muchos pacientes que presentan alergia al polen también son alérgicos a algunas frutas o verduras como peras, manzanas, zanahorias, cerezas, etc.

Manifestaciones clínicas

Varían mucho en cuanto a localización, severidad y tiempo de aparición desde la ingestión del

alérgeno. Van desde una simple urticaria hasta anafilaxis, que puede ser fatal (Tabla 32.1).

Los órganos primarios afectados incluyen la piel, el tracto gastrointestinal y el aparato respiratorio. Los efectos sobre el sistema nervioso central están menos documentados, a excepción de las migrañas. Un mismo alimento puede dar lugar a diferentes síntomas, pero al mismo tiempo los mismos síntomas pueden tener diferentes orígenes.

Cualquiera de los síntomas causados por una alergia alimentaria puede estar potencialmente causado por otras formas de alergia (pólenes, ácaros,...). Así, ningún síntoma por sí mismo es concluyente para el diagnóstico de una alergia alimentaria.

Como consecuencia, resulta complicado establecer relaciones causa-efecto entre alimento implicado y síntomas. Otras reacciones reproducibles de hipersensibilidad alimentaria ocurren más lentamente y entonces su relación con el

Tabla 32.1. Manifestaciones clínicas de la alergia alimentaria.

Síntomas orofaríngeos/abdominales
Síntomas cutáneos
Síntomas respiratorios
Náusea y dolores abdominales
Vómitos
Diarrea
Cólicos
Síntomas cutáneos
Urticaria
Prurito
Angioedema
Eritema
Dermatitis atópica
Conjuntivitis
Síntomas respiratorios
Rinitis
Edema laríngeo
Asma
Tos
Síndrome inducido por la leche con enfermedad respiratoria (síndrome de Heiner)
Síntomas neurológicos
Migrañas
Síntomas sistémicos
Anafilaxis

alimento es todavía más difícil de establecer (caso de las enteropatías inducidas por alimentos, colitis o eccema).

Hay que señalar que en determinados casos la sensibilización inicial puede producirse por alérgenos inhalados o de otro tipo no alimentario. El desarrollo posterior de alergia alimentaria se produce por reactividad cruzada.

La *anafilaxis* o *anafilaxia*, inducida por alimentos es una reacción inmunitaria aguda, a menudo grave y a veces letal, que suele presentarse dentro de un lapso de tiempo limitado tras la exposición a un antígeno. La más peligrosa es la anafilaxis sistémica, que causa dolor abdominal, náusea, vómito, cianosis, hipotensión arterial, angioedema, dolor torácico, urticaria, diarrea y muerte. Los cacahuets son la causa más común de muerte por anafilaxis. Otros alimentos como los restantes frutos secos, la soja, las semillas de sésamo, huevos y algunas especias pueden producir anafilaxis. Algunos individuos pueden padecer anafilaxis inducida por el ejercicio, en la que ciertos alimentos como moluscos, cebada o trigo producen anafilaxis solo cuando se realiza ejercicio físico tras la ingestión.

El síndrome alérgico de manifestación oral incluye escozor, picor inflamación y enrojecimiento de los labios boca y parte superior de la garganta en los minutos siguientes a la ingestión del alimento. Es común para ciertos casos de frutas como las fresas y habitualmente está ligado a reactividad cruzada al polen de la especie vegetal en cuestión.

El síndrome intestinal consiste en náusea, vómitos, dolor abdominal y diarrea aguda y no suele ocurrir de forma aislado sino asociado a otros síntomas (respiratorios y dérmicos).

Los ataques agudos de urticaria y angioedema suelen ocurrir conjuntamente con otros síntomas respiratorios o gastrointestinales. Por otro lado, en ciertos individuos susceptibles se puede producir urticaria como resultado de hipersensibilidad a ciertos colorantes alimentarios (tartrazina o sulfitos). Aunque los síntomas son idénticos, no se trata de una verdadera alergia alimentaria, sino de un efecto de tipo farmacológico que induce la liberación de mediadores

químicos que también están involucrados en los fenómenos alérgicos.

Algunas condiciones patológicas asociadas a la alergia alimentaria incluyen la enfermedad celíaca, gastroenteritis eosinofílica, dermatitis atópica o el asma. En la enfermedad celíaca, también conocida como enteropatía por gluten, no se conoce la causa primaria pero sin duda existe una respuesta alérgica retardada como componente de la enfermedad. Muchos pacientes que padecen dermatitis atópica presentan elevados niveles de IgE en sangre y resultados positivos en las pruebas de sensibilización dérmica frente a numerosos alérgenos alimentarios. Por definición, los pacientes con dermatitis atópica tienden a producir grandes cantidades de IgE frente a bajas dosis de alérgenos. De todas maneras, la alergia a algún alimento (o grupo de alimentos) en particular es raramente el factor único implicado en la aparición de la dermatitis atópica (Leung y Bieber, 2003).

Naturaleza de los alérgenos alimentarios

Los alérgenos alimentarios más comunes se presentan en alimentos con alto contenido en proteínas, sobre todo los de origen vegetal o marino. Además de factores genéticos, medioambientales y de exposición relativa, la naturaleza molecular, en especial la conformación espacial del alérgeno juega un papel importante en el desarrollo de las alergias alimentarias. La mayoría de los alérgenos conocidos están involucrados en reacciones mediadas por IgE.

En los últimos años, gracias a las técnicas de biología molecular se han podido caracterizar muchos alérgenos alimentarios a nivel molecular, lo que ha supuesto un mayor grado de comprensión de la inmunopatogénesis de la alergia alimentaria, así como de su diagnóstico y tratamiento (Sampson, 2004).

Hay muchas proteínas presentes en alimentos muy diversos que se conocen están implica-

das en reacciones alérgicas, pero solo unas pocas han sido aisladas y caracterizadas.

Los alimentos más frecuentemente implicados en orden de importancia son:

- En niños: leche de vaca, huevo, soja, cacahuetes, frutos secos de árboles, pescado y crustáceos.
- En adultos: cacahuetes, frutos secos de árboles, crustáceos, pescado y huevo.

La rama europea del ILSI (Bousquet *et al.*, 1998) llegó a la conclusión de que para incluir un alérgeno alimentario en la lista de alérgenos comunes se deben dar dos circunstancias:

- Que se hayan realizado pruebas doble-ciego y control de placebo controlado (DCPC).
- Que exista información detallada de anafilaxis fatal o grave donde el alimento en cuestión esté claramente implicado.

Una lista completa de los grupos de alimentos que contribuyen al desarrollo de alergia alimentaria mediada por IgE aparece en la Tabla 32.2. Los alimentos están clasificados en nueve grupos diferentes, con independencia de que se puedan ir agregando nuevos grupos. Así, la aparición de nuevas alergias frente a alimentos recientemente introducidos en la dieta occidental: kiwi, papaya, mango, hará que se revise de nuevo esta lista.

Hay que tener en cuenta que la sensibilidad frente a un alérgeno alimentario varía mucho de un individuo a otro e incluso es diferente para un mismo individuo en distintas situaciones. Es así difícil hablar de un valor umbral que provoque la reacción adversa

La correcta clasificación de alérgenos en grupos permitirá hacer previsiones sobre alergenicidad cruzada, cuando existan epítomos similares, por ejemplo entre el polen determinadas especies vegetales y ciertas frutas (Papageorgiou, 2002)

El tratamiento térmico puede afectar a la alergenicidad de los alimentos. Como las proteínas poseen estructura tridimensional, los epítomos son en gran parte de los casos de tipo conformacional con una estructura espacial determinada. Los epítomos conformacionales se forman a partir de una serie de segmentos de la cadena polipeptídica (que pueden estar distantes en la secuencia lineal de aminoácidos) que se agrupan en el espacio al plegarse la molécula y adoptar su estructura tridimensional. Los cambios que se producen en la estructura de la proteína tras el calentamiento afectan al epítomo, perdiéndose así las propiedades alérgicas. Hay otro tipo de epítomos denominados lineales, que son estables frente al tratamiento térmico y en los cuales el epítomo es una secuencia lineal de la cadena polipeptídica. La desnaturalización de la proteína provoca, pues, en muchos casos la desaparición de la alergenicidad, pero no en todos.

Tabla 34.2. Clasificación de los alérgenos alimentarios (adaptado de Bousquet *et al.*).

GRUPO	ALIMENTOS	DCPC	REACCIÓN FATAL	ANAFILAXIS
1	Trigo y otros cereales	Sí	No	Sí
2	Crustáceos, moluscos	Sí	Sí	Sí
3	Huevos	Sí	Sí	Sí
4	Pescado	Sí	Sí	Sí
5	Cacahuete, soja, otras leguminosas	Sí	Sí	Sí
6	Leche	Sí	Sí	Sí
7	Frutos secos	Sí	Sí	Sí
8	Semillas de sésamo y otras semillas	Sí	Sí	Sí
9	Frutos en drupa (ciruelas), apio, arroz	No	No	Sí

Asimismo, el tratamiento térmico puede conducir a la formación de nuevos alérgenos que no estaban presentes en la materia prima. Esto se debe a que los cambios conformacionales pueden poner de manifiesto la existencia de un epítipo «escondido».

1. Leche de vaca

Es la alergia más común y la más conocida; es común en niños de corta edad y causa, además de los síntomas característicos de la alergia, otras reacciones adversas como intolerancia a la lactosa. Aparece en un 0,5-4% de los niños recién nacidos, debido a que las proteínas de la leche son los primeros antígenos con los que se enfrenta el recién nacido. Los síntomas más comunes incluyen eccema y urticaria.

Los alérgenos de la leche de vaca son proteínas. La β -lactoglobulina estimula la máxima producción de inmunoglobulina E, aunque solo supone el 10% de la proteína total. Su potencia como alérgeno puede deberse a que es el único tipo de proteína de la leche de vaca que no está presente en la leche humana y presenta cierta resistencia a la digestión en el estómago, permitiendo que cierta parte pueda absorberse sin ser totalmente degradada.

Las estrategias para evitar estos síntomas pasan por utilizar hidrolizados proteicos, que presentan menor alergenicidad.

2. Alérgenos en alimentos de origen vegetal

No todas las proteínas que contenga un alimento presentarán propiedades alergénicas. Los vegetales de la dieta contienen miles de proteínas diferentes. Así, para los alimentos de origen vegetal se ha comprobado (Mills *et al.*, 2003) que las proteínas que disparan una reacción alérgica a través del tracto gastrointestinal pertenecen casi exclusivamente a tres superfamilias: prolaminas (que incluyen las prolaminas de reserva de los cereales, las proteínas de transporte de lípidos de carácter no específico, los inhibidores de la α -amilasa y 2S albúminas), cupinas (determinadas globulinas de reserva,

presentes en la soja y otras leguminosas) y las proteínas de defensa que permiten a las plantas resistir el estrés biótico y abiótico (proteasas de cisteína) (Breiteneder y Radauer, 2004).

3. Alérgenos de origen marino

Las reacciones alérgicas tras el consumo de alimentos marinos son frecuentes. Los síntomas más habituales incluyen enrojecimiento de la piel, eccema e inflamación de labios y garganta. También, aunque en menor medida, se pueden producir síntomas respiratorios y gastrointestinales. Además, se han descrito casos de alergia ocupacional en trabajadores de empresas de transformación de pescados y mariscos.

La tropomiosina es el principal alérgeno encontrado en moluscos y crustáceos (Lehrer *et al.*, 2003). Curiosamente la tropomiosina también ha sido identificada como un alérgeno importante en otros invertebrados como los ácaros del polvo doméstico. Diferentes regiones de la molécula de tropomiosina pueden unirse a la IgE; en concreto se han identificado 5 regiones en la tropomiosina de la gamba que contiene 8 epítipos. Las mutaciones de estos epítipos alergénicos de la gamba y otros crustáceos podrán reducir su alergenicidad.

Tratamiento

La inmunoterapia para tratar enfermedades mediadas por IgE se ha utilizado desde principios del siglo pasado y sigue estando indicada para pacientes con rinitis alérgica y asma por alérgenos ambientales. Por el contrario, la inmunoterapia con inyección del antígeno para desensibilizar a individuos con alergia alimentaria no se recomienda debido al riesgo de anafilaxis por la elevada capacidad que presentan los alérgenos alimentarios puros para unirse a la IgE. Por ello, el único tratamiento posible hasta el momento sigue siendo la eliminación del alimento (o grupo de alimentos) de la dieta. Esto no está exento de problemas, ya que la industria alimentaria suele utilizar muchos alimentos de

elevado potencial alergénico (cacahuets, soja, huevos, etc.) en la formulación de sus productos. En este sentido, es de particular interés para la población alérgica la información que aparece en las etiquetas de los alimentos. Existen páginas web que dan excelente información a los pacientes sobre cómo evitar situaciones de riesgo (<http://www.foodallergy.org>).

Los antihistamínicos pueden mejorar los síntomas de la alergia alimentaria con manifestación oral o epidérmica, pero no bloquean las reacciones sistémicas. Los corticosteroides también se utilizan para casos de desórdenes crónicos mediados por IgE (dermatitis atópica o asma).

Las nuevas estrategias para el tratamiento de alergias alimentarias pasan por inmunoterapia oral, inmunoterapia con alérgenos recombinantes o alteración de la proteína del alimento mediante ingeniería genética. Teóricamente, la terapia con anticuerpos anti-IgE sería de utilidad frente a múltiples alérgenos alimentarios, aunque tendría que administrarse indefinidamente para mantener su eficacia (Sampson, 2004). Este tipo de terapia se ha probado con éxito para tratar la alergia a los cacahuets (Leung *et al.*, 2003).

La prevención pasa en la actualidad por estimular las campañas de lactancia materna, para prolongarla hasta los 3-6 meses, ya que se ha comprobado que disminuye así el riesgo de enfermedad atópica. La Academia Americana de Pediatría recomienda en la actualidad que los bebés de alto riesgo (por antecedentes familiares de alergia alimentaria) sean exclusivamente alimentados con leche materna y que la introducción de alimentos sólidos se retrase hasta los 6 meses. Los principales alérgenos como cacahuets, frutos secos y alimentos marinos deben introducirse pasados los 3 años.

Etiquetado de los alimentos alérgicos

Para el consumidor que presenta alergia alimentaria resulta importante tener información com-

pleta sobre alérgenos potenciales que puede contener un alimento. La propuesta de modificación de la Directiva de la Unión Europea 2000/13/EC (European Commission, 2002) tiene previsto abolir la denominada regla del 25%, que significa que para algunos productos no es necesario detallar todos los ingredientes si estos suponen menos del 25% del peso final del alimento. La modificación propone que para cualquier alimento se detallen todos y cada uno de sus ingredientes, aún estando presentes en cantidades mínimas, lo que sin duda puede dar lugar a etiquetas demasiado prolijas, sobre todo si tienen que figurar en varios idiomas.

Si se conocieran con exactitud los umbrales de respuesta de los alérgenos, el problema del etiquetado quedaría en parte resuelto. La propuesta de modificación también contiene una lista de ingredientes capaces de causar alergias u otro tipo de reacción adversa demostrable. Los alimentos e ingredientes de esta lista concuerdan con los propuestos en la lista de alérgenos comunes de la Comisión del Codex Alimentarius (1999) y de la FDA (FDA, 2001).

La lista de ingredientes que deben aparecer en la etiqueta es como sigue:

- Apio.
- Cereales que contienen gluten y sus productos derivados.
- Crustáceos y derivados.
- Huevos y derivados.
- Pescados y derivados.
- Leche y productos lácteos (incluyendo lactosa).
- Mostaza y productos derivados.
- Nueces y productos derivados.
- Cacahuets y derivados.
- Sésamo y derivados.
- Soja y derivados.
- Sulfitos a concentraciones de al menos 10 ppm.

Hay dos maneras de proteger al consumidor alérgico: informándole de la composición de los alimentos (etiquetado) y asegurarle que el alérgeno no está presente en el alimento. La ausencia total de un alérgeno en un alimento es difícil

de asegurar debido a las prácticas habituales en la industria alimentaria, que tienden a no separar las líneas de producción y a fabricar diversos productos con idéntica maquinaria. Las buenas prácticas de fabricación en la industria alimentaria pueden contribuir a que alérgenos indeseables no pasen de un producto a otro. Las recomendaciones generales para la industria alimentaria pasan asimismo por restringir el uso de ingredientes como cacahuetes o frutos secos o cualquiera de los incluidos a la lista de alérgenos siempre que no sean esenciales para el producto en cuestión.

Por otro lado, sigue poniéndose en cuestión la oportunidad de que aparezcan frases como «sin gluten» o «libre de cacahuetes» en las etiquetas de los alimentos como garantía de ausencia de un alérgeno. En la práctica resulta imposible garantizar la ausencia de un alérgeno, pero se puede garantizar la presencia de muy bajas cantidades. Una declaración positiva parece más adecuada, incluyendo todos los alérgenos, aunque estén presentes en bajísimas concentraciones.

Métodos de análisis de proteínas alergénicas en alimentos

Los requerimientos para una adecuada detección de proteínas con potencial alergénico son (Krska *et al.*, 2004):

- Sensibilidad suficiente para detectar cantidades traza de las proteínas alergénicas. Hay un consenso general que el límite de detección (LOD) para alérgenos en diferentes alimentos debe estar entre 1 y 100 mg/kg.
- Especificidad adecuada para detectar proteínas alergénicas en matrices alimentarias, incluyendo alimentos procesados.
- Instrumentación sencilla y fácil de usar por personal no experto.
- Para uso industrial resulta interesante que el análisis se pueda efectuar *on line*.

En la actualidad no existe ningún test predictivo para identificar y ordenar la potencia alergénica de las diferentes proteínas ni tampoco existe el conocimiento suficiente para relacionar estructura con alergenicidad con vistas a realizar predicciones. Esto sería de gran interés en el caso de las nuevas proteínas derivadas de la biotecnología.

Casi todos los alérgenos son proteínas o glicoproteínas, y aunque las masas moleculares de los polipéptidos suelen oscilar entre 5 y 70 kDa, sin embargo muchos alérgenos son oligómeros con masas moleculares mayores de 200 kDa (Besler *et al.*, 2000).

Son de elección los métodos inmunoanalíticos debido a alta especificidad y sensibilidad de los anticuerpos (Poms *et al.*, 2004). Son los que se utilizan en los laboratorios de las industrias alimentarias y en los controles oficiales para detectar y cuantificar los alérgenos presentes en alimentos. La selección del anticuerpo resulta crucial en cualquier método inmunoanalítico. La determinación de la alergenicidad de un alimento se basa por lo general en su capacidad para unirse a IgE específicas procedentes de suero humano de individuos sensibilizados con una sintomatología clínica clara asociada con la exposición. Una vez que se han identificado y purificado los alérgenos, se pueden obtener anticuerpos a partir de animales de experimentación como conejos, ratas, cabras o pollos para poderlos usar en análisis rutinario de alimentos.

Otros métodos alternativos son las técnicas basadas en PCR (reacción en cadena de la polimerasa); aunque su uso es aún limitado, resultan ser de elección cuando no se dispone de anticuerpos adecuados. Esta técnica tiene ciertas limitaciones (fragmentación excesiva del ADN, inhibidores de la PCR,...), pero se pueden analizar alérgenos en concentraciones menores de 10 ppm (Holzhauser *et al.*, 2002; Koeppel *et al.*, 1998).

Bibliografía

Besler M, Elsayed S, Helbling A (2000). Allergen Data Collection- Update (<http://www.food-aller->

- gens.de). *Internet Symposium on Food Allergens* 3: 37-53.
- Bousquet J, Björkstén B, Brujinzeel-Koomen CAFM, Hugget A, Ortolani C, Warner JO *et al* (1998). Scientific criteria and the selection of allergenic foods for product labelling. *Allergy* 53: 3-21.
- Breiteneder H, Radauer C (2004). A classification of plant food proteins. *J Allergy Clin Immunol* 113: 821-830.
- Codex Alimentarius Commission (1999). Food labelling: complete texts. Joint FDA/WHO Food standards Programme (Rome: FAO/WHO).
- Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment (2000). Adverse reactions to food and food ingredients. London Food Standards Agency. <http://www.foodstandards.gov.uk/science/ouradvisors/toxicity/reports/foodreactions>
- European Commission (2002). Food without fear: amended food labelling directive allows consumers to discover details on allergens. Press release IP/02/1680, 14 November 2002.
- FDA, Food and Drug Administration (2001). Compliance Policy Guide. Sec. 555. 250 Statement of Policy for labelling and Preventing Cross-contact of Common Food allergens (Washington, DC:FDA).<http://www.fda.org>
- Helm RM, Burks AW (2000). Mechanisms of Food Allergy. *Current Opin Immunol* 12: 647-653.
- Holzhauser T, Stephan O, Vieths S (2002). Indirect competitive ELISA for determination of traces of peanut (*Arachis hipogea* L.) protein in complex food matrices. *J Agricul Food Chem* 50: 5808-5815.
- ILSI (Internacional Life Sciences Institute) (2003). *Food Allergy*. ILSI Europe Concise Monograph Series. William F Jackson Ed. ILSI Europe, Bélgica.
- Johansson SGO, Hourihane JOB, Buosquet J (The EACCI Nomenclature task force) (2001). A revised nomenclature for allergy (position paper). *Allergy* 56: 813-824.
- Koeppel E, Stadler M, Luethy J, Huebner P (1998). Detection of wheat contamination in oats by polymerase chain reaction (PCR) and enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA). *Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung A* 206: 399-403.
- Krska R, Welzig E, Baumgartner S (2004). Immunanalytical detection of allergenic proteins in food. *Anal Bioanalytical Chem* 378: 63-65.
- Lehrer SB, Ayuso R, Reese G (2003). Seafood Allergy and Allergens: a review. *Marine Biotechnology* 5: 339-348.
- Leung DYM, Bieber T (2003). Atopic dermatitis. *Lancet* 361: 151-160.
- Leung DYM, Sampson HA, Yunginger JW, Burks AW, Schneider L, Wortel CH (2003). Effect of anti IgE therapy in patients with peanut allergy. *New Eng J Med* 348: 986-993.
- Mills ENC, Madsen C, Shewry PR, Wichers HJ (2003). Food allergens of plant origin: their molecular and evolutionary relationships. *Trends in Food Science and Technology* 14: 145-156.
- Papageorgiou PS (2002). Plant food allergens: clinical aspects of food allergy. *Biochemical Society Transactions* 30: 901-906.
- Poms RE, Klein CL, Anklam E (2004). Methods for allergen analysis in food. *Food Additives Contaminants* 21(1): 1-31.
- Sampson HA (1999). Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol* 103: 717-728.
- Sampson HA (2004). Update to food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 113(5): 805-819.

Arturo Hardisson, Dailos M. González Weller

Introducción. Mecanismos de la carcinogénesis química. Nutrientes y cáncer. Compuestos cancerígenos. Prevención de los riesgos de exposición a carcinógenos. Bibliografía.

Introducción

El cáncer es una enfermedad que el ser humano conoce desde hace miles de años, y en el siglo I se empieza a reconocer como tal. La primera referencia de la que se tiene constancia data de más de 2000 años a. de C., en el Ramayana hindú (Serra, 1995; Melgar, 1998).

Hace 200 años, aproximadamente, es cuando se descubre que ciertos agentes contaminantes que estaban presentes en el ambiente eran capaces de provocar ciertas formas o tipos de cáncer. Este hecho se puso de manifiesto al observar la relación que existía entre la aparición de cáncer de escroto en deshollinadores de Londres con su exposición al hollín y alquitrán de hulla. No obstante, esta relación no se pudo confirmar hasta 1916, cuando se observa que tras la aplicación de alquitrán de hulla en orejas de conejo, en estos se desencadenaba un cáncer de piel.

A partir de este momento se empiezan a realizar distintos estudios sobre el cáncer, hasta que

en el siglo XX se comienzan a tener evidencias del papel de la dieta en la etiopatogenia del cáncer (Serra, 1995).

En 1984, a raíz de la clasificación de los factores de riesgo asociados al cáncer, hecha por el Instituto Nacional del Cáncer de EE UU (Tabla 33.1), y al analizar los datos epidemiológicos de los riesgos evitables de cáncer en EE UU, se llega a la conclusión de que los factores alimentarios eran la primera causa, con un 35% de porcentaje relativo. Dejando a un lado la exposición al tabaco, responsable de un 30% de las muertes por cáncer, se ve cómo la dieta lo es de prácticamente la mitad de las restantes (Farré, 1996).

Actualmente existen recomendaciones dietéticas para la prevención del cáncer basadas en estudios epidemiológicos sobre dietas y estilos de vida, que en algunos casos se vienen desarrollando desde hace 30 años (Wargovich y Cunningham, 2003).

Por lo tanto, el cáncer representa un problema de salud de importante consideración, siendo el factor alimentario el principal factor de riesgo asociado a la aparición de esta enfermedad.

Tabla 33.1. Factores de riesgo ligados al cáncer (Agencia Internacional de Investigación en Cáncer, 1999).

Factor de riesgo	Porcentaje relativo
Factores alimentarios	35%
Tabaco	30%
Causas mal conocidas	16% (6% factores genético-hereditarios)
Virus	5%
Factores laborales	4%
Radiación actínica	3%
Alcohol	3%
Contaminación ambiental	3%
Aditivos alimentarios	1%
Fármacos y procedimientos médicos	1%

Mecanismos de la carcinogénesis química

Debido a que determinados componentes químicos de los alimentos pueden favorecer la mutación de células sanas, con el consiguiente desarrollo de la enfermedad, en este apartado se tratará de profundizar en el modo de actuar de los carcinógenos químicos.

Una de las principales teorías que tratan de explicar el fenómeno de la carcinogénesis sostiene que la transformación cancerosa se debe a la aparición de una serie de mutaciones sucesivas, producidas por determinados agentes carcinógenos (Ballesta, 1991). Un carcinógeno se podría definir como cualquier agente que induce neoplasias que generalmente no se observan de modo natural, la pronta aparición de neoplasias, o de un gran número de tumores (Melgar, 1998).

Una forma de clasificar los agentes carcinógenos es la siguiente: *sustancias genotóxicas*, capaces de producir daños o modificaciones en el ADN; *sustancias epigenéticas*, las que ejercen el efecto oncogénico por medio de otro con acción genotóxica.

En la Tabla 33.2 se recoge, de manera más detallada, esta clasificación de los carcinógenos.

La carcinogénesis química es un proceso que consta de diferentes etapas. En la primera (etapa

de iniciación) se produce una alteración rápida e irreversible de la célula, dejando a esta dispuesta para un posterior desarrollo del proceso neoplásico. La mayoría de las sustancias que actúan como iniciadores son mutagénicos y por eso se les califica de carcinógenos genotóxicos. Estos iniciadores suelen ser sustancias fuertemente electrofílicas que se unen covalentemente con zonas nucleofílicas de macromoléculas celulares como péptidos, proteínas, ARN y ADN. Esta unión con el ADN es considerada como una fase crítica en el inicio de la formación tumoral. Por lo tanto, esta primera fase se produce cuando un carcinógeno altera la información genética de la célula (ADN) (Serra, 1995). En muchas ocasiones los carcinógenos que actúan como iniciadores han de sufrir un proceso de activación metabólica, proceso que se lleva a cabo mediante la actuación de diversas enzimas presentes en retículo endoplásmico.

La siguiente etapa es la de la promoción, etapa en la que se desencadena la proliferación de células precancerosas. Los agentes promotores no son considerados en sí mismos sustancias carcinógenas, pero son capaces de aumentar la incidencia de cáncer cuando ya han actuado los agentes iniciadores. Generalmente no son sustancias electrofílicas y no se enlazan al ADN. Su mecanismo de acción, si bien no está bien establecido, parece que se lleva a cabo produciendo una anulación de los proce-

Tabla 33.2. Clasificación de carcinógenos (Melgar, 1998).

Carcinógenos genotóxicos	Ejemplos
Carcinógenos primarios (acción directa)	Agentes alquilantes
Procarcinógenos (requieren activación)	Benzo(a)pireno Cloruro de vinilo Dimetilnitrosamina (DMN)
Inorgánicos	Níquel Cromo Arsénico
Carcinógenos epigenéticos	Ejemplos
Estado sólido	Plásticos, asbestos
Hormonas	Estrógenos, andrógenos
Inmunosupresores	Análogos de purina
Cocarcinógenos	Éster de forbol Catecol
Promotores	Éster de forbol Ácidos biliares Compuestos organoclorados Sacarina, medicamentos

sos de inhibición del desarrollo y del crecimiento celular.

Diversos factores, incluyendo los dietéticos, pueden estimular o inhibir este proceso a distintos niveles (Serra, 1995).

Una vez que se han activado estas dos etapas fundamentales, el proceso conduce hacia la aparición de células neoplásicas que se independizan de los controles biológicos normales. Estas células neoplásicas desencadenan la formación de un tumor, que puede ser benigno (su estructura no se diferencia en gran manera del tejido de origen, crece lentamente sin infiltrarse, permaneciendo encapsulado por una capa de tejido conjuntivo), o mediante una tercera etapa de progresión, acaba por desarrollarse un tumor maligno (su estructura celular es muy diferente a la del tejido originario, presentando grandes aberraciones nucleares y cromosómicas que crecen rápidamente y que pueden invadir tejidos circundantes e incluso por vía linfática o sanguínea colonizar otros tejidos) que puede desembocar en un proceso

de metástasis (Ballesta, 1991; Serra, 1995; Melgar, 1998).

No obstante, se ha demostrado que tras una única exposición a un agente carcinógeno rara vez se desarrolla cáncer. Esto se debe a un mecanismo de reparación del ADN que posee la célula y que le permite eliminar la parte dañada. Para que este proceso sea eficaz, el mecanismo de reparación debe activarse antes de que ocurra la división celular, ya que en caso contrario, tras la replicación del ADN se introducirán las bases erróneas (Melgar, 1998).

En la Figura 33.1, se muestra un esquema del proceso de carcinogénesis química.

Nutrientes y cáncer

Durante muchos años se han tenido pruebas de que la incidencia de la mayoría de los cánceres comunes podría reducirse mediante la modificación de las prácticas dietéticas, por lo que se ha

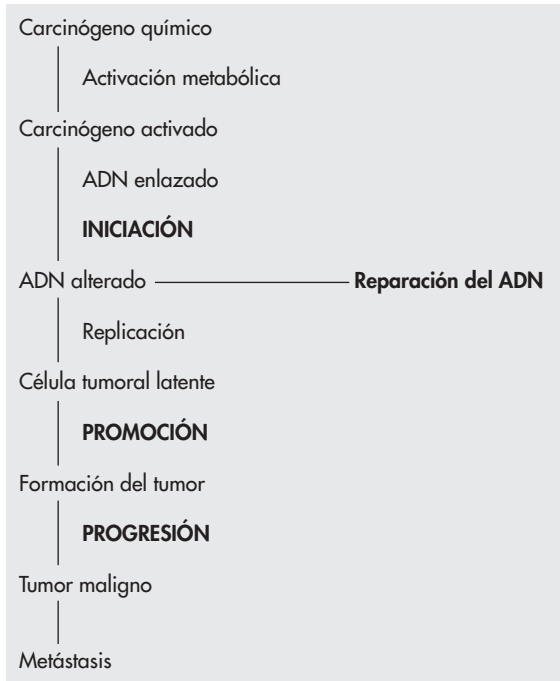


Figura 33.1. Esquema del proceso de carcinogénesis química.

llegado a la conclusión de que muchos de los nutrientes que contienen los alimentos son capaces de favorecer o inhibir la carcinogénesis (Doll y Peto, 1989).

Una variación en la composición de la dieta parece ejercer mayor influencia sobre la morbilidad por cáncer que los aditivos alimentarios, los productos químicos de uso industrial, la actividad laboral, la polución y otros factores de riesgo que la población en general considera más peligrosos (Farré, 1996).

No obstante, evaluar los factores etiológicos de origen alimentario que puedan desencadenar o estar implicados en un proceso canceroso es complicado, ya que pueden influir otros aspectos como tiempo de exposición, edad, hábitos alimentarios, características genéticas, etc.

Por lo tanto, a la hora de plantear nuevas investigaciones relacionadas con alimentación y cáncer deberían tenerse en cuenta los siguientes factores metodológicos: método de valoración de dietas capaz de proporcionar una información más completa sobre la energía ingerida y el

mayor número de nutrientes; adaptar el método a los hábitos alimentarios y culturales locales; que el método se adapte al nivel de educación de los sujetos objeto de estudio; marcadores bioquímicos de la ingesta de nutrientes, marcadores de características genéticas individuales, etc.

Los elementos que están presentes en la dieta pueden afectar a la incidencia del cáncer en diferentes estadíos. Estos se resumen en la Tabla 33.3.

Por lo tanto, los nutrientes que se ha demostrado participan como reguladores en el cáncer experimental abarcan varios tipos de grasas, de hidratos de carbono, incluyendo fibras, las proteínas, varias vitaminas como el retinol, el ácido l-ascórbico y a-tocoferol, varios minerales como el selenio, el zinc, el hierro, el yodo, así como diferentes fitoquímicos, antioxidantes o no, como el β -caroteno. Aparte de estos nutrientes, otros componentes o factores de la dieta que están relacionados con la etiopatogenia del cáncer serían el alcohol, las dietas ricas en alimentos ahumados, adobados y salados, las calorías totales ingeridas y el peso corporal (Serra, 1995; Chávez *et al.*, 2002).

1. Grasas

Los estudios en animales de experimentación muestran un efecto de los lípidos sobre la carcinogénesis y apoyan un papel promotor de los mismos. Las dietas con altos contenidos en grasas se asocian con una alta incidencia de cáncer de colon, de vesícula, posmenopáusico de mama y de endometrio, pero estas conclusiones derivan de estudios ecológicos de correlación poblacional entre ingesta *per capita* de grasa y estadísticas de mortalidad e incidencia que no han sido corroboradas en estudios etiológicos. En esta incidencia es importante tanto la calidad como la cantidad de la grasa. Estudios realizados en animales de experimentación demuestran que aquellos alimentados con dietas de alto contenido en grasas insaturadas presentan mayor incidencia de tumores que los que reciben grasas saturadas (Serra, 1995; Cortina, 1996; Melgar, 1998; Cueto *et al.*, 2001).

Tabla 33.3. Estadios en que la dieta afecta la incidencia de cáncer (Doll y Peto, 1989; Melgar Riol, 1998).

Estadios	Ejemplos
1. Ingestión de carcinógenos alimentarios o de sus precursores	Carcinógenos en alimentos naturales (productos vegetales). Carcinógenos producidos en la cocción (alimentos ahumados). Aflatoxinas. Carcinógenos producidos por microorganismos en alimentos almacenados.
2. Promoviendo la formación de carcinógenos en el organismo	Proporcionando sustratos para la formación de carcinógenos en el organismo (nitros y nitritos a nitrosaminas). Por alteración de la ingesta o excreción de ácidos biliares y colesterol (con la consecuente producción de metabolitos carcinogénicos en el intestino). Por alteración de la flora bacteriana intestinal (y, en consecuencia, de la capacidad de formar metabolitos carcinogénicos).
3. Afectando el transporte, activación o desactivación de carcinógenos	Alterando la concentración en las heces o la duración del contacto con ellas (fibra). Por inducción o inhibición enzimática (que afectan el metabolismo o catabolismo de los carcinógenos). Por desactivación o prevención de la formación de especies intracelulares de vida corta (por ejemplo, mediante el empleo de selenio, vitamina E, o por la fijación de radicales libres; mediante el uso de β -caroteno o de otros sequestradores del oxígeno; por uso de otros antioxidantes).
4. Afectando la «promoción» celular (células que ya están iniciadas)	Deficiencia de ingesta o transporte de Vit A o β -carotenos.
5. Excesiva nutrición	Edad de la menarquía. Estrógenos derivados del tejido adiposo. Otros efectos.

2. Hidratos de carbono (fibra dietética)

Parece que tienen un efecto protector sobre el cáncer de colon, más consistentemente la procedente de frutas y verduras, dado que realizan una dilución, por efecto hidrofílico, del carcinógeno en el colon; permiten una mayor velocidad de tránsito intestinal; aumentan el volumen fecal, impidiendo la absorción de procarcinógenos intestinales en la mucosa; afectan a la producción de ácidos biliares fecales directamente o a través de la modificación de la composición y actividad metabólica de la flora intestinal y son capaces de reducir el pH del colon por aumento de la fermentación y de la producción

de ácidos grasos de cadena corta (Serra, 1995; Cortina, 1996; Cueto *et al.*, 2001).

3. Proteínas

Existe una asociación entre el consumo de proteínas, particularmente de procedencia animal, y la incidencia de algunos cánceres. Esta asociación está mediada por la acción de otros nutrientes, como pueden ser las grasas (Rivero, 1994).

4. Vitaminas

Vitamina A: existen numerosas pruebas que sugieren que alimentos ricos en retinol (vitami-

na A) son protectores ante determinados tumores epiteliales malignos. No obstante, y dado que los niveles de retinol se mantienen invariables a los cambios dietéticos, debido a mecanismos homeostáticos, se piensa que la asociación entre retinol sérico y cáncer puede ser debida a factores reguladores del retinol sérico más que a la ingesta de vitamina A.

Existen numerosos estudios que han puesto de manifiesto una relación entre déficit de vitamina A y cáncer de pulmón, mientras que otros estudios han demostrado efectos protectores del consumo habitual de alimentos ricos en vitamina A sobre los cánceres de orofaringe, laringe, estómago, colon y vejiga.

Los alimentos ricos en vitamina A protegen contra la formación de radicales de oxígeno y contra la peroxidación de los lípidos (Serra, 1995; Cortina, 1996).

Vitamina C: estudios en poblaciones humanas han mostrado un efecto protector de las dietas ricas en ácido l-ascórbico (vitamina C) sobre la incidencia de cánceres de esófago, estómago y cuello del útero. A pesar de que son muchos los estudios que apoyan el papel de la vitamina C en la disminución del riesgo de cáncer, no existen mecanismos bioquímicos que expliquen dicho proceso. La vitamina C podría bloquear la formación de nitrosaminas a partir de nitratos y nitritos en el tubo digestivo y evitar la oxidación de algunas sustancias químicas, debido a sus propiedades antioxidantes (Ramón *et al.*, 1993; Serra, 1995; Cueto, 2001).

Vitamina E: existen pocos estudios sobre el papel del α -tocoferol (vitamina E) en la carcinogénesis, pero su papel como antioxidante hace que sea considerada como un agente preventivo potencial en la lucha contra el cáncer. Bajos niveles de vitamina E se han asociado con un mayor riesgo de cáncer de mama, pulmón e intestino (Serra, 1995).

5. Minerales

Selenio: los efectos protectores del selenio se deben a que de todas, la principal función que tiene es la proteger al organismo contra el estrés

oxidativo. Para ello se incorpora en cuatro tipos de enzimas denominadas glutatión peroxidasa dependientes de selenio, designadas como: GSHPx-1, GSHPx-2, GSHPx-3, GSHPx-4. Esta enzima utiliza glutatión para reducir peróxidos en células, protegiendo de esta manera a los lípidos de membrana y posiblemente a proteínas y ácidos nucleicos contra daños por oxidantes o radicales libres (Klaassen y Watkins, 2001). Se sabe que esta oxidación de lípidos, ácidos nucleicos o proteínas se ha sugerido como causa en la etiología de distintas enfermedades crónicas, incluyendo el cáncer (Mayne, 2003).

Varios estudios han encontrado una relación entre niveles séricos bajos de selenio y un mayor riesgo de cáncer, especialmente de pulmón, colon, recto, mama y ovario (Serra, 1995; Cortina, 1996). No obstante, la concentración óptima de Se para usarlo por sus efectos beneficiosos aún es desconocida, o no se conoce del todo. Se sabe que el selenito sódico reduce los efectos tóxicos de determinados mutágenos y carcinógenos y que incrementa la actividad de la glutatión peroxidasa y catalasa (Bronzetti *et al.*, 2003).

Zinc: algunos estudios sugieren que niveles elevados de zinc se asocian con una mayor incidencia de cáncer de mama y de estómago, mientras que niveles bajos lo harían con incidencias más elevadas de cáncer de esófago y de pulmón (Serra, 1995). Parece ser que este elemento induce el crecimiento de tejidos normales y malignos y produce un incremento en sarcomas producidos por sustancias químicas. Incluso existen estudios epidemiológicos que demuestran el antagonismo entre el selenio y el zinc en la producción de varios tipos de cáncer (Hardisson y Castells, 1988).

Hierro: estudios recientes parecen indicar que depósitos elevados de hierro, así como niveles plasmáticos de hierro en el organismo favorecen la aparición de cáncer, particularmente en los hombres (Serra, 1995; Wu *et al.*, 2004).

Yodo: la deficiencia de yodo modifica la proporción de carcinomas de tiroides papilares y foliculares de manera evidente. Así, se ha visto cómo la incidencia de carcinomas de tiroides foliculares son mayores en regiones

deficientes de yodo, lo que sugiere la importancia de suplementaciones con yodo en esas áreas. Asimismo, tanto a nivel experimental como epidemiológico, la deficiencia de yodo se ha relacionado con el cáncer de mama y recientemente con el de estómago (Serra, 1995; Melgar, 1998; Gyory *et al.*, 2004).

6. β -caroteno

El β -caroteno y otros carotenoides se han usado por su actividad anticancerosa, bien debida a su capacidad antioxidante o por su disponibilidad a ser convertido en vitamina A (Russell, 2004). Es por ello por lo que al igual que ocurre con la vitamina A, los alimentos ricos en β -caroteno actúan como protectores ante determinados tumores epiteliales malignos y sobre el cáncer de pulmón. Su mecanismo protector se basa en que actúa como un eficiente neutralizador de los radicales oxígeno, ya que son moléculas eficaces para reducir la energía del oxígeno activado (Serra, 1995, Cortina, 1996).

7. Alcohol

Diversos estudios epidemiológicos ponen de manifiesto una estrecha relación entre el consumo de alcohol y la aparición de ciertos tumores de la cabeza y del cuello. La ingesta de alcohol y tabaco actúan de forma sinérgica aumentando el riesgo de cáncer bucal de laringe y esófago (Serra, 1995).

El alcohol también aumenta el riesgo del cáncer de mama, posiblemente por el efecto sobre el metabolismo de esteroides en el hígado. En relación con otros tumores, se ha puesto de manifiesto la asociación que existe entre el consumo de cerveza y el cáncer colorrectal. Parece que el cáncer de páncreas también se asocia a un excesivo consumo de alcohol (Serra, 1995; Cortina, 1996).

Diversos compuestos químicos de todo tipo como pueden ser nitrosaminas, hidrocarburos policíclicos, etc., que acompañan al etanol en las bebidas alcohólicas, pueden tener un papel importante en la carcinogénesis. También puede actuar como disolvente, con lo que facilita el transporte

de carcinógenos a través de las membranas, y por último, puede inducir enzimas microsomales que pueden determinar la activación metabólica de los carcinógenos (Melgar, 1998).

Estudios recientes en animales de experimentación han demostrado que la ingesta de alcohol durante el embarazo incrementa el riesgo de aparición de tumores de mama en la descendencia (Hilakivi-Clarke *et al.*, 2004).

8. Alimentos ahumados, adobados y salados

Estudios epidemiológicos internacionales sugieren que las poblaciones que consumen dietas ricas en alimentos ahumados, salados y adobados tienen una mayor incidencia de padecer cáncer de esófago y estómago (Serra, 1995; Melgar Riol, 1998).

Los nitratos y nitritos en aguas y alimentos y los alimentos salados se han asociado con el cáncer de estómago en diversos estudios epidemiológicos, y los salazones y adobos, con el cáncer de nasofaringe y de esófago (Serra, 1995).

9. Calorías totales ingeridas y peso corporal

Estos efectos sobre la etiología del cáncer son menos evidentes, aunque se ha visto que un exceso de peso conlleva un mayor riesgo de muerte en muchos tipos de cáncer: colon, recto, próstata, mama, ovario y útero (Melgar, 1998). También existen pruebas que demuestran que un alto contenido de energía se relaciona con el cáncer de páncreas y la obesidad con el cáncer de vesícula y de páncreas (Golsom *et al.*, 1990). Se ha descubierto una asociación débil e inconsistente entre obesidad y cáncer de mama en mujeres posmenopáusicas. Sin embargo, se ha comprobado que en mujeres premenopáusicas la obesidad parece proteger del cáncer de mama, seguramente por la existencia de un mayor número de ciclos menstruales anovulatorios (Cueto *et al.*, 2001).

Las hipótesis que intentan explicar la asociación entre sobrepeso y cáncer se refieren al

depósito de carcinógenos químicos en el tejido adiposo, al aumento de la multiplicación celular producido por el exceso de energía disponible, o a la influencia de hormonas femeninas en relación con el metabolismo de las mismas en el tejido adiposo (Serra, 1995).

Por lo tanto, y teniendo en cuenta lo comentado, se podría decir que existe una serie de factores alimentarios y dietéticos que pueden actuar como promotores de la carcinogénesis, mientras que otros realizan o desempeñan funciones protectoras (Cortina, 1996).

Compuestos cancerígenos

Los compuestos cancerígenos o carcinógenos que están presentes en los alimentos se pueden clasificar de la siguiente manera: carcinógenos naturales; carcinógenos formados en el intestino y en el procesado de alimentos; carcinógenos añadidos en la cadena alimentaria industrial (Hardisson y Castells, 1988).

1. Carcinógenos naturales

Carcinógenos provenientes de plantas comestibles

Un ejemplo típico es el glicósido cicasina, que se encuentra en el fruto de las plantas del género *Cycad* (*C. circinalis* y *C. revoluta*) y que posee actividad neurotóxica y carcinogénica (Hardisson y Castells, 1988; Doll y Peto, 1989). La harina preparada a partir de los frutos de otra planta similar al género *Cycad*, la *Encephalartos hildebrandti*, produce tumores en el hígado, riñones y pulmones de ratas, posiblemente debido también a un glicósido similar a la cicasina (Hardisson y Castells, 1988).

El poder carcinógeno de estos glucósidos se atribuye a su correspondiente aglucona, el metilazooximetanol, que proviene del ataque de la enzima β -D-glucosidasa, producida por la actividad de la flora bacteriana y de las células epiteliales del intestino (Hardisson y Castells, 1988).

Otro carcinógeno sintetizado por plantas comestibles se encuentra en el aceite de sassafras (*Sassafras officinalis*). Este aceite también se encuentra en pequeñas cantidades en el *Cinnamomum camphora*, la nuez moscada, el anís, el Mace o macis y el tomillo. Su composición contiene más de un 93% de safrol (p-alil-metilenodioxibenceno), compuesto que presenta actividad hepatocarcinógena en ratas cuando se administra durante 67 semanas en dosis de 0,5% en cada ración. Actualmente no existen datos epidemiológicos que demuestren la aparición de tumores en el hígado ni en ningún otro órgano en poblaciones en las que se consumen artículos que contienen safrol (Hardisson y Castells, 1988). Otro aceite esencial con propiedades carcinogénicas es el aceite de cálamó, que se encuentra en 340 especies tropicales del sudeste asiático. Tras experimentar con él en ratas se demostró que causaba cáncer de intestino delgado (Hardisson y Castells, 1988).

También se sabe que la ingestión de helecho (*Pteridium aquilinum*) induce la aparición de tumores en ratas y también se ha relacionado con el cáncer en seres humanos. Existen datos que sugieren que la actividad carcinogénica del helecho está localizada en el rizoma, pero no se han provocado tumores en ratas que durante cuatro meses fueron alimentadas con el almidón del rizoma. Esto sugiere que el lavado arrastra el principio carcinogénico (Hardisson y Castells, 1988; Doll y Peto, 1989).

Los alcaloides producidos por los Senecios, plantas usadas para hacer té en el sudeste de EE UU y en Curaçao, son toxinas hepáticas potentes en animales que pueden provocar cáncer de hígado. Se ha asociado el consumo de estos té con el cáncer de esófago y otras formas de cáncer humano. La hepatotoxicidad parece deberse a la formación de metabolitos pirrólicos (Hardisson y Castells, 1988).

Carcinógenos producidos por hongos (micotoxinas)

Existen gran número de toxinas fúngicas en los alimentos, pero solo unas pocas parecen consti-

tuir peligro potencial o real para la salubridad del hombre. Las micotoxinas más conocidas son las aflatoxinas (Hardisson y Castells, 1988; Serra *et al.*, 2001).

Las aflatoxinas son producidas principalmente por hongos del género *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. Níger*, *A. ruber*, etc.) (Hardisson y Castells, 1988), y las mejor estudiadas son las producidas por *Aspergillus flavus* y *parasiticus* (Farré, 1996).

El *Aspergillus flavus*, que es un hongo que suele contaminar los cacahuetses y otros alimentos básicos que contienen hidratos de carbono, almacenados en climas húmedos y calientes, es un factor importante en la producción de cáncer de hígado en algunos países tropicales (Doll y Peto, 1989).

Las aflatoxinas son los carcinógenos hepáticos más potentes que se conocen en la actualidad, de hecho, son una de las principales causas implicadas en el desarrollo de carcinomas hepatocelulares (Wild, 2001). Prácticamente afectan a todos los animales y al hombre. Dentro de este grupo de compuestos, las más hepatocarcinógenas son: aflatoxinas B1; aflatoxina B2; aflatoxina B2A; aflatoxina G1; aflatoxina G2; aflatoxina G2A.

Las lesiones más características causadas por una intoxicación por micotoxinas se muestran en la Tabla 33.4.

En la Tabla 33.5 se agrupan otras micotoxinas que no son tan importantes como las citadas, pero que sin embargo algunas de ellas pueden ser más tóxicas. Este el caso de la luteosquirina y la islanditoxina producidas por el hongo *Penicillium islandicum*, que son fuertemente hepatocarcinógenas (Hardisson y Castells, 1988).

2. Carcinógenos formados en el intestino y en el procesado de alimentos

Nitrosaminas

Las nitrosaminas resultan de la interacción de los nitritos con las aminas secundarias y terciarias

Tabla 33.4. Lesiones más características causadas por una intoxicación con micotoxinas (Hardisson y Castells, 1988).

Tipo de lesión	Efecto producido
Lesiones hepáticas	Hepatitis con necrosis y hemorragias que afectan al parénquima, tejido conectivo y conductos biliares. Se afectan las deshidrogenasas mitocondriales. Inhibición del ADN hepático.
Lesiones gástricas	Lesiones irritativas con posible ulceración.
Lesiones renales	Degeneración parenquimatosa.
Lesiones hemáticas	Hemorragias y edemas localizados. Aumento de la fragilidad capilar.

presentes en los alimentos. También pueden proceder de la interacción de los nitratos previamente reducidos a nitritos con las aminas citadas. Estos componentes son considerados entre los carcinógenos químicos más potentes en pruebas de laboratorio, y la producción de cantidades incluso pequeñas en el organismo puede ser importante. Las nitrosaminas pueden originar distintos tipos de cáncer, entre los que destacan el de esófago, faringe, cavidad nasal, riñón, lengua, estómago, pulmones, piel, etc. (Doll y Peto, 1989; Serra *et al.*, 2001).

Tabla 33.5. Otras micotoxinas de interés (Hardisson y Castells, 1988).

Toxina	Agente productor
Patulina (Clavacina)	<i>Aspergillus clavatus</i> (<i>penicillium</i> , <i>patulinum</i> y <i>urticae</i>).
Gliotoxina	<i>A. chevalieri</i> , <i>A. fumigatus</i> y <i>P. obscurum</i> .
Xanthocilina	<i>P. notatum</i> , <i>A. chevalieri</i> .
Ocratoxina A	<i>A. ochraceus</i> , <i>P. viridicatum</i> .
Maltorizina	<i>A. oryzae</i> .
Luteosquirina	<i>P. islandicum</i> .
Islanditoxina (cicloclorotina)	<i>P. islandicum</i> .
Regulosina	<i>P. regulosum</i> .

El riesgo para el hombre puede residir, bien en la exposición directa a los nitrosocompuestos como tales (a través de alimentos, atmósfera, cosméticos, etc.) o bien, en la formación de estos *in vivo* a partir de los precursores adecuados, ya que el pH ácido del estómago podría favorecer la nitrosación. (Serra *et al.*, 2001).

El primer suministrador de agentes nitrosantes es el anión nitrito, presente en la saliva humana, además de ser utilizado como aditivo alimentario permitido. No obstante, la vía principal de ingestión de nitrito procede de los nitratos, que se encuentran ampliamente distribuidos en los vegetales y en el agua, además de utilizarse también como aditivos alimentarios (Serra *et al.*, 2001).

En la Tabla 33.6 se presenta el contenido de las cuatro nitrosaminas más importantes en distintos tipos de alimentos. Puede observarse cómo para productos derivados del pescado, el contenido es significativamente superior que para el pescado fresco o congelado, esto se explica por el procesado que sufren los alimentos que contribuye a incrementar las tasas de nitrosaminas en los mismos (Hardisson y Castells, 1988; Serra *et al.*, 2001).

Hidrocarburos aromáticos policíclicos

Son sustancias que se producen en las combustiones incompletas de material orgánico: carbón y petróleo, y constituyen uno de los grupos de carcinógenos más importantes que pueden afectar a la salud pública. Se encuentran presentes en alimentos, posiblemente más que cualquier otro grupo de carcinógenos. Aparecen en vegetales y sus aceites, y en varios tipos de pescados y carnes asadas y ahumadas, siendo este último el grupo de más importancia (Farré, 1996; Serra *et al.*, 2001).

En los vegetales el origen de estas sustancias puede ser de dos tipos:

- El resultado de la muerte del vegetal, por medio de la cual se producen hidrocarburos como residuos del metabolismo.
- El resultado de una contaminación por cercanía de las plantaciones a carreteras u otras fuentes de emisión de tipo industrial (Hardisson y Castells, 1988).

En lo referente a las carnes, cuando se cocinan a la brasa y alcanzan temperaturas del orden de los 500 °C, se produce la pirólisis de las gra-

Tabla 33.6. Nitrosaminas en alimentos (mg/kg de alimento) (Conning y Lansdown, 1983).

Tipo de muestra	Nitrosodietilamina	Nitrosodimetilamina	Nitrosopiperidina	Nitrosopirrolidina
Vegetales y aceites vegetales	0-0,2	No determinado en 16 especies vegetales	—	—
Aceite de soja refinado	0-4	0-20	—	—
Quesos	0,1-68	2-11	—	—
Pescados				
Fresco o congelado	1-2	3-18	—	—
Salados 50-108	1-35	—	0-37	—
Ahumado	147	6-177	1	—
Carnes				
Carnes curadas	40	1-80	60 (salchichas)	10 -105 (salchichas)
Bacon cocinado	1-4	0,1-28	1	3-44
Bacon no cocinado	0-2	1-95	No determinado	17
Aguas 0,01-1,83 (mg/l)	0,8-3,3 (mg/l)	3,3 (mg/l)	0,09-0,2 (mg/l)	—
Bebidas alcohólicas	Máximo 0,1	Máximo 10	—	—

sas, que es la causa principal de la aparición de estos compuestos.

Se ha comprobado que la presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos en carnes, y especialmente en aquellos de mayor poder carcinogénico, es directamente proporcional a la temperatura de cocción. También el contenido aumenta a medida que la cantidad de grasa de la carne es mayor (Serra *et al.*, 2001).

En la Tabla 33.7 se muestra el contenido de los hidrocarburos aromáticos policíclicos más importantes en algunos alimentos, se observa cómo el bonito ahumado presenta altos contenidos de los mismos, al igual que las salchichas (Hardisson y Castells, 1988).

3. Carcinógenos añadidos en la cadena alimentaria industrial

Aditivos alimentarios

Existen diversos estudios en los que se ha demostrado que determinados aditivos alimentarios, que se han utilizado para conservar diferentes tipos de alimentos preparados, se asocian con un incremento en el riesgo de la aparición de cáncer (Jian *et al.*, 2004). No obstante, solamente un pequeño número de ellos están implicados en la producción de algún tipo de reacción adversa en el ser humano (Simon, 2003). Entre los aditivos con implicaciones carcinogénicas citaremos como más importantes a los siguientes:

a) Colorantes

Existen numerosas familias de colorantes con propiedades cancerígenas. Sin embargo, el grupo de los azoicos es probablemente el más popular, ya que por reducción biológica en el organismo pueden producir aminas aromáticas del tipo α -naftilamina, bencidina y anilina, a las cuales se les atribuye propiedades promotoras del cáncer.

El cáncer experimental es mucho más frecuente entre los azoicos liposolubles que en los hidrosolubles, ya que estos últimos son fácilmente eliminados por vía urinaria (Hardisson y Castells, 1988).

b) Edulcorantes

Los más utilizados por su eficacia y coste son:

— *Ciclamato*: se ha visto que tanto la ciclohexilamina (sustancia que puede acompañar al ciclamato en forma de impureza o formarse como consecuencia del metabolismo de bacterias intestinales), como el propio ciclamato, a grandes dosis pueden inducir cáncer de vejiga en rata o provocar atrofia testicular. No obstante, no existen resultados de estudios epidemiológicos que demuestren la carcinogenicidad de este aditivo e el hombre.

— *Sacarina*: se ha demostrado que esta sustancia causa cáncer de vejiga en ratas (más en machos que en hembras), pero cuando se administra en cantidades elevadas. No se ha obtenido una prueba convincente de la producción de cáncer en otros órganos ni en otros animales (Hardisson y Castells, 1988; Doll y Peto, 1989).

c) Antioxidantes

Los más peligrosos son los de origen sintético. La tiourea usada para evitar el oscurecimiento de frutas conservadas por largos periodos de tiempo ha sido prohibida por su actividad cancerígena, mutágena y bocígena. El butilhidroxi-tolueno (BHT) empleado como antioxidante de grasas (mantequilla, crema), puede retardar el crecimiento, provocar hipertrofia de hígado, elevar la tasa sanguínea de lípidos y colesterol en animales de experimentación. Asimismo, administrado durante la gestación puede provocar anoftalmia en un 10% de los descendientes. Los galatos, usados como antioxidantes de grasas, mantequilla y yoghurt, han provocado retraso en el crecimiento, trastornos renales e hipertrofia de la mucosa gástrica en animales de experimentación. Sin embargo, en las dosis usadas normalmente en alimentación no tienen ningún efecto negativo y sí se les puede considerar *scavenger* de radicales libres (Hardisson y Castells, 1988).

Tabla 33.7. Contenido de hidrocarburos aromáticos policíclicos en algunos alimentos (Conning y Lansdown, 1983).

Alimento	3,4 benzopireno (mg/kg)	1,2 benzantraceno (mg/Kg)
Vegetales frescos	2,85-24,5	0,3-43,6
Aceites vegetales	0,4-1,4	0,8-1,1
Aceite de coco	43,7	98,0
Margarina	0,4-0,5	1,4-3,0
Café	0,3-1,3	1,3-3,0
Té	3,9	2,9-4,6
Granos	0,19-4,13	0,40-6,85
Ostras y moluscos	1,5-9,0	—
Jamón ahumado	3,2	2,8
Pescado ahumado	0,82	1,9
Bonito ahumado	37	189
Salchichas	12,5-18,8	17,5-26,2
Carne a la brasa	0,17-0,63	0,2-0,4
Beef a la barbacoa	3,3	13,2

4. Plaguicidas, bifenilos policlorados, dioxinas y metales pesados

Dentro de los plaguicidas cabe destacar tres grupos perfectamente diferenciados: *organoclorados*; *organofosforados*; *carbamatos*.

Los primeros son los que tienen interés desde el punto de vista de la toxicidad crónica, ya que tienen una gran afinidad por las grasas y por ello un marcado carácter acumulativo. Los organofosforados son ampliamente utilizados en la agricultura mundial, habiendo reemplazado casi por completo a los compuestos organoclorados, debido fundamentalmente a su escasa persistencia en el medio ambiente, su mayor actividad y a la menor posibilidad de aparición de resistencias, mientras que los carbamatos, al igual que lo organofosforados, se degradan fácilmente en el medio ambiente, aunque se ha detectado su presencia en alimentos (Ferrer y Martínez, 1993; Serra *et al.*, 2001).

En relación con las propiedades carcinogénicas del dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) y compuestos similares, se ha demostrado en animales de experimentación que este compuesto aumenta el peso del hígado en ratas; sin embargo, en el hombre, no existen pruebas contun-

dentes de la carcinogenicidad de este producto. En cambio, un tiocarbamato como es la etilentiourea, presenta claras propiedades de carcinógeno, produciendo cáncer de tiroides (Hardisson y Castells, 1988).

Los bifenilos policlorados (PCB) presentan los mismos inconvenientes que los plaguicidas organoclorados, entre los que destaca su persistencia en el medio y los alimentos. La principal vía de entrada de estas sustancias en el organismo es la alimentaria, ya que existen muchos tipos de alimentos con tendencia a la contaminación (caso de los pescados) o se produce contaminación en el proceso de envasado de algunos alimentos, por migración de los bifenilos policlorados del material de envasado al alimento (Serra *et al.*, 2001).

Son numerosos los estudios de niveles de estos productos en leche y alimentos grasos en general, lo cual es útil para estimar la ingesta medio diaria de los PCB, o cuáles son los isómeros presentes en los alimentos, ya que hoy en día están distribuidos en leche y tejido adiposo humano, con posibles riesgos carcinogénicos y teratogénicos, pues atraviesan la barrera placentaria (Cameán y Repetto, 1995).

Con el nombre de dioxinas se conocen a dos grupos de sustancias organocloradas; las policlorodibenzo-p-dioxinas (PCDD) y los policlorodibenzofuranos (PCDF) bajo las cuales se engloban un total de 210 compuestos. Pertenecen al grupo de los contaminantes orgánicos lipofílicos y persistentes (Casanovas *et al.*, 1996).

Tanto los PCDF como PCDD se caracterizan por ser sólidos cristalinos de color blanco con elevados puntos de fusión y de ebullición y fotolábiles (relativamente sensibles a la radiación UV). Tienen una elevada estabilidad térmica para tratarse de compuestos orgánicos (se descomponen a 850 °C aproximadamente) (Casanovas, 1996; Clemente *et al.*, 2004).

Se ha comprobado que son potentes carcinógenos y teratógenos, así como poderosos agentes inmunotóxicos (Serra *et al.*, 2001).

Con respecto a los metales pesados, sus propiedades carcinogénicas más importantes están en relación con la exposición por vía respiratoria. La vía oral es mucho menos importante, sin embargo, se sabe que metales como el arsénico, cadmio, cromo y níquel son carcinógenos para los seres humanos.

En lo referente al arsénico, estudios epidemiológicos apoyan una relación causal entre exposición y cáncer cutáneo. Puede haber dos tipos celulares de cáncer cutáneo inducido por arsénico: carcinomas de células basales y carcinomas de células escamosas que surgen en áreas queratóticas. La exposición ocupacional a arsénico transportado por el aire también puede vincularse con cáncer pulmonar, regularmente una forma poco diferenciada de carcinoma epidermoide. Otras neoplasias que se han relacionado con exposición a As son el angiosarcoma del hígado, linfomas, leucemia y cánceres nasofaríngeo, renal y de la vejiga. Los estudios acerca de los efectos mutágenos en general han resultado negativos. Exposiciones ocupacionales excesivas de As parecen no tener efectos sobre la reproducción y teratogenicidad (Soria *et al.*, 1995; Dueñas *et al.*, 2001; Klaassen y Watkins, 2001). Se ha descrito, en aguas con contaminación natural por arsénico, intoxicaciones en ciertas regiones del planeta como la pro-

vincia de Córdoba en Argentina, que originan un hidroarsenicismo crónico regional endémico.

El cadmio es un antagonista del selenio, con lo cual se considera un cancerígeno, pues anula la acción antineoplásica del selenio. También se ha visto que el cadmio es un mutágeno potente, ya que interacciona directamente con el ADN y da lugar a errores en la síntesis del mismo (Hardisson y Castells, 1988).

El cromo, concretamente las especies hexavalentes, inducen estrés oxidativo, daños en el ADN, alteración de la expresión de los genes y apoptosis celular (Bagchi *et al.*, 2003). El daño más importante del ADN inducido por cromo, se debe a la reducción intracelular de Cr(VI) a especies de Cr(III), lo que forma complejos con los grupos fosfatos del ADN, siendo estos complejos los que juegan un papel predominante en la genotoxicidad, mutagenicidad y la formación de tumores (Zhitkovich *et al.*, 2000; Zhitkovich *et al.*, 2001; Blankert *et al.*, 2003).

Los mecanismos exactos por los cuales el níquel induce carcinogénesis no son conocidos del todo y han sido sujeto de numerosos estudios epidemiológicos e investigaciones. Parece que compuestos de níquel (II), en particular a altas dosis, evidencian actividad genotóxica y mutagénica. La genotoxicidad del níquel (II) puede verse agravada por la producción de daños en el ADN por especies reactivas de oxígeno. Muchos de los efectos tóxicos del níquel se deben a la interferencia con el metabolismo de metales esenciales como hierro (II), manganeso (II), calcio (II), zinc (II) o magnesio (II) (Kasprzak *et al.*, 2003).

3. Hormonas

Algunas hormonas, sobre todo las sintéticas, pueden tener propiedades carcinogénicas relacionadas o no con su acción hormonal. Las hormonas anabolizantes con fines de engorde para el ganado quizás sean las que han despertado más interés del público por el posible riesgo (carcinogénesis y teratogénesis) para la salud del consumidor (Hardisson y Castells, 1988; Cameán y Repetto, 1995).

De entre las sustancias químicas con mayor riesgo carcinogénico merecen destacar los estró-

genos y los bocígenos. Se ha comprobado en animales de experimentación que estrógenos de diferentes familias químicas han causado tumores, si bien esta observación no puede ser extrapolada al hombre, pues no se ha determinado claramente. Sin embargo, la administración de dietilestilbestrol a las embarazadas aumenta de manera considerable el riesgo de que sus hijas contraigan adenocarcinomas vaginales. Aunque esta acción carcinogénica transplacentaria en el hombre se refiere al contacto con estilbestrol usado para fines médicos, esta sustancia puede también encontrarse como contaminantes alimentario (Hardisson y Castells, 1988).

Algunos factores ambientales, como por ejemplo el defecto de yodo en el agua, origen bocio y estudios epidemiológicos han demostrado que en estas zonas la incidencia de carcinoma de tiroides es cinco veces mayor que en zonas donde no se presenta este problema (Hardisson y Castells, 1988).

Prevención de los riesgos de exposición carcinógenos

Los profesionales sanitarios pueden hacer en este campo una gran labor de educación, debiendo tener presente, los siguientes puntos:

1. Conseguir, ante todo, una alimentación sana, variada y equilibrada, para lo cual precisa de conocimientos previos sobre la composición y el valor nutritivo de los distintos alimentos.

2. Asegurarse de que cada individuo reciba el valor calórico que le corresponda, desde que se ha comprobado que existe una relación entre el incremento de la ingesta calórica y la aparición de ciertos cánceres.

3. Dentro del valor calórico total que cada individuo precise, habrá que hacer un reparto calórico, reduciendo, en concreto, las grasas de la dieta. Es necesario evitar el consumo de la grasa visible de las carnes y limitar el consumo de embutidos y carne roja, quitar la piel del

pollo, no utilizar grasas animales para cocinar (evitar la manteca y la mantequilla) y limitar el consumo de los quesos grasos, la leche entera y los productos de pastelería y helados.

4. Se recomendará el consumo diario de frutas y vegetales frescos, por su alto contenido en vitaminas A, C y E, debido a su efecto protector contra el cáncer; sin que ello signifique el recomendar suplementos vitamínicos no carentes de toxicidad como podría ser la toxicidad hepática y dermatológica de la vitamina A.

5. Se recomendará también la reducción o desaparición en la dieta de salazones, adobados y ahumados, y de las carnes curadas y alimentos en escabeche, por su contenido en nitritos, precursores de nitrosaminas, y por su relación con ciertos cánceres.

6. Otra medida dietética podría ser el promover el consumo de alimentos ricos en fibras, como frutas y verduras.

7. Seguir los métodos de cocción correctos. Evitar freír los alimentos a altas temperaturas y sobre todo no reutilizar el aceite excesivamente. En este sentido, es mejor emplear el aceite de oliva porque resiste mejor las temperaturas elevadas. Es preferible cocinar los alimentos hervidos, el horno o al vapor.

8. Por último, se recomienda la moderación o la supresión del consumo de bebidas alcohólicas y tabaco, por la asociación del alcohol con la hepatocarcinogénesis y la asociación del tabaco-alcohol con la aparición del carcinoma de boca, laringe y esófago (Hardisson y Castells, 1988; Serra, 1995; Melgar, 1998).

Bibliografía

- Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC) (1999). *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. IARC. Lyon.
- Bagchi D, Stohs SJ, Downs BW, Bagchi M, Preuss HG (2003). Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. *Toxicology* 186(1-2): 171-173.
- Ballesta MA (1991). Historia natural del cáncer. *Lab* 2000; n.º 34, 21-37.

- Blankert SA, Coryell VH, Picard BT, Wolf KK, Lomas RE, Sterans DM (2003). Characterization of nonmutagenic Cr(III)-DNA interactions. *Chem Res Toxicol* 16(7): 847-854.
- Bronzetti G, Cini M, Caltavuturo L *et al* (2003). Antimutagenicity of sodium selenite in Chinese hamster V79 cells exposed to azoxymethane, methylmethanesulphonate and hydrogen peroxide. *Mutat Res* 523-524: 21-31.
- Cameán A, Repetto M (1995). Estado actual de la toxicología alimentaria. En: Repetto M (ed.). *Toxicología avanzada*. Díaz de Santos. Madrid: 205-292.
- Casanovas J, Ramos L, Llorens J (1996). *Dioxinas y furanos. Problemática ambiental y metodología analítica*. Centro de Publicaciones de la Secretaría General Técnica del Ministerio de Obras Públicas, Transportes y Medio Ambiente. Madrid.
- Chávez A, de Irala J, de Chávez M (2002). Cáncer. En: Martínez A, Astiasarán I, Madrigal H. *Alimentación y salud pública*. 2.ª edición. McGraw-Hill Interamericana de España, S.A.U. Madrid: 184-188.
- Clemente C, Santos N, Álvarez R, Rubio C, Hardisson A (2004). La toxicología de las dioxinas y su presencia en los alimentos. *Alimentaria*, 35(3): 65-69.
- Conning DM, Lansdown ABG (1983). Toxic hazards in food. *Croom*. Londres: 122-144.
- Cortina P. (1996). Factores alimentarios en el cáncer. En: Almenar Cubells D, Azagra Ros P, Carbonell Ramón M. D *et al*. *Nutrición y cáncer*. Centro de Publicaciones. Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid: 25-39.
- Cueto A, Tardón A, Delgado M (2001). Epidemiología del cáncer. En: Piédrola Gil *et al* (eds.). *Medicina preventiva y salud pública*, 10.ª edición. Masson, S. A. Barcelona: 689-702.
- Doll R, Peto R (1989). *Las causas del cáncer*. Salvat Editores, S. A. Mallorca.
- Dueñas A, Martín JC, González MA (2001). Arsénico. En: Dueñas A *et al*. *Intoxicaciones agudas en medicina de urgencia y cuidados críticos*. Masson. Barcelona: 171-174.
- Farré R (1996). Componentes de la dieta y cáncer. En: Almenar D, Azagra P, Carbonell MD *et al*. *Nutrición y cáncer*. Centro de Publicaciones. Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid: 61-70.
- Ferrer A, Martínez J (1993). Insecticidas. En: Marruecos L, Nogué S, Nolla J (eds.). *Toxicología clínica*. Springer-Verlag Ibérica. Barcelona: 275-291.
- Golsom AR, Kaye SA, Prineal RJ *et al*. (1990). Increased incidence of carcinoma of the breast associated with abdominal adiposity in postmenopausal women. *Am J Epidemiol*. 131: 794-803.
- Gyory F, Balazs G, Nagy E. V, Juhasz F, Mezosi E, Szakall S *et al*. (2004). Differentiated thyroid cancer and outcome in iodine deficiency. *Eur J Surg Oncol*. 30(3):325-31.
- Hardisson A, Castells S (1988). Cancerígenos en alimentos. *Revista Alimentaria*; 190: 71-85.
- Hilakivi-Clarke L, Cabanes A, de Assis S, Wang M, Khan G, Shoemaker WJ *et al*. (2004). In utero alcohol exposure increases mammary tumorigenesis in rats. *Br J Cancer* 90(11): 2225-2231.
- Jian L, Zhang DH, Lee A. H, Binns CW (2004). Do preserved foods increase prostate cancer risk?. *Br J Cancer* 90(9): 1792-1795.
- Kasprzak KS, Sunderman FW Jr, Salnikow K (2003). Nickel carcinogenesis. *Mutat Res*. 533(1-2): 67-97.
- Klaassen CD, y Watkins JB (2001). *Casarett & Doull. Manual de toxicología*. McGraw-Hill Interamericana. México: 659-722.
- Mayne ST (2003). Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J Nutr*. 133(3): 933-940.
- Melgar MJ (1998). Nutrición y cáncer. En: Rodríguez F, Gómez JJ, Rodríguez TM *et al*. (eds.). *Enfermedades y otros riesgos asociados al consumo de alimentos*. Ilustre Colegio Oficial de Veterinarios de Ourense: 377-391.
- Ramón JM, Serra-Majem L, Cerdó M, Oromí J (1993). Dietary and gastric cancer risk: a case-control study in Spain. *Cancer* 71: 1731-1736.
- Rivero M (1994). Nutrición y cáncer. *El farmacéutico*; 138: 29-35.
- Russell RM (2004). The enigma of beta-carotene in carcinogenesis: what can be learned from animal studies. *J Nutr*. 134(1):262S-268S.
- Serra L (1995). Dieta, nutrición y cáncer. En: Serra LL, Aranceta J, Mataix J. *Nutrición y salud pública. Métodos, bases científicas y aplicaciones*. Masson, S. A. Barcelona: 251-257.
- Serra LL, Mata E, Hardisson A (2001). Peligros y riesgos sanitarios asociados a los alimentos. En: Gálvez R, Sierra, Sáenz MC *et al*. (eds.). Piédrola Gil. *Medicina preventiva y salud pública*, 10.ª edición. Masson, S. A. Barcelona: 359-369.

- Simon RA (2003). Adverse reactions to food additives. *Curr Allergy Asthma Rep.* 3(1): 62-66.
- Soria ML, Repetto G, Repetto M (1995). Revisión general de la toxicología de los metales. En: Repetto M (ed.). *Toxicología avanzada*. Díaz de Santos, S. A. Madrid: 293-358.
- Wargovich MJ, Cunningham JE (2003). Diet, individual responsiveness and cancer prevention. *J Nutr.* 133(7 Suppl): 2400S-2403S.
- Wild CP, Turner PC (2001). Exposure biomarkers in chemoprevention studies of liver cancer. *IARC Sci Publ.* 154: 215-22.
- Wu T, Sempos CT, Freudenheim JL, Muti P, Smit E (2004). Serum iron, copper and zinc concentrations and risk of cancer mortality in US adults. *Ann Epidemiol.* 14(3): 195-201.
- Zhitkovich A, Shrager S, Messer J (2000). Reductive metabolism of Cr(VI) by cysteine leads to the formation of binary and ternary Cr-DNA adducts in the absence of oxidative DNA damage. *Chem Res Toxicol* 13(11): 1114-11124.
- Zhitkovich A, Song Y, Quievryn G, Voitkun V (2001). Non-oxidative mechanisms are responsible for the induction of mutagenesis by reduction of Cr(VI) with cysteine: role of ternary DNA adducts in Cr(III)-dependent mutagenesis. *Biochemistr.* 40(2): 549-560.

Judith Maraver, Isabel M.^a Moreno, Ángeles Jos, Ana M.^a Cameán

Introducción y conceptos básicos. Fuentes de exposición y radioelementos de interés. Descontaminación de alimentos radioactivos. Efectos toxicológicos. Aspectos legales. Programas de vigilancia radiológica ambiental en España. Agradecimientos. Bibliografía.

Introducción y conceptos básicos

Los radionúclidos han estado presentes en los alimentos desde siempre y esto se debe a la elevada cantidad de elementos que tienen equivalentes radioactivos que pueden reemplazarlos en la composición de los alimentos, y que tienen las mismas propiedades químicas que sus equivalentes no radioactivos, con la diferencia de que se descomponen liberando radiaciones ionizantes.

Aunque son bien conocidos los efectos tóxicos derivados de grandes dosis de radioactividad, no existen evidencias de efectos perjudiciales debidos a las concentraciones de radionúclidos detectados normalmente en la dieta.

Los radionúclidos o isótopos radioactivos son elementos con el núcleo inestable, que se deterioran o desintegran en proporciones predecibles. El deterioro de los radionúclidos, o radio-

actividad, se manifiesta por la emisión de radiación, que en general puede ser de dos tipos: radiación electromagnética (rayos- γ y rayos-x) y radiación particulada (α (α^-) y β (β^-), electrones (e^-), positrones (β^+) y neutrones).

Recordemos que: las partículas α son núcleos de helio; las partículas β son electrones rápidos; las radiaciones γ son haces de fotones de gran energía.

Desde el descubrimiento del polonio y del radio a finales del siglo XIX, se han identificado y caracterizado alrededor de 40 radionúclidos naturales. Muchos de ellos son elementos de alto peso atómico (número atómico >81) existiendo tres series diferentes, cada una de las cuales comienza con un radionúclido de larga vida y termina con un isótopo estable de plomo. Estas series son conocidas como series del uranio, del torio y del actinio. Además, hay algunos radionúclidos naturales que no son miembros de esas series. Algunos de ellos tienen vidas medias lo suficientemente largas como para existir desde el momento de la formación de la corteza

terrestre (^{40}K , ^{50}V , ^{87}Rb , ^{115}In , ^{138}La , ^{147}Sm y ^{176}Lu). Sin embargo, otros se van produciendo continuamente, formándose por reacciones nucleares entre componentes de la radiación cósmica y núcleos estables, como por ejemplo el ^{14}C y el tritio (^3H).

La unidad clásica de radioactividad es el curie (Ci), el cual equivale a $3,7 \cdot 10^{10}$ desintegraciones nucleares por segundo. Otra forma de expresar la radioactividad es utilizando la unidad del Sistema Internacional (S.I.) que es el becquerelio (Bq), siendo 1 Bq una desintegración radioactiva por segundo. Como la radiación interacciona con la materia, deposita energía, llamada *dosis absorbida*, la cual se mide en grays (Gy), siendo 1 Gy equivalente a 1 J/kg de masa. Para una misma dosis, las partículas α son más dañinas en tejidos vivos que las β o que los rayos γ por lo que, con el propósito de comparar dosis de diferentes radiaciones, la dosis absorbida es multiplicada por un factor que tiene en cuenta la forma en la que una radiación en particular distribuye la energía en los tejidos. A esto se le denomina «dosis equivalente» y se mide en sievert (Sv), donde

$$1 \text{ Sv} = 1 \text{ Gy} \times \text{Wr}$$

donde Wr es el factor de valoración de la radiación considerada. Para los rayos γ y las partículas β , Wr toma el valor de 1, y para las partículas α toma el valor de 20.

Fuentes de exposición y radioelementos de interés

El hombre está expuesto continuamente a radiación de numerosas fuentes tanto naturales (rayos cósmicos, los rayos gamma emitidos por los materiales radiactivos naturales existentes en la Tierra, el ^{222}Rn es un gas derivado del ^{226}Ra y que se encuentra en la tierra y en las rocas), como artificiales (usos médicos, ciertos hábitos de vida, actividades industriales que implican utilización de radiaciones ionizantes, las pruebas nucleares y la industria nuclear).

En general, los alimentos aportan aproximadamente un 10% de la dosis media de radiación anual recibida (Moeller, 1988; Silini, 1988; Stroube *et al.*, 1985; Jones, 1992). En condiciones normales, las actuales descargas de desechos a la atmósfera, a los ríos y al mar desde industrias de energía nuclear, no representan una seria amenaza en términos de contaminación de alimentos (Lambert y Mondon, 1999) lo cual, sin embargo, no ha sido siempre así. En consecuencia, se reconoce la necesidad del control de la contaminación radioactiva de los alimentos, desarrollándose modelos a nivel internacional.

1. Radiactividad natural

La vía primaria de exposición a los radionúclidos de origen natural es la dieta, siendo los huesos el principal lugar de deposición en animales y humanos. El riesgo para la salud humana es considerado casi inexistente, puesto que los niveles de radionúclidos por incidencia natural hallados en la mayoría de los alimentos y agua de bebida han sido extremadamente bajos.

2. Radiactividad artificial: Chernóbil

El 24 de octubre de 1986 se produjo el accidente nuclear de Chernóbil a consecuencia del cual se produjo la diseminación de radionúclidos al aire, el agua y los alimentos (Cameán y Repetto, 1995). Desde esta fecha se ha estado realizando el seguimiento de alimentos en áreas afectadas por la lluvia radioactiva, consecuencia de dicha explosión nuclear.

Los radioelementos de mayor interés han sido los rutenios, yodos y cesios. Estos elementos se comportan desde un punto de vista metabólico como sus homólogos estables o como otros elementos similares estructuralmente en el sistema periódico. El cesio se comporta como el potasio y el yodo como el elemento estable. Ciertos elementos se encuentran diseminados en todo el organismo, como ocurre con el Cs, pero otros tienen cierta organotropía (el Sr tiene afinidad por el hueso, el I por el tiroides, etc.). El rutenio se distribuye uniformemente en el orga-

nismo desde el momento que atraviesa la barrera intestinal, pero como su coeficiente de transferencia a través de la mucosa intestinal es débil, irradia esencialmente dicho órgano antes de ser eliminado por heces (99%) (Cameán y Repetto, 1995).

Desde la catástrofe de Chernóbil numerosas investigaciones se han dirigido para determinar si la exposición a la radiación ha tenido efectos adversos sobre la salud humana. Además de la exposición a la radiación aerotransportada inmediatamente después del accidente, los residentes en áreas afectadas han podido estar expuestos y pueden ser propensos a continuas exposiciones desde ciertos alimentos producidos en la localidad. Los radionúclidos que se determinan más frecuentemente en alimentos son: ^{210}Po y ^{210}Pb (Carvalho, 1995; Carvalho, 1998; Heyraud *et al.*, 1994; Noshkin *et al.*, 1994; Yan, 1991; Pietrzak-Flis *et al.*, 1997), ^{226}Ra (Chambra, 1966; Kametani *et al.*, 1981; Mastinu y Santoni, 1980; Ye, 1984), ^{232}Th y ^{238}U (Dang *et al.*, 1992; Dang *et al.*, 1990; Shiraishi *et al.*, 1992), ^{137}Cs (Zhu *et al.*, 1993). En algunos trabajos se presentan concentraciones de otros radionúclidos como: ^{234}U , ^{235}U , ^{238}U , ^{228}Th , ^{230}Th , ^{232}Th (Fisenne *et al.*, 1987; Pietrzak-Flis *et al.*, 1997; Smith-Brigg y Bradley, 1984), ^{226}Ra y ^{228}Ra (Lin *et al.*, 1988; Lalit y Ramachandran, 1980; Mastinu y Santanori, 1980).

Seguidamente vamos a describir algunos de los estudios realizados para detectar y cuantificar radionúclidos en alimentos.

Después de Chernóbil, los renos y los lucios de la región más al norte de Suiza tuvieron niveles de ^{137}Cs similares a las existentes antes del accidente (57-180 y 14-24 Bq/kg peso fresco, respectivamente). Por el contrario, los de la zona más al sur contuvieron niveles 80 veces mayores. El mayor valor detectado fue 18.425 Bq/kg en músculo de reno, mientras que los mayores valores en lucios fueron 567 Bq/kg.

Por otro lado, los niveles medios de radiocesio monitorizados en truchas en un lago noruego subalpino situado en un área de alta lluvia radioactiva después de este desastre de 1986 subieron rápidamente de 300 a 7.000 Bq/kg a finales de

agosto. Estos valores tan significativos cayeron a 4.700 Bq/kg durante el verano de 1987 y a 3.000 Bq/kg en junio de 1989. Las vidas medias del ^{137}Cs y ^{134}Cs en truchas durante este periodo fueron de 3,0 y 1,3 años, respectivamente.

Los niveles de radionúclidos (^{137}Cs y ^{134}Cs) detectados en Polonia entre 1989 y 1992 en distintos alimentos, incluyendo leche, carne de vaca y carne de cerdo, disminuyeron con el tiempo, acompañándose de una disminución de esos isótopos en el cuerpo humano. La vida media efectiva se estimó en 1,94 años para el ^{137}Cs y en 0,98 años para el ^{134}Cs (Pietzak-Fli y Krajewski, 1994). Las medidas de radioactividad en algunos alimentos en Ucrania en 1991 demostraron que los niveles de radionúclidos eran bajos, excepto en setas, que contenían 6110, 728, y 118 Bq de ^{137}Cs , ^{134}Cs y ^{80}Sr , respectivamente (Hoshi *et al.*, 1994).

Diversos análisis de hongos superiores europeos confirmaron que muchas especies de setas acumulan radionúclidos. Se comprobó que los niveles de radionúclidos dependían de las condiciones del suelo y de la especie. Algunas variedades comestibles acumulaban altos niveles de radioactividad, por lo que no deberían ser consumidas frecuentemente (Francic *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1993). Con el paso del tiempo, los niveles de radionúclidos en hongos superiores han disminuido significativamente debido a la disminución de la radioactividad y a la transferencia de isótopos desde la superficie a capas más profundas del suelo, donde no se encuentran biodisponibles.

Otros cultivos también absorben radioactividad desde el suelo, como cereales, zanahorias, patatas y vegetales frondosos (Paasikallio *et al.*, 1994; Amaral *et al.*, 1994) aunque con menos intensidad.

Los resultados de las medidas de radioactividad realizadas en 1990 sobre alimentos recogidos en regiones de Rusia, Bielorrusia y Ucrania, muy contaminadas por el accidente de Chernóbil, se han empleado para estimar la seguridad de los alimentos. La contaminación total por radiocesio estuvo en el rango de 1-170 Bq/kg en muestras de leche, queso, manteca, patatas, calabazas, zanahorias y remolachas. Excepto las

setas, todos los productos alimenticios investigados se consideraron como seguros respecto a la contaminación radioactiva. La carga de radioactividad asociada al consumo de esos alimentos fue estimada en 0,2 mSv/año.

Los animales de pastoreo de los campos contaminados también pueden estar expuestos a radionúclidos. Los análisis del forraje y de leche de vaca en diversos países como Austria (Mück, 1995; Mück *et al.*, 1994) y Suiza (Karlén *et al.*, 1995) demostraron una significativa transferencia de radionúclidos desde la vegetación a la leche.

Pollos criados en ambientes contaminados con radioactividad pueden alimentarse inevitablemente con partículas radioactivas del suelo. Los factores de transferencia de ^{137}Cs del suelo a huevos y carne de pollo fueron determinados sobre 0,0055-0,01 y 0,021-0,055, respectivamente (Amaral *et al.*, 1995). Los bajos niveles de transferencia están relacionados probablemente con los complejos formados entre los componentes del suelo y el cesio.

Los radionúclidos de la explosión de Chernóbil también encontraron su camino hacia ríos, lagos y zonas de costa marina, donde contaminaron organismos acuáticos. Estudios en Turquía (Baysal y Tunçer, 1994), Noruega (Ugedal *et al.*, 1995) y Finlandia (Särkkä *et al.*, 1995) documentaron concentraciones de ^{137}Cs en varios pescados en masas de agua locales.

La captación de radionúclidos desde el suelo y el agua de riego contaminados hacia los cultivos ha sido estudiada en invernaderos y pequeñas plantas experimentales. Los factores de transferencia (actividad en peso seco de planta/actividad en peso seco de suelo) para cultivos de pepinos, tomates, perejil, rábanos y lechugas sobre turba contaminada con ^{137}Cs variaron de 0,66 a 1,8 unidades. Los factores de transferencia para cultivos de trigo, alfalfa y remolacha regados con agua que contenía ^{238}U , ^{232}Th , ^{226}Ra , ^{210}Pb y ^{210}Po variaron con las especies de plantas y con los tipos de riegos. El riego por aspersión aparentemente depositó más radioactividad sobre las plantas que el riego por inundación.

En cultivos experimentales (campos, invernaderos) se ha estudiado la tasa de transferencia de ^{137}Cs desde el suelo a los cultivos (Demirel *et al.*, 1994) resultando que lechugas, judías y trigo crecidos en el campo absorbieron 0,065-1,057% de la radioactividad aplicada, siendo la lechuga la que más radionúclidos acumuló. Los experimentos en invernaderos indicaron que el césped y los cereales fueron los menos eficientes en la absorción del elemento y las lechugas y judías fueron las más eficientes.

En España también se han realizado estudios para detectar radionúclidos en alimentos después del accidente de Chernóbil, tanto en alimentos importados (Catalán y Hernández, 2003) como en alimentos autóctonos (Ballesteros *et al.*, 1999).

Descontaminación de alimentos radioactivos

La estrategia más importante consiste en prevenir la entrada de radionúclidos en la cadena alimentaria protegiendo o tratando el suelo y eliminando la contaminación superficial cuidadosa y rápidamente.

Después del accidente en Chernóbil, extensas áreas del este y norte de Europa recibieron niveles significativos de lluvia radioactiva. Aún así, esas áreas se utilizaron para la producción de alimentos, por lo que se desarrollaron distintos métodos para minimizar la transferencia de radionúclidos a humanos a través de la cadena alimentaria. La evaluación de los resultados obtenidos ha sido la siguiente (Howard y Desmet, 1993):

- a) Con suficiente cuidado, la contaminación radioactiva de los cultivos puede prevenirse o reducirse cosechando rápidamente o cubriendo verduras y frutas con hojas impermeables para prevenir la deposición directa.
- b) Después de la deposición, se puede reducir la transferencia de radionúclidos desde el

suelo hacia las plantas mediante técnicas tales como la lixiviación o la dilución (arando en profundidad, por ejemplo), y se pueden emplear materiales de inmovilización de elementos como el Cs. Se ha descubierto que los fertilizantes con potasio reducen la captación de Cs sobre un 60%, y los fertilizantes con amonio tienen el efecto opuesto. Otra estrategia empleada ha sido plantar cultivos alternativos sobre el suelo contaminado que capten menos radioactividad.

c) La adición de productos como la bentonita y los hexacianoferratos a la dieta de animales de granja previene la absorción de altos niveles de radioactividad, reduciéndose la absorción de Cs en un 50-75%. La absorción de Sr se puede reducir en un 43% añadiendo al alimento compuestos de calcio.

d) Datos del ganado indicaron que el ^{137}Cs se elimina rápidamente de la carne cuando los animales son alimentados con fuentes no contaminadas, sobre todo durante los últimos 2-4 meses previos a la matanza. Sin embargo, para poder utilizar la leche de los animales, estos tienen que tomar alimentos con bajos niveles de radioactividad.

La eficiencia de las medidas propuestas para disminuir la contaminación de los productos agrícolas en áreas contaminadas por el accidente de Chernóbil fue descrita y discutida. Los tipos de medidas tomadas incluyeron:

- Prohibición-prevención del uso de campos altamente contaminados para el cultivo y pasto.
- Examen de áreas contaminadas para determinar el grado de contaminación y los tipos de radionúclidos presentes.
- Determinación de parámetros del suelo que dirigen la transferencia de radionúclidos a plantas y de las formas de tratar los suelos y pastos para evitar esta transferencia.
- La concentración de ^{137}Cs en cultivos varió de 10 a 100 veces dependiendo de la especie de planta y del tipo de suelo. El abonado con cal y el fertilizado de praderas pro-

dujo un aumento de la productividad de la hierba y la reducción de la transferencia de radionúclidos a la leche de vaca de 3-5 veces.

Efectos toxicológicos

Ya que los radionúclidos se encuentran presentes en muy bajos niveles en los alimentos, la contaminación por ellos probablemente no tiene gran relevancia en términos generales de toxicidad. Sin embargo, sus concentraciones en alimentos pueden ser importantes en determinados casos debido a las siguientes razones (Concon, 1988; Gofman, 1981; Lambert y Mondon, 1999; Jones, 1992; Cameán y Repetto, 1995).

1. Los radionúclidos pueden originar peligros carcinogénicos (leucemia, cáncer de pecho, pulmón, tiroides, huesos, etc.), mutagénicos, teratogénicos y efectos sobre la reproducción.
2. Varios radionúclidos tienen una especial y fuerte afinidad por órganos y tejidos específicos (yodo, tiroides; estroncio, huesos; etc.) de forma que la dosis relativa para un órgano o sección de órgano puede ser varias veces mayor que la dosis ingerida o absorbida. Esa afinidad puede llevar a la acumulación de radionúclidos, aumentando la cantidad de estos con el tiempo.
3. A excepción de los mecanismos de excreción y de desintegración radioactiva, el cuerpo no posee mecanismos de detoxificación para radionúclidos, aunque otros procesos corporales o sustancias pueden permitir la mitigación de sus efectos.
4. Varios radionúclidos tienen una vida media larga (^{137}Cs =30 años; ^{90}Sr =29 años, etc.), y así sus efectos radioactivos pueden persistir durante toda la vida de una persona.

Estas consideraciones recalcan la importancia toxicológica de los radionúclidos en la cade-

na alimentaria humana. En particular, deben establecerse los siguientes parámetros:

1. La presencia, persistencia y niveles de radionúclidos en alimentos y aguas de bebida.
2. La forma en la que los radionúclidos entran en la cadena alimentaria humana.
3. Los factores y condiciones que conducen a un incremento de la concentración (biomagnificación) de los radionúclidos en alimentos.
4. Las formas de prevenir estos incrementos.
5. La distribución geográfica y ecológica de los radionúclidos y los factores que afectan a dicha distribución.
6. Los efectos biológicos y factores mitigantes o exacerbantes de dichos efectos.
7. Las conexiones toxicológicas entre los radionúclidos y otras sustancias.

Los radionúclidos de interés en Toxicología Alimentaria penetran en el organismo humano por ingestión y pueden tener una fuente natural o derivarse de accidentes de reactores, lluvia radiactiva de desastres nucleares, etc.

De forma natural, los que pueden estar presentes en la dieta son:

- ^{40}K : principalmente en frutas y verduras.
- ^{226}Ra : cuya fuente principal son los cereales.
- ^{238}U : en alimentos y aguas de bebida. Tiene organotropidad por el hueso.
- ^{210}Pb : y ^{210}Po : a través de carnes y pescados.
- ^{87}Rb , ^{14}C , ^3H , etc.

Tras exposiciones y desastres nucleares, los radioelementos a tener en cuenta por su interés biológico y su periodo son: ^{85}Kr ; ^{89}Sr y ^{90}Sr ; ^{103}Ru y ^{106}Ru , ^{129}I y ^{131}I ; ^{133}Xe ; ^{134}Cs y ^{137}Cs ; ^{140}Ba y ^{144}Ce .

Los radionúclidos más destructivos son aquellos que pueden penetrar en tejidos blandos y pasar a formar parte del metabolismo

activo. El ^{137}Cs es particularmente destacable debido a que su similitud química con el potasio lleva a que sea rápidamente absorbido por la corriente sanguínea y pueda ser distribuido a todas las células del cuerpo. Su vida media es de 27 años.

Otros radionúclidos que pueden causar daños fisiológicos son el ^{90}Sr y el ^{131}I . Como el ^{90}Sr es un análogo del calcio, es fácilmente adsorbido tanto desde el tracto intestinal como desde el pulmón y se deposita en hueso. La cantidad absorbida por el pulmón depende de los niveles de otros metales traza del organismo; por ejemplo, las ingestas adecuadas de calcio y fosfato disminuyen considerablemente su absorción (Concon, 1988; Jones, 1992).

Una única ingesta de ^{90}Sr puede dar como resultado una alta incidencia de cánceres de hueso y leucemias. La edad de la exposición determina la susceptibilidad a la leucemia, pues los niños de edad inferior a 10 años tienen un riesgo mayor. El Consejo Federal de Radiación ha establecido que el ^{90}Sr no debería exceder los 1.500 mrem por encima de los niveles de fondo. La misma recomendación se aplica al ^{131}I (Jones, 1992).

El radioiodo es producido en abundancia en operaciones de reactores nucleares durante la lluvia nuclear. Altos niveles de este radionúclido producen la casi total destrucción del tiroides, con un consiguiente descenso en la producción de hormona tiroidea. Los niveles de ^{131}I dañan el tiroides pero permiten una proliferación celular que conduce al cáncer por hiperplasia. Los niños parecen ser dos veces más susceptibles que los adultos (Upton y Linsalata, 1988).

Los estudios indican que la biodisponibilidad del uranio es baja (<6%), aunque hay algunas variaciones individuales. Se necesita más información sobre la absorción por niños y sobre la absorción relativa de uranio en aguas y alimentos; la naturaleza química del uranio afecta muy probablemente a su absorción desde los mismos (Leggett y Harrison, 1995).

Se constató un aumento significativo en la incidencia del cáncer de tiroides en Bielorrusia, desde una media de 4 casos al año durante 1986-

1989 a 29 casos en 1990, 55 en 1991, y 60 en 1992 (Kazakov *et al.*, 1992). El mayor incremento ocurrió en Gomel, una región justo al norte de Chernóbil, que recibió un alto nivel de radiactividad después del accidente de 1986. Prácticamente todos los tumores fueron carcinomas papilares y parecían ser relativamente agresivos. El rápido incremento de este tipo de cáncer inmediatamente después del accidente fue inesperado, aunque diversos científicos (Baverstock *et al.*, 1992; Beral y Reeves, 1992; Shigematsu y Thiessen, 1992) cuestionaron si el aumento de la incidencia de cáncer de tiroides fuera o no un resultado directo del accidente de Chernóbil.

Desde que Noruega recibió un nivel relativamente alto de lluvia ácida después del accidente de Chernóbil, ha existido una gran preocupación sobre su impacto en los embarazos (Lie *et al.*, 1992). La única asociación positiva observada entre la dosis de radiación y las consecuencias en los nacimientos fue un incremento en la incidencia de hidrocefalia. La aparente ausencia de efectos de la lluvia radioactiva sobre los nacimientos puede ser en parte el resultado de una intensiva campaña gubernamental de consejos alimentarios dados a los noruegos, particularmente sobre los alimentos más afectados (pescado fresco, leche y carne de reno) (Strand *et al.*, 1992) estimándose que sin ellos se habría consumido entre un 50% y 700% más de radiactividad.

Desde junio de 1986 hasta enero de 1988 en el sureste de Alemania se realizó un seguimiento de la presencia de ^{137}Cs en alimentos contaminados y en las personas expuestas a los mismos. Dichos alimentos contaminados constituyeron solo una parte de la exposición total (Voigt y Paretzke, 1993). Los mayores niveles de radiactividad fueron detectados en cerdo, leche o productos lácteos. Se estimó que la dosis ingerida acumulada de Cs radioactivo cinco años después del accidente fue de 0,21 Sv para hombres y 0,15 Sv para mujeres.

Algunas publicaciones (Sugenoya *et al.*, 1995; Nikiforov y Gnepp, 1994; Stsjazhko *et al.*, 1995; Likhtarev *et al.*, 1995) indican que, des-

pués de Chernóbil, niños de áreas altamente expuestas de Bielorrusia, Ucrania, y Rusia han desarrollado un exceso de anormalidades tiroideas, incluyendo cáncer de tiroides después de Chernóbil. Ello puede explicarse por la absorción de ^{131}I de las emisiones de la planta nuclear por las vacas, posterior secreción del mismo a través de la leche, y el hecho de un mayor consumo de leche por los niños en comparación con los adultos.

También se ha observado un aumento significativo de trisomía 21 (Sperling *et al.*, 1994) en algunas ciudades europeas, lo cual puede ser debido a la absorción de yodo radioactivo.

Aspectos legales

Los efectos biológicos de la radiación son revisados regularmente por grupos de expertos, en particular por el Comité Científico de las Naciones Unidas sobre los Efectos de la Radiación Atómica (UNSCEAR, 1993) y el Comité sobre los Efectos Biológicos de la Radiación Ionizante (BEIR, 1989) en EE UU.

Como niveles de referencia, de forma similar a los contaminantes químicos y los aditivos, para los contaminantes radioactivos existe el denominado «límite de dosis». Este límite se establece en la legislación de cada país siguiendo las recomendaciones de los modelos de protección tanto para trabajadores como para la población que ha realizado la Comisión Internacional sobre Protección Radiológica (ICRP). En su publicación sobre dosis límite de 1991, la ICRP recomendó una dosis anual límite para la población de 1 mSv excluyendo los usos médicos y las dosis desde fuentes naturales (ICRP, 1991). En España, mediante el Real Decreto 783/2001, de 6 de julio, por el que se aprueba el Reglamento sobre protección sanitaria contra radiaciones ionizantes, se ha transpuesto la Directiva 96/29/EURATOM que recoge la recomendación de la ICRP. Por otro lado, en el documento UNSCEAR 2000 se propone un valor máximo de dosis efectiva anual entre 0,2 y

0,8 mSv debido a la ingestión de alimentos y agua. En cualquier caso, este valor se refiere a la suma de las dosis por todas las vías y todos los radionúclidos y, con fines prácticos, la ICPR ha establecido un sistema simple de límites frente a los que poder comparar niveles de radioactividad medioambientales en alimentos, plantas, etc. Estos límites, que podrían equipararse a los Límites Máximos de Residuos (LMR) establecidos para los residuos químicos, se conocen como «límites derivados» y se calculan a partir de estimaciones conservadoras de consumo de alimentos. Es decir, se calculan de forma que si no son superados es muy improbable que los límites de dosis se sobrepasen. Además, en España y en otros países existe otro tipo de parámetros de referencia que implica unas limitaciones de ingesta de cada uno de los radioisótopos, que se denominan «límites de incorporación anual por ingestión».

La dosis anual media vía alimentos estimada por el Consejo de Seguridad Nuclear (CSN) es de unos 300 mSv al año, 180 de los cuales se deben al ^{40}K , componente natural de los mismos.

Desde la publicación de las recomendaciones de la ICRP de 1990, se distingue entre «práctica» e «intervención» (García *et al.*, 2002).

La intervención trata de disminuir la exposición global de la población a la radiación eliminando las fuentes existentes, modificando las vías por las que la irradiación tiene lugar o reduciendo el número de individuos expuestos. De esta manera, cuando se toma la decisión de restringir la venta de un alimento contaminado, se está realizando una intervención.

Se encuentran publicados por diversos organismos internacionales valores límite de contaminación radiactiva de los productos alimenticios. En todos los casos se indica que se trata de valores aplicables a situaciones postaccidente nuclear o emergencia radiológica. No están publicados datos que indiquen valores de contaminación radiactiva en alimentos en circunstancias normales. De hecho, en las recomendaciones anteriores se expresa claramente que los valores límite no son aplicables a radionúclidos «que han estado siempre presentes en la dieta».

La recomendación dada por la Unión Europea a través del Reglamento EURATOM 3984/87 y su modificación en el Reglamento EURATOM 2218/89 indica que los niveles máximos admisibles podrán realizarse o completarse y que los productos alimenticios cuyos niveles de contaminación sobrepasen los valores máximos no podrán comercializarse. Es llamativo que no se

Tabla 34.1. Tolerancias máximas para los productos alimenticios (Bq/kg) (Reglamento N.º 2218/89).

	Alimentos para lactantes	Productos lácteos	Otros productos alimenticios excepto productos alimenticios secundarios	Productos alimenticios líquidos
Isótopos de estroncio, en particular ^{90}Sr	75	125	750	125
Isótopos de yodo, en particular el ^{131}I	150	500	2.000	500
Isótopos de plutonio y elementos transplutónicos emisores de radiación alfa, en particular ^{239}Pu y ^{241}Am	1	20	80	20
Todos los demás nucleidos cuyo periodo de semidesintegración sea superior a 10 días, en particular ^{134}Cs y ^{137}Cs	400	1.000	1.250	1.000

haya adoptado un conjunto de tolerancias máximas de contaminación radiactiva de alimentos aplicables en cualquier situación.

Los valores propuestos de concentraciones de actividad máxima figuran en la Tabla 34.1.

La Organización Mundial de la Salud (OMS, 1988), ha propuesto también para situaciones postaccidente unos factores que permiten el cálculo de la dosis por unidad de actividad de diversos radionúclidos ingeridos con los alimentos (Tabla 34.2).

Puede señalarse que este organismo indica que estos niveles se aplican a alimentos de comercio internacional y están propuestos suponiendo un nivel de dosis de referencia de 5 mSv, debido a que considera que es la dosis efectiva comprometida que resultaría de la ingestión de alimentos durante el primer año después de un accidente, aunque indiquen que debido a las hipótesis conservadoras adoptadas es muy improbable que la aplicación de estos niveles ocasione una dosis individual superior a una pequeña fracción de 1 mSv (límite de dosis actualmente vigente para el público en general). El planteamiento de la Organización Mundial de la Salud ha sido también adoptado inicialmente por la FAO (FAO, 1989).

Independientemente de una situación de accidente o no, la Agencia Internacional de la Energía Atómica (IAEA, 1989) ha propuesto una relación de radionúclidos a considerar para valorar la contaminación de alimentos o de muestras medioambientales que pertenezcan a la cadena trófica:

- Aire: ^{131}I , ^{134}Cs , ^{137}Cs
- Agua: ^3H , ^{89}Sr , ^{90}Sr , ^{131}I , ^{134}Cs , ^{137}Cs
- Leche: ^{89}Sr , ^{90}Sr , ^{131}I , ^{134}Cs , ^{137}Cs

- Carne: ^{134}Cs , ^{137}Cs
- Otros alimentos: ^{89}Sr , ^{90}Sr , ^{134}Cs , ^{137}Cs
- Vegetales: ^{89}Sr , ^{90}Sr , ^{95}Zr , ^{95}Nb , ^{103}Ru , ^{106}Ru , ^{131}I , ^{134}Cs , ^{137}Cs , ^{141}Ce , ^{144}Ce
- Suelo: ^{90}Sr , ^{134}Cs , ^{137}Cs , ^{238}Pu , ^{239}Pu , ^{240}Pu , ^{241}Am , ^{242}Cm

El interés de determinaciones de radionúclidos en alimentos se pone de manifiesto por el hecho de que la Comisión (DG 11) de la Unión Europea recoge periódicamente los datos correspondientes a diversos radionúclidos en alimentos, leche y agua de bebida determinados en los países de la Unión. Los radionúclidos en cuestión son tritio, ^{90}Sr y ^{137}Cs para el agua, ^{90}Sr y ^{137}Cs en la leche y también en la dieta elaborada.

La OIEA publicó en 1989 un manual (IAEAE, 1989) con métodos para la medida de radionúclidos en alimentos.

Programas de vigilancia radiológica ambiental en España

Los objetivos básicos de la vigilancia radiológica ambiental son los siguientes:

- Detectar la presencia y vigilar la evolución de elementos radiactivos y de los niveles de radiación en el medio ambiente determinando las causas de los posibles incrementos.
- Estimar el riesgo radiológico potencial para la población.
- Determinar, en su caso, la necesidad de tomar precauciones o establecer alguna medida correctora.

Y en el caso concreto de la vigilancia alrededor de las centrales nucleares y otras instalaciones nucleares y radiactivas del ciclo del combustible nuclear:

- Garantizar el cumplimiento de los requisitos legales y reglamentarios impuestos a las instalaciones.

Tabla 34.2. Factor de dosis por unidad de actividad (Sv/Bq).

	Leche y alimentos para lactantes	Resto de alimentos
^{241}Am , ^{239}Pu	1,0E-05	1,0E-04
^{90}Sr	1,0E-06	1,0E-06
^{131}I , ^{134}Cs , ^{137}Cs	1,0E-07	1,0E-07

- Verificar la idoneidad del programa de vigilancia de efluentes y de los modelos de transferencia de los radionúclidos en el medio ambiente, de modo que se puedan detectar eventuales fugas inadvertidas.

El sistema de redes de vigilancia radiológica ambiental establecido en España para conseguir estos objetivos está integrado por:

- La red de vigilancia implantada en la zona de influencia de las centrales nucleares y otras instalaciones nucleares y radiactivas del ciclo del combustible nuclear, donde los titulares de las instalaciones desarrollan Programas de Vigilancia Radiológica Ambiental (PVRA), a los que el Consejo de Seguridad Nuclear (CSN) superpone sus programas de control independiente, bien de modo directo o mediante encomiendas a las comunidades autónomas.
- La red de vigilancia nacional (Revira), no asociada a instalaciones, que gestiona el CSN, constituida por:

- La Red de Estaciones de Muestreo (REM), donde la vigilancia se realiza mediante programas de muestreo y análisis llevados a cabo por diferentes laboratorios.
- La Red de Estaciones Automáticas (REA) de medida en continuo, que facilita datos en tiempo real de los valores de concentración de actividad en la atmósfera así como de los niveles de radiación ambiental en distintas zonas del país.

Los programas en el entorno de las instalaciones se han establecido de acuerdo con el tipo de instalación y las características del emplazamiento; los programas de ámbito nacional se han elaborado teniendo en cuenta los acuerdos alcanzados en el marco de los artículos 35 y 36 del tratado de Euratom. La Comisión de la Unión Europea, ante las distintas prácticas seguidas por los estados miembros, elaboró una recomendación sobre el alcance mínimo de estos progra-

mas, publicada en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas de 27 de julio de 2000.

Para el desarrollo de los programas de vigilancia se lleva a cabo la recogida y análisis de muestras en las principales vías de transferencia de los radionúclidos en aquellos elementos de los ecosistemas que pueden contribuir a la exposición de las personas a las radiaciones. En términos generales estas vías se pueden clasificar como:

— *Vías transitorias*. Son aquellas en la que la concentración de un radionucleido es proporcional a la tasa de emisión del mismo por lo que, en principio, existirá concentración mientras exista emisión. Dadas las características de los vertidos, en condiciones normales de operación de las instalaciones, y si no existen causas externas (por ejemplo, el accidente de la central nuclear de Chernóbil), los valores de radionucleidos artificiales obtenidos en estas vías suelen estar por debajo del Límite Inferior de Detección (LID), o próximos a estos.

— *Vías integradoras*. Son aquellas en las que la concentración de un radionucleido se incrementa con la emisión continua del mismo al medio, pudiendo persistir después del cese de la emisión. En estas vías se pueden observar algunos incrementos debidos a la operación continuada de las instalaciones nucleares y radioactivas, o bien como consecuencia de una alteración en los niveles de fondo radioactivo (explosiones nucleares en la atmósfera, accidente de la central nuclear de Chernóbil). Dentro de estas vías se incluyen los alimentos como vegetales, leche y carnes.

— *Vías integradoras y acumuladoras*. Son aquellas en las que la concentración de un radionucleido se deriva de las vías de exposición anteriores. En las muestras seleccionadas en estas vías, de existir actividad en las denominadas integradoras y transitorias, bien por deposición radiactiva (poso radioactivo) y/o como consecuencia del funcionamiento de las instalaciones, se pueden detectar también los isótopos presentes en las mismas.

Los programas de vigilancia siguen, en la actualidad, las recomendaciones de la guía de

seguridad del CSN publicada en el año 1993, GS-4.01, «Diseño y desarrollo del Programa de Vigilancia Radiológica Ambiental para centrales nucleares». Se toman muestras de las distintas vías de exposición entre las que vamos a destacar el agua potable y los alimentos al ser las más íntimamente relacionadas con el tema de este capítulo.

1. Agua potable

La recogida de estas muestras tiene como finalidad evaluar la dosis potencial que puede recibir la población como consecuencia de su ingestión. Ninguno de los valores obtenidos en los diferentes análisis realizados en la campaña 2002 superó los niveles de notificación que representan las concentraciones de actividad que podrían dar lugar a los valores de dosis establecidos por el CSN para limitar la emisión de efluentes durante el funcionamiento de las centrales. Tampoco superaron los indicados en el Real Decreto 140/2003, por el que se establecen los criterios sanitarios de calidad de las aguas de consumo humano.

En los emplazamientos costeros no se requiere la vigilancia del agua potable, ya que estas muestras no se ven afectadas por los vertidos líquidos de las instalaciones.

2. Alimentos

Las muestras que componen esta vía proporcionan resultados directos para la evaluación de las dosis por ingestión. Los radionúclidos se incorporan a los vegetales bien directamente (deposición y riego) o indirectamente a través del suelo, y a los animales mediante ingestión de su dieta y agua.

El tipo de alimentos considerados en los PVRA es muy variado (leche, vegetales, carnes, huevos, miel, peces y mariscos) y está relacionado con los usos de la tierra en el entorno de cada instalación. Los resultados obtenidos no han superado los niveles de notificación establecidos por el CSN. Estos, como ya se ha dicho, representan las concentraciones de actividad que podrían dar lugar a los valores de

dosis fijados por el CSN para limitar la emisión de efluentes durante el funcionamiento de las centrales.

Agradecimientos

Al Consejo de Seguridad Nuclear por su colaboración desinteresada en la elaboración de este capítulo.

Bibliografía

- Amaral ECS, Paretzke HG, Campos MJ (1994). The contribution of soil adhesion to radiocaesium uptake by leafy vegetables. *Radiat Environ Biophys* 33: 373-379.
- Amaral ECS, Paretzke HG, Campos MJ (1995). Transfer of ^{137}Cs from soil to chicken meat and eggs. *J Environ Radioactivity* 29: 237-255.
- Baverstock K, Egloff B, Pinchera A (1992). Thyroid cancer after Chernobyl. *Nature* 359: 21-22.
- Baysal A, Tunçer S (1994). Radioactivity levels in fish, shellfish, algae and seagrass collected from the eastern Black Sea of Turkey, 1992. *Toxicol Environ Chem* 42: 149-153.
- BEIR (1989). Report of the «Biological Effects of Ionizing Radiations». Committee of the U.S. National Academy of Sciences and National Institutes of Health, Washington, D.C.
- Beral V, Reeves G (1992). Childhood thyroid cancer in Belarus. (*Letter*) *Nature* 359: 680-681.
- Camean AM, Repetto M (1995). Estado actual de la Toxicología Alimentaria En: Repetto M (ed.). *Toxicología avanzada*. Diaz de Santos, Madrid. 285-288.
- Carvalho F (1995). Po-210 and Pb-210 intake by the Portuguese population: the contribution of seafood in the dietary intake of Po-210 and Pb-210. *Health Phys.* 69: 469-480.
- Carvalho F (1998). Po-210 in marine organism: a wide range of natural radiation dose domains. *Radiat Prot Dosim.* 24 : 109-111.
- Chambra S (1966). Radium-226 in food and man in Bombay and Kerala satate (India). *Br J Radiol.* 39: 141-146.

- Concon JM (1988). *Food toxicology*. Partes A y B. Marcel Dekker. Nueva York.
- CSN (2004). Programas de vigilancia radiológica ambiental. Resultados 2002. Colección Informes Técnicos 12. 2004.
- Dang HS, Pullat VR, Jaiswal DD (1990). Daily intake of uranium by urban Indian populations. *J. Radioanal Nucl Chem*. 138: 67-72.
- Dang HS, Pullat VR, Pillai KC (1992). Simultaneous determination of Th-232 and U-238 in biological samples. Application to the estimation of their daily intake through diet. *J Radioanal Nucl Chem*. 162 (1): 163-169.
- Demirel H, Özer I, Çelenk I (1994). Uptake of cesium-137 by crops from contaminated soils. *J Environ Qual*. 23: 1280-1282.
- Directiva 96/29/EURATOM, de 13 de mayo de 1996, del Consejo, por la que se establecen las normas básicas relativas a la protección sanitaria de los trabajadores y de la población contra los riesgos que resultan de las radiaciones ionizantes.
- Fisenne IM, Perry PM, Decker KM (1987). The daily intake of U-234, 235, 238, Th-228, 230, 232 and Ra-226, 228 by New York city residents. *Health Phys*. 53: 357-363.
- Food Research Institute (1993). *Food safety* 1993, New York. 260-262.
- Food Research Institute (1994). *Food safety* 1994, New York. 204-206.
- Food Research Institute (1995). *Food safety* 1995, New York. 225-227.
- Food Research Institute (1996). *Food safety* 1996, New York. 213-214.
- Franic Z, Sencar J, Bauman A (1992). Caesium radioactivity in mushrooms in Northwest Croatia. *Periodicum Biologorum* 94: 115-120.
- Gofman JW (1981). *Radiation and human health*. Sierra Club Books, San Francisco.
- Heyraud M, Cherry RD, Oschadleus HD (1994). Polonium-210 and lead-210 in edible molluscs from near the Cape of Good Hope: sources of variability in polonium-210 concentrations. *J. Environ Radioact*. 24: 253-272.
- Hoshi M, Yamamoto M, Kawamura H (1994). Fallout radioactivity soil and food samples in the Ukraine: measurements of iodine, plutonium, cesium, and strontium isotopes. *Health Phys*. 67: 187-191.
- Howard BJ, Desmet GM (1993). Relative effectiveness of agricultural countermeasure techniques -REACT- Proceedings of a workshop organised by the Commission of the European Communities DG XII-D-3 Radiation Protection Research DG XI-A-1 Radiation Protection, Brussels, 1-4 October 1991. *Sci. Total Environ*. 137.
- ICRP (1991) 1990 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection, Annals of the International Commission on Radiological Protection 21(1-3). *ICRP Publication 60*. Pergamon Press, Oxford.
- International Atomic Energy Agency (1989) Measurement of radionuclides in food and the environment. *Technical Reports Series N.º 295*. Vienna.
- Jones JM (1992). *Food safety*. Eagan Press, St Paul, MN.
- Kametani K, Ikebuchi H, Matsumura T (1981). Ra-226 and Pb-210 concentrations in foodstuffs. *Radioisotopes* 30: 681-683.
- Karlén G, Johanson KJ, Bertilsson J (1995). Transfer of ¹³⁷Cs to cow's milk: investigations of dairy farms in Sweden. *J Environ Radioactivity* 28: 1-15.
- Kazakov VS, Demidchik EP, Astakhova LN (1992). Thyroid cancer after Chernobyl. *Nature* 359: 21.
- Lalit BY, Ramachandran TV (1980). Natural radioactivity in Indian foodstuffs. *Natural Radiation Environment III*, vol 1: 800-809.
- Lambert BE, Mondon KJ (1999). Radioactivity in food. Environmental. En: Moffat CF, Whittle KJ (eds.). *Contaminants in Food*. CRC Press, Boca Raton FL. 104-145.
- Legget RW, Harrison JD (1995). Fractional absorption of ingested uranium in humans. *Health Phys*. 68: 484-498.
- Lie RT, Irgens LM, Skjærven R (1992). Birth defects in Norway by levels of external and food-based exposure to radiation from Chernobyl. *Am J Epidemiol*. 136: 377-388.
- Likhtarev IA, Sobolev BG, Kairo IA (1995). Thyroid cancer in the Ukraine. *Nature* 375:365.
- Lin LC, Lei Q (1988). Natural radionuclide activity of foodstuffs and water and residents doses estimation in Beijing area. *Chin J Radiol Med Prot*. 8: 26-30.
- Mastinu GG, Santanori GP (1980). The exposure of the Italian population to natural radioactivity in drinking water and food. Seminar on the Radiological Burden of Man from Natural Radioactivity in the Countries of the European Communities. CEC Doc. N.º V/2408/80.

- Mastinu GG, Santaroni GP (1980). Radium 226 levels in Italian drinks waters and foods. *Natural Radiation Environment III*, vol. 1: 810-825.
- Moeller DW (1988). Radiation exposures from natural background ACSH News Views 9: 7-8.
- Mück K (1995). Longterm reduction of caesium concentration in milk after nuclear fallout. *Sci Total Environ*. 162: 63-73.
- Mück K, Roth K, Gerzabek MH, Oberländer HE (1994). Effective half-lives of I- and Cs-isotopes in grassland shortly after fallout. *J Environ*. 24: 127-143.
- Nikiforov Y, Gnepp DR (1994). Pediatric thyroid cancer after the Chernobyl disaster. Pathomorphologic study of 84 cases (1991-1992) from the Republic of Belarus. *Cancer* 74: 748-766.
- Noshkin V, Robinson W, Wong K. (1994) Concentration of Po-210 and Pb-210 in the diet of the Marshall Islands. *Total Environ*. 155: 87-104.
- Paasikallio A, Rantavaara A, Sippola J (1994). The transfer of cesium-137 and strontium-90 from soil to food crops after the Chernobyl accident. *Sci Total Environ*. 155: 109-124.
- Pietrazak-Flis Z, Krajewski P (1994). Radiocesium in diet and humans in northeastern Poland after the Chernobyl accident. *Health Phys*. 67: 115-121.
- Pietrzak-Flis Z, Suplinska MM, Rosiak L (1997). The dietary intake of U-238, U-234, Th-230, Th-232, Th-228 and R-226 from food and drinking water by inhabitants of the Walbrzych region. *J. Radioanal Nucl Chem*. 222: 189-193.
- Pietrzak-Flis, Chrzanowski ZE, Dembinska S (1997). Intake of Ra-226, Pb-210 and Po-210 with food in Poland. *Sci Total Environ*. 203: 157-165.
- Reglamento (EURATOM) N° 2218/89.
- Reglamento (EURATOM) N° 3955/87.
- Shigematsu I, Thiessen JW (1992). Childhood thyroid cancer in Belarus. *Nature* 359: 681.
- Shiraishi K, Igarashi Y, Takaku Y (1992). Daily intakes of thorium-232 and uranium-238 in Japanese males. *Health Phys*. 63: 187-191.
- Silini G (1988). Biological effects of ionizing radiation. En: Harley JH, Schmidt GD, Silini G (eds.). *Radionuclides in the Food Chain*. ILSI Monographs. Springer-Verlag, New York. 33-44.
- Smith ML, Taylor HW, Sharma HD (1993). Comparison of the post-Chernobyl ¹³⁷Cs contamination of mushrooms from eastern Europe, Sweden, and North America. *Appl Environ Microbiol*. 59: 134-139.
- Smith-Briggs JL, Bradley EJ (1984). Measurements of natural radionuclides in UK diet. *Sci Total Environ*. 35: 431-440.
- Sperling K, Pelz J, Wegner RD (1994). Significant increase in trisomy 21 in Berlin nine months after the Chernobyl reactor accident: temporal correlation or causal relation? *Br Med J*. 309: 158-162.
- Strand P, Selnæs TD, Bøe (1992). Chernobyl fallout: internal doses to the Norwegian population and the effect of dietary advice. *Health Phys*. 63: 385-392.
- Stroube WB, Jelinek CF, Baratta EJ (1985). Survey of radionuclides in food, 1978-1982. *Health Phys*. 49: 731-735.
- Stsjazhko VA, Tsyb AF, Tronko ND (1995). Childhood thyroid cancer since accident at Chernobyl. *Br Med J*. 310: 801.
- Sugenoya A, Asanuma K, Hama Y (1995). Thyroid abnormalities among children in the contaminated area related to the Chernobyl accident. *Thyroid* 5: 29-33.
- Ugedal O, Forseth T, Jonsson B, Njåstad (1995). Sources of variation in radiocaesium levels between individual fish from a Chernobyl contaminated Norwegian lake. *J Appl Ecol*. 32: 352-361.
- United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, UNSCEAR 2000. Report to the General Assembly. 93-156.
- UNSCEAR (1993). *Sources and effects of ionizing radiation*, United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. United Nations, Nueva York.
- Upton AC, Linsalata P (1988). Long-term health effects of radionuclides in food and water supplies. En: Harley JH, Schmidt GD, Silini G (eds.). *Radionuclides in the Food Chain*. ILSI Monographs. Springer-Verlag, New York. 218-234.
- Voigt G, Paretzke HG (1992). ¹³⁷Cs uptake with cafeteria food after the Chernobyl accident. *Health Phys*. 63: 574-575.
- Yan J (1991). Content of Po-210 and Pb-210 in main foods of human province. *Radiat Prot*. 11: 221-223.
- Ye C (1984). Estimation of intake and distribution of Ra-226 in bone of inhabitants of Nanchang. *Radiat Prot*. 4: 430.
- Zhu H, Wang S, Wei M (1993). Determinations Sr-90, Cs-137, Ra-226, Ra-228, Pb-210 contents in Chinese diet and estimations of internal doses due to these radionuclides. *Radiat Prot*. 13: 85-92.

Judith Maraver, Isabel M.^a Moreno, Ángeles Jos, Ana M.^a Cameán

Introducción histórica. Aspectos físicos de la irradiación. Aplicaciones y aspectos legales de la irradiación de los alimentos. Efectos sobre los componentes de los alimentos. Consideraciones microbiológicas. Consideraciones toxicológicas de los alimentos irradiados. Métodos para la detección de alimentos irradiados. Bibliografía.

Introducción histórica

Los alimentos pueden ser conservados por diversos métodos: físicos, químicos o biológicos, con el fin último de prevenir cambios indeseables y aumentar la durabilidad de los mismos. Hasta principios de los años 50 se usaron los métodos tradicionales que estaban disponibles para estos propósitos, como por ejemplo el tratamiento térmico por cocinado, la pasteurización y la esterilización térmica en enlatados.

Minck descubrió la acción bactericida de los rayos X y en 1943 apareció el primer artículo sobre la exitosa conservación de hamburguesas por irradiación (Goldblith, 1966). Los esfuerzos para descubrir un uso pacífico de la energía atómica condujeron más tarde a emplear la energía ionizante de los rayos γ que emanan de los isótopos radioactivos, de las fuentes de rayos X o de los electrones acelerados para la pre-

servación de los productos alimenticios. Esta técnica de conservación de alimentos alcanzó el umbral de industrialización en varios países desarrollados en la década de los años sesenta.

El principio sobre el cual se basa la irradiación de alimentos es esencialmente la absorción de cuantos de energía de radiación electromagnética por los alimentos tratados. La radiación empleada es la emitida de forma continua por ^{60}Co y ^{137}Cs durante su deterioro o la radiación emitida discontinuamente por fuentes de rayos X o aceleradores lineales de electrones. Estas fuentes de radiaciones ionizantes han sido específicamente elegidas para asegurar que no se producirá ningún aumento en la radioactividad de los alimentos por encima de los niveles que presentan de forma natural.

Los resultados tecnológicos tras la acción de la radiación son:

- La reducción o eliminación de las consecuencias perjudiciales y riesgos para la

salud debido a la contaminación microbiológica y por parásitos en los alimentos.

- El retraso de la germinación de ciertos alimentos de origen vegetal.
- La desinfección de cosechas importantes para que puedan ser almacenadas durante largos periodos de tiempo.

Además de estos fines, la irradiación permite eliminar sustancias tóxicas o indeseables presentes en los alimentos, tales como ciertos alérgenos o N-nitrosaminas volátiles (Jo *et al.*, 2001). La irradiación no puede en ninguna circunstancia mejorar la naturaleza y calidad de los alimentos cuando experimentan este tratamiento; sin embargo, sí mejora su estado higiénico y, consecuentemente, permite alargar el tiempo de vida.

Aspectos físicos de la irradiación

La radiación electromagnética adecuada para el tratamiento de productos alimenticios tiene una longitud de onda entre 10^3 y 10^{-1} nm. La energía

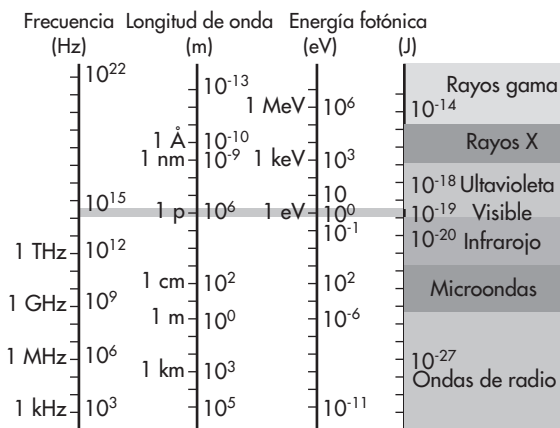


Figura 35.1. Espectro electromagnético.

de radiación correspondiente está entre 10^2 y 10^6 eV. Esto se ilustra en la Figura 35.1.

La energía de los fotones, los cuales en el caso de los rayos γ surgen de núcleos atómicos y en el caso de los rayos X de la parte externa, al igual que la energía de los electrones acelerados, es medida en electronvoltios (1 eV es la energía absorbida por un electrón cuando se acelera a través de un campo eléctrico de potencial 1 voltio).

La dosis de radiación, o cantidad de energía de la radiación incidente absorbida por la materia irradiada, es medida en Gy o Rad (1 Gy es la absorción de 1 J por kg de materia irradiada). En la Tabla 35.1 exponemos algunos valores típicos para el tratamiento por radiación usados en la conservación de alimentos en comparación con otros procesos de conservación.

La energía de los cuantos de fotones o de los electrones en movimiento debe ser suficientemente alta para superar la energía de ionización de los átomos o moléculas de los alimentos que van a ser irradiados. Sin embargo, debe existir también un límite superior para esta energía de radiación, de manera que no se excedan los valores que inducen reacciones nucleares y consecuentemente radioactividad por creación de isótopos radioactivos en los alimentos tratados. El límite superior para la inducción de reacciones nucleares para la mayoría de los átomos se sitúa en el rango de 13-16 MeV, por lo que es convencional restringir el haz de electrones a 10 MeV y en rayos γ y X a 5 MeV.

Tabla 35.1. Equivalentes de energía (kJ/kg) usados en la conservación de alimentos (después de Brynjofsson, 1980).

Radurización (2-5 kGy)	20
Radapertización (30 kGy)	160
Esterilización por calor	920
Almacenamiento a -25 °C durante 3-5 semanas	5150
Almacenamiento a 0 °C durante 10 días	390

Aplicaciones y aspectos legales de la irradiación de los alimentos

Las aplicaciones de la irradiación de alimentos pueden clasificarse en tres categorías: altas dosis (> 10 kGy), dosis medias (1-10 kGy), y bajas dosis (< 1 kGy). A altas dosis, los alimentos son esterilizados como las conservas comerciales. A

dosis medias, hay un efecto de pasteurización gracias al cual aumenta la vida media de los alimentos y se elimina o disminuye su carga de microorganismos patógenos. A bajas dosis, los alimentos son desinfectados de insectos y otras formas de vida mayores, y se retrasa la maduración de frutas y verduras (Woods y Pikaev, 1994). En la Tabla 35.2 aparecen las aplicaciones generales de la irradiación de alimentos.

En los últimos años el tratamiento por irradiación ha adquirido una evolución importante

Tabla 35.2. Aplicaciones y objetivos de la irradiación de alimentos.

Categoría	Objetivo	Modo	Alimentos	Dosis (kGy)
Tratamiento con dosis medias (1-10 kGy)	Aumentar el tiempo de conservación.	Inhibición de la germinación.	Patatas, cebollas, ajos, cebolletas, batatas.	0,05-0,15
	Mejorar/aumentar la vida media.	Retraso en la maduración.	Frutas y verduras frescas.	0,25-1
	Eliminación de insectos y parásitos para propósitos de cuarentena.	Eliminación o esterilización sexual de insectos, destrucción de parásitos como <i>Trichinella spiralis</i> y <i>Taenia saginata</i> .	Cereales y legumbres, harina, frutas secas y frescas, nueces, carne y pescado desecados, carne de cerdo fresca.	0,15-0,7
Tratamiento con dosis bajas (< 1 kGy)	Mejorar la vida media.	Pasteurización para reducir las poblaciones de bacterias, mohos y levaduras.	Ciertas frutas y verduras, rebanadas de pan.	1-3
	Mejorar la conservación refrigerada.	Reducción de las poblaciones de microorganismos capaces de crecer a temperatura de refrigeración.	Carne, ave, pescado.	1-5
	Prevención de las intoxicaciones alimentarias.	Destrucción de <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Listeria</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Yersinia</i> , y otras especies patógenas no esporuladas.	Carne, ave, huevos en polvo, ancas de rana, alimentos marinos congelados, otros alimentos que puedan llevar microorganismos patógenos.	3-10
	Mejorar las propiedades tecnológicas de los alimentos.	Reblandecimiento de los tejidos.	Uvas (incluido el zumo producido), verduras deshidratadas (reduciendo el tiempo de cocinado).	2-7
	Prevención de la contaminación de alimentos a los cuales se les añade ingredientes.	Reducción de las poblaciones de microorganismos en los ingredientes.	Especias, verduras desecadas, otros ingredientes alimentarios.	3-10
Tratamiento con dosis altas (10-45 kGy)	Esterilización comercial sin refrigeración.	Destrucción de organismos alterantes y patógenos, incluidos los formadores de esporas.	Carne, ave, alimentos marinos, alimentos preparados, dietas esterilizadas de hospital.	30-50
	Descontaminación de ciertos aditivos e ingredientes alimentarios.	Destrucción de organismos alterantes y patógenos, incluidos los formadores de esporas.	Especias, preparaciones enzimáticas, goma natural.	10-50

Tabla 35.3. Países donde se permite la irradiación de alimentos.

País	Productos alimenticios
Argentina	Patatas, fresas, cebolla y ajos.
Brasil	Espicias y vegetales deshidratados.
Canadá	Espicias y condimentos.
Chile	Cebollas, patatas, especias y vegetales deshidratados.
China	Patatas.
Finlandia	Espicias.
Hungría	Corcho de vino.
Israel	Espicias.
Japón	Patatas.
República de Corea	Ajo en polvo.
Sudáfrica	Frutas, carnes, cebolla y patatas.
Tailandia	Patatas, cebollas, ajos, trigo, arroz, pescado y pollos.

en las reglamentaciones, tanto europeas como de terceros países.

La irradiación de alimentos está permitida en aproximadamente 40 países y está respaldada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Asociación Médica Americana (AMA), la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) y muchas otras organizaciones. En la Tabla 35.3 aparece una lista de países donde está permitida la irradiación de alimentos, así como los alimentos que pueden ser irradiados (EE UU y UE no aparecen porque se comentarán posteriormente) (FDA, 2000).

En 1980 el Comité Mixto FAO/OMS/OIEA de Expertos, basándose en estudios científicos, concluyó que la irradiación de cualquier producto alimenticio con una dosis máxima de 10 kGy se considera segura. En 1983, la Comisión Mixta FAO/OMS del Codex Alimentarius adoptó, en estrecha colaboración con el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA), una Norma General del Codex Alimentarius para alimentos irradiados y un código internacional recomendado de prácticas, para el funcionamiento de instalaciones de radiación utilizadas para el tratamiento de alimentos.

En EE UU, la FDA ha aprobado la irradiación de diferentes productos alimenticios junto con las dosis máximas que pueden aplicarse en dicho proceso (Tabla 35.4).

En 1999 la FAO, la OIEA y la OMS publicaron un informe de un grupo de estudio sobre la salubridad de los alimentos irradiados con dosis superiores a 10 kGy. Este grupo de estudio concluyó que los alimentos irradiados con cualquier dosis adecuada para alcanzar los objetivos tecnológicos deseados son seguros para su consumo y nutricionalmente adecuados.

Sin embargo, el Comité Científico sobre Alimentos de la Comisión Europea, en una revisión realizada en el 2003 sobre los efectos de los alimentos irradiados en el hombre, concluyó que los estudios clínicos en humanos con alimentos irradiados, aunque no muestran ningún efecto adverso después de la irradiación, tampoco proporcionan suficientes datos para generali-

Tabla 35.4. Alimentos que las regulaciones de la FDA permiten que sean irradiados (FDA, 2000).

Alimentos	Objetivo	Dosis
Cerdo refrigerado	Control de <i>Trichinella spiralis</i>	Desde 0.3 kGy (mín.) hasta 1 kGy (máx.)
Alimentos refrigerados	Inhibición del crecimiento y de la maduración	1 kGy máx.
Alimentos	Desinfección artrópodos	1 kGy máx.
Preparaciones enzimáticas secas	Desinfección artrópodos	10 kGy máx.
Espicias secas/condimentos	Desinfección artrópodos	30 kGy máx.
Aves de corral	Control de patógenos	3 kGy máx.
Carne congelada (NASA)	Esterilización	44 kGy mín.
Carne refrigerada	Control de patógenos	4,5 kGy máx.
Carne congelada	Control de patógenos	7 kGy máx.

zar la irradiación de alimentos con dosis superiores a 10 kGy y que estos sigan siendo seguros y saludables.

La Unión Europea ha consensuado una vía de armonización con los estados miembros, con vistas al buen funcionamiento del mercado interior para este tipo de tratamiento en los productos alimenticios, teniendo en cuenta los límites requeridos para la protección de la salud humana y siempre que no sea un método utilizado como sustituto de las medidas higiénicas o sanitarias o de las prácticas correctas de elaboración o de cultivo.

La armonización establecida incluye dos líneas fundamentales: la primera es la regulación, en una Directiva marco, de la aproximación de las legislaciones de los estados miembros en lo que se refiere al tratamiento por radiaciones ionizantes de alimentos e ingredientes alimentarios tratados con radiaciones ionizantes (Directiva 1999/2/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de febrero); la segunda, es una Directiva de aplicación que regula los productos alimenticios que pueden tratarse con radiaciones ionizantes y fija las dosis máximas autorizadas para alcanzar el objetivo perseguido (Directiva 1999/3/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de febrero, relativa al establecimiento de una lista comunitaria de alimentos e ingredientes alimentarios tratados con radiaciones ionizantes).

A la espera de que se amplíe la lista comunitaria de alimentos irradiados, cinco estados miembros mantienen las autorizaciones nacionales de determinados productos alimenticios, de conformidad con el apartado 4 del artículo 4 de la Directiva 1999/2/CE. En la siguiente tabla (Tabla 35.3) podemos ver cuáles son estos países y los alimentos en los que está permitida la irradiación en sus respectivas legislaciones nacionales.

En lo que se refiere a las instalaciones radiactivas en sí, los requisitos de autorización, tanto en sus aspectos de seguridad como técnicos, se encuentran establecidos en el Real Decreto 1836/1999, de 3 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento sobre instalaciones nucleares y radiactivas.

El Real Decreto 348/2001, de 4 de abril, por el que se regula la elaboración, comercialización e importación de productos alimenticios e ingredientes alimentarios tratados con radiaciones ionizantes, incorpora al ordenamiento jurídico español las dos Directivas antes mencionadas. En el Anexo I del presente Real Decreto se establecen las condiciones para la autorización de la irradiación de productos alimenticios, que son las siguientes:

1. La irradiación de productos alimenticios solo podrá autorizarse cuando:

- a) Esté justificada y sea necesaria desde el punto de vista tecnológico.
- b) No presente peligro para la salud y se lleve a cabo de acuerdo con las condiciones propuestas.
- c) Sea beneficiosa para el consumidor.
- d) No se utilice como sustituto de medidas de higiene y medidas sanitarias, ni de procedimientos de fabricación o agrícolas correctos.

2. La irradiación de productos alimenticios solo se podrá utilizar para los siguientes fines:

- a) Reducción de los riesgos de enfermedades causadas por los productos alimenticios mediante la destrucción de los organismos patógenos.
- b) Reducción del deterioro de los productos alimenticios, frenando o deteniendo el proceso de descomposición y destruyendo los organismos responsables de dicho proceso.
- c) Reducción de la pérdida de productos alimenticios debida a procesos de maduración prematura, germinación o aparición de brotes.
- d) Eliminación, en los productos alimenticios, de los organismos nocivos para las plantas y los productos vegetales.

Dichos productos deberán hallarse en el momento del tratamiento en condiciones adecuadas de salubridad (Artículo 4.1).

Tabla 35.5. Alimentos y dosis permitidas en distintos países de la UE.

Producto	Autorizado con las dosis máximas indicadas (kGy)				
	Bélgica	Francia	Italia	Países Bajos	Gran Bretaña
Hierbas aromáticas congeladas		10			
Patata	0,15		0,15		0,2
Ñame					0,2
Cebolla	0,15	0,075	0,15		0,2
Ajo	0,15	0,075	0,15		0,2
Chalote	0,15	0,075			0,2
Hortalizas, incluidas las legumbres					1
Legumbres				1	
Frutas (incluidos los hongos, el tomate y el ruibarbo)					2
Hortalizas secas y frutos secos		1		1	
Cereales					1
Copos y gérmenes de cereales para productos lácteos		10			
Copos de cereales				1	
Harina de arroz		4			
Goma arábiga		3		3	
Carne de pollo				7	
Aves de corral		5			
Aves de corral (aves domésticas, gansos, patos, pintadas, palomas, codornices y pavos)					7
Carne de pollo recuperada mecánicamente		5			
Menudillos de pollo		5			
Ancas de rana congeladas	5	5		5	
Sangre, plasma y coagulados deshidratados		10			
Pescados y mariscos (incluidos anguilas, crustáceos y moluscos)					3
Gambas congeladas, peladas o bien decapitadas	5	5			
Gambas				3	
Clara de huevo		3		3	
Caseína y caseinatos		6			

En el Anexo II, se establece que la irradiación solo podrá llevarse a cabo con las siguientes fuentes de radiación:

- Rayos gamma procedentes de radionucleidos ^{60}Co o ^{137}Cs .
- Rayos X generados por aparatos que funcionen con una energía nominal (energía cuántica máxima), igual o inferior a 5 MeV.
- Electrones generados por aparatos que funcionen con una energía nominal (energía cuántica máxima), igual o inferior a 10 MeV.

En el Anexo III se explica que la dosis total media absorbida deberá calcularse de la siguiente forma:

1. Dosimetría

Dosis total media absorbida.

A los efectos de determinar la salubridad de productos alimenticios tratados con una dosis total media igual o inferior a 10 KGy, se puede presuponer que, dentro de esta gama específica de dosis, todos los efectos químicos de la irradiación son proporcionales a la dosis.

La dosis total media D se fija con ayuda de la siguiente ecuación integral para el producto alimenticio tratado:

$$D = 1/M^2 \int p(x, y, z) d(x, y, z) dV,$$

donde:

M = Masa total de la muestra tratada.

p = Densidad local en el punto de que se trate (x, y, z) .

d = La dosis local absorbida en el punto en cuestión (x, y, z) y

dV = El elemento en volumen infinitesimal $dx dy dz$, representado en la realidad por las fracciones de volumen.

La dosis total media absorbida por productos homogéneos o productos a granel con una densidad de llenado aparentemente homogénea, puede determinarse directamente distribuyendo por todo el volumen del producto, estratégica y aleatoriamente, un número suficiente de dosímetros. La distribución de dosis, así calculada, permite obtener un valor medio que corresponde a la dosis total media absorbida.

Si está bien determinada la forma de la curva de distribución de la dosis a través del conjunto del producto, se puede calcular dónde se presenten dosis mínimas y dosis máximas. Puede medirse la distribución de la dosis en estos dos puntos en una serie de muestras del producto para obtener una estimación de la dosis total media.

En algunos casos, la media aritmética de los promedios de la dosis mínima y dosis máxima constituye un valor estimativo válido para la dosis total media. En estos casos:

$$\text{La dosis media total} = \frac{\overline{D_{\text{máx.}}} + \overline{D_{\text{mín.}}}}{2}$$

$$\text{La proporción} \frac{\overline{D_{\text{máx}}}}{\overline{D_{\text{mín}}}} \text{ no debería rebasar } 3$$



Figura 35.2. Símbolo de la radura.

En el punto 2 de este anexo se especifican los procedimientos de medida de las dosis para garantizar que no se sobrepasen los límites exigidos.

En el Anexo IV del Real Decreto figuran los productos alimenticios que podrán tratarse con radiaciones ionizantes, junto a las dosis máximas de radiación autorizadas. En concreto, solo está autorizada la irradiación de hierbas aromáticas secas, especias y condimentos vegetales, sin superar en ningún caso los 10 kGy como valor máximo de la dosis total absorbida.

El tratamiento con radiaciones ionizantes no podrá aplicarse en combinación con un procedimiento químico que tenga la misma finalidad que el tratamiento por radiación (Artículo 4.4).

Todos los productos alimenticios que hayan sido tratados con radiación ionizante deberán llevar una de las menciones siguientes: *irradiado* o *tratado con radiación ionizante* (Artículo 6.3 del Real Decreto 1344/1999, de 31 de julio, por el que se aprueba la Norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios). En caso de productos que se vendan a granel, la mención figurará junto a la denominación del producto en un cartel o letrero colocado encima o al lado del recipiente que los contenga (Artículo 6.1.a. del RD 348/2001). Cuando un producto irradiado se utilice como ingrediente, la misma mención deberá acompañar a su denominación en la lista de ingredientes (Artículo 6.1.b. del RD 348/2001).

En EE UU y otros países, además de las menciones de *irradiado* o *tratado con radiación ionizante*, debe aparecer la radura, que es el símbolo internacional para la irradiación (Figura 35.2).

Efectos sobre los componentes de los alimentos

La energía de los fotones de la radiación usada para el tratamiento de productos alimenticios es suficientemente alta como para liberar electrones desde los átomos y moléculas constituyentes, es decir, para inducir ionización. La absorción de la energía de radiación conduce, como proceso primario, a la formación de moléculas ionizadas o radicales libres, los cuales son químicamente muy reactivos. La formación primaria de radicales es independiente de la temperatura, y los productos intermedios son productos de vida corta que experimentan reacciones secundarias conducentes eventualmente a la formación de compuestos radioquímicos estables, de constitución determinada por la composición y estructura molecular de la materia irradiada. Estas reacciones secundarias son dependientes de la temperatura, de la presencia de oxígeno y de otras variables.

Se ha comprobado que con las dosis permitidas de radiación no se producen niveles significativos de radioactividad en los alimentos (Diehl, 1995; Terry y McColl, 1992).

Los efectos químicos de la radiación son expresados cuantitativamente como valores G. Los valores G se definen como el número de moléculas que sufren cambios debido a la radiación absorbida para cada 100 eV de energía absorbida. Para las dosis de radiación aplicadas normalmente en el procesado de alimentos, los valores G están entre 1 y 3. Así, para un valor G de 3 y una dosis absorbida de 10 Gy, cambiará $3 \cdot 10^{-6}$ mol kg^{-1} de sustancia. Para una dosis de D krad, los productos radioquímicos generados serán $D \cdot G \cdot 10^{-3}$ mmol kg^{-1} de sustancia.

Es posible determinar el valor de G por irradiación de soluciones de compuestos individuales o de mezclas simples y análisis para determinar la presencia de productos de descomposición. El conocer los valores G de los componentes de un producto alimenticio puede emplearse para cal-

cular los valores G del producto alimenticio irradiado, ya que los componentes individuales producen los mismos productos radioquímicos si son irradiados aisladamente o como parte de un alimento completo. Para alimentos irradiados adecuadamente es generalmente aplicable un valor G de 1. La mayoría de los compuestos identificados después de la irradiación también están presentes en alimentos no irradiados pero tratados por otros procesos, siendo aproximadamente un 10% los productos no encontrados normalmente en alimentos (Takeguchi, 1983). Las aplicaciones de dosis medias y bajas causan cambios químicos casi insignificantes en el alimento.

En general, se sabe que la irradiación de alimentos con dosis adecuadas no produce daños mayores que el tratamiento térmico. Por otra parte, las reacciones que ocurren en alimentos irradiados, aunque menores en número, son similares a las que tienen lugar en alimentos tratados térmicamente. La mayoría de los cambios en alimentos irradiados dan lugar a productos normales de alimentos o comúnmente generados en ellos durante el procesado y la digestión.

La irradiación de muchos materiales conduce a la deposición en estos materiales de energía, lo que puede dar lugar a reacciones y cambios químicos. Los cambios químicos en los alimentos irradiados aumentan al aumentar la dosis de radiación. Para evaluar la seguridad del consumo de alimentos irradiados son muy importantes los cambios químicos inducidos en estos por la radiación. Esta sección ofrece una visión general de los nutrientes más importantes que se encuentran en los alimentos, así como los posibles cambios causados a estos nutrientes por los procesos de irradiación.

1. Agua

El agua está presente en casi todos los alimentos en distintas proporciones (desde un 5-15% en frutos secos hasta un 80-90% en frutas y verduras). La radiolisis del agua es además de especial interés en la irradiación de alimentos. Los productos radiolíticos del agua son enumerados en la Tabla 35.6.

Tabla 35.6. Productos radiolíticos del agua.

e-aq	Electrones acuosos (solvatados o hidratados).
-H	Átomo de hidrógeno.
H ₂	Hidrógeno.
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno.
H ₃ O ⁺	Protón hidratado o solvatado.

La formación de peróxido de hidrógeno, un agente oxidante bien conocido, tiene una gran importancia en los alimentos irradiados. Sin embargo, es menos significativo que la formación de intermedios altamente reactivos. El radical hidroxilo resultante de la ionización del agua es un poderoso agente oxidante y puede reaccionar con moléculas de nutrientes, aditivos o ingredientes que forman otros alimentos. El potencial para formar muchos productos radiolíticos diferentes es, por lo tanto, bastante alta aunque la cantidad formada realmente es extremadamente pequeña (Swallow, 1991). Aunque esas reacciones ocurren con gran rapidez (a veces en fracciones de segundo), solo se detectan los radicales que quedan atrapados en las partes duras de los alimentos (zonas extremadamente secas, congeladas o densas, como pueden ser huesos y semillas). La detección de estos radicales constituye la base de los métodos que se usan para saber si un alimento ha sido o no irradiado.

2. Hidratos de carbono

Los mayores efectos de la irradiación sobre los hidratos de carbono encontrados en alimentos son los mismos que los que producen el cocinado y otros tipos de procesados de alimentos. Entre estos efectos podemos destacar el acortamiento de las cadenas grandes de los polisacáridos, la degradación del almidón y de la celulosa en azúcares simples, y la formación de ácidos, cetonas y otros azúcares a partir de los monosacáridos. Generalmente los aminoácidos y las proteínas protegen a los carbohidratos de la degradación debida a la irradiación. La irradiación a altas dosis produce el ablandamiento de

frutas y verduras a causa de sus efectos sobre la pared celular de las células vegetales y sobre las pectinas que proporcionan rigidez al tejido vegetal. El uso de la irradiación sobre frutas y verduras destinados a ser consumidas está limitado debido a los efectos sobre la calidad que aparecen a dosis de 1,0 kGy. Por lo general, dosis bajas o medias de irradiación (hasta 10 kGy) tienen efectos suaves en los carbohidratos, no alterándose perceptiblemente su función en los alimentos ni su valor alimenticio.

3. Proteínas

Pueden producirse reacciones muy complejas entre los 20 aminoácidos constituyentes de las proteínas y tres especies reactivas procedentes de la hidrólisis del agua. Se sabe que la irradiación de las proteínas con altas dosis puede producir desnaturalización, formación de radicales proteicos debido a las interacciones con radicales del agua y alteraciones en los aminoácidos (Tabla 35.7). En comparación con ciertos tratamientos convencionales como la esterilización, las dosis bajas no producen más roturas de proteínas en fragmentos de bajo peso molecular y aminoácidos; sin embargo, las dosis muy altas (>100 kGy) pueden causar rotura de las cadenas laterales de aminoácidos. No se ha observado ningún efecto sobre el valor biológico de las proteínas.

Se ha observado que la irradiación afecta a la concentración de aminoácidos en productos de soja y leche (Horvatic y Grüner, 1993). Con dosis de 3 y 5 kGy (utilizando una fuente de ⁶⁰Co), los niveles de metionina disminuyeron en un 10% y los de triptófano en un 23% (3 kGy) y 8% (5 kGy). Las concentraciones de metionina también disminuyeron significativamente con 1 kGy, no así las de triptófano.

4. Lípidos

Al contrario que en el caso de las proteínas y los carbohidratos, las reacciones de los lípidos con las especies reactivas procedentes de la radiólisis del agua son mucho menos importantes en la

Tabla 35.7. Efectos de la irradiación sobre proteínas y lípidos

Componentes		Efectos nutricionales y sobre la calidad	Posibles efectos funcionales
Lípidos	Aminoácidos	Destrucción debida a desaminación, descarboxilación, o rotura de cadenas laterales. Producción de radicales de aminoácidos, amoniaco.	Formación de compuestos saboreados.
	Polipéptidos	Destrucción debida a desaminación, descarboxilación, o rotura de cadenas laterales.	<i>Cross-linking</i> .
		Producción de aminoácidos debido a las roturas de los enlaces peptídicos.	Desnaturalización.
		Producción de radicales de aminoácidos, amoniaco.	Activación, desactivación o ningún efecto.
		Desnaturalización.	Alteración de las propiedades gelificantes y emulsionantes.
		Formación de agregados proteicos.	Formación de compuestos saboreados.
Proteínas	Enzimas	Activación, desactivación o ningún efecto.	Activación, desactivación o ningún efecto.
	Triglicéridos y ácidos grasos	Producción de ésteres, lactonas y cetonas.	Producción de rancidez debido a la oxidación en presencia de oxígeno.
	Fosfolípidos y esteroides	Producción de ésteres, aldehídos y cetonas.	Producción de rancidez debido a la oxidación en presencia de oxígeno.
	Lípidos en alimentos	Producción de ésteres, lactonas y cetonas.	Producción de rancidez debido a la oxidación en presencia de oxígeno.
		Producción de ésteres, aldehídos y cetonas.	Destrucción de ácidos grasos poliinsaturados.

mayoría de las situaciones (Diehl, 1995). La irradiación de los lípidos produce oxidación, la cual puede conducir a la formación de hidroperóxidos lipídicos. El desarrollo de rancidez, con la consiguiente producción de olor y sabor desagradables, se produce solo a altas dosis. Otros efectos incluyen la polimerización lipídica, típicamente observada cuando los alimentos se almacenan después del tratamiento con altas dosis (> 100 kGy) de radiación y la rotura de los lípidos, con la consiguiente formación de aldehídos, ésteres y cetonas (Tabla 35.7).

Generalmente la eliminación del oxígeno durante la irradiación inhibe la oxidación de los lípidos. Esto se puede lograr empaquetando los alimentos o mediante irradiación a vacío. Los cambios químicos que ocurren en los lípidos

como resultado de la irradiación pueden también disminuirse aplicando el tratamiento a alimentos congelados.

El efecto más significativo de la irradiación de la carne es la pérdida de vitamina B₁ y de ácidos grasos poliinsaturados. Al ser dosis y temperatura dependiente, es posible reducir esas pérdidas por irradiación a bajas temperaturas, por ejemplo, -30 °C a -40 °C y eliminando el oxígeno empaquetando al vacío o en atmósfera de nitrógeno. La digestibilidad de la carne y su valor biológico se afectan poco generalmente. La irradiación en presencia de oxígeno favorece la oxidación lipídica y la formación de carbonilos, los cuales reaccionan con proteínas y aminoácidos para dar lugar a una menor utilización neta de las proteínas.

5. Vitaminas

En general, los alimentos que se irradian sufren pérdidas de vitaminas porque estas se destruyen. Además, las vitaminas antioxidantes como la vitamina C y E, pueden combinarse con radicales libres y perder su actividad. Alternativamente, los radicales libres y sus productos pueden atacar y destruir la estructura o la actividad de las vitaminas. Sin embargo, se ha observado que ciertas vitaminas (vitamina B₁₂, ácido pantoténico...) son bastante resistentes a la destrucción inducida por la irradiación. Por otro lado, las vitaminas hidrosolubles, tiamina y ácido ascórbico, son las menos resistentes a los efectos causados por la irradiación.

Las vitaminas son sensibles a las pérdidas por degradación debidas a la irradiación, al igual que cuando se someten a otros tratamientos, como el calentamiento. La magnitud de la sensibilidad varía de unas vitaminas a otras, de unos productos a otros y de unas condiciones de tratamiento a otras. Para retener las vitaminas en los alimentos que van a ser irradiados se recomienda frecuentemente emplear bajas dosis de radiación en combinación con muestras a temperaturas bajas, en ausencia de luz y oxígeno.

Ensayos con roedores de laboratorio han demostrado un crecimiento y desarrollo normales de los animales cuando se ha empleado dieta de laboratorio irradiada. Cuando se aplicaron dosis superiores a 15 kGy, se hicieron necesarios suplementos vitamínicos, mientras que la dosis de 1 kGy no causó pérdidas significativas de nutrientes en la alimentación animal (Elias, 1987).

Cuando se irradian alimentos frescos con bajas dosis de radiación, se produjeron pérdidas de vitamina C comparables a las que se dieron cuando se almacenaron en frío; a dosis mayores, las pérdidas pudieron equipararse a las que se produjeron en el cocinado. La irradiación de frutas, vegetales y tubérculos reduce la vitamina C y los carotenos hasta tal punto que su valor nutritivo se considera insignificante. Las pérdidas de vitamina E pueden ser reducidas en parte por la eliminación de oxígeno durante la irradiación y el almacenamiento.

Se han estudiado los efectos de la radiación (Bloomfield, 1993) en alimentos que constituyen una fuente de vitamina A en países desarrollados y en vías de desarrollo. La estimación de la pérdida de carotenoides en vegetales irradiados se encuentra en el rango de 0-95%, mientras que los niveles de vitamina A en alimentos de origen animal disminuyen en un 6-85%. Esas pérdidas están relacionadas con el tipo de alimento, las condiciones de irradiación y los métodos de extracción y cuantificación de la vitamina.

Los efectos de la radiación γ utilizando fuentes de ¹³⁷Cs en 1; 2,25; 5 y 10 kGy en pechuga de pollo fueron determinados en muestras envasadas en ambiente aerobio y tratadas a 4 °C (Lakritz y Thayer, 1992). Se comprobó que la irradiación inducía una disminución dosis-dependiente de los tocoferoles. A 3 kGy, la máxima dosis aprobada para aves de corral, los γ y α -tocóferoles disminuyeron en un 15 y un 30% respectivamente.

En otros estudios en pechugas de pollo irradiadas con 3 kGy a 2 °C (niveles de radiación aprobados por la FDA para el procesado de las aves de corral) se observó que la concentración de α -tocóferol quedó reducida a un 6% (Lakritz y Thayer, 1994). Las pérdidas de tiamina en músculo esquelético de cerdo, pollo y vaca irradiado con 1,5-10 kGy fueron casi tres veces mayores que las pérdidas de estas vitaminas en hígado en los mismos animales (Fox *et al.*, 1993).

En experimentos con carne de cerdo deshidratada por congelación y parcialmente rehidratada posteriormente, se observó que un incremento del contenido de agua provocaba un incremento de la pérdida de tiamina y una disminución de la pérdida de α -tocóferol (Fox *et al.*, 1994).

Consideraciones microbiológicas

La radiación reduce o elimina la microflora responsable del deterioro de los alimentos, así como los microorganismos patógenos. La sensi-

bilidad al calor de las bacterias es paralela a su sensibilidad a la radiación. Ambos procesos, por tanto, consiguen el mismo resultado final por disminución de la carga microbiana.

Actualmente se acepta universalmente que la diana más importante de las radiaciones ionizantes es el ADN. Los efectos sobre la membrana citoplasmática pueden jugar un papel adicional en determinadas circunstancias (Grecz *et al.*, 1983; Diehl, 1995).

La resistencia a la radiación depende no solo de la dosis de radiación sino también de la temperatura y del medio (Grecz *et al.*, 1981). Las formas vegetativas son 2-3 veces más resistentes en un sistema seco o congelado que en agua. De forma similar, la resistencia a la irradiación al vacío o en atmósfera de nitrógeno es mayor que en presencia de oxígeno. La sensibilidad de los microorganismos a la radiación es generalmente expresada como el número de Gy que mata al 90% de las bacterias (valores D_{10}).

La destrucción de microorganismos mediante irradiación puede verse afectada por diversos factores. Los microorganismos presentan diferente sensibilidad a la radiación dependiendo de sus variaciones morfológicas, de la misma forma que presentan diferente sensibilidad al calor, secado y congelación. Generalmente, el orden de resistencia varía de la siguiente forma: virus > esporas bacterianas > células bacterianas > mohos y levaduras. Generalmente, las formas de vida más simples son las más resistentes a la irradiación. La resistencia a la irradiación se expresa como valores D_{10} que es la dosis requerida para matar al 90% de la población microbiana en un medio (en nuestro caso alimento) determinado. Así, un organismo con un valor de D_{10} de 0,5 kGy es más resistente a la radiación que uno con una D_{10} de 0,25 kGy, ya que se requiere el doble de la dosis de radiación para destruir el mismo número de células. Los valores de D_{10} para bacterias formadoras y no formadoras de esporas se resumen en la Tabla 35.8.

Cuando los alimentos son tratados con dosis altas de radiación no se produce ningún riesgo para la salud pública relacionado con microorganismos, ya que este tratamiento da lugar a

productos comerciales estériles. Por el contrario, cuando los alimentos son tratados con dosis de radiación no esterilizantes, algunos microorganismos sobreviven. Este descubrimiento ha causado numerosas inquietudes (HMSO, 1986; WHO, 1994; Diehl, 1995; Nawrot *et al.*, 1999):

1. Producción de efectos selectivos en la flora microbiana de los alimentos a causa de la radiación: los organismos inocuos son menos resistentes a la radioactividad que ciertas especies patógenas. Por tanto, muchos microorganismos patógenos pueden sobrevivir. También es posible que los organismos alterantes puedan ser destruidos preferentemente por la radiación, permitiendo a organismos patógenos como *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, y *Bacillus cereus* sobrevivir y crecer libremente. En ausencia de microorganismos alterantes, los alimentos parecerían aptos para el consumo al no poseer alteradas las propiedades organolépticas, pero pueden contener un número alto de patógenos y representar un riesgo para la salud humana.
2. Producción de mutaciones en las poblaciones que sobreviven: esto puede transformar organismos que no eran patógenos en otros más virulentos.
3. Incremento de la resistencia a la radiación debido al tratamiento repetido con dosis de radiación subletales.
4. Cambio potencial en las características de diagnóstico de los microorganismos debido a la irradiación, dificultándose así la identificación de especies.
5. Producción de toxinas por especies de bacterias u hongos: se ha observado que cuando se han irradiado esporas de *Aspergillus flavus* o *A. parasiticus* o cultivos derivados de dichas esporas se incrementa la producción de aflatoxinas.

Diversos estudios (Diehl, 1995; Nawrot *et al.*, 1999) muestran que la seguridad microbiológica de los alimentos irradiados es comparable

Tabla 35.8. Valores de D_{10} de diversas bacterias formadoras y no formadoras de esporas.

	Bacterias	Medio	Temperatura de irradiación	D_{10} (Gy)
BACTERIAS NO FORMADORAS DE ESPORAS	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Pescado homogeneizado	Ambiente	30-60
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Carne de vaca picada baja en grasa	Ambiente	120
	<i>Pseudomonas putida</i>	Carne de ave	10 °C	80
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Agua sobre papel de filtro	Ambiente	120-140
	<i>Campylobacter jejuni</i>	Carne de vaca picada	Ambiente	140-160
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Carne de vaca picada	2 °C	140-190
	<i>Proteus vulgaris</i>	Ostras homogeneizadas	5 °C	200
	<i>Yersinia enterocolytica</i>	Carne de vaca picada	Ambiente	100-210
	<i>Shigella dysenteriae</i>	Camarones homogeneizados	Congelado	200
	<i>Shigella flexneri</i>	Camarones homogeneizados	Congelado	410
	<i>Brucella abortus</i>	Carne de vaca picada	Ambiente	340
	<i>Listeria monocytogenes</i>	Carne de ave	12 °C	490
	<i>Listeria monocytogenes</i>	Tampón fosfato	0 °C	180
	<i>Listeria monocytogenes</i>	Alimentos de pollo desecado	0 °C	440
	<i>Escherichia coli</i>	Carne de vaca picada baja en grasa	Ambiente	430
	<i>Escherichia coli</i>	Carne de pollo deshuesado	-5 °C	420
	<i>Escherichia coli</i>	Carne de pollo deshuesado	5 °C	280
	<i>Escherichia coli</i>	Carne de pollo deshuesado	10 °C	230
	<i>Salmonella anatum</i>	Carne de vaca picada	Ambiente	670
	<i>Salmonella enteritidis</i>	Carne de vaca picada baja en grasa	Ambiente	700
	<i>Salmonella enteritidis</i>	Carne de pollo deshuesada	10 °C	620
	<i>Salmonella newport</i>	Huevo líquido	0 °C	320
	<i>Salmonella oranienburg</i>	Huevo líquido	0 °C	320
	<i>Salmonella panama</i>	Carne de vaca picada	Ambiente	660
	<i>Salmonella paratyphi A</i>	Ostras homogeneizadas	5 °C	750
	<i>Salmonella paratyphi B</i>	Ostras homogeneizadas	5 °C	850
	<i>Salmonella stanley</i>	Carne de vaca picada	Ambiente	780
	<i>Salmonella typhimurium</i>	Carne de vaca picada	Ambiente	550
	<i>Salmonella typhimurium</i>	Carne de pollo deshuesada	-30 °C	900
	<i>Salmonella typhimurium</i>	Carne de pollo deshuesada	0 °C	450
	<i>Salmonella typhimurium</i>	Carne de pollo deshuesada	10 °C	390
	<i>Salmonella typhosa</i>	Ostras homogeneizadas	5 °C	750
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Carne de vaca picada baja en grasa	Ambiente	580
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Carne de pollo deshuesada	0 °C	470
<i>Lactobacillus sp</i>	Carne de vaca picada	Ambiente	300-880	
<i>Streptococcus faecalis</i>	Camarones homogeneizados	5 °C	750	

Tabla 35.8 (Continuación). Valores de D_{10} de diversas bacterias formadoras y no formadoras de esporas.

	Bacterias	Medio	Temperatura de irradiación	D_{10} (Gy)
BACTERIAS NO FORMADORAS DE ESPORAS	<i>Streptococcus faecium</i>	Disolución tampón	5 °C	900
	<i>Deinococcus radiodurans</i>	Caldo de nutrientes	Ambiente	3.500
	<i>Moraxella-Acinetobacter</i> (del pescado marino)	Agar de nutrientes	Ambiente	950-1.900
	<i>Moraxella-Acinetobacter</i> (de la carne)	Caldo de nutrientes	Ambiente	4700
	<i>Clostridium botulinum</i> A-33	Disolución tampón	Ambiente	3.300
	<i>Clostridium botulinum</i> A-62	Solución tampón	Ambiente	2.200
	<i>Clostridium botulinum</i> B-53	Disolución tampón	Ambiente	3.300
	<i>Clostridium botulinum</i> B-51	Disolución tampón	Ambiente	1.300
	<i>Clostridium botulinum</i> E (Alaska)	Estofado de carne de vaca	Ambiente	1.400
	<i>Clostridium botulinum</i> E (Iwamai)	Estofado de carne de vaca	Ambiente	1.250
	<i>Clostridium perfringes</i> C	Agua	Ambiente	2.100
	<i>Clostridium perfringes</i> E	Agua	Ambiente	1.200
	<i>Bacillus cereus</i>	Caldo de nutrientes	Ambiente	3.200
	<i>Bacillus pumillus</i> E-601	Seco	Ambiente	3.000
	<i>Bacillus subtilis</i> 6051	Disolución salina	Ambiente	640
<i>Bacillus stearo thermophilus</i>	Disolución tampón	0 °C	1.000	

con la de los alimentos conservados mediante otros métodos de conservación aceptables, no existiendo indicación de riesgo bacteriológico asociado a los procesos de irradiación (Word y Bruhn, 2000). Expertos de la OMS concluyeron que no hay razón alguna para suponer que los alimentos irradiados necesitan estar sujetos a controles diferentes a los aplicados regularmente a alimentos procesados por técnicas convencionales (WHO, 1994).

Sin embargo, la irradiación de alimentos por sí misma no puede garantizar la seguridad microbiológica de los alimentos así tratados. A causa de la resistencia natural a la radiación de algunos microorganismos, la aplicación de bajas dosis no puede solventar por sí misma todos los problemas relacionados con la seguridad microbiológica de los alimentos. Algunos problemas requieren tratamientos combinados para su solución. Sin embargo, la irradiación crea otra barre-

ra para la transmisión de patógenos a través de los alimentos, especialmente organismos gram negativos, dejando supervivientes que son normalmente más sensibles al calor, al desecado y a otros tratamientos tecnológicos. Los problemas derivados de este tratamiento no son mayores que los encontrados con otros métodos de conservación parcial, por ejemplo, la pasteurización y el salado.

Consideraciones toxicológicas de los alimentos irradiados

El tratamiento de alimentos con radiaciones ionizantes no induce radioactividad medible en los alimentos cuando se suministra la energía y los

niveles de dosis no exceden las dosis recomendadas para el procesado de alimentos. El potencial para inducir radioactividad solo está relacionado con las fuentes de electrones o rayos X y no es una consecuencia de las fuentes de radionúclidos. Así, los alimentos objetos de radiaciones ionizantes con ^{60}Co y ^{137}Cs o electrones acelerados de 10 MeV o menos y con rayos X de 5 MeV o menos no se transformarán en alimentos radioactivos (Diehl, 1995; Nawrot *et al.*, 1999).

La salubridad y potencial toxicidad de los alimentos irradiados y de los componentes alimenticios irradiados han sido estudiadas en un gran número de investigaciones *in vivo* e *in vitro* desde 1961:

1. Estudios de toxicidad subcrónica

Unos 400 estudios de toxicidad subcrónica sobre la ingesta de alimentos irradiados estuvieron disponibles a partir de 1982 y fueron revisados por la FDA para su aceptabilidad como evidencia de su seguridad, sometiéndose al grupo de expertos de la OMS en 1994. De estos, unos 250 fueron considerados aceptables o aceptables con reservas a causa de ser inadecuados.

Se observaron solo algunos efectos adversos, principalmente en estudios de las dietas de animales de laboratorio que utilizaron dosis superiores a 10 kGy, asociándose con la pérdida de vitaminas y otros macronutrientes.

En un estudio subcrónico de 90 días, ratas jóvenes de la generación F_{2b} procedentes de un estudio multigeneracional que fueron alimentadas tanto con alimentos irradiados (3 o 6 kGy) como con una dieta basal en la que la carne de pollo no irradiado constituía el 35%, no se observaron efectos adversos sobre el peso corporal, el peso de los órganos, los parámetros urinarios y hemáticos, ni tampoco se produjeron cambios histopatológicos significativos (FDA, 1987).

2. Estudios toxicológicos de reproducción y desarrollo

De los 22 estudios de reproducción y teratogenicidad revisados por la FDA, 11 fueron lleva-

dos a cabo en ratas, 6 en ratón, 3 en perros, 1 en hamsters y otro en conejos. Un estudio holandés no encontró diferencias en el crecimiento, reproducción, hematología e histopatología entre ratas alimentadas con dieta irradiada (50 kGy) y ratas alimentadas con dieta no irradiada (Strik, 1986). En cerdos encontraron resultados similares (Strik, 1986).

Otros estudios multigeneracionales en ratas compararon la carne de pollo irradiada (3 o 6 kGy) con la carne de pollo no irradiada, constituyendo en ambos casos el 35% de la dieta basal de estos animales, no observándose efectos relacionados con el tratamiento sobre los parámetros reproductivos (fertilidad, número de crías, pérdidas posimplantación) ni sobre el peso de las crías, mortalidad de las mismas y su crecimiento (FDA, 1987).

3. Estudios crónicos de carcinogenicidad

De 63 estudios crónicos disponibles, 2 fueron llevados a cabo sobre ratas, 18 en ratón, 11 en perros, uno en cerdos y otro en monos. En ningún estudio realizado con ratas se observaron efectos tóxicos significativos, excepto un descenso ocasional de los niveles de enzimas séricas o pequeñas disminuciones en los pesos de las crías de la segunda y tercera generación, que desaparecieron posteriormente.

De acuerdo con la FDA, muchos de los estudios crónicos con perros no mostraron efectos adversos o bien estos eran inconsistentes. Igualmente, no se observaron efectos adversos en los estudios crónicos realizados con monos y cerdos.

4. Estudios de genotoxicidad

Casi 60 estudios de la inducción de mutagénesis por consumo de alimentos irradiados fueron revisados por la FDA. Los resultados de estos fueron contradictorios, ya que mientras un pequeño número de estudios obtenían resultados positivos tras alimentación con trigo irradiado a 0,75 kGy, otros, usando dosis mucho mayores, dieron resultados negativos.

La irradiación de soluciones puras de glucosa o sacarosa ha producido efectos mutagénicos en el ensayo de mutagénesis reversa en *Salmonella enterica* var. *typhimurium*, aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos, y la inducción de mutaciones en *Drosophila melanogaster*. Estos efectos no se produjeron sin embargo en los estudios *in vivo* realizados con alimentos irradiados.

La posible actividad mutagénica de las 2-alkilciclobutanonas, formadas en la grasa contenida en alimentos durante su irradiación ha sido considerada por el Comité Científico sobre Alimentación (SCF, 2002). Se sabe que estos compuestos se forman por la escisión de los triglicéridos de la grasa alimentaria inducida por la irradiación, y se han empleado como marcadores específicos de alimentos grasos irradiados a partir de 1992, pero solo recientemente se ha sintetizado material puro suficiente para llevar a cabo ensayos de su potencial genotoxicidad. Los ensayos realizados al respecto han dado lugar a resultados contradictorios, por lo que la genotoxicidad de estos compuestos no se ha establecido aún (Sommers CH, 2003). Algunas investigaciones apuntan sobre su posible actividad promotora de tumores (Rao, 2003), concretamente de tumores de colon en ratas (Raul *et al.*, 2002).

5. Estudios clínicos en humanos

Los primeros estudios clínicos de los efectos del consumo de alimentos irradiados en humanos se realizaron en 1957 por Plouhg *et al.*, y en 1958 por Bierman *et al.*, y en ninguno de ellos se produjeron efectos clínicos adversos o cambios en los valores químicos analíticos, prestándose especial atención al funcionamiento cardíaco, hematología, y las funciones hepática y renal.

A finales de los años 80 se realizó un estudio a doble ciego con estudiantes sanos, 36 hombres y 34 mujeres, a los que se les administró en la dieta 35 clases distintas de alimentos irradiados durante 90 días. Se realizaron exámenes físicos antes y después del consumo de esta dieta. Además, se determinaron las aberraciones cromosómicas estructurales, intercambios de cro-

mátidas hermanas y micronúcleos en linfocitos. En la orina se ensayó la inducción de mutaciones reversas en cepas de *Salmonella enterica* var. *typhimurium* con y sin activación metabólica. No se encontraron efectos adversos en el examen físico, no hubo diferencias significativas en la frecuencia de aberraciones cromosómicas con respecto al control y tampoco un aumento significativo de poliploidías. Los resultados obtenidos en el ensayo de micronúcleos y de intercambios de cromátidas hermanas tampoco fueron significativos y la orina no mostró evidencia de actividad genotóxica (Anon, 1987; Shao y Feng, 1988).

Posteriormente no se han realizado estudios clínicos adicionales con alimentos irradiados.

Métodos para la detección de alimentos irradiados

Existe un gran interés en desarrollar métodos que distinguan los alimentos irradiados de los alimentos no sometidos a este proceso.

El hecho de que no se hayan encontrado productos específicos de la radiación en todos los alimentos irradiados hace difícil demostrar analíticamente con propósito de inspección si los alimentos en venta o en tránsito han sido irradiados.

Existen métodos para mostrar diferencias entre alimentos irradiados y no irradiados, pero su exactitud no ha sido demostrada en la práctica y por lo general no se pueden hacer estimaciones cuantitativas de la dosis de radiación recibida por los alimentos individuales. Actualmente se están realizando estudios para comprobar la fiabilidad de los distintos métodos en la identificación de alimentos de distinta naturaleza irradiados.

A principios de la década de los 90, la Comisión Europea financió un programa de investigación que duró dos años para el desarrollo y validación de métodos de detección para los

Tabla 35.9. Protocolos del Comité Europeo de Normalización.

N.º	Método	Alimentos a los que se aplica
EN 1784	Análisis por cromatografía gaseosa de hidrocarburos para la detección de alimentos irradiados que contienen grasas.	Carne, queso camembert, aguacates, papayas, mangos.
EN 1785	Análisis por cromatografía de gases/espectrometría de masas para la detección de 2-alquilciclobutanonas en la identificación de alimentos irradiados que contienen grasas.	Carne, huevo.
EN 1786	Espectroscopía por resonancia de espín electrónico para la detección de alimentos irradiados que contienen huesos.	Carne y pescado.
EN 1787	Espectroscopía por resonancia de espín electrónico para la detección de alimentos irradiados que contiene celulosa.	Páprikas, nueces.
EN 1788	Termoluminiscencia para la detección de alimentos irradiados desde los cuales pueden ser aislados minerales silicatos.	Hierbas aromáticas, especias, camarones.
EN 13708	Espectroscopía de resonancia de espín electrónico para la detección de alimentos irradiados que contienen azúcares cristalinos.	Pasas, papayas desecadas, higos desecados, mangos desecados.
EN 13783	Combinación del filtro epifluorescente directo/recuento en placa para la detección de alimentos irradiados.	Hierbas y especias.
13784	Ensayo del cometa para la detección de alimentos irradiados.	Carnes y vegetales.

alimentos tratados mediante radiaciones ionizantes utilizando materiales certificados de referencia (MCR). En el transcurso de dicho programa, fueron desarrollados numerosos métodos. En 1993, la Comisión Europea envió un mandato al Comité Europeo para la Normalización (CEN) con el objeto de estandarizar dichos métodos. El CEN creó el grupo de trabajo 8 «Alimentos Irradiados» del Comité Técnico 275 «Análisis de alimentos» Métodos Horizontales (CEN/TC275/WG8) el cual tuvo su primera reunión en noviembre de 1993. Como resultado del trabajo realizado por el CEN/TC275/WG8, los estándares europeos están disponibles en los institutos nacionales de estandarización. Estos estándares europeos han sido adoptados por la Comisión del Codex Alimentarius como métodos generales y aparecen referenciados en los Estándares Generales del Codex para Alimentos Irradiados en la sección 6.4 en «Verificación post-irradiación». Entre estos métodos podemos destacar los que aparecen en la Tabla 35.9.

Además de estos métodos normalizados, hay otros que también tienen aplicación en la detección de alimentos irradiados:

- *Análisis electroforético.*
- *Medidas de la viscosidad.*
- *Método del sensor electrónico.*
- *Análisis por inmunoblotting.*
- *Medidas de la conductividad eléctrica y de la impedancia.*

Bibliografía

- Anónimo (1987). Safety evaluation of 35 kinds of irradiated foods. *Chin. Med.* 100: 715-718.
- Bierman EL (1958). Short-term human feeding studies of foods sterilized by gamma radiation and stored at room temperature. *US Army Med Nutr Labor* 224
- Bloomfield L (1993). Food irradiation and vitamin A deficiency. *Food Policy* 18: 64-72.
- Comisión de la UE (2002). Informe de la Comisión sobre el tratamiento con radiación ionizante de productos durante el período de septiembre de 2000 a diciembre de 2000. COM (2002) 549.
- Deshpande SS (2002). *Handbook of food toxicology: Toxicants resulting from food processing*, Marcel Dekker, New York.

- Diehl JF (1995). The safety of irradiated food. 2.^a edición. *Marcel Dekker*, New York.
- Elias P. S. (1987) Food Irradiation. En: Miller K (ed.). *Toxicological aspects of food*. Elsevier Applied Science. Amsterdam 295-331.
- European Commission Scientific Committee on Food (2003). Revision of the opinion of the Scientific Committee on Food on the irradiation of food.
- FDA (1987). *Federal Register*, 52, 6391.
- FDA (1998) Food irradiation: The treatment of foods with ionizing radiation. *Food Testing Anal* 4(3): 9-35.
- FDA (2000). *Food Irradiation: A safe measure*.
- Food Research Institute (1993). *Food Safety* 1993, New York. 260-262.
- Food Research Institute (1994). *Food Safety* 1994, New York. 204-206.
- Food Research Institute (1995). *Food Safety* 1995, New York. 225-227.
- Food Research Institute (1996). *Food Safety* 1996, New York. 213-214.
- Fox JB Jr, Lakritz L, Kohout KM, Thayer DW (1994). Water concentration/activity and loss of vitamins B₁ and E in pork due to gamma radiation. *J Food Sci* 59: 1291-1295.
- Fox JB Jr, Lakritz L, Thayer DW (1993). Effect of reductant level in skeletal muscle and liver on the rate of loss of thiamin due to γ -radiation. *Int J Radiat Biol* 64: 305-309.
- Goldblith SA (1966). Historical development of food irradiation. En: Food Irradiation. *Proc Int Symp food irradiation*. STI/PUB 127, IAEA, Vienna. 3-21.
- Grecz N, Bruszew G, Amin I (1981). *Combination processes in food irradiation*. IAEA, Vienna. 3-20.
- Grecz N, Rowley DB, Matsuyama A (1983). The action on bacteria and viruses. En: Josephson ES, Peterson MS, *Preservation of food by ionizing radiation*. CRC Press, Boca Raton, FL. 167-218.
- HMSO (1986) Report on the Safety and Wholesomeness of Irradiated Foods. Advisory Committee on Irradiated and Novel Foods. Her Majesty's Stationary Office, London.
- Horvatic M, Grüner M (1993). Einfluß der Gamma-Bestrahlung auf den Methionin- und Tryptophangehalt in Sojaproteinprodukten. *Nahrung* 37: 147-152.
- Jo C, Lee JW, Byun MW (2001). Short communication of novel application of food irradiation. *J Food Sci Nutri* 6: 253-256.
- Lakritz L, Thayer DW (1992). Effect of ionizing radiation on unesterified tocopherols in fresh chicken breast muscle. *Meat Sci* 32: 257-265.
- Lakritz L, Thayer DW (1994). Effect of gamma radiation on total tocopherols in fresh chicken breast muscle. *Meat Sci* 37: 439-448.
- Minck F (1986). Zur Frage über die Einwirkung der Röntgenschen Strahlen auf Bakterien und ihre eventuelle therapeutische Verwendbarkeit. *Münch Med Wochenschr*, 5, 101; 9, 202.
- Nawrot PS, Vavasour EJ, Grant DL (1999). Food irradiation, heat treatment, and related processing techniques: safety evaluation. En: van der Heijden K, Younes M, Fishbein L, Miller S (eds.). *International food safety handbook* 287-316. Marcel Dekker, New York.
- Plough IC (1957). An evaluation in human beings of the acceptability, digestibility and toxicity of pork sterilized by gamma radiation and stored at room temperature. *US Army Med Nutr Labor* 204.
- Rao C (2003). Do irradiated foods cause or promote colon cancer?. *Nutr Cancer* 46: 107-109.
- Raul F, Gosse F, Delincee H, Hartwing A, Marchioni E, Miesch M *et al* (2002). Food-borne radiolytic compounds (2-alkylcyclobutanones) may promote experimental colon carcinogenesis. *Nutr Cancer* 44: 188-191.
- Real Decreto 348/2001, de 4 de abril, por el que se regula la elaboración, comercialización e importación de productos alimenticios e ingredientes alimentarios tratados con radiaciones ionizantes. *BOE* n.º 82, 2001.
- SCF (Scientific Committee for Food) (2002). *Statement on a report on cyclobutanones*.
- Shao S, Feng J (1988). Safety estimation of persons feeding from 35 kinds of irradiated diets—chromosome aberrations and SCE analysis of cultured lymphocyte. *Chin Radiat Med Prot* 3:271-271.
- Sommers CH (2003). 2-Dodecylcyclobutanone does not induce mutations in the Escherichia coli tryptophan reverse mutation assay. *J Agr Food Chem* 51: 6367-6370.
- Strick JJTWA (1986). Toxicological investigations on irradiated feed in pigs. *Tijds Dierg* 111: 240-243.
- Swallow J (1991). Wholesomeness and safety of irradiated foods. En: Friedman M (ed.). *Nutritional and toxicological consequences of food processing*. Plenum Press, New York, 11-31.

Takeguchi CA (1983). Regulatory and toxicological aspects of food irradiation. *J Food Safety* 5: 213-217.

Terry AJ, McColl NP (1992). *Radiological consequences of food irradiation*. National Radiological Protection Board, London.

WHO (1994). Safety and nutritional adequacy of irradiated food. World Health Organization, Geneva.

Word OB, Bruhn CM (2000). Position of the American Dietetic Association: food irradiation. *J Am Diet Assoc* 100: 246-253.

LAS FUENTES DE INFORMACIÓN EN TOXICOLOGÍA ALIMENTARIA: BASES DE DATOS ACCESIBLES EN INTERNET

Guillermo Repetto, Ana del Peso, Ángeles Jos, Isabel Moreno, Silvia Pichardo, Ana María Cameán

Disponibilidad de información de calidad. La selección de las bases de datos. Localización de la información en una base de datos. Entidades internacionales sobre seguridad alimentaria. Entidades españolas y seguridad alimentaria. Buscadores generales y metabuscadores. Las bases de datos especializadas. Aditivos alimentarios. Toxinas de animales, vegetales y microorganismos. Residuos de medicamentos. Residuos de plaguicidas. Contaminantes. Alergias alimentarias. Cáncer y reproducción. Evaluación del riesgo y la toxicidad. Otros alimentos. Información bibliográfica y legislativa. Bibliografía.

Disponibilidad de información de calidad

La seguridad alimentaria es una disciplina de gran trascendencia y que origina una gran preocupación social. Los recientes desastres químicos alimentarios están motivando en los consumidores una mayor demanda de control alimentario y han forzado a las administraciones públicas al endurecimiento de las legislaciones específicas y a la creación de organismos independientes en la mayoría de los países y organizaciones internacionales.

La Toxicología Alimentaria estudia los riesgos para la salud ocasionados por la presencia

en los alimentos de toxinas propias o producidas por microorganismos, de plaguicidas que fueron aplicados sobre los vegetales, de medicamentos veterinarios y hormonas con los que se trataron los animales, de contaminantes ambientales como las dioxinas o los bifenilos policlorados que se introdujeron en la cadena alimentaria, de los aditivos añadidos para mejorar las características, y finalmente de los subproductos generados durante su producción y procesado.

La enorme complejidad y amplitud de los aspectos considerados por la Toxicología Alimentaria exige que los profesionales de los distintos ámbitos y los consumidores dispongan de información adecuada sobre las sustancias, su cinética, sus efectos y las regulaciones que le sean aplicables.

El orden habitual del proceso de generación y uso de la información científica y reguladora consiste en que la información básica producida en los laboratorios de investigación sea inicialmente publicada en artículos de revistas científicas, las cuales comprueban previamente su veracidad e interés mediante un sistema de revisión por expertos. A partir de ese momento, se extraen referencias de los artículos que se incluyen en bases de datos bibliográficas, y también de datos concretos que se introducen en bases de datos informacionales. Las organizaciones y administraciones públicas utilizan esos datos para la elaboración de informes y documentos técnicos que son empleados como base para generar nuevas normativas y legislar límites, siendo ambos incluidos en otras bases de datos. También deben estar disponibles los informes de las evaluaciones del riesgo o de los posteriores estudios de monitorización del cumplimiento de los límites administrativos, generando las alarmas específicas cuando sea necesario, de las cuales deben ser informados todos los implicados.

Antes de 1990 el acceso a la información toxicológica estaba muy limitado, quedando esta concentrada en algunas bases de datos privadas u oficiales o comerciales, o directamente en revistas y directorios de resúmenes de publicaciones. A partir de entonces gran parte de la información pasa a ser compartida. Comienza la disponibilidad a través de Internet en diversas bases de datos de gran interés, ya que sus propietarios permiten su difusión. A partir del año 2000 se empieza a generalizar el acceso a textos completos, incluyendo los artículos de revistas, habiendo surgido en la actualidad el debate acerca de la necesidad de la libre disposición de los mismos.

Este incremento exponencial en la cantidad de la información disponible presenta el grave inconveniente de que no toda la información es de buena calidad (Winter, 2002), y de que es preciso establecer procedimientos para seleccionar adecuadamente las bases de datos útiles, relevantes y bien fundamentadas. La generalización de sistemas uniformados para la catalogación de

portales de Internet de calidad controlada puede ayudar en la selección de las mismas.

La selección de las bases de datos

Las bases de datos en Internet presentan una serie de ventajas que incluyen el acceso desde cualquier lugar, la inmediatez de la respuesta, la disponibilidad de la última versión de la información, fácilmente actualizada, y la gran variedad y amplitud de contenidos de la misma. Entre los principales inconvenientes figura que las direcciones de acceso son muy cambiantes, lo que obliga a comprobar continuamente su funcionamiento. La operatividad de los servidores y las limitaciones de las conexiones restringen actualmente el acceso a algunas direcciones, particularmente a determinadas horas del día. De igual modo, algunos navegadores resultan incompatibles para determinadas direcciones. El idioma puede suponer una limitación más, ya que la mayor parte de las bases de datos está en inglés.

Sin embargo, hemos de reconocer que el acceso a la información sobre la salud utilizando instrumentos de búsqueda y términos simples no es eficiente (Berland *et al.*, 2001). La cobertura de la información clave en sitios web en inglés y en español es insuficiente e inconsistente, a pesar de que la precisión de la información proporcionada en general es buena. Para entender la información sobre salud en la Red se requieren unos niveles altos de lectura.

Los datos fundamentales utilizados en toxicología incluyen la identificación de la sustancia, sus propiedades fisicoquímicas, producción y localización de los fabricantes, procedimientos analíticos, medidas de seguridad ocupacionales y de manipulación y transporte, emergencia, tratamiento de intoxicaciones, cinética y exposición ambiental, biorremediación, toxicidad y cinética en diferentes organismos, e información de normas reguladoras.

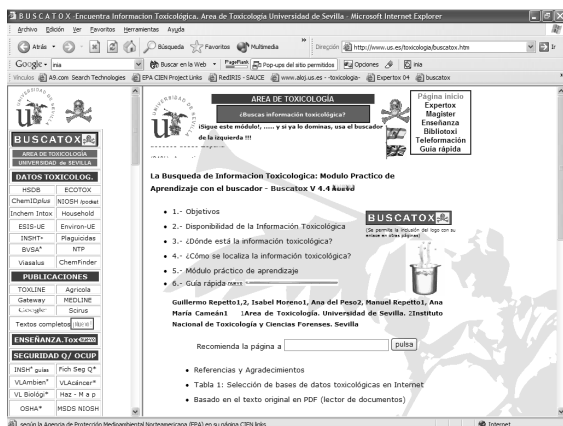


Figura 36.1. Imagen del buscador y módulo de aprendizaje Buscatox, libremente accesible a través de la página del Área de Toxicología de la Universidad de Sevilla (<http://www.us.es/toxicologia/buscatox.htm>).

Esta información se encuentra en una gran cantidad de bases disponibles, por lo que los criterios más útiles para seleccionarlas debieran basarse en la relevancia de la información que contengan; la fidelidad de la mismas a los documentos originales; la objetividad en el tratamiento de los datos, separando la información de cualquier tipo de anuncios, y si es posible, citando la fuente original; la mayor cobertura posible; y la actualización periódica.

No pueden proporcionarse reglas generales para la selección de las bases de datos, ya que aunque disponemos de algunas bases de datos muy completas, siempre suele existir alguna más específica que profundice más sobre el aspecto concreto que nos interese. Por ello, en principio es conveniente buscar la información en varias bases de datos, comenzando por una general, como la de HSDB, y después en algunas de la temática específica. Sin embargo, cada caso particular requiere una estrategia diferente.

Las bases de datos pueden ser de acceso gratuito, de acceso libre tras registro, o de pago. Según el formato pueden encontrarse en CD-ROM para acceso desde sistemas convencionales o en agendas electrónicas (PDA, Notebook) o en Internet. En este caso, la propiedad del sistema debiera quedar clara, así como la autoría de

los documentos. El respaldo de instituciones de prestigio supone un valor añadido de gran interés.

En los próximos apartados se incluyen referencias a bases de datos y páginas de Internet que se han considerado contienen la información más útil en Toxicología Alimentaria. Se han revisado todos los enlaces en el momento de la redacción, tratando de escoger las páginas más actualizadas. Sin embargo, es posible que algunas direcciones cambien o que se generen otras páginas que las sustituyan.

Localización de la información en una base de datos

Las bases de datos emplean diferentes criterios para la clasificación y búsqueda de la información, lo que obliga al usuario a adaptarse y a recordar las peculiaridades de cada una de ellas si desea obtener con rapidez resultados útiles.

Una vez instalada la base de datos se accede al programa de búsquedas. En el caso de las bases de datos en Internet se abre el navegador, y en la ventana de selección se teclea exactamente la dirección completa de la página de acceso a cada base de datos, que se identifica con las siglas «http».

Cuando se abre la página, se escriben en la ventana de búsqueda el o los términos (separados por espacios) que mejor definan el objetivo de la misma. No es posible dar recomendaciones generales, ya que cada base de datos es diferente de las demás. En algunas bases de datos la búsqueda se realiza a través de menús, pulsando sucesivamente en las letras y términos, generalmente subrayados y en azul, que enlazan sus contenidos.

La eficiencia en localizar información exclusiva del compuesto solicitado es muy variada dependiendo de la base de datos. Por ejemplo, es del 63% para ChemFinder y del 73% para ChemIDplus. Este aspecto es fundamental ya que muchas publicaciones citan los com-

puestos estudiados con nomenclaturas antiguas. Es muy conveniente seguir las recomendaciones de la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) o mejor aún, emplear el número clave exclusivo asignado por el Chemical Abstracts Service (CAS) para más de 23 millones de sustancias. Otras entidades también emplean sus propias claves, como RTECS, EINECS, EEC, etc.

En primer lugar, es preciso definir claramente cuál es la información que se desea encontrar. Es recomendable preparar previamente una lista con los descriptores, sinónimos o frases que mejor definan el objetivo, usando el idioma de la base de datos. Los términos suelen combinarse entre sí para reducir el número de respuestas, empleando cuando sean necesario comandos de inclusión de ambos (y/and/+), inclusión de alguno (o/or/,) o exclusión (no/not/-).

Para no perder información, se recomienda utilizar términos en singular, o mejor aún, usar solo la parte básica de la palabra, truncamiento que en algunos archivos será preciso señalar con símbolos como «*» ó «?»». Por ejemplo, si el término empleado es «toxi*», la búsqueda identificará todas las variantes, como toxinas, tóxico, toxicidad, etc. Por supuesto, los términos debieran estar en el mismo idioma que la base de datos, a menos de que esta disponga de traducción automática.

La elección de los términos adecuados requiere práctica, por lo que es muy útil comenzar con palabras clave de alguna publicación de tema semejante al objetivo. Las diferentes estrategias de ir añadiendo o reduciendo términos persiguen obtener un número adecuado, es decir, suficiente pero no demasiado alto de resultados que permita manejar las respuestas.

Para poder practicar y aprender o mejorar en la eficiencia de la búsqueda de información es necesario un entrenamiento periódico para estar al día de las nuevas estructuras y funciones de búsqueda de las bases de datos. Se recomienda realizar el curso práctico de autoaprendizaje de Buscatox disponible en la página <http://www.us.es/toxicologia/buscatox.htm> y practicar periódicamente con distintas bases de datos. Esta es la única manera de estar prepara-

dos y ser capaces de encontrar eficientemente información útil para tomar decisiones trascendentes y generalmente urgentes, como se nos demanda en la práctica profesional.

Entidades internacionales sobre seguridad alimentaria

La Comisión del *Codex Alimentarius* (http://www.codexalimentarius.net/web/index_es.jsp) fue creada en 1963 por la FAO y la OMS para desarrollar normas alimentarias, reglamentos y otros textos relacionados tales como códigos de prácticas bajo el Programa Conjunto FAO/OMS de Normas Alimentarias. Las materias principales de este Programa son la protección de la salud de los consumidores, asegurar unas prácticas de comercio claras y promocionar la coordinación de todas las normas alimentarias acordadas por las organizaciones gubernamentales y no gubernamentales. Actualmente están representados 168 estados, incluyendo los de la Unión Europea. Es necesario advertir que existen sitios de Internet no oficiales que están usando nombres muy parecidos e incluso direcciones (URL) muy similares a las del Codex.

Recordemos que el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) (<http://www.fao.org/waicent/faoinfo/economic/esn/jecfa/jecfa.htm>) evalúa científicamente la seguridad de los aditivos alimentarios, residuos de medicamentos veterinarios en alimentos, tóxicos naturales y contaminantes en alimentos. Estas evaluaciones sirven de base a la Comisión del *Codex Alimentarius* y a las agencias internacionales y gobiernos para establecer los niveles permitidos de los mismos.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha incluido recientemente en su web un apartado sobre seguridad alimentaria (<http://www.who.int/foodsafety/en/>) con información útil sobre actividades propias, publicaciones, evaluaciones de riesgos y ayuda al consumidor. Esta página aloja información sobre las activi-

dades de la Comisión del *Códex Alimentarius* (<http://www.who.int/foodsafety/codex/en/>) y tiene enlaces con otras organizaciones. A través de su Departamento de Seguridad Alimentaria (<http://www.who.int/fsf/link.htm>) trata de reducir en el mundo el serio impacto negativo de las enfermedades alimentarias. Desde 1976, la OMS ha implementado el programa de Monitorización y Evaluación de la Contaminación Alimentaria (GEMS/Food), informando a los gobiernos, a la Comisión del *Códex Alimentarius* y a otras instituciones relevantes, así como al público, de los niveles de contaminantes en los alimentos, de su contribución en la exposición humana total, y de su relevancia sobre la salud pública (<http://www.who.int/foodsafety/chem/en/>).

Como se ha indicado, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) (http://www.fao.org/index_es.htm) conduce las actividades internacionales encaminadas a erradicar el hambre, pero su espectro de acción es mucho más profundo.

En los últimos años, la confianza de los consumidores en la seguridad de los productos alimenticios se ha visto a veces alterada por el efecto acumulativo de las crisis sanitarias relacionadas con los alimentos. Para hacer frente a este problema, la Unión Europea está aplicando una estrategia global, a fin de que los ciudadanos vuelvan a confiar en la seguridad de los alimentos que consumen, «de la granja a la mesa». Las actividades y regulaciones de la Unión Europea sobre seguridad alimentaria están disponibles en la web oficial de Europa (http://www.europa.eu.int/pol/food/index_es.htm, o http://europa.eu.int/comm/food/index_es.htm).

La página sobre seguridad de los alimentos y piensos de la Dirección General de Sanidad y Protección de los Consumidores de la Unión Europea (http://www.europa.eu.int/comm/food/food/index_es.htm) muestra que las actividades relativas a la seguridad alimentaria abarcan toda la cadena de producción de los alimentos, desde la sanidad animal y la política fitosanitaria hasta el etiquetado de los productos alimentarios, pasando por el bienestar animal.

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (<http://www.efsa.eu.int/>) proporciona desde 2002 a la Comisión Europea asesoramiento científico independiente, sobre todo aquello que influye directa o indirectamente en la seguridad alimentaria. Se trata de una entidad jurídica aparte, independiente de las demás instituciones de la UE.

La creación de la EFSA era una de las principales medidas que contenía el *Libro Blanco* sobre seguridad alimentaria de la Comisión, publicado en enero de 2000. La labor de la EFSA abarca todas las etapas de la producción y el suministro de alimentos, desde la producción primaria, pasando por la seguridad de los piensos, hasta llegar al suministro de los alimentos a los consumidores. Recoge información y analiza los nuevos avances científicos, a fin de poder identificar y determinar los riesgos potenciales que amenazan a la cadena alimentaria. Asimismo, puede llevar a cabo evaluaciones científicas sobre cualquier cuestión que pueda afectar directa o indirectamente a la seguridad de los alimentos suministrados, en relación con la salud y el bienestar de los animales o con la salud de las plantas.

El Comité Científico sobre Alimentos (SCF) de la Unión Europea (http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/index_en.html) ha de responder cuestiones científicas y técnicas relativas a la salud del consumidor y seguridad alimentaria, y en particular las relativas a la toxicología e higiene en la cadena completa de producción alimentaria, nutrición y aplicaciones tecnológicas, así como de los materiales que entran en contacto con los alimentos. En su página se incluyen las agendas de las reuniones. También existe un Laboratorio Central de Referencia de la UE (<http://gmo-crl.jrc.it/>).

El Instituto norteamericano para Seguridad Alimentaria y Nutrición Aplicada (JIFSAN) (<http://www.jifsan.umd.edu/>) fue establecido en 1996 entre la Universidad de Maryland y la Administración para los Alimentos y las Drogas de EE UU (FDA) (<http://www.fda.gov/>), que es la responsable de la protección de la Salud Pública, asegurando la seguridad y eficacia de

los medicamentos humanos y veterinarios, productos biológicos, accesorios médicos, los alimentos, cosméticos y productos que emiten radiaciones. Tanto la página principal de la FDA como la específica del JIFSAN son muy completas, conteniendo información actualizada sobre muy diversos temas de Toxicología Alimentaria y los compuestos químicos (<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/chemist.html>).

Otras páginas de organismos de la administración norteamericana son la del Servicio de Inspección en Seguridad Alimentaria (FSIS) (<http://www.fsis.usda.gov/>) con información en español sobre los aspectos de interés para el consumidor (http://www.fsis.usda.gov/OA/pubs/cfg/toc_spanish.htm), la Oficina de Información sobre Investigación en Seguridad Alimentaria de la Biblioteca Nacional de Agricultura (<http://www.nal.usda.gov/fsrio/>), el Servicio de Alimentación y Nutrición con información en español de interés para la administración y los consumidores (<http://www.fns.usda.gov/fsec/o>) el Portal hacia la Información Gubernamental sobre Seguridad Alimentaria (FoodSafety.gov) (<http://www.foodsafety.gov/>).

Epi-ETA, Red de profesionales trabajando en epidemiología de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos en las Américas (<http://www.epi-eta.org/EpietaEsp/default.asp>), es una iniciativa entre el Centro de Colaboración para la Vigilancia de Enfermedades Transmitidas por Alimentos dependiente de la Organización Mundial de la Salud y perteneciente al Centro para el Control y Prevención de Enfermedades norteamericano (<http://www.cdc.gov/spanish/default.htm>) y el centro especializado de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), Instituto Panamericano para la Seguridad de Alimentos (INPPAZ) de Buenos Aires.

Estándares Alimentarios Australia-Nueva Zelanda (<http://www.foodstandards.gov.au/>) supone una parte integrante del rígido sistema regulatorio alimentario en estos países, desarrollando nuevas normativas para toda la cadena alimentaria con el apoyo de expertos de otros países en forma abierta, basándose en evalua-

ciones científicas rigurosas. Algunas agencias europeas con información específica son la Agencia de Seguridad Alimentaria de Gran Bretaña (<http://www.foodstandards.gov.uk/>), la Agencia de Seguridad Alimentaria de Irlanda (<http://www.fsai.ie/>), la Agencia de Seguridad Alimentaria de Bélgica (<http://www.favv-afsca.fgov.be/>), o el Ministerio de Agricultura de Alemania (<http://www.verbraucherministerium.de/>). También es de interés la página de la Agencia de Inspección Alimentaria de Canadá (<http://www.inspection.gc.ca/>).

El Instituto de las Ciencias de la Vida (ILSI) (<http://www.ilsi.org>) es una red global de científicos interesados en aumentar las bases científicas de las tomas de decisiones sobre la salud pública, gracias al avance de la ciencia. Desde 1978 intenta profundizar en aspectos científicos de la nutrición, toxicología, evaluación del riesgo, y el medio ambiente, gracias a la colaboración de científicos académicos, de la administración y de la industria. Su página web contiene abundante información sobre evaluación del riesgo y sobre la seguridad de ingredientes y aditivos.

Agua, saneamiento y salud (http://www.who.int/water_sanitation_health/es/index.html). La OMS trabaja en aspectos relacionados con el agua, el saneamiento y la higiene cuando la carga de salud es alta, cuando las intervenciones podrían marcar una diferencia significativa y cuando hay un conocimiento limitado.

La Agencia Europea para el Desarrollo y la Salud (AEDES) es una Sociedad Cooperativa de derecho belga. Más de 650 expertos han participado en misiones y proyectos en más de 50 países, lo que representa por encima de 4.500 personas/mes en proyectos de larga duración y más de 400 personas/mes en misiones cortas. AEDES ha gestionado una media de 6 millones de dólares por año (<http://www.aedes.be/services/food/es/default.asp>).

Food Chemical News, USA, actualiza las noticias sobre alimentos y compuestos químicos (<http://www.fcnpublishing.com/>). Otras opciones son el Instituto Británico de Ciencia y Tecnología Alimentaria (<http://www.ifst.org/>), el

Consejo Europeo de Información sobre la Alimentación (EUFIC), que presenta una gran variedad de información en español (<http://www.eufic.org/sp/home/home.htm>), la Fundación del Concejo Internacional de Información Alimentaria (IFIC), página de difusión con información en inglés y español sobre Alimentación y Seguridad Alimentaria (<http://ific.org/sp/index.cfm>), The Chemistry Society Network (<http://www.chemsoc.org/>), British Nutrition Foundation (<http://www.nutrition.org.uk/>), American Heart Association (<http://www.americanheart.org/>), Food safety (http://www.everythingaboutfood.com/food_safety.htm) o Food Safety Network (<http://www.foodsafety-network.ca/>)

Entidades españolas y seguridad alimentaria

La Agencia Española de Seguridad Alimentaria (AESA) ([Http://www.aesa.msc.es/aesa/web/AESA.jsp](http://www.aesa.msc.es/aesa/web/AESA.jsp)) tiene una web muy interesante que enlaza con la legislación y otras fuentes informativas, apartados para el consumidor, y que incluye diversas publicaciones de gran interés, como por ejemplo: La Seguridad Alimentaria en la Educación Secundaria Obligatoria, Tablas europeas de composición de alimentos, Proyecto «EuroFIR» incluido en el ámbito del «VI programa marco de la Unión Europea», Guía de Implantación de sistemas de autocontrol en la restauración hospitalaria, Plan de análisis de peligros y puntos de control crítico, Guía de Etiquetado y trazabilidad, Memoria del Sistema Coordinado de Intercambio Rápido de Información (SCIRI), Información Básica Nutricional 1. Los Alimentos: Alimentación, Nutrición y Salud, Información Básica Nutricional 2. Alimentos y necesidades nutricionales, o Repercusiones del vertido del Prestige en la seguridad alimentaria

El Área de Vigilancia de la Salud Pública del Servicio de Vigilancia Epidemiológica del Cen-

tro Nacional de Epidemiología (CNE) (España) (<http://cne.isciii.es/ve/ve.htm>) recoge los informes sobre casos registrados, particularmente de enfermedades infecciosas intestinales.

El Centro de Información y Documentación del Consumo (CIDOC) es el área del Instituto Nacional del Consumo, del Ministerio de Sanidad español, que se encarga de elaborar y difundir información a los consumidores y a las organizaciones y administraciones que se ocupan de la defensa de sus derechos. El CIDOC ofrece en estas páginas la Base de Datos de Información sobre Consumo, que se agrupa en dos bloques temáticos: uno jurídico, que engloba tanto legislación como jurisprudencia de consumo y otro de carácter bibliográfico, en el que están incluidas monografías, artículos y la relación de revistas que se reciben en el CIDOC. Asimismo, incorpora una herramienta denominada «Catálogo de fuentes de información estadísticas y cualitativas sobre Consumo», que sistematiza la búsqueda de bases de datos sobre estudios, tanto públicos como privados, nacionales e internacionales (<http://www.consumo-inc.es/rwarc/consumo.html>).

La Agencia Española del Medicamento (AGEMED) (<http://www.agemed.es/>), creada en 1997, adscrita al Ministerio de Sanidad y Consumo, unifica las actividades de evaluación, autorización, registro y control de los medicamentos de uso humano y veterinario.

Otros recursos son la página web de la Asociación Española de Toxicología (<http://www.aetox.com>) que actualiza información general sobre Toxicología y enlaza con otras organizaciones de interés. El Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses (<http://www.mju.es/toxicologia/index.html>). El Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) (<http://www.inia.es/>). La Página sobre Seguridad Alimentaria de la Confederación de Consumidores y Usuarios (CECU) (<http://www.seguridadalimentaria.org/>), y Consumaseguridad, la Página de Seguridad Alimentaria de la Fundación Eroski con una gran variedad de información (<http://www.consumaseguridad.com/>).

Buscadores generales metabuscadores

En las búsquedas en Internet, atendiendo a la amplitud del campo de la búsqueda, se pueden utilizar buscadores generales, buscadores para compuestos químicos y buscadores especializados. Los *portales o buscadores generales* (Google, <http://www.google.es/>; Altavista, <http://www.altavista.com/>; Yahoo, <http://es.yahoo.com/>; Excite, <http://www.excite.es/>; Lycos, <http://www.lycos.es/>, etc.) pueden ser útiles para encontrar documentos sobre diversos compuestos. Aunque no garantizan el éxito de la búsqueda ni la objetividad de la información, resultan interesantes por su capacidad de localizar documentos y páginas por gran parte de la red. Sin embargo, están muy limitados, ya que no revisan bases de datos específicas porque que no tienen acceso a su información.

Los *meta buscadores para compuestos químicos* resultan de enorme interés ya que ofrecen un listado de bases de datos en las que puede encontrarse información concreta sobre el producto concreto que nos interese. De esa forma, es posible ir accediendo a cada una de las bases de datos especializadas para encontrar la información deseada.

TOXNET (Toxicology data network) es un conjunto de excelentes bases de datos informacionales y bibliográficas sobre Toxicología desarrollado por la Biblioteca Nacional de Medicina norteamericana. Es sin duda el más completo accesible gratuitamente vía web (<http://toxnet.nlm.nih.gov/index.html>). Se recomienda acceder inicialmente a las bases de datos de información depurada y posteriormente a las bibliográficas. Aunque se irán describiendo algunas de sus bases de datos independientes más interesantes, también puede utilizarse como meta buscador ChemIDplus (<http://chem2.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/chemidlite.jsp>), que facilita la identificación inequívoca de 350.000 sustancias, incluyendo las denominaciones y estructuras de más de 56.000, enlazando en

forma muy ágil con las diversas bases de datos de toxicidad, carcinogenicidad, alteraciones de la reproducción, etc.

ChemFinder (<http://www.chemfinder.com/>) es un meta buscador interesante sobre compuestos químicos pero que presenta la incomodidad de precisar el registro previo gratuito y la presencia de publicidad.

Las bases de datos especializadas

Una opción más refinada consiste en realizar una búsqueda dirigida en *buscadores especializados* enfocados al tipo de información precisa. Para ello es imprescindible disponer de un listado actualizado de las mejores bases de datos disponibles en cada momento, o acceder a ellas a través de BUSCATOX, para el que se ha realizado una selección de unas 80 direcciones de gran interés, escogidas de entre los más de 400 enlaces actuales con información toxicológica de calidad. BUSCATOX está disponible en la página del Área de Toxicología de la Universidad de Sevilla (<http://www.us.es/toxicologia/>). En la Tabla 36.1 se incluye una selección de bases de datos agrupadas según diversas áreas.

La Base de Datos de Sustancias Peligrosas HSDB (<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>) de la Biblioteca Nacional de Medicina Norteamericana e incluida en TOXNET, es la base de datos sobre los peligros de los compuestos químicos más potente disponible en forma gratuita, y supera en capacidad a muchas comerciales. Se caracteriza porque la información que contiene ha sido adecuadamente revisada por un equipo de expertos que aseguran la veracidad de la información. Contiene información de más de 4.500 compuestos distribuida en 150 campos sobre efectos humanos, tratamiento médico de urgencias, estudios de toxicidad en animales, metabolismo y cinética, cinética ambiental, exposición ambiental y ocupacional, regulaciones y niveles, propiedades

Tabla 36.1. Selección de bases de datos toxicológicas accesibles libremente en Internet (todas ellas incluidas en Buscatox <http://www.us.es/toxicologia/BUSCATOX.htm>).

Emergencias químicas	Erg 2000 Canutec	http://www.tc.gc.ca/canutec/erg_gmu/search/buscar.htm
Información de un compuesto	H S D B (la mejor) >4700 INCHEM INSHT BVSA Viasalus NTP NIOSH	http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB http://www.inchem.org/search2.html http://www.mtas.es/insht/principal/busquedas.htm http://www.cepis.ops-oms.org/bvsacep/e/servi.html http://www.viasalus.com/vs/B2P/cn/toxi/index.jsp?id=b2p_toxicologia http://ntp-server.niehs.nih.gov/cgi/iH_Indexes/ALL_SRCH/iH_ALL_SRCH_Frames.html http://www.cdc.gov/niosh/srh-nio1.html
Clasificación compuesto por	UE Toxicidad: E S I S (EINECS, IUCLID, ELINCS...) Ecotoxicidad: N-Class Carcinogenicidad: IARC	http://ecb.jrc.it/esis/ http://www.kemi.se/nclass/SpecificSubstance.asp http://www.iarc.fr
Seguridad química y limitaciones en el trabajo	INSHT: fichas seguridad química, VLA, VLB MSDS (bases de FDS) Haz-Map	http://www.mtas.es/insht/principal/busquedas.htm http://www.ilpi.com/msds/index.html http://hazmap.nlm.nih.gov/
Compuestos según su uso	Productos del hogar Plaguicidas (Extoxnet) Contaminantes ambientales	http://hpd.nlm.nih.gov/ http://ace.orst.edu/info/extoxnet/pips/ghindex.html http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?TRI
Concentraciones en fluidos biológicos	Tabla CFB	http://www.us.es/toxicologia/
Tratamiento de intoxicados	Protocolos del Hospital Clínic de Barcelona INTOX	http://wzar.unizar.es/stc/Barcelona.htm http://www.intox.org/pagesource/treatment/spanish/guides_list_espanol.htm
Información original (bibliografía)	TOXLINE NLM-GATEWAY	http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?TOXLINE http://gateway.nlm.nih.gov/gw/Command
Conjunto de bases de datos	TOXNET ChemDplus ChemFinder BUSCATOX	http://toxnet.nlm.nih.gov/index.html http://chem2.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/chemidlite.jsp http://chemfinder.cambridgesoft.com/ http://www.us.es/toxicologia/buscatox.htm

físico-químicas, farmacología, normas de seguridad, producción y uso, y métodos analíticos. Para su empleo se recomienda utilizar lo más posible los índices de las subpáginas.

La base de datos INCHEM (<http://www.inchem.org/search2.html>) facilita acceso a documentos revisados sobre la seguridad química y la gestión de los compuestos, ayudando al cum-

plimiento de objetivos como el capítulo 19 de la Agenda 21. Está producida por el Programa Internacional de Seguridad Química y el Centro Canadiense para Seguridad y Salud Ocupacional

La página del Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo español (INSHT) (<http://www.mtas.es/insht/principal/busquedas.htm>) recoge muy diversa e interesante

información en español sobre seguridad química, como los valores límites ambientales (VLA) y biológicos (VLB), normas de seguridad, programas de formación, etc. También puede obtenerse mucha información en la página web del Instituto Nacional de Salud y Seguridad Ocupacional norteamericano (NIOSH, <http://www.cdc.gov/niosh/srh-nio1.html>).

La Biblioteca Virtual en Salud y Ambiente (BVSA, <http://www.cepis.ops-oms.org/bvsa-cepe/e/servi.html>) está desarrollada por el Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente en cooperación con la Organización Panamericana de la Salud y la Organización Mundial de la Salud. Es una magnífica y actualizada fuente de información sobre problemas toxicológicos, particularmente centrados en el área latinoamericana.

El curso interactivo Toxicología de Viasalus (http://www.viasalus.com/vs/B2P/cn/toxi/index.jsp?id=b2p_toxicologia) aporta los datos suficientes y necesarios a fin de introducir al lector en un programa de información y formación en Toxicología Clínica

La base de datos del Programa Nacional de Toxicología norteamericano (NTP) (http://ntp-server.niehs.nih.gov/cgi/iH_Indexes/ALL_SRC_H/iH_ALL_SRCH_Frames.html) permite el acceso a los informes de estudios de toxicidad y carcinogenicidad llevados a cabo por el mismo.

En la Unión Europea los compuestos industriales se clasifican en existentes y nuevos. Los productos químicos existentes son aquellos comercializados en la Comunidad antes de 1981. En el Inventario Europeo de Sustancias Existentes (EINECS) realizado en 1981 figuran 100.106 sustancias. Los productos químicos nuevos se evalúan antes de su comercialización en el mercado comunitario, siendo incluidos en la Lista Europea de Nuevas Sustancias Químicas (ELINCS), que no incluye plaguicidas, materiales radioactivos, residuos, y sustancias empleadas en investigación científica. Desde 1981 se han presentado unas 4.000 notificaciones correspondientes a 2.000 nuevas sustancias, lo que equivale a unas 400 por año. Las sustancias existentes se incluyen en IUCLID: Base de

Datos Uniforme Internacional de Información Química, que es utilizada por la Comisión para almacenar y difundir la información recabada con arreglo al Reglamento (CEE) n.º 793/93, y que también ha sido adoptada por la OCDE. El Sistema de Información Europeo sobre Sustancias Químicas (ESIS) (<http://ecb.jrc.it/esis/>) incluye acceso libre a bases de datos como EINECS, ELINCS y un extracto de IUCLID.

Para aspectos medioambientales es muy útil la base de datos N-Class de Clasificación del Peligro Medioambiental (<http://www.kemi.se/nclass/SpecificSubstance.asp>) desarrollada por el Concejo Nórdico de Ministros en colaboración con la Oficina Europea de Compuestos Químicos.

El Archivo Legal de la UNEP (<http://www.chem.unep.ch/irptc/legint.html>) se encuadra en el Programa de Medio Ambiente de las Naciones Unidas, incluyendo unos 53.000 registros para más de 10.000 sustancias de 13 países y 5 organizaciones internacionales, lo que permite comparar sus diferentes regulaciones.

La base de datos de Productos de Uso Doméstico Household (<http://hpd.nlm.nih.gov/index.htm>), abierta desde 2004 por la NLM, tiene enlaces a más de 5.000 productos empleados en el hogar, incluyendo los de limpieza, desinfección, lavado, higiene personal, y plaguicidas de uso no agrícola, también denominados biocidas.

El Sistema de Registro de Sustancias de la Agencia de Protección Medioambiental norteamericana (SRS, <http://www.epa.gov/srs/>) proporciona información sobre los compuestos y sobre sus regulaciones. ECOTOX (<http://www.epa.gov/ecotox/quicksearch.html>) facilita información sobre la toxicidad de los compuestos para la vida acuática, terrestre y las plantas, gracias a sus tres bases de datos: Acquire, Terretox y Phytotox.

Si nos concretamos a las *Fichas Internacionales de Seguridad Química*, es muy interesante la colección en español del Programa Internacional de Seguridad Química, con la participación de Instituto Nacional de Salud y Seguridad Ocupacional norteamericano (NIOSH) y reco-

gidas en la página del Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo español (<http://www.mtas.es/insht/ipcsnspn/spanish.htm>). Para la localización de más Material Safety Data Sheets, a través de la página MSDS solutions (<http://www.ilpi.com/msds/index.html>) se acceden a otras muchas bases de datos tanto abiertas como restringidas, que se diferencian, sobre todo, en el número de compuestos incluidos. Así, por ejemplo, MSDS Online dispone de 1.200.000 fichas, MSDS Solutions 1.000.000, Seton Compliance Resource Center 350.000, MSDSs.com 300.000, etc.

En casos de emergencia química es muy útil la versión en español de la base de datos ERG 2000 (http://www.tc.gc.ca/canutec/erg_gmu/search/buscar.htm), disponible no sólo en línea, sino también en versión descargable.

Aditivos alimentarios

Periódicamente se realizan campañas difamatorias contra algunos alimentos basándose en la supuesta carcinogenicidad de determinados aditivos alimentarios apoyados en falsos listados y jugando con los números clave de los mismos. Solo es posible desarmar esta manipulación del consumidor aportando datos reales sobre ellos. Recordemos que el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) (<http://www.fao.org/waicent/faoinfo/economic/esn/jecfa/jecfa.htm>) evalúa científicamente la seguridad de los aditivos alimentarios, residuos de medicamentos veterinarios en alimentos, tóxicos naturales y contaminantes en alimentos. Estas evaluaciones sirven de base la Comisión del *Codex Alimentarius* y a las agencias internacionales y gobiernos para establecer los niveles permitidos de los mismos. Desde 1956 el JECFA ha realizado más de 1.300 evaluaciones de aditivos alimentarios (<http://www.inchem.org/jecfa.html>) que se encuentran recogidas en su base de datos con las especificaciones más recientes para aditivos alimentarios, con excepción de los utilizados como aromatizantes,

aunque las especificaciones solo están disponibles en inglés (http://apps3.fao.org/jecfa/additive_specs/foodad-q.jsp?language=es). También existe su contrapartida para los aromatizantes (http://apps3.fao.org/jecfa/flav_agents/flavag-q.jsp?language=es).

En la página de la Unión Europea se recoge la legislación europea sobre aditivos y aromatizantes alimentarios (http://europa.eu.int/comm/food/fs/sfp/flav_index_en.html). El sitio «Food Additives in the European Union» de la Escuela de Biociencias Alimentarias de la Universidad de Reading (UK) incluye no solo los documentos de la legislación europea y de Gran Bretaña, sino que además fue la primera página web en incluir el listado de los aditivos con sus números (<http://www.foodlaw.rdg.ac.uk/additive.htm>). Otras páginas contienen el listado de los aditivos permitidos en la Unión Europea, con sus número clave, incluyendo colorantes, preservantes, antioxidantes, edulcorantes, emulsificantes, estabilizantes, gelificantes, etc., como la de la Agencia de Estándares Alimentarios (UK) (<http://www.food.gov.uk/safereating/additivesbranch/numberlist>) o en la página en español sobre aditivos alimentarios del Consejo Europeo de Información sobre la Alimentación (EUFIC) (http://www.eufic.org/sp/quickfacts/aditivos_alimentarios.htm).

En Estados Unidos la base de datos de aditivos EAFUS es mantenida por el Centro para la Seguridad Alimentaria y Nutrición Aplicada (CFSAN) de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) (<http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/eafus.html>). Contiene información administrativa, química y toxicológica de más de 2.000 sustancias añadidas a los alimentos, incluyendo las reguladas por la FDA como directos, «secundariamente directos», colorantes y los calificados como «Generalmente Reconocidos como Seguros» (GRAS). Adicionalmente, se incluye solo información administrativa y química de unas 1.000 sustancias. Aunque la base de datos se autotitula como «todo lo añadido a los alimentos en Estados Unidos», es necesario indicar que no se incluye un grupo de sustancias calificadas como GRAS que están fuera de la

competencia de la FDA. También puede accederse a la legislación (http://www.cfsan.fda.gov/_redbook/red-toca), al Code of Federal Regulations sobre medicamentos y alimentos (http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx_01/21cfrv3_01.html) y a listados específicos de colorantes empleados en alimentación (<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/col-toc.html>), medicamentos, cosméticos y accesorios médicos (<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/opa-col2.html>), así como de ingredientes en productos cosméticos (<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/cos-chem.html>).

La lista de aditivos autorizados por la Unión Europea en piensos para alimentación animal se encuentra en la página de Europa (http://europa.eu.int/comm/food/food/animalnutrition/feedadditives/authoradditives_en.htm)

Toxinas de animales, vegetales y microorganismos

Cada vez existe mayor preocupación por los efectos adversos que provocan sobre el hombre las *toxinas*, es decir, las sustancias tóxicas provenientes de organismos vivos. El *Handbook de microorganismos patógenos y toxinas naturales en alimentos*, conocido como «Bad Bug Book», contiene información muy completa con secciones específicas para la intoxicación por ciguatera, toxinas de moluscos, intoxicaciones escombroides, tetrodotoxina, toxinas de setas, aflatoxinas, alcaloides pirrolidínicos y grayanotoxinas (<http://www.cfsan.fda.gov/~mow/intro.html>). La Biblioteca en línea de Seguridad e Intoxicaciones del Departamento de Seguridad y Salud Ambiental de la Universidad de Oklahoma contiene información sobre plantas, animales, y artrópodos tóxicos (<http://www.pp.okstate.edu/ehs/links/poison.htm>), al igual que la sección de Compuestos Carcinógenos Naturales en los alimentos de EXTOWNET (<http://extownet.orst.edu/faqs/natural/natcarc.htm>).

Dado que muchas de las toxinas son carcinogénicas, puede consultarse la base de datos

de Potencia Carcinogénica de Berkeley (<http://potency.berkeley.edu/cpdb.html>). Destaca particularmente el gran número de páginas dedicadas a mico toxinas (<http://www.mycotoxin.com/mycotoxin/>), como las del CFSAN (http://vm.cfsan.fda.gov/_lrd/fdaact.htmlcafla).

En relación con plantas tóxicas existen una gran cantidad de bases de datos de interés no solo veterinario sino también sanitario. Entre ellas destacan la base de datos Fitoquímicos y Etnobotánicos del Dr. Duke (<http://www.ars-grin.gov/duke/>), la de Plantas Tóxicas del Centro Antitóxico de Illinois (<http://www.mchc.org/ipc/poisoninghazards/toxicplants/highly-plants.htm>), la de Plantas del Centro Nacional de Datos de Plantas norteamericano (<http://plants.usda.gov>), la de Plantas Tóxicas para el Ganado del Centro de Investigación en Plantas Tóxicas norteamericano (http://www.pprl.ars.usda.gov/Poisonous_Plants.htm), la interesante Base de Datos de Plantas Tóxicas de la Universidad de Cornell (<http://www.ansci.cornell.edu/cgi-bin/db2www/plants.d2w/input>), la base de datos bibliográfica de Plantas Tóxicas de la FDA del CFSAN (<http://www.cfsan.fda.gov/~djw/plantox.html>), el Sistema Canadiense de Información sobre Plantas Tóxicas (http://www.cbif.gc.ca/pls/pp/poison?p_x=px), la Base de datos de Plantas Tóxicas de la Universidad de Pennsylvania con diversas secciones que incluyen casos de intoxicaciones y fotografías de las plantas (<http://cal.vet.upenn.edu/poison/>), las Plantas Tóxicas de Carolina del Norte (<http://www.ces.ncsu.edu/depts/hort/consumer/poison/poison.htm>) y la guía Ilustrada de algunas Plantas Tóxicas Comunes en Nueva Escocia (<http://museum.gov.ns.ca/poison/ppguide.htm>).

Residuos de medicamentos

Los Límites Máximos de Residuos de Medicamentos Veterinarios en alimentos, establecidos en el *Codex Alimentarius*, se encuentran recogidos en FAOSTAT, una base de datos estadísticos de la FAO integrada en línea que actualmente contiene más de 3 millones de series anuales

internacionales (http://faostat.fao.org/faostat/vetdrugs/jsp/vetd_q-s.jsp?language=ES&version=ext&hasbulk=).

Los Límites Máximos de Residuos (MRL) de medicamentos veterinarios en alimentos de origen animal establecidos en la Unión Europea se encuentran actualizados en la página denominada «Pharmaceuticals», de la Comisión Europea, DG Enterprise de Medicamentos (<http://pharmacos.eudra.org/F2/mrl/index.htm>).

La Agencia Europea del Medicamento (EMA) (<http://www.emea.eu.int/>) se encarga de controlar la seguridad de los medicamentos humanos y veterinarios, en particular mediante una red de fármaco vigilancia y el establecimiento de niveles de seguridad para residuos en animales. También es interesante conocer los esfuerzos que se están llevando a cabo para la armonización legislativa, en la página de VICH, de Cooperación Internacional sobre la Armonización de los Requerimientos Técnicos para el Registro de Productos Veterinarios (<http://vich.eudra.org/>).

En Estados Unidos la base de datos de Residuos en Alimentos Animales denominada FARAD contiene información práctica para evitar residuos de medicamentos, plaguicidas y contaminantes ambientales (<http://www.farad.org/>). Se precisa registrarse para acceder a parte de la información.

Residuos de plaguicidas

Aunque existe una gran preocupación del consumidor por la existencia de residuos de plaguicidas en los alimentos, este aspecto está bastante bien regulado y será aún más exigente en el futuro. Se ha comentado que la Comisión del *Codex Alimentarius* fija los criterios normativos básicos para todas las naciones. Fue creada por dos organizaciones de las Naciones Unidas: la FAO y la OMS, y está formada por comités encargados de diferentes aspectos alimentarios. El Comité del *Codex* sobre Residuos de Plaguicidas se encarga de de los residuos de plaguicidas en los alimentos, revisando anualmente los estudios científicos y estableciendo niveles de seguridad (LMR). La base de datos de la FAO denominada FAOSTAT contiene más de 3 millones de series anuales internacionales, con los límites máximos del Codex para residuos de plaguicidas y límites máximos para residuos extraños de la Comisión del *Codex Alimentarius* (http://faostat.fao.org/faostat/pestdes/jsp/pest_q-s.jsp?language=ES&version=ext&hasbulk=).

Uno de los objetivos de los LMR del *Codex* es facilitar el comercio internacional: las normas tienen por objeto asegurar que los países importadores no impedirán la importación de productos básicos alimenticios por motivo de residuos que ocurren hasta el nivel de LMR. La mayoría de los países industrializados ha establecido también leyes que fijan los LMR permitidos en los alimentos, y que son aplicables a los alimentos para consumo interno y de importación. No obstante, a menudo hay variaciones entre los estándares nacionales y las recomendaciones internacionales.

En España está disponible en línea el *Registro de Plaguicidas*, de la Dirección General de Salud Pública, del Ministerio de Sanidad y Consumo (http://www.msc.es/medioambiente/prodQuimicos/plaguicidas/registro_plaguicidas.jsp), así como el Registro de biocidas, de la misma Dirección General (http://www.msc.es/medioambiente/prodQuimicos/plaguicidas/cont_biocidas.jsp).

El Centro para la Seguridad Alimentaria y Nutrición Aplicada de la Administración para los Alimentos y las Drogas de EE UU (CFRAN) también incluye información sobre plaguicidas (<http://vm.cfsan.fda.gov/~lrd/pestadd.html>), ya que el control de los niveles en alimentos lo realiza la FDA y el Departamento de Agricultura, pero el registro depende de la EPA. Inicialmente conviene revisar el estado de reregistro del plaguicida (<http://cfpub.epa.gov/oppref/rereg/status.cfm?show=rereg>) con toda la nueva información disponible, y si no se encontrara en revisión, buscar en el Registro de Plaguicidas de la Oficina de Programas de Plaguicidas (OPP) (<http://www.cdpr.ca.gov/docs/epa/epamenu.htm>).

A través de la página de la EPA puede obtenerse una gran cantidad de información referente a todos los aspectos relativos a la regulación en EE UU y a la seguridad de los plaguicidas (<http://www.epa.gov/pesticides/index.htm>). La denominada como Red de Extensión de la Toxicología o EXTOWNET es una excelente fuente de información sobre plaguicidas con perfiles toxicológicos de más de 200 plaguicidas (<http://extownet.orst.edu/pips/ghindex.html>).

Son muy completas también las páginas del Centro Nacional de Información sobre Plaguicidas de EE UU- NPIC (<http://npic.orst.edu>), la base de datos sobre Factores de Riesgo Medioambiental por plaguicidas, particularmente de cáncer de mama (<http://envirocancer.cornell.edu/libsearch.cfm>), los recursos educativos sobre plaguicidas de la Universidad de Nebraska (<http://PestEd.unl.edu>), el listado de programas de ordenador para controlar la aplicación de plaguicidas (<http://pested.unl.edu/softrec.htm>), o el «Pesticide Bookmarks», que conecta con 300 páginas de Internet sobre plaguicida (<http://pested.unl.edu/pestbkmk.htm>).

Es preciso tener mucha cautela con la información proveniente de entidades que promueven la desaparición de los plaguicidas, ya que suelen olvidar mencionar la información relativa a la relación dosis-respuesta. Destacan especialmente NCAP (Northwest Coalition for Alternatives to Pesticides, <http://www.pesticide.org/>), PANNA (Pesticide Action Network of North America, <http://www.panna.org/>) y Pesticide Action Network (PAN, <http://www.pan-international.org/>). Puede encontrarse una revisión muy completa sobre sitios de Internet sobre plaguicidas en Felsot (2002).

Contaminantes

Muchos tipos de compuestos pueden contaminar los alimentos. Son particularmente importantes los compuestos orgánicos persistentes como los bifenilos policlorados (PCB) y las dioxinas, pero también muchos metales como plomo, mercurio, arsénico y cadmio. La Agencia

Norteamericana de Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades (ATSDR) proporciona resúmenes también en español de las características de muchos contaminantes ambientales (http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_toxfaqs_index.html#E). Algo menos completos son los de EXTOWNET (<http://ace.orst.edu/info/extownet/faqs/food-con/main.htm>).

El Centro para la Seguridad Alimentaria y Nutrición Aplicada (CFSAN) de la Administración para los Alimentos y las Drogas de EE UU también recoge información sobre plaguicidas, metales, contaminantes y toxinas (<http://vm.cfsan.fda.gov/~lrd/pestadd.html>). En relación con las dioxinas son interesantes el Compendio de exposición humana a dioxinas (<http://europa.eu.int/comm/environment/dioxin/summary.pdf>) y la página del Centro Nacional para Evaluación Ambiental de la EPA (<http://cfpub2.epa.gov/ncea/cfm/dioxin.cfm?ActType=default>).

La Lista de Aditivos Indirectos Usados en Sustancias en Contacto con los Alimentos (<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/opa-indt.html>) es mantenida por el Centro para la Seguridad Alimentaria y Nutrición Aplicada (CFSAN) de la Administración para los Alimentos y las Drogas de EE UU bajo el programa (PAFA). Contiene información administrativa y química de más de 3.000 sustancias empleadas en artículos que no se añaden al alimento, pero que pueden entrar en contacto con en el empaquetado o procesado. Incluye adhesivos, pegamentos, papel, polímeros y coadyuvantes en la producción.

Si lo que interesa conocer es la estimación de la liberación de compuestos tóxicos al ambiente, puede acudir al Registro Europeo de Emisiones Contaminantes (EPER, <http://www.eper.cec.eu.int/>) o al Inventario de Emisiones Tóxicas norteamericano (TRI, <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?TRI>).

Alergias alimentarias

Las reacciones alérgicas se manifiestan solo en una parte de la población expuesta. Se ha esti-

mado que ocho alimentos (leche de vaca, moluscos, huevos, pescado, cacahuete, soja, nuez y trigo) pueden ser responsables de al menos el 90% de todas las alergias alimentarias. Existen variadas fuentes de información sobre alergias alimentarias, como el Centro para la Seguridad Alimentaria y Nutrición Aplicada de la Administración para los Alimentos y las Drogas de EE UU (<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/whalrgy.html>), la FAO (http://www.fao.org/docrep/meeting/P186_38177), EUFIC (http://www.eufic.org/sp/quickfacts/alergias_alimentarias.htm), Medline Plus (<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/foodallergy.html>), el Instituto Norteamericano de Enfermedades Alérgicas e Infecciosas (<http://www.niaid.nih.gov>), el American College of Alergia, Asma e Inmunología (<http://allergy.mcg.edu>), la Asociación Dietética Americana (<http://www.eatright.org>), la Red de Alergia Alimentaria (<http://www.foodallergy.org>) o la Fundación Americana de Asma y Alergia (<http://www.aafa.org>),

Cáncer y reproducción

Las monografías de la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer del Programa de Evaluación de Riesgos Carcinogénicos en Humanos son evaluaciones por expertos independientes de la carcinogenicidad de muy diferentes agentes, mezclas y exposiciones y sirven de base a las legislaciones de la mayoría de los países. Desde 1972 se han revisado más de 900 agentes (<http://193.51.164.11/www.iarc.fr>). Por su parte, el Departamento norteamericano de Salud y Servicios Humanos publica periódicamente sus Informes sobre Carcinógenos, incluidos en el Programa Nacional de Toxicología (<http://ehp.niehs.nih.gov/roc/toc10.html>).

La base de datos de Potencia Carcinogénica (CPDB) (<http://potency.berkeley.edu/>) recoge en forma estandarizada los resultados pormenorizados de más de 6.000 estudios de carcinogenicidad en animales correspondientes a más de 1.500 productos, evaluando la incidencia de

tumores en cada diana, la forma de la curva dosis-respuesta la potencia carcinogénica y la significación estadística.

A través de TOXNET se accede a los datos de carcinogenicidad, mutagenicidad, promoción tumoral, e inhibición tumoral del Instituto Norteamericano del Cáncer en el Sistema de Información e Información en Carcinogénesis Química (CCRIS, <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?CCRIS>); a la base de datos de Toxicología genética GENE-TOX con datos de mutagenicidad revisados por la EPA (<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?GENETOX>); al Centro de Información sobre Mutágenos Ambientales (EMIC, <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?EMIC>); y a la base de datos bibliográficos del Centro de Información sobre Toxicología del Desarrollo y la Reproducción y Teratogénesis Ambiental (DART/ETIC, <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?DARTETIC.htm>).

Evaluación del riesgo y la toxicidad

Análisis de Riesgos en Seguridad de los Alimentos (<http://www.foodriskclearinghouse.umd.edu/>) es una extraordinaria página del Instituto para la Seguridad Alimentaria y Nutrición Aplicada enfocada al análisis del riesgo por alimentos con información muy completa sobre todos los aspectos relacionados con la seguridad alimentaria. La base de datos Internacional de Estimación de Toxicidad para el Riesgo (ITER, <http://www.tera.org/iter>, <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?iter>) presenta información sobre el riesgo químico de diferentes entidades nacionales e internacionales como la EPA, ATSDR, Health Canadá, the Dutch National Institute of Public Health and the Environment, el IARC, etc. Se ha incluido recientemente también en TOXNET.

ASTDR ToxFAQs™ (<http://atsdr1.atsdr.cdc.gov:8080/toxfaqta.html>) son una serie de resú-

menes sobre sustancias peligrosas elaborados por la División de Toxicología de la Agencia Norteamericana de Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades (ATSDR). Esta misma agencia ha desarrollado la base de datos sobre Niveles Mínimos de Riesgo para sustancias peligrosas (MRLs) (<http://www.atsdr.cdc.gov/mrls.html>) en forma similar a la dosis de referencia de la EPA. El MRL es una estimación de la exposición diaria humana que no representaría riesgo apreciable de efectos no carcinogénicos tras un periodo de exposición. Es un valor de criba, no con la intención de definir acciones de limpieza. Se evalúan todos los datos disponibles y se trata de identificar el órgano diana.

Una de las fuentes de información más interesantes es el Sistema Integrado de Información del Riesgo (IRIS, <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?IRIS.htm>) que proporciona datos de la EPA para la estimación del riesgo humano centrándose en la identificación del peligro y en la evaluación dosis-respuesta. La EPA también ha desarrollado una serie de herramientas para la evaluación del riesgo humano (<http://www.epa.gov/superfund/programs/risk/tooltrad.htm>). Otro de los muchos sitios interesantes de Internet es Riskworld (<http://www.riskworld.com>).

Los protocolos experimentales empleados para la evaluación de la toxicidad con fines reguladores han de haber sido aprobados por las agencias reguladoras respectivas. La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE, <http://www.oecd.org/>) ha ido elaborando los métodos de ensayo estandarizados y legalmente válidos para determinar las propiedades intrínsecas de las sustancias químicas empleados por la mayoría de los países. Su compleja página web es reestructurada frecuentemente con lo que los enlaces directos se modifican. En el momento de redactar este texto puede accederse a través del apartado de Directrices de la OCDE para el Ensayo de Compuestos Químicos (http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html) a los listados de los protocolos de las cinco secciones principales: propiedades físico-químicas, efectos en sistemas bióticos, degra-

dación y acumulación, efectos sobre la salud (humana) y actividades especiales. Lamentablemente para obtener los protocolos es preciso adquirirlos vía web.

Los protocolos de la Unión Europea coinciden aproximadamente en un 80% con los de la OCDE, y casi todos pueden obtenerse en forma gratuita a través de la página del Área de Métodos de Ensayo de la Oficina Europea de Compuestos Químicos (ECB, <http://ecb.jrc.it/testing-methods/>).

Otras fuentes de protocolos de ensayo son las páginas de la EPA (<http://www.epa.gov/OST/WET/disk2/>), de la base de datos de FRAME/ERGATT/ECVAM de métodos experimentales *in vitro* INVITTOX (<http://www.invittox.com/>), o de Modelos experimentales usados en experimentación (<http://www.nih.gov/science/models/>).

Otros alimentos

En relación con nuevos alimentos y alimentos transgénicos, además de las ya indicadas de las administraciones y consumidores, puede encontrarse información administrativa en la página de biotecnología del Centro para la Seguridad Alimentaria y Nutrición Aplicada de la Administración para los Alimentos y las Drogas de EE UU (<http://vm.cfsan.fda.gov/~lrd/biotechm.html>), The Bioindustry Association (<http://www.bioindustry.org/>), o incluso Greenpeace (http://www.greenpeace.org/espana_es/).

Para profundizar en los aspectos toxicológicos de grasas y aceites, pueden destacarse las páginas de la Sociedad Americana de Químicos del Aceite (<http://www.aocs.org>), el Consejo Oleícola Internacional (<http://www.internationaloliveoil.org/>), Instituto de la Grasa del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (<http://www.ig.csic.es/>), la Federación de Asociaciones de Aceites, Semillas y Grasas (FOSFA, <http://www.fosfa.org/>), OCL-Oléagineux Corps gras Lipides (<http://www.john-libbey-eurotext.fr/fr/revues/ocl/>), Oleo Digital (<http://www.tecnipublicaciones.com/oleo/>) y la Comisión sobre la

Química de los Alimentos, Aceites Comestibles y Grasas de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, <http://www.cfsan.fda.gov/~frf/iupac.html>).

Información bibliográfica y legislativa

La extensa base de datos de literatura toxicológica en línea TOXLINE (<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?TOXLINE>) incluye unos 3 millones de referencias bibliográficas sobre los efectos bioquímicos, farmacológicos, fisiológicos y toxicológicos de compuestos y productos en humanos, animales y ambiente. Se acceden a los resúmenes de las publicaciones, y a enlaces hacia proveedores de los artículos completos.

La base de datos bibliográfica Agrícola-AGRICultural OnLine Access (<http://agricola.nal.usda.gov/>) fue creada por la Biblioteca Nacional de Agricultura Norteamericana (NAL) e incluye desde 1970 citas de literatura sobre agricultura, veterinaria, entomología, plantas, acuicultura, pesca, ganadería, alimentos, nutrición y ciencias medioambientales. Enlaza con fuentes de textos completos.

La fuente de bibliografía Gateway (<http://gateway.nlm.nih.gov/gw/Command>) permite búsquedas en múltiples bases de datos de la Biblioteca Nacional Norteamericana, incluyendo MEDLINE/PubMed, TOXLINE Special, LocatorPlus, MedlinePlus, ClinicalTrials.gov, DIRLINE, Genetics Home Reference, Meeting Abstracts, HSRProj, OMIM, y HSDB.

Por su parte PubMed es un servicio de la Biblioteca Nacional de Medicina Norteamericana que incluye más de 14 millones de citas de artículos biomédicos (Medicina, Enfermería, Odontología, Veterinaria y otras ciencias preclínicas) publicados desde 1950, y extraídas de MEDLINE y de diversas revistas científicas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>).

El acceso a la Legislación Europea se encuentra en la página de Europa (<http://europa.eu.int/eur-lex/es/search/index.html>), y la de Compuestos existentes (<http://ecb.jrc.it/existing-chemicals/>) y Nuevos compuestos (<http://ecb.jrc.it/new-chemicals/>). Existen diversos accesos a la Legislación Española (<http://www.boe.es/g/es/>, <http://www6.uniovi.es/boe/busca.html>). Y finalmente la Legislación Norteamericana sobre medicamentos y alimentos, recogida en Code of Federal Regulations (http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx_01/21cfrv3_01.html).

Bibliografía

- Berland GK, Elliot MN, Morales LS, Algazy JJ, Kravitz RL, Broder MS *et al* (2001). Información sobre la salud en internet. Accesibilidad y legibilidad en inglés y en español. *JAMA* (ed. Esp.) 10: 359-368.
- Brinkhuis RP (2001). Toxicology information from US government agencies. *Toxicology* 157: 25-49.
- Cameán AM, Jos A, Moreno I, Repetto G, Repetto M (2003). Toxicología Alimentaria: Programa de Prácticas Experimentales y Búsqueda en Internet. En: *Innovaciones Docentes en la Universidad de Sevilla Curso 2001-2002*. Colección Innovación y Desarrollo de la Calidad de la Enseñanza Universitaria N.º 4. Instituto de Ciencias de la Educación de la Universidad de Sevilla, 139-143.
- Felsot AS (2002). WEB resources for pesticide toxicology, environmental chemistry, and policy: a utilitarian perspective. *Toxicology* 173: 153-166.
- Guerbet M, Guyodo G (2002). Comparison of 35 electronic databases for environmental risk assessment. *Environ Toxicol* 17: 7-13.
- Poppenga RH, Spoo W (2002). Internet resources for veterinary toxicologists. *Toxicology* 173: 179-189.
- Repetto G, del Peso A, Jos A, Moreno I, Cameán AM, Repetto M (2002). Innovación en la docencia de la toxicología mediante la aplicación de nuevas tecnologías. *Revista de Toxicología* 19: 129-140.
- Repetto G, Moreno I, del Peso A, Repetto M, Cameán AM (2001). La búsqueda de información toxicológica: módulo práctico de aprendizaje. *Revista de Toxicología* 18: 92-98.

- South JC (2001). Online resources for news about toxicology and other environmental topics. *Toxicology* 157: 153-164.
- Wexler P, Hakkinen PJ, Kennedy GL, Stoss FW (2000). *Information resources in toxicology*. 3.^a Ed. Academic Press, San Diego. pp. 921.
- Wexler P (2001). TOXNET: An evolving web resource for toxicology and environmental health information. *Toxicology* 157: 3-10.
- Wexler P (2004). The U.S. National Library of Medicine's Toxicology and Environmental Health Information Program. *Toxicology* 198: 161-168.
- Winter CK (2002). Electronic information resources for food toxicology. *Toxicology* 173: 89-96.
- Wright LL (2001). Searching fee and non-fee toxicology information resources: an overview of selected databases. *Toxicology* 157: 89-110.

MANEJO CLÍNICO DE LAS INTOXICACIONES ALIMENTARIAS

Juan Carlos Ríos, Enrique Paris, Marli Bettini, Guillermo Repetto

Intoxicaciones y toxiinfecciones alimentarias. Intoxicación por alimentos marinos. Intoxicación por hongos. Bibliografía.

Todos los alimentos pueden ser susceptibles de contaminación, ya sea por microorganismos, parásitos o sustancias tóxicas. Las intoxicaciones producidas por alimentos son una de las causas más comunes de gastroenteritis epidémicas en el mundo y el costo anual para los diferentes países es muy alto.

Las intoxicaciones alimentarias son afecciones de evolución rápida, generalmente de naturaleza entérica, adquirida por el consumo de alimentos o agua contaminada. Este término se aplica a intoxicaciones producidas por toxinas de origen bacteriano (toxina estafilocócica, toxina botulínica) y por diversas sustancias orgánicas que pueden encontrarse en alimentos naturales tales como ciertos hongos, productos del mar y por contaminantes químicos (metales pesados, plaguicidas, etc.) (Repetto, 1997). En general, las intoxicaciones alimentarias bacterianas más comunes son cuadros relativamente leves y autolimitados, no obstante, pueden ocurrir intoxicaciones severas y a veces letales.

El diagnóstico de las intoxicaciones alimentarias es difícil y a menudo inexacto. El siguiente texto puede ayudar en el proceso de

diagnóstico y manejo de la intoxicación alimentaria.

Intoxicaciones y toxiinfecciones alimentarias

En cuanto a los trastornos por contaminación microbiana de los alimentos, se encuentran en la bibliografía clasificaciones muy contradictorias; Repetto hace una clasificación muy lógica en la que considera intoxicaciones y toxinfeciones de origen bacteriano. Las primeras se originan al consumir alimentos que contienen toxinas producidas por el microorganismo (toxina botulínica, aflatoxinas, etc.); las segundas se producen tras ingerir alimentos contaminados por microorganismos que, al desarrollarse en el interior del consumidor, segregan distintas toxinas (estafilococo, salmonellas, escherichias, etc.) (Repetto, 1997).

Existe confusión y controversia con estos términos, puesto que se habla de forma general de

intoxicaciones alimentarias en la mayoría de los casos en situaciones que estrictamente no son intoxicaciones, sino realmente infecciones, y los trastornos están causados por la multiplicación del microorganismo patógeno en el hospedador, particularmente en el tracto gastrointestinal (Cameán y Repetto, 1995).

1. Intoxicaciones de origen bacteriano

En la Tabla 37.1 se exponen algunos ejemplos de las intoxicaciones alimentarias de origen microbiano más características, el periodo de incubación, sus principales síntomas iniciales y los tipos de alimentos involucrados.

Para un control y prevención de la contaminación microbiana de los alimentos es esencial conocer los factores o requerimientos necesarios para el crecimiento de los microorganismos o para la producción de toxinas, como temperatura, acidez, sales, humedad, presencia de otros microorganismos, etc. Todos estos factores se interrelacionan y las condiciones en las que el peligro es mínimo dependen del tipo de alimento y del grado de contaminación (Moreno y Cameán, 2002).

2. Toxiinfecciones alimentarias

Según la FAO, las toxiinfecciones alimentarias son la segunda causa de morbilidad en la población; pero muchas permanecen sin declarar, quizás por su mediana severidad y recuperación rápida, salvo el cólera.

Están producidas por numerosos microorganismos (Cameán y Repetto, 1995) (en la Tabla 37.1 aparecen los más significativos) en su mayoría de la familia *Enterobacteriaceae*, grupo muy heterogéneo. Los alimentos susceptibles de contaminación pueden ser de todo tipo, ya que la fuente de agentes causales suele ser el tracto gastrointestinal de individuos reservorios o las heces de animales y humanos infectadas, o aguas contaminadas que, por deficiencias sanitarias, infectan a alimentos como: carne fresca procedente de animal entero, pescados, moluscos, pasteles de

crema, leche no pasteurizada, etc. (Moreno y Cameán, 2002).

3. Tratamiento

La mayoría de las intoxicaciones alimentarias bacterianas son episodios autolimitados y no requieren hospitalización o terapia más específica que la reposición oral de líquidos. La reposición de líquidos y electrolitos intravenosos está indicada en pacientes que no pueden retener líquidos orales y en pacientes con severos desbalances hidroelectrolíticos.

Se debe monitorizar la vía aérea y la respiración, especialmente en pacientes afectados neurológicamente, para detectar precozmente depresión respiratoria o signos de distress respiratorio. Los pacientes con botulismo requieren tratamiento precoz y agresivo con soporte respiratorio en una unidad de cuidados intensivos, ya que puede ocurrir fallo respiratorio con compromiso vital del paciente, por lo que se sugiere considerar una intubación temprana o electiva. El lavado gástrico y el carbón activado no tienen ninguna utilidad en las toxinfecciones o intoxicaciones bacterianas (Kim, 1994; Tunick y Goldfrank, 1998; Ellenhorn, 1997).

Tratamiento específico

Hidratación

Se debe rehidratar y administrar electrolitos si es necesario, con disoluciones salinas intravenosas u otros cristaloides, especialmente en niños y pacientes ancianos (los pacientes con sintomatología leve pueden tolerar rehidratación oral). Los pacientes hipotensos pueden requerir grandes volúmenes de soluciones intravenosas (Kim, 1994; Ellenhorn, 1997; Goldfrank *et al.*, 1998).

Vómitos

Los agentes antieméticos son aceptados para el tratamiento sintomático y pueden ser indicados en algunos tipos de intoxicaciones alimentarias bacterianas (Kim, 1994, Poisindex Food Poisoning-Unknown).

Tabla 37.1. Principales agentes que provocan intoxicaciones y toxiinfecciones bacterianas.

Agente	Período de incubación	Síntomas iniciales	Fuente	Agente patógeno
Intoxicación				
<i>Staphylococcus</i> spp	2-6 h	Dolor abdominal, vómitos, diarrea	Comidas preparadas: carnes, pastas, ensaladas	Enterotoxina termoestable
<i>Bacillus cereus</i> Tipo I	1-6 h	Dolor abdominal, vómitos, diarrea	Arroz cocido	Toxina termolábil
Tipo II	12 h	Dolor abdominal, diarrea	Carnes y vegetales	Toxina termolábil
<i>Clostridium perfringens</i>	8-24 h	Dolor abdominal, vómitos, diarrea, disentería	Carnes y aves cocinadas	Enterotoxina termolábil
<i>Clostridium botulinum</i>	6-9 días	Laxitud, cefaleas, sequedad de boca y síntomas gastrointestinales. Parálisis flácida, midriasis, paresias, calambres en extremidades, muerte por parálisis respiratoria (70% mortandad).	Embutidos caseros, conservas caseras: cárnicas, pescado, vegetales, etc.	Toxina
Toxiinfecciones				
<i>Salmonella</i> spp	8-24 h	Dolor abdominal, vómitos, diarrea, disentería, fiebre	Aves, huevos, algunas mascotas (tortugas, lagartos, pollos)	Bacteria y endotoxina
<i>E. coli</i> enterotoxigénica	24-72 h	Dolor abdominal, diarrea, disentería, fiebre	Agua y alimentos contaminados	Enterotoxina termoestable
<i>Vibrio cholera</i>	24-72 h	Dolor abdominal, vómitos, diarrea, fiebre	Alimentos contaminados	Enterotoxina termolábil
<i>Shigella</i> spp	24-72 h	Dolor abdominal, vómitos, diarrea, disentería, fiebre	Agua y alimentos contaminados	Bacteria y endotoxina
<i>Campylobacter jejuni</i>	1-7 d	Dolor abdominal, vómitos, diarrea, disentería, fiebre	Leche, aves de corral y agua no potable	Bacteria. Enterotoxina termolábil
<i>Yersinia</i> spp	1-7 d	Dolor abdominal, vómitos, diarrea, disentería, fiebre	Carne de cerdo, leche	Bacteria. Enterotoxina

(Camean y Repetto, 1995; Poisindex Food-poisoning *Bacillus cereus*, 2004; Poisindex Food-poisoning Botulism, 2004; Poisindex Food-poisoning *Clostridium perfringens*, 2004; Poisindex Food-poisoning *Listeria*, 2004; Poisindex Food-poisoning *Salmonella*, 2004; Poisindex Food-poisoning *Shigella*, 2004; Poisindex Food-poisoning *Staphylococcus*, 2004; Poisindex Food-poisoning *Streptococcus*, 2004).

Infeción

Los antibióticos pueden ser indicados solo en casos severos y para las intoxicaciones de las siguientes especies bacterianas:

Shigella* spp, *Salmonella* spp, *Streptococcus* spp y *Listeria

Los antibióticos más usados son penicilinas, aminoglicósidos y sulfamidas (Poisindex Food-poi-

soning *Salmonella*, 2004; Poisindex Food-poisoning *Shigella*, 2004; Poisindex Food-poisoning *Staphylococcus*, 2004; Poisindex Food-poisoning *Streptococcus*, 2004).

Campylobacteriosis

La eritromicina es el antibiótico de elección para la gastroenteritis por *Campylobacter*. Debe ser aplicada los primeros 3 a 4 días de aparición de

los síntomas. Su administración temprana reduce significativamente la duración de la diarrea en niños con disentería aguda, pero no en adultos. La dosis oral adultos es de 500 mg cada 6 horas durante 5-7 días, y la de niños de 40 a 50 mg/kg/día dividido en cuatro dosis durante 5-7 días. Los pacientes con fallo renal no requieren reducción de dosis, pero sí los que tienen insuficiencia hepática.

Se puede usar ciprofloxacino pero solo en pacientes adultos con una dosis oral de 500 mg. dos veces al día durante 3-5 días. Los pacientes con insuficiencia renal y geriátricos requieren ajuste de dosis.

Cólera

La reposición de líquidos es la principal terapia. El tratamiento con antibióticos disminuye la duración del cuadro clínico, los requerimientos de fluidos y el periodo de excreción del *Vibrio*.

La tetraciclina o doxiciclina son los antibióticos de elección. Otras alternativas incluyen trimetoprim-sulfametoxazol, ciprofloxacino, norfloxacino, eritromicina y furazolidona (Peter *et al.*, 1997).

Botulismo

La administración de la antitoxina botulínica debe hacerse lo antes posible en pacientes sintomáticos. Dado que la antitoxina es de origen equino, debe descartarse la hipersensibilidad a sueros equinos, siendo la posibilidad de reacciones de hipersensibilidad del 20% de los individuos tratados. La antitoxina de origen equino apenas se ha utilizado en el botulismo infantil por el riesgo de inducir hipersensibilidad de por vida frente a los antígenos equinos y por la ausencia de datos que demuestren sus efectos beneficiosos. Actualmente se ha elaborado una antitoxina botulínica humana, llamada *inmunoglobulina botulínica*, la cual se está estudiando en California para evaluar su eficacia, cuando se administra en las fases iniciales de la enfermedad (Peter *et al.*, 1997; Woo, 1994; Anderson *et al.*, 2002; Goldfrank y Flomenbaum, 1998; Poisindex Food-poisoning Botulism, 2004).

Intoxicación por alimentos marinos

Las principales intoxicaciones de esta etiología se originan por la ingestión de pescados y moluscos que contienen biotoxinas producidas por dinoflagelados o que son segregadas para combatir a los depredadores (Cameán y Repetto 1995).

En estos tipos de intoxicación se pueden encontrar:

1. Intoxicación amnésica por moluscos (ASP o VAM)

La toxina causal es el ácido domoico, que es un aminoácido neuroexcitatorio derivado del ácido kaínico, análogo del ácido glutámico. Esta toxina es producida por las diatomeas *Pseudonitzschia pungens*, *Pseudonitzschia australis* (*Nitzschia pseudoseriata*), y *Nitzschia pseudodelicatissima*. Los principales síntomas después de la ingestión de mariscos contaminados son gastrointestinales y neurológicos, pero también se han descrito efectos cardiovasculares. Estos síntomas comienzan generalmente cerca de las 5 horas (con un rango de 25 minutos a 38 horas) postingestión. En los pacientes más jóvenes predominan los efectos gastrointestinales como náuseas, vómitos y diarrea, que pueden progresar a una hipotensión, edema pulmonar, convulsiones, coma y muerte. La pérdida de memoria temporal es uno de los síntomas más característicos asociados a esta intoxicación (Gago, 2002).

2. Intoxicación por ciguatera (CTX)

Es causada por la ingestión de peces de los arrecifes tropicales; donde un microorganismo del plancton, el dinoflagelado *Gambierdiscus toxicus* produce la ciguatoxina, que es ingerida y se acumula en la carne del animal marino. Su cuadro clínico se caracteriza por una tríada de diarrea, vómito y mialgias, comenzando generalmente de 6 a 24 horas después de la ingestión de pescados contaminados. Los síntomas gastrointestinales

aparecen primeramente (de 1 a 6 horas postingestión) y se resuelven en el plazo de 3 días seguidos por síntomas neurológicos. Las parestesias son comunes y pueden persistir durante semanas o meses. Las muertes por este tipo de intoxicación son raras (Cameán y Repetto, 1997; Gago, 2002; Kim, 1994; Krochmal, 1998).

3. Intoxicación diarreica por moluscos (DSP o VDM)

Esta intoxicación ocurre después de comer moluscos que se han alimentado del fitoplancton marino conteniendo las toxinas diarreicas. Los dinoflagelados de la especie *Dinophysis prora-centrum* son las fuentes primarias de las toxinas. Su periodo de incubación tiene su inicio entre 4 a 12 horas y dura menos de 3 a 4 días. El cuadro clínico se caracteriza por enfriamiento (escalofríos), dolor abdominal, náusea, vómitos y diarrea (Cameán y Repetto, 1997; Gago, 2002; Kim, 1994; Krochmal, 1998).

4. Intoxicación neurológica por moluscos (NSP o VNM)

Es producida por *Ptychodiscus brevis*. Su periodo de incubación es de 30 minutos a 5 horas. Se encuentra principalmente en almejas, ostras y moluscos bivalvos. Su cuadro clínico se caracteriza por parestesias de cara, garganta, dedos de manos y pies, y una sensación de calor en piel y mucosas. También se puede presentar dolor y/o espasmos abdominales, incoordinación, convulsiones, coma y depresión respiratoria (Cameán y Repetto, 1997; Gago, 2002; Kim, 1994; Krochmal, 1998).

5. Escumbroidosis o intoxicación histamínica

Esta intoxicación es una forma de ictiosarcototoxicosis (la toxina está contenida dentro de la carne de los pescados). Los pescados implicados tienen la histidina libre (aminoácido) presente en su musculatura, que se metaboliza a histamina y saurina (análogo de la histamina), respon-

sables de los síntomas observados. Los síntomas se desarrollan generalmente de 30 a 60 minutos después de comer los pescados en mal estado, y que pueden o no tener un gusto «penetrante» o a «pimienta». Esto se origina por una descomposición bacteriana del pez, que produce concentraciones elevadas de histamina. Los peces que provocan este tipo de intoxicación son la caballa, el atún, la trucha, la albacora y el bonito. El cuadro clínico se debe a una reacción histamínica, que es idéntica a una reacción alérgica, caracterizado por enrojecimiento y rubor facial, eritema, prurito, cefalea, palpitations y síntomas gastrointestinales como diarrea, náusea y vómito. En casos más severos, se ha presentado opresión torácica y broncoespasmo. Aunque se han descrito shock y muerte, en los últimos años no ha habido informes de casos severos; el cuadro generalmente es leve y limitado, incluso sin tratamiento. Los síntomas se resuelven en el plazo de 3 a 36 horas (con un promedio de 14 horas) (Cameán y Repetto, 1997; Gago, 2002; Kim, 1994; Krochmal, 1998).

6. Tetrodotoxina (TTX)

La intoxicación es causada por la ingestión de la carne, vísceras o piel de peces del orden de los tetradontiformes, que contienen, la TTX. La concentración más alta está en las vísceras. La musculatura del cuerpo está generalmente libre del veneno. Los síntomas generalmente aparecen de 10 a 45 minutos postingestión, pero se pueden retrasar hasta 3 horas. La muerte puede ocurrir en el plazo de 6 a 24 horas. El pronóstico del paciente es bueno si sobrevive las primeras 24 horas. Su cuadro clínico se caracteriza por hipotermia, hipotensión, parálisis respiratoria, vómito, palidez, sudoración excesiva y parestesias (Cameán y Repetto, 1997; Gago, 2002; Kim, 1994; Krochmal, 1998).

7. Intoxicación paralizante por moluscos (PST)

Los organismos responsables de este tipo de intoxicación son dinoflagelados de los generos

Gonyaulax, *Alexandrium* y *Pyrodinium*. El periodo de incubación es generalmente 30 minutos, pero se puede retrasar hasta 10 horas. Las toxinas son denominadas saxitoxinas. La principal fuente de intoxicación es por el consumo de mejillones, almejas y ostras. Su cuadro clínico se caracteriza inicialmente por entumecimiento de las yemas de los dedos y de la boca, seguido por incoordinación muscular, distress respiratorio, parálisis y muerte (Cameán y Repetto, 1997; Gago, 2002; Kim, 1994; Krochmal, 1998).

Manejo clínico general

Se aplica el ABC de la reanimación. Asegurar que la vía aérea esté permeable para una adecuada función cardiorespiratoria y oxigenación cerebral. Monitorizar la vía aérea y la respiración, especialmente en pacientes afectados neurológicamente, para detectar precozmente depresión respiratoria o signos de distrés respiratorio (Dueñas, 1999; Ellenhorn, 1997; Tunik y Goldfrank, 1998; Paris y Ríos, 2000).

Terapia de soporte y sintomática

Dar apoyo respiratorio con protección de la vía aérea y mantenimiento de la función respiratoria. Se debe considerar la intubación traqueal en pacientes con compromiso de conciencia por el alto riesgo de aspiración. Un alto número de intoxicados con compromiso de conciencia hipoventilan, de ahí que deban asistirse primero con ambú y luego con ventilación mecánica. El apoyo hemodinámico es básico en estos pacientes. En ellos la hipotensión es frecuente por aumento de la capacitancia venosa y la disminución del retorno venoso, o por fallo miocárdico. De no corregirse este factor, el pronóstico empeora. Un apoyo hemodinámico adecuado consiste en el uso de soluciones intravenosas y drogas cardio y vasoactivas. Inicialmente se usará suero fisiológico, y si no hay respuesta, catecolaminas (dopamina, noradrenalina o dobutamina) (Dueñas, 1999; Ellenhorn, 1997; Tunik y Goldfrank, 1998; Paris y Ríos, 2000).

Manejo específico

El uso de carbón activado está recomendado. Se administran 50-100 g en adultos y 25-50 g en niños (1 g/kg) (se puede mezclar 30 g/240 mL de agua). También se puede considerar la administración de múltiples dosis de carbón activado a dosis de 0,5 g/kg cada 4 a 6 horas (Dueñas, 1999; Ellenhorn, 1997; Tunik y Goldfrank, 1998; Paris y Ríos, 2000).

Convulsiones

Las crisis convulsivas son una complicación grave, por esta razón se debe detener idealmente antes de 30 minutos (Nota: los anticonvulsivos pueden producir depresión respiratoria e hipotensión si se administran rápidamente).

El fármaco de elección es el diazepam: 0,15-0,25 mg/kg i.v. lenta en niños y 10-30 mg en adultos, a una velocidad de perfusión no superior a 2 mg/min. Si las convulsiones continúan, puede darse una segunda dosis. La vía rectal puede usarse en niños (0,5 mg/kg), si no hay buen acceso i.v. lorazepam 0,1-0,2 mg/kg, máximo 2 mg i.v. por dosis. Considerar midazolam i.m. 0,1-0,2 mg/kg. en niños o 10-15 mg. en adultos, cuando el acceso a una vía venosa no es posible. Si las convulsiones son de difícil manejo, con grandes dosis de benzodiazepinas, se debe considerar el fenobarbital: 10-20 mg/kg i.v. lento, pasar en 15-20 minutos. Pueden repetirse dosis hasta 30 mg/kg, monitorizando la función cardiorrespiratoria. También se puede usar fenitoína: 15-20 mg/kg i.v. lenta, pasar en 20-30 minutos, monitorizando la función cardiorrespiratoria. Identificar y corregir alteraciones sistémicas, como alteraciones electrolíticas, hipoglicemia y acidosis láctica (Dueñas, 1999; Ellenhorn, 1997; Tunik y Goldfrank, 1998; Paris y Ríos, 2000).

Fallo respiratorio

Se deben obtener gases arteriales y/o saturar al paciente con un oxímetro de pulso. La oxigenoterapia debe indicarse en pacientes con un grado de hipoxemia tal, que suponga un peligro

para la vida ($\text{PaO}_2 < 60$ mm Hg). La indicación de ventilación está basada principalmente en el cuadro clínico y en la PaCO_2 , un paciente con compromiso de conciencia y PaCO_2 elevada (> 60 mm Hg), indica la necesidad de ventilación asistida.

Ventilación manual asistida. A través de bolsa y mascarilla de ambú, o tubo endotraqueal, con O_2 100 %, mientras se conecta a ventilador mecánico.

Realizar intubación endotraqueal.

Programación del ventilador según la patología del paciente.

Si el paciente tiene ventilaciones espontáneas, setear el ventilador en modo ventilación mandatoria intermitente (usualmente 10-12 resp/min).

Si el tubo endotraqueal fue ubicado solo para protección de vía aérea, se puede dejar con ventilación espontánea con flujo de O_2 por tubo T (Dueñas, 1999; Ellenhorn, 1997; Tunik y Goldfrank, 1998; Paris y Ríos, 2000).

Hipotensión

Debe haber monitoreo cardiorespiratorio estricto, evitando la hipertensión, y llegando a rangos de presión arterial normal en corto tiempo, para no disminuir así la perfusión renal y cerebral, y se acentúe o produzca daños isquémicos en ellos (Dueñas, 1999; Ellenhorn, 1997; Tunik y Goldfrank, 1998; Paris y Ríos, 2000).

Bradiarritmia

Una bradicardia sinusal de 40-50/min es normal cuando la T^a corporal es de 32-35°C.

Se administra atropina 0,5-2 mg EV (0,01-0,03 mg/kg i.v. en niños). Si no responde a atropina, se puede administrar isoproterenol, en dosis 1-10 mcg/min i.v. (0,05-1 mcg/kg/min en niños). Otra alternativa es la epinefrina 2-20 mcg/min.

Tratar la causa de la bradiarritmia tratando la intoxicación (Dueñas, 1999; Ellenhorn, 1997; Tunik y Goldfrank, 1998; Paris y Ríos, 2000).

Intoxicaciones por hongos

El interés del hombre por las setas se remonta muy atrás en el pasado de la humanidad. Las setas tóxicas pueden provocar diversos trastornos en función de la toxina que contengan. Aunque los hongos superiores no se encuentran en alta proporción en la dieta humana, presentan un alto riesgo tóxico, principalmente por la frecuencia de la intoxicación, incluso con una alta fatalidad, en relación al número de personas expuestas. Debido a que las distintas especies de hongos varían ampliamente en las toxinas que contienen y porque identificarlas con certeza es difícil, se utiliza la clínica más que un sistema taxonómico de clasificación. Aún así existen 8 grupos de hongos tóxicos reconocidos con mayor frecuencia en función del tipo de toxina que contienen: ciclopéptidos, giromitrina, orelanina, muscarina, coprina, ácido iboténico/muscínol, psilocibina y toxinas gastrointestinales (Cameán y Repetto, 2002; Alexis y Carlson, 2002). Podemos clasificar los hongos de acuerdo a la Tabla 37.2.

El manejo y pronóstico puede ser determinado con un importante grado de certeza por la anamnesis y los síntomas iniciales.

Algunos principios que debemos tener en cuenta en las intoxicaciones por hongos son:

- Nunca se deben ingerir hongos silvestres a menos que un micólogo con experiencia pueda reconocerlos.
- La toxicología de las distintas especies puede variar dependiendo del área de crecimiento.
- Si se sospecha de intoxicación, intentar encontrar el hongo ingerido para lograr identificarlo.
- Los hongos son con frecuencia culpados de diversos malestares, pudiendo haber infecciones u otras enfermedades que pueden ser la verdadera causa, incluso el modo de preparación y los utensilios de cocina (salsas, ollas, vino, especias) pueden ser responsables del malestar.

Tabla 37.2. Clasificación de los hongos.

Toxina	Género y especies	Inicio de síntomas	Principal sitio de acción	Síntomas
Ciclopéptidos Amatoxina Falotoxina Virotóxina	<i>Amanita phalloides</i> <i>Amanita verna</i> <i>Amanita virosa</i> <i>Amanita ocreata</i> <i>Galerina autumnalis</i> <i>Galerina marginata</i> <i>Galerita venenata</i> <i>Lepiota helveola</i> <i>Lepiota chlorophyllum</i> <i>Lepiota brunneoincarnata</i> <i>Lepiota josserandii</i>	6-12 h 12-24 h 24-72 h	Hepático	Etapa 1: gastroenteritis, diarrea profusa, dolor abdominal. Etapa 2: aparente mejoría de síntomas digestivos, comienzo de daño hepático. Etapa 3: Insuficiencia hepática y renal, encefalopatía y muerte.
Giromitrina Monometilhidracina	<i>Gyromitrina esculenta</i> <i>Gyromitrina ambigua</i> <i>Gyromitrina infulas</i>	6-12 h	SNC	Gastroenteritis, mareos, cefalea, convulsiones.
Orelanina Orellina	<i>Cortinarius orellanus</i> <i>Cortinarius speciosissimus</i> <i>Cortinarius gentilus</i>	24-36 h Semanas o meses	Renal	Gastroenteritis, oliguria Insuficiencia renal aguda, nefritis tubulointerstitial y fibrosis.
Muscarina	<i>Clitocybe illudens</i> <i>Clitocybe dealbata</i> <i>Inocyte fascigiata</i> <i>Inocyte geophylla</i> <i>Boletus calopus</i> <i>Boletus luridus</i>	0,5-3 h	Sistema Nervioso Autónomo	Broncorrea, broncoespasmo, vómitos, diarrea, sialorrea, poliuria, lagrimeo.
Coprina l-aminociclopropanol	<i>Coprinus atramentarius</i> <i>Coprinus quadricus</i> <i>Coprinus variegatus</i>	0,5-3 h después de la ingesta de etanol	Acetaldehído dehidrogenasa	Rubor facial, náuseas, vómitos, palpitaciones, disnea, hipotensión (reacción antabús).
Ácido iboténico Muscimol	<i>Clitocybe claviceps</i> <i>Amanita muscaria</i> <i>Amanita pantherina</i> <i>Amanita gemata</i>	0,5-3 h	SNC	Hiperactividad, excitación, alucinaciones, euforia, temblores, mioclonos, convulsiones, delirio. Hipersomnolencia inhibitoria, agotamiento, coma.
Psilocibina	<i>Psilocybe cubensis</i> <i>Psilocybe cyanescens</i>	10-15 h	SNC	Euforia, alucinaciones, agitación, hipertermia, convulsiones.
Toxinas gastrointestinales	<i>Agaricus hordensus</i> <i>Chlorophyllum molybdites</i> <i>Chlorophyllum esculentum</i> <i>Clitocybe nebularis</i> <i>Omphalates illudens</i>	0,5-2 h 0,5-3 h	GI	Náuseas, vómitos, diarrea.

(Camean y Repetto, 1995; Poisindex Mushrooms-chlorophyllum, 2004; Poisindex Mushrooms-Coprine, 2004; Poisindex Mushrooms-Cyclopeptides, 2004; Poisindex Mushrooms-hallucinogenic, 2004; Poisindex Mushrooms-Monomethylhydrazine, 2004; Poisindex Mushrooms-Muscarine/histamine, 2004; Poisindex Mushrooms-Muscimol/Ibotenic acid, 2004; Poisindex Mushrooms-Orellanine/Orelline, 2004).

- No hay una aproximación genérica para evaluar el potencial tóxico de un hongo. Ningún sabor ni olor son buenos predictores de la toxicidad.
- La cocción podría inactivar algunas toxinas pero no otras. Ningún hongo silvestre debe ser ingerido crudo o en grandes cantidades.

- Algunos fenómenos asociados pueden contribuir a la toxicidad: insecticidas rociados sobre los hongos, ingesta asociada de alcohol que provoque una reacción antabus.
- Algunos hongos comestibles pueden deteriorarse y llegar a ser tóxicos, por lo tanto solo los hongos «jóvenes» deben consumirse.

1. Tratamiento específico de acuerdo al tipo de hongos

Hongos-ciclopéptidos

El tratamiento de la intoxicación aguda por estos hongos no debe demorarse, ya que la demora en su instauración hace que el paciente pueda sufrir una insuficiencia hepática. Se debe considerar la realización de un lavado gástrico si existe riesgo vital (idealmente antes de 1 hora) post-ingesta con protección de la vía aérea por el riesgo de convulsiones. Administrar carbón activado: 50-100 g en adultos y 25-50 g en niños (1 g/kg). (Se puede mezclar 30 g/240 mL de agua). También se puede considerar la administración de múltiples dosis de carbón activado a dosis de 0,5-1 g/kg cada 4 a 6 horas. esto puede aumentar la eliminación, pero no mejora el pronóstico de la intoxicación, además se debe considerar solo en intoxicaciones graves. Se recomienda forzar la diuresis durante el inicio de la rehidratación y corregir lo antes posible la deshidratación e hipovolemia. Se debe controlar la presión arterial, presión venosa central y el flujo urinario.

Si la silibinina está disponible considerar su administración de 20 a 50 mg/kg/ día i.v. cada 6 horas y por una semana.

Administrar penicilina G en una dosis de 300.000 a 1.000.000 U/kg/día en infusión i.v. aunque su eficacia no ha sido probada a través de estudios controlados.

Si existe insuficiencia hepática realizar irrigación intestinal, administración de vitamina K parenteral (fitomenadiona cada 6 h) y/o plasma fresco. Si la insuficiencia es severa (con encefalopatía, ictericia marcada y/o protrombina me-

nor al 10%) solicitar la evaluación por un especialista para un eventual transplante hepático.

En caso de insuficiencia renal aguda efectuar hemodiálisis (Dueñas, 1999; Ellenhorn, 1997; Tunik y Goldfrank, 1998; Paris y Ríos, 2000).

Terapias experimentales

Ácido tióctico: este ácido no ha sido probado en estudios controlados en cuanto a su eficacia clínica. En animales ha demostrado ser inefectivo. No está disponible para el uso en seres humanos.

Cimetidina: es un inhibidor del citocromo P₄₅₀ que ha sido probada como un posible antídoto debido a que las amanitinas son convertidas a metabolitos tóxicos vía hepática por el citocromo P₄₅₀. Aún no se recomienda su uso como terapia estándar debido a la falta de estudios que la avalen.

N-Acetilcisteína (NAC): estudios en ratones demuestran que una dosis única no tiene efectos protectores. En otro estudio, efectuado en 11 pacientes con distintos grados de intoxicación por amanita, se les inició una terapia con NAC durante la fase gastrointestinal de la intoxicación en una dosis similar a la usada en intoxicación por paracetamol. Además se usó hemoperfusión, penicilina en altas dosis y tratamiento de soporte. Diez pacientes se recuperaron y un paciente con hepatitis B crónica preexistente murió debido a un fallo hepático.

Aucubina: es un glucósido que se obtiene de la *Aucuba japonica*. La aucubina ha mostrado efectos protectores en la intoxicación por amanita en perros y ratones. No se han realizado pruebas en humanos. La aucubina tiene una baja biodisponibilidad oral.

Terapia con oxígeno hiperbárico: se han intentado en ratones para proteger de la hepatotoxicidad tras la administración de alfa-aminitina. No se observó hepatoprotección derivada de la terapia con oxígeno hiperbárico.

Aumento de la eliminación

Diuresis: estudios toxicocinéticos indican que se eliminan cantidades importantes de amatoxinas

en la orina, especialmente durante las 48 horas que siguen a la ingestión. Por esta razón se establece como meta el mantenimiento de un volumen de orina normal o ligeramente aumentado.

Eliminación extracorpórea

Se ha demostrado que las amatoxinas están presentes en el plasma durante las primeras 24 a 48 horas y en una concentración muy baja comparada con la concentración que se encuentra en la orina. Debido a que las amatoxinas son eliminadas rápidamente del plasma por los riñones, las técnicas de eliminación extracorpóreas no se consideran útiles, a menos que el paciente presente un fallo renal previo a la intoxicación donde se indica la realización de hemodiálisis o hemoperfusión. La hemoperfusión es útil para remover las amatoxinas durante el cuadro inicial o como soporte en el paciente que ya presenta un fallo hepático. Este procedimiento es más efectivo durante las primeras 24 horas tras la ingestión, sin embargo, su efecto adverso es la trombocitopenia, lo que aumenta el riesgo de hemorragias (Dueñas, 1999; Poisindex Mushrooms-Cyclopeptidoes, 2004; Gisbert, 1998; Ellenhorn, 1997; Goldfrank, 1998).

Hongos monometilhidrazina (giromitrina)

Se recomienda administrar carbón activado en dosis de 50-100 g en adultos y 25-50 g en niños.

Piridoxina: puede ser el antídoto para los síntomas neurológicos, aunque la experiencia en cuanto a su uso es limitada en intoxicaciones por estos hongos. La dosis recomendada en la literatura es de 25 mg/kg dada como una infusión en 15-30 minutos. Se pueden administrar dosis repetidas cuando hay signos neurológicos recurrentes con una dosis máxima de 15 a 20 g.

Debido a que las toxinas de estos hongos inducen convulsiones por disminución de la concentración de GABA, las benzodiacepinas y los barbitúricos, además de la piridoxina, son las drogas preferidas para controlarlas. Administrar diazepam en un bolo i.v. (Adultos 5-10 mg inicialmente que puede ser repetida

tras 15 minutos según necesidad. Niños 0,25-0,4 mg/kg hasta 10 mg/dosis) o lorazepam en bolo i.v. adultos 4-8 mg y niños 0,05-0,1 mg/kg. Si las convulsiones no se resuelven, se administra fenobarbital.

Para tratar la posible hipotensión se infunden 10-20 mL/kg de fluido isotónico. Si la hipotensión persiste, se administra dopamina (5-20 mcg/kg/min) o norepinefrina (en adultos, comenzar infusión con 0,5-1 mcg/min, y en niños con 0,1 mcg/kg/min); hasta obtener la respuesta deseada (Dueñas, 1999; Poisindex Mushrooms-Monomethyhydrazine, 2004; Gisbert, 1998; Ellenhorn, 1997; Goldfrank, 1998).

Hongos orelina/orelanina

Los pacientes generalmente no se vuelven sintomáticos hasta varias horas después de la exposición, siendo limitada la utilidad de la descontaminación gastrointestinal.

Administrar carbón activado solo si el paciente se presenta tras unas pocas horas después de la ingestión en dosis de 50-100 g en adultos y 25-50 g en niños. Para las convulsiones administrar diazepam en bolo i.v. (adultos 5-10 mg inicialmente que pueden ser repetida tras 10-15 minutos según necesidad. Niños 0,2-0,5 mg/kg, repetir cada 5 minutos si es necesario) o lorazepam (adultos 2-4 mg; niños 0,05-0,1 mg/kg). Si las convulsiones no se resuelven, administrar fenobarbital.

Se debe monitorizar si hay riesgo de hipotensión, disrritmias o depresión respiratoria, y evaluar la presencia de hipoglucemia, alteraciones electrolíticas e hipoxia.

Terapias experimentales

— Ciclofosfamida: al usarse en forma concomitante con *C. orellanoides*, la ciclofosfamida evita la inflamación renal en ratas. No existe evidencia de que ocurra lo mismo en humanos. (Poisindex Mushrooms-Orellanine/orelline, 2004).

— Corticosteroides y terapia antioxidante: una paciente que presentó fallo renal agudo tras una intoxicación con *Cortinarius orellanus* fue tratada

con hemodiálisis, y 60 mg de prednisolona en conjunto con N-acetilcisteína. La paciente se recuperó y requirió diálisis hasta el día 17. (Poisindex Mushrooms-Orellanine/orelline, 2004).

En este tipo de intoxicación se produce una nefritis intersticial. Los corticosteroides son usados frecuentemente para otras formas de nefritis intersticial. Pese a que se ha descrito éxito con el uso de corticoides, aún se requiere más investigación, ya que existen autores que afirman que estos medicamentos no producen beneficios.

— Aumento de la eliminación: algunos autores recomiendan la hemoperfusión hasta una semana tras la ingestión. Sin embargo, otros autores sugieren que el procedimiento de hemodiálisis o hemoperfusión se efectúe lo más pronto posible para prevenir la insuficiencia renal irreversible. No hay estudios controlados que evalúen su eficacia, por lo tanto no se recomienda su uso de forma rutinaria. No se recomienda forzar la diuresis porque puede aumentar el daño renal. La peritoneodiálisis ha sido utilizada con éxito, pero se prefiere como tratamiento la hemodiálisis o hemoperfusión (Dueñas, 1999; Poisindex Mushrooms-Orellanine/orelline, 2004; Gisbert, 1998; Ellenhorn, 1997; Goldfrank, 1998).

1.4. Hongos muscarínicos

Administrar carbón activado en dosis de 50-100 g en adultos, 25-50 g en niños (1-12 años) y de 1 g/kg en niños menores de 1 año.

Se debe administrar atropina si existen síntomas colinérgicos que provoquen riesgo vital. La dosis de prueba estándar es de 1-2 mg i.v. en adultos y de 0,02 mg/kg en niños. Los pacientes intoxicados no muestran signos de atropinismo, debiéndose continuar la administración de atropina hasta que se produzca el cese de las secreciones (Dueñas, 1999; Poisindex Mushrooms-Muscarine/histamine, 2004; Gisbert, 1998; Ellenhorn, 1997; Goldfrank, 1998).

1.5. Hongos coprine

Corrección de fluidos y anomalías electrolíticas. En los casos severos se pueden requerir medidas sintomáticas y de sostén.

Evitar productos que contienen alcohol, tales como elixires, tinturas y extractos.

El fomepizol i.v. (4-metilpirazol) (5 mg/kg infundidos en una solución buffer en 2 a 3 minutos) se ha mostrado eficaz en el control de la reacción disulfiram-alcohol. Esto no ha sido aprobado en los Estados Unidos para dicho uso.

Hipotensión: infundir 10-20 mL/kg de fluido isotónico. Si la hipotensión persiste, administrar norepinefrina (0,1-0,2 mcg/kg/min); administrar hasta obtener la respuesta deseada (Dueñas, 1999; Poisindex Mushrooms-Coprine, 2004; Gisbert, 1998; Ellenhorn, 1997; Goldfrank, 1998).

Hongos-muscínol/ácido iboténico

Administrar carbón activado en dosis de 50-100 g en adultos y 25-50 g en niños. Los pacientes con depresión del sistema nervioso central pueden requerir intubación y ventilación mecánica (Dueñas, 1999; Poisindex Mushrooms-Muscimol/ibotenic acid, 2004; Gisbert, 1998; Ellenhorn, 1997; Goldfrank, 1998).

Hongos alucinógenos

Administrar carbón activo en dosis de 50-100 g en adultos y 25-50 g en niños. Para las convulsiones administrar diazepam en un bolo i.v. (adultos 5-10 mg inicialmente que puede ser repetida tras 15 minutos según necesidad. Niños 0,25-0,4 mg/kg hasta 10 mg/dosis) o lorazepam en bolo i.v. (adultos 4-8 mg; niños 0,05-0,1 mg/kg). Si las convulsiones no se resuelven, administrar fenobarbital.

Ansiedad y agitación: tranquilizar al paciente hablándole en un cuarto tranquilo con luz tenue es la terapia de primera línea. La administración de diazepam 5-10 mg v.o. ó 2-5 mg i.v. en adultos (0,05-0,1 mg/kg) y 0,1-0,2 mg/kg en niños es una manera eficaz de sedar.

Hipertermia: en los niños se puede tratar con paños de agua tibia o administrando paracetamol. Monitorizar por riesgo de hipotensión, disrritmias, o depresión respiratoria. Evaluar la presencia de hipoglucemia, alteraciones electrolíticas e

hipoxia (Dueñas, 1999; Poisindex Mushrooms-Hallucinogenic, 2004; Gisbert, 1998; Ellenhorn, 1997; Goldfrank, 1998).

Hongos chlorophyllum

Considerar la realización de lavado gástrico si existe riesgo vital (idealmente antes de 1 hora) con protección de la vía aérea por el riesgo de convulsiones. Administrar carbón activado en dosis de 50-100 g en adultos y 25-50 g en niños. Los catárticos no se indican debido a la presencia de diarrea como efecto gastrointestinal, de comienzo rápido. Los medicamentos antiespasmódicos no están indicados. Se pueden requerir medicamentos vasopresores si el paciente presenta shock hipovolémico. Se debe mantener un adecuado balance electrolítico, especialmente en los niños, adultos mayores y pacientes debilitados. También pueden ser requeridos fluidos endovenosos. Raramente se indican anti-convulsivantes como el diazepam para el manejo de las convulsiones (Dueñas, 1999; Poisindex Mushrooms-Chlorophyllum, 2004; Gisbert, 1998; Ellenhorn, 1997; Goldfrank, 1998).

Bibliografía

- Alexis J, Carlson AG (2002). Intoxicación Alimentaria. En: Ling LJ, Clark RF, Ericson TB, Trestail JH (eds.). *Secretos de la toxicología*. McGraw-Hill Interamericana. México. 249-253.
- Anderson IB, Lee ML, Erickson T (2002). Botulismo. En: Ling LJ, Clark RF, Ericson TB, Trestail JH (eds.). *Secretos de la toxicología*. McGraw-Hill Interamericana. México. 254-259.
- Cameán A, Repetto M (2002). Sustancias tóxicas naturales en alimentos En: Cameán A, Gago A, García M.^a, Morales M.^o, Morales M.^a, Moreno I et al. (eds.). *Toxicología de los alimentos*. Toxicología de postgrado. Curso Internacional de Postgrado a Distancia. cd-rom. Universidad de Sevilla.
- Cameán AM, Repetto M (1995). Estado actual de la toxicología alimentaria. En: Repetto M (ed.). *Toxicología avanzada*. Ediciones Díaz de Santos, S. A. Madrid. 205-292.
- Dueñas A (1999). *Intoxicaciones agudas en medicina de urgencia y cuidados críticos*. Masson, S. A. Barcelona, pp. 432.
- Editorial Staff (2004). Food Poisoning-*Bacillus Cereus* (Management/Treatment Protocol). En: Klasco RK (ed.). POISINDEX® System. Thomson MICROMEDEX, Greenwood Village, Colorado (vol. 121).
- Editorial Staff (2004). Food Poisoning-Botulism (Management/Treatment Protocol). En: Klasco RK (ed.). POISINDEX® System. Thomson MICROMEDEX, Greenwood Village, Colorado (vol. 121).
- Editorial Staff (2004). Food Poisoning-*Clostridium perfringens* (Management/Treatment Protocol). En: Klasco RK (ed.). POISINDEX® System. Thomson MICROMEDEX, Greenwood Village, Colorado (vol. 121).
- Editorial Staff (2004). Food Poisoning-Listeria (Management/Treatment Protocol). En: Klasco RK (ed.). POISINDEX® System. Thomson MICROMEDEX, Greenwood Village, Colorado (vol. 121).
- Editorial Staff (2004). Food Poisoning-Salmonella (Management/Treatment Protocol). En: Klasco RK (ed.). POISINDEX® System. Thomson MICROMEDEX, Greenwood Village, Colorado (vol. 121).
- Editorial Staff (2004). Food Poisoning-Shigella (Management/Treatment Protocol). En: Klasco RK (ed.). POISINDEX® System. Thomson MICROMEDEX, Greenwood Village, Colorado (vol. 121).
- Editorial Staff (2004). Food Poisoning-*Staphylococcus* (Management/Treatment Protocol). En: Klasco RK (ed.). POISINDEX® System. Thomson MICROMEDEX, Greenwood Village, Colorado (vol. 121).
- Editorial Staff (2004). Food Poisoning-*Streptococcus* (Management/Treatment Protocol). En: Klasco RK (ed.). POISINDEX® System. Thomson MICROMEDEX, Greenwood Village, Colorado (vol. 121).
- Editorial Staff (2004). Food Poisoning-Unknown (Management/Treatment Protocol). En: Klasco RK (ed.). POISINDEX® System. Thomson MICROMEDEX, Greenwood Village, Colorado (vol. 121).
- Editorial Staff (2004). Mushrooms-Chlorophyllum (Management/Treatment Protocol). En: Klasco RK (ed.). POISINDEX® System. Thomson MICROMEDEX, Greenwood Village, Colorado (vol. 121).

- Editorial Staff (2004). Mushrooms-Coprine (Management/Treatment Protocol). En: Klasco RK (ed.). POISINDEX[®] System. Thomson MICROMEDEX, Greenwood Village, Colorado (vol. 121).
- Editorial Staff (2004). Mushrooms-Cyclopeptides (Management/Treatment Protocol). En: Klasco RK (ed.). POISINDEX[®] System. Thomson MICROMEDEX, Greenwood Village, Colorado (vol. 121).
- Editorial Staff (2004). Mushrooms-Hallucinogenic (Management/Treatment Protocol). En: Klasco RK (ed.). POISINDEX[®] System. Thomson MICROMEDEX, Greenwood Village, Colorado (vol. 121).
- Editorial Staff (2004). Mushrooms-Monomethylhydrazine (Management/Treatment Protocol). En: Klasco RK (ed.). POISINDEX[®] System. Thomson MICROMEDEX, Greenwood Village, Colorado (vol. 121).
- Editorial Staff (2004). Mushrooms-Muscarine/histamine (Management/Treatment Protocol). En: Klasco RK (ed.). POISINDEX[®] System. Thomson MICROMEDEX, Greenwood Village, Colorado (vol. 121).
- Editorial Staff (2004). Mushrooms-Muscimol/ibotenic acid (Management/Treatment Protocol). En: Klasco RK (ed.). POISINDEX[®] System. Thomson MICROMEDEX, Greenwood Village, Colorado (vol. 121).
- Editorial Staff (2004). Mushrooms-Orellanine/orellanine (Management/Treatment Protocol). En: Klasco RK (ed.). POISINDEX[®] System. Thomson MICROMEDEX, Greenwood Village, Colorado (vol. 121).
- Ellenhorn MJ (1997). *Ellenhorn's Medical Toxicology*. Williams & Wilkins. Baltimore, pp. 2047.
- Gago A (2002). Biotoxinas Marinas. En: Cameán A, Gago A, García M.^a, Morales M.^o, Morales M.^a, Moreno I, Olea F *et al.* (eds.). *Toxicología de los alimentos*. Toxicología de postgrado. Curso internacional de postgrado a distancia. cd-rom. Universidad de Sevilla.
- Gisbert JA (1998). Intoxicaciones por hongos. En: Gisbert Calabuig JA (ed.). *Medicina legal y Toxicología*. Masson. Barcelona, 883-891.
- Gisbert JA, Castellano M (1998). Intoxicación por alimentos. En: Gisbert Calabuig JA (ed.). *Medicina legal y toxicología*. Masson. Barcelona, 871-882.
- Goldfrank LR (1998). Mushrooms: Toxic and Hallucinogenic. En: Goldfrank LR. *et al.* (eds.). *Toxicologic emergencies*. Appleton & Lange. New York, 1207-1219.
- Goldfrank LR, *et al.* (eds.). *Goldfrank's toxicologic emergencies*. Appleton & Lange. New York, 1177-1187.
- Kim S (1994). Food Poisoning: Bacterial. En: Olson KR (eds.). *Poisoning and drug overdose*, Appleton & Lange. New York, 170-171.
- Kim S (1994). Food Poisoning: Fish and Shellfish. En: Olson KR (ed.). *Poisoning and drug overdose*. Appleton & Lange. New York, 172-173.
- Krochmal P (1998). Marine Toxins. En: Viccellio P (ed.). *Emergency toxicology*. Lippincott-Raven. New York, 1055-1064.
- Ly BT (2002). Intoxicación con hongos. En: Ling LJ, *et al.* (eds.). *Secretos de la Toxicología*. McGraw-Hill Interamericana. México, 269-274.
- Meter G, May C, Halsey N, Marcy M, Pickering LK (1997). *Red Book. Reporte del comité de enfermedades infecciosas*. American Academy of Pediatrics. New York, pp. 809.
- Moreno I, Cameán A (2002). Contaminantes Biológicos. En: Cameán A, *et al.* (eds.). *Toxicología de los alimentos*. Toxicología de postgrado. Curso internacional de postgrado a distancia. cd-rom. Universidad de Sevilla.
- Olson KR (1994). Mushrooms, Amatoxin Type. En: Olson KR (ed.). *Poisoning and drug overdose*, Appleton & Lange. New York, 225-226.
- Olson KR (1994). Mushrooms. En: Olson KR (ed.). *Poisoning and drug overdose*. Appleton & Lange. New York, 223-225.
- Paris E, Ríos JC (2001). *Intoxicaciones: epidemiología, clínica y tratamiento*. Ediciones Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile, pp 302.
- Repetto M (1997). *Toxicología Fundamental*. Ediciones Díaz de Santos, S. A. Madrid, pp 405.
- Shih RD (1998). Mushroom poisoning. En: Viccellio P (ed.). *Emergency toxicology*, Lippincott-Raven. New York, 1081-1086.
- Tunik MG, Goldfrank LR (1998). Food Poisoning. En: Goldfrank LR, *et al.* Hoffman RS (eds.). *Goldfrank's toxicologic emergencies*. Appleton & Lange. New York, 1159-1176.
- VanDevander PL (1998). Foodborne toxins. En: Viccellio P (ed.). *Emergency toxicology*. Lippincott-Raven. New York, 997-1006.
- Woo OF (1994). Botulism. En: Olson KR (ed.). *Poisoning and drug overdose*. Appleton & Lange. New York, 107-108.

Índice analítico

- Absorción
 - cutánea, 104
 - de tóxicos, 19
- Aceites, 517, 658
 - de frituras, 281
 - de oliva, 606
 - de ricino, 523
 - de sassafras, 600
 - y grasas, 519
 - y grasas calentadas, 281
- Acero, 439
- Acesulfamo, 480
- Ácido(s),
 - akadaico, 145, 146
 - anilidas de, 534
 - arsénico, 337
 - ascórbico, 471, 550
 - benzoico, 472
 - cianhídrico, 193
 - dimetilarsínico, 334
 - djencólico, 199
 - domoico, 154, 155, 156
 - erúcico, 523
 - fítico, 246
 - fusárico, 297
 - gálico, 245
 - grasos, 517, 518
 - anilidas de, 534
 - esenciales, 521
 - insaturados, 526
 - saturados, 521, 522
 - trans, 531, 532
 - lácticos, 472
 - lisérgico, 302
 - momometilarsónico, 334
 - okadaico, 180
 - orgánicos, 472
 - oxálico, 242
 - sulfuroso, 472
- Acónito, 213
- Acreditación de la calidad, 284
- Acrilonitrilo, 448
- Acroleína, 505, 531
- Actividad estrogénica, 299
- AD, 154, 156
- Adenilato ciclasa, 257, 262, 264
- Aditivos, 394, 603
 - alimentarios, 12, 453, 454, 458, 646, 653
 - autorizados, 458
 - E, 456
 - exposición a, 127
 - factor de seguridad, 456
 - listas positivas, 454
 - margen de seguridad, 456
 - listado de los, 653
 - zootécnicos, 394
- ADN, 575, 634
- Adriatoxina, 151
- Aductos, 502
- Aflatoxinas, 290, 292, 432, 534, 601
- Agaritina, 244
- Agencia Española de Seguridad Alimentaria, 649
- Agentes bacterianos, 261
- Agentes de guerra, 298
- Agua,
 - contaminada, 136
 - criterios de calidad, 135
 - potable, 136, 270
 - radiólisis del, 63
- Aguacate, 204
- Ahumados, 599
 - alimentos, 496
- Ajo, 503, 557
- Alcaloides, 301
 - de pirrolizidina, 201, 212
- Alcánfor, 206
- Alcohol, 599
- Alergenicidad, 104, 573
- Alergenos,
 - alimentarios, 576, 586
 - de origen marino, 588

- de origen vegetal, 588
- Alergia(s), 401, 583
 - a setas, 234
 - alimentarias, 15, 108, 109, 581, 582, 657
 - medicamentosa, 402
 - nuevas, 587
 - reacciones mediadas por IgE, 573
- Algas, 568, 570
 - cianofíceas, 169
 - verdes azuladas, 142, 169, 176
- Algodón, 523, 524
- Algunos alcaloides psicoactivos, 205
- Alimentación animal, 654
- Alimento(s)
 - ahumados, 496, 599
 - cocinado de, 405
 - contaminantes, 646, 656, 658
 - etiquetado de los, 577
 - fritura de, 531
 - genéticamente modificados, 109
 - hipersensibilidad a, 582
 - inocuo, 571
 - irradiación de, 35
 - irradiados, 445, 626, 630, 636, 637, 638
 - detección, 639
 - lavado de manos, 274
 - manipuladores de, 274
 - marinos, 4
 - nuevos, 567, 658
 - equivalencia sustancial, 571
 - prácticas correctas de higiene, 274
 - preparación higiénica de los, 269
 - radiactividad en los, 630, 637
 - salados, 599
 - salubridad de los, 273
 - transgénicos, 14, 569, 658
 - vegetales, 191
- Alitamo, 482
- Almejas, 141
- Almidón, bloqueadores de, 240
- Alquilmercurios, 339
- Alta presión, 446
- Alteraciones hormonales, 384
 - inmunotóxicas, 108
- Alubias, 193
- Alucinógenos, 302
- Aluminio, 30, 64, 439
- Amanitinas, 227, 228
- Amaranto, 468
- Amarillo anaranjado, colorante, 468
- Amatoxinas, 228, 231, 670
- Amigdalina, 45, 194
- Amilasas, inhibidores de, 240
- Aminas
 - aromáticas, 500
 - heterocíclicas, 499
 - vasoactivas, 203
 - vasopresoras, 49, 203
- Amotoxinas, 227
- Anabolizantes, 400, 409
- Análisis de peligros y puntos críticos del control, 276, 277
- Anátidas, 427
- Anatoxina, 172
- Anilidas de ácidos grasos, 534
- Animales de compañía, 270
- Animales transgénicos, 117, 569
- Anís, 600
 - estrellado, 206
- Annato, 466
- Antibióticos, 151, 401, 404, 407, 410, 473, 663, 664
- Antibiotina, 244
- Anticancerígenos, 247
- Anticarcinógeno, 196
- Anticonceptivos, 557
- Anticonvulsionantes, 666
- Antigenicidad, 108
- Antihormonas, 400
- Antiinfecciosos, 407
- Antiinflamatorios, 408
- Antimetabolitos, 199
- Antimicrobianos, 404
- Antiminerales, 240
- Antinutrientes, 237
 - polivalentes, 245
- Antioxidantes, 207, 449
 - de grasas, 603
- Antiparasitarios, 407
- Antipiridoxina, 244
- Antiprotozoarios, 408
- Antitiamina, 243
- Antitiroideos, 560
- Antitoxina botulínica, 664
- Antivitaminas, 283, 243, 245
- Antocianidinas, 206
- Antocianinas, 466
- Apio, 204

- APPCC (Análisis de peligros y puntos críticos de control), 276, 283
 Árbol de decisión, 278
 Aromatizantes, 458
 Arroz, 258
 hervido, 258
 Arsénico, 30, 65, 313, 334, 605
 inorgánico, 314, 316, 317
 orgánico, 315, 316
 Arsenito, 335, 337
 Arsenoazúcares, 336
 Arsenobetaina, 336
 Arteriosclerosis, 521
 Artoenoides, 599
 Asma, 460
 ASP, 154
 Aspartamo, 459, 481
Aspergillus, 291, 292, 295, 303
 Atropina, 213, 224
 estricnina, 213
 Atún, 344, 365
 Aves acuáticas, 426
 Avidina, 244
 Avitaminosis, 244
 Avoparcina, 404
 AZA, 161
 Azafrán, 206
 Azaspirácidos, 160, 161, 162
 Azorubina, 468
 Azoxiglucósidos, 205
 AZP, 160
 Azúcar invertido, 478
- Bacitrina, 410
 Bambú, 194 205
 Barbacoa, 496
 Barnices epoxifenólicos, 448
 Barra magnética, 361
 Bases de datos, 645, 659
 Batata, 194
 Benzoapireno, 35, 494-496, 497, 498, 534
 Beriberi, 544
 Berza, 195
 Betaagonistas, 405, 406, 409
 Betacaroteno, 465, 599
 Betaionona, 466
 Betalainas, 467
 BHA, 461
- BHT, 461
 Bifenilos,
 clorados, 10
 policlorados, 430, 604, 656, 658
 polihalogenados, 374
 Bioensayo con ratones, 144, 145, 152, 161, 162
 Bioindicadores, 98, 414
 Biotecnología, 116
 Biotina, 243
 Biotoxinas marinas, 141, 145, 153, 157
 Bisferol A, 450
 Bisferoles, 563
 Bisulfito, 472
 Bizina, 466
 Blanqueado de papel, 377
 Bloqueadores de almidón, 240
 Bocígenos, 196
 Bicio, 196, 241, 560
 Bociógenos, 560
 Bonito ahumado, 603
 Botulismo, 252, 662, 664
 alimentario, 255
 Bradicardia, 667
 Brócoli, 195
 Brote alimentario, 251
 BUCATOX, 652
 Buenas prácticas,
 agrícolas, 283
 de manufactura, 283
 Bufotenina, 225
 Búsqueda de información en toxicología, 645
 Butilhidroxianisol, 449
 Butilhidroxitolueno, 449, 603
- Caballa, 665
 Cacahuets, 601
 Cacao, 205
 Cadaverina, 50
 Cadena alimentaria, 283
 Cadmio, 30, 61, 317, 318, 320, 418, 420, 422, 438, 605
 Café, 204
 Cafeico, 49
 Cafeína, 204
 Calidad,
 acreditación de la calidad, 284
 concepto de, 282
 total, 282, 283
 Calor, resistencia al, 262

- Campylobacter, 268
 Cáncer, 203, 242, 384, 385, 403, 497, 509, 593, 614
 de hueso, 614
 de tiroides, 614, 615
 esofágico, 300
 factor dependiente, 91
 riesgo de, 91
 y nutrientes, 596
 Cancerígenos, 13
 Canela, 206
 Cañerías de plástico, 450
 Cangrejos, 156
 Cantaxantina, 466, 530
 Capacidad,
 corrosiva, 107
 fototóxica, 108
 Caramelo, 466
 Carbón activado, 662, 666, 669, 671
 Carcinogenicidad, 117
 Carcinogenesis, 44, 180
 química, 594
 Carcinogenicidad, 384, 657
 Carcinógenos, 13
 epigenéticos, 117
 no genotóxicos, 118
 Carnes,
 asadas, 602
 de caza, 413, 423, 602
 de cría, 416
 silvestre, 416
 Carotenoides, 466, 530, 599
 Cáscara sagrada, 216
 Cauchos sintéticos, 440
 Caza,
 ilegal, 415
 mayor, 415
 menor, 415
 silvestre, 415
 Cebos envenados, 431
 Cerámica, 438
 Ceras, 519
 Cereales, 497
 Certificación de la calidad, 283
 Cerveza, 337, 510
 Cesio, 610, 612, 614
 Chaconina, 199
 Chalconas, 206
 Chérbobil, 610
 Cianobacterias, 142, 169, 172, 174, 176
 Cianogénesis, 194
 Cianotoxinas, 170, 176, 178
 Cianuro, 242
 Cicasina, 45, 205
 Ciclamato(s), 47, 459, 479, 603
 Ciclohexilamina, 480, 603
 Ciervo, 420
 Cigarrillos, 317
 Ciguatera, 664
 Ciguatoxinas, 103
 Cilindrospermopsinas, 171
 Cinética, modelos predictivos de, 104
 Clasificación y etiquetado, 124, 133
 Claviceps purpúrea, 301
 Clombuterol, 401
 Cloracné, 381
 Clorafenicol, 401, 410
 Clorofilas, 467, 530
 Clorogénico, 47
 Clorpromazina, 403, 410
 Cloruro,
 de polivinilo, 48, 449
 de vinilideno, 448
 de vinilo, 448
Clostridium,
 botulinum, 460
 perfringens, 267
 Clucosinolatos, 196
 Coccidiostáticos, 401
 Cochinilla, 467
 Cocinado se alimentos, 405, 445, 631
 Col, 195
 Colchicina, 410
 Cólera, 664
 Coles de Bruselas, 195
 Colesterol LDL, 520, 532
 Cólico, 51
 Coliflor, 195
 Colitis hemorrágica, 265
 Colorantes, 458, 460, 463, 464, 465, 603
 azoicos,
 amaranto, 468
 amarillo anaranjado, 468
 azafrán, 468
 azorubina, 468
 negro brillante, 469
 rojo cochinilla, 469
 indigoides,
 indigotina, 469

- inocuo, 465
- inorgánicos, 470
- lista positiva, 465
- quinoleínicos
 - amarillo de quinoleínas, 469
- toxicidad de los, 470
- triferil metánicos, 469
 - azul brillante, 469
 - azul patentado, 469
 - verde ácido brillante, 469
 - verde lisamina, 469
- xanténicos
 - eritrosina, 469
- Colza, 523
 - transgénica, 569
- Comité Científico para la Alimentación, 455
- Comité Conjunto de Expertos en Aditivos, 456
- Compuestos,
 - bociogénicos, 241
 - clorados, 426, 427
 - orgánicos, 426
 - clorados, 415
 - organoclorados, 428
 - organometálicos, 328, 330
 - radioquímicos, 630
 - tireostáticos, 400
- Concepto de calidad, 282
- Contaminación fecal, 266
- Contaminantes, 417, 470, 471
 - ambientales, 128, 129
 - biológicos, 6
 - en alimentos, 646, 656
 - en tejidos, 415
 - exposición a, 127, 128
 - orgánicos, 427
 - persistentes, 427
 - químicos, 8
- Controles de vigilancia, 280
- Coprina, 225
- Cornezuelo de centeno, 290, 301
- Cortinarinas, 227
- Coste médico, 273
- Crecimiento, promotores del, 400, 401, 403
- Criptorquidismo, 556
- Criterio de vigilancia, 280
- Cromo, 338, 605
- Crucíferas, 241, 242
- Cumestrol, 559
- Curcuma, 467
- Curry, 467
- Cycasina, 600
- Dapsona, 410
- Dátil, 557
- DDA, 89
- DDE, 427, 430
- DDT, 427, 604
 - de la granja a la mesa*, 647
- Declaración de Helsinki, 119
- Delirio atropínico, 224
- Dermotoxinas, 298
- Deshalogenación, 52
- Desinfección, 625, 634
- Desmetilación, 52
- di(2-etilhexil) ftalato, 449
- di(2-etilhexil) adipato, 449
- Diabetes mellitus, 521, 522
- Diagrama de flujo, 277
- Diarreas del viajero, 266, 268
- Diatomeas, 154
- Dibenzofuranos, 10, 374
- Dibutiril ftalato, 449
- Dieldrin, 430
- Dietas hipoproteicas, 267
- Dietilestilbestrol, 403, 555, 606
- Difenil cresil fosfato, 449
- Dihidrochalcona, 483
- Dimetilhidrazina, 46
- Dinoflagelados, 141, 142, 149, 157, 159
- Dinophysistoxina, 146
- Diosorina, 204
- Dióxido de cloro, 446
- Dioxinas, 10, 374, 376, 377, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 418, 426, 431, 438, 554, 605, 656, 658
 - métodos alternativos para la determinación de, 388
 - niveles de fondo, 385
- Disentería, 664
 - bacilar, 266
- Disolvente, 450
- Dispersión de matriz en fase sólida, 360
- Disruptores,
 - endocrinos, 14, 103, 342, 422
 - hormonales, 113, 553
 - estrógenos, 553
 - fitoestrógenos, 553
 - progestágenos, 553
 - testosterona, 553

- Disulfiram, efecto del, 225
Dosimetría, 628
Dosis,
 de referencia aguda, 398
 equivalente, 610
 sin efecto adverso observado, (NOAEL), 133
DSP, 145, 146
DTX, 145, 146
Durrina, 194
- E. coli*, 264
Edulcorantes, 458, 475, 476
 poder, 476
Efecto del disulfiram, 225
Efectos estrogénicos, 298
Eicosanoides, 521
Elastómeros, 440
Electroforesis capilar, 365
Embalaje, 437, 440, 445, 448
Embriotoxicidad, 113
Empaquetado, 440, 658
Endocitosis, 24
Eneldo, 204
Enfermedad(es)
 cardiovascular, 521
 celíaca, 586
 diarreicas, 273
Empaquetado, 656
Ensayos de migración, 443
Enteritis,
 necrosante, 443
 salmonelósica, 260
 salmonelosis, 260
Enterocitos, 22
Enteropatía por gluten, 586
Enterotoxinas, 252, 256, 257, 262, 263, 265, 267
Envasado, 604
Envases, 445, 439, 441, 562
 de hojalata, 562
Epitelio intestinal, 22
Epitopos conformacionales, 587
Epoxiresinas, 563
Equivalencia,
 sustancial, 571, 572
 tóxica
 cantidad de, 375
 factor de, 375
- Ergotamina, 302, 303
Ergotismo, 303
Escatol, 51
Escombroidosis, 665
Escopolamina, 213
Escorbuto, 550, 552
Escualeno, 520
Espárragos, 253
Especiación, 327
 análisis por, 328
Especie(s),
 arsenicales, 334, 335
 cinéticas, 414, 424
 química, 8
 reactivas, 631
 redox, 331
Espinacas, 253, 508, 510
Espiramicina, 410
Espirolidas, 157, 158
Estaño, 30, 332, 341, 439
Esterigmatocistina, 303
Esterilización, 445, 625
Esteroles, 520
Esteviósido, 484, 570
Estimación de la exposición en humanos, 131
Estireno, 449
Estómago, 23
Estragol, 206
Estrogenicidad, 555, 561
Estrógenos, 201, 298, 553, 606
Estroncio, 613, 614
Estudios de toxicocinética, 103
Estudios Multicéntrico de Citotoxicidad, 106
Estudios toxicológicos, 572
Etilentiourea, 604
Etiqueta, 629
Etiquetado, 133, 589, 647
 de los alimentos, 577
 peligrosidad, 133
Evaluación de riesgos, 95, 123, 124
Evaluar,
 la exposición, 124
 los efectos, 124
Exceso de peso, 599
Exocitosis, 24
Exotoxinas, 266
Exposición,
 a aditivos, 127
 a contaminantes, 127
 a residuos, 357

- Extracción,
 - de residuos, 357
 - en fase sólida, 359
- Factor,
 - dependiente de cáncer, 91
 - de equivalencia tóxica, 375
 - de seguridad, 456
- Faloidina, 228
- Falolisina, 228
- Falosinas, 227
- Falotoxinas, 228
- Favismo, 197
- Fenilbutazona, 410
- Fermentación fúngica, 291
- Fetotóxico, 383
- Fibra, 522
 - dietética, 597
- Ficotoxinas, 154
- Fiebres tifoideas, 260
- Fitoesteroles, 530, 573, 577
- Fitoestrógenos, 201, 202, 553, 557, 559
- Fitohemoaglutininas, 193, 245
- Fitoplancton, 158
- Flavonoides, 206
- Flavor, 499, 528
 - rancio, 527
- Flora intestinal, 24
- Fluidos supercríticos, 361
- Fluorouracilo, 51
- Formaldehído, 448
- Fosfolípidos, 521
- Frijoles, 194
- Fritura de alimentos, 531
- Fructosa, 478
- Ftalatos, 438, 449, 563, 564
- Fumonisininas, 290, 299
- Fusarium, 291, 295, 300

- Galatos, 603
- Gálico, 47
- Gangrena gaseosa, 267
- Gastroenteritis, 663
- Genes *van*, 404
- Genoma, 134
- Genotoxicidad, 115, 638
- Genotóxicos, 403

- Gestión del riesgo, 125
- Ginkgo, 215
- Ginseng, 214
- Giromitrina, 226, 244, 670
- Glicirricina, 213, 483
- Glicirrízico, 47
- Glucoalcaloides, 199
- Glucosa, 478
- Glucósidos cianogénicos, 193, 242
- Glucosinolatos, 195, 241
- Glutamato, 460
- Gluten enteropatía por, 586
- Gosipol, 247, 524
- GRAS, sustancias, 457, 459, 463, 464, 653
- Grasas, 517, 596, 658
 - de fritura, 533
 - saturadas, 519
 - sustitutos de las, 569, 573
- Grupos de población especiales, 573
- Guanilato ciclasa, 264
- Gymnodiminas, 159

- Habas, 197
- Hamburguesa, 501
- HAP, 494
- HCB, 427, 430
- Helecho, 600
- Hemaglutinina, 245
- Hemólisis, 226
 - inmunitaria, 226
- Herbicida, 568
- Hesperidina, 45
- Hidracinas, 226
- Hidratos de carbono, irradiación, 631
- Hidrazina, 244
- Hidrocarburos aromáticos policíclicos, 494, 603
- Hydrogenación, 531
- Hidroperóxidos, 527
 - lipídicos, 632
- Hidroxianisol, 461
- Hidroxitolueno, 461
- Hierba de San Juan, 215
- Hierro, 439, 598
- Higiene,
 - alimentaria, 263, 269
 - de los alimentos, 274
 - preparación, 269
 - personal, 274

- Hiosciamina, 213
Hipericum, 215
 Hipersensibilidad a alimentos, 582
 Hipertensión, 52, 204, 522
 Hipotensión, 667
 Hojalata, 438, 562
 Homoanatoxina, 172
 Hongos, 289, 420
 alucinógenos, 671
 muscarínicos, 671
 orelina, 670
 terapias experimentales, 670
 Hormona(s), 403, 406, 409, 605
 del crecimiento, 400
 esteroides, 400, 403
 ováricas, 384
 prohibidas, 405
 tiroideas, 196, 400
 Horno microondas, 262, 504, 507, 510
 Huevos, 262, 269
 Humedales, 424
- Ictiosarcotoxicosis, 665
 IDA, 89, 127, 134, 135, 455
 Identificar la peligrosidad, 124
 IgE, reacciones mediadas por, 573
 Imidazoquinolinas, 500
 Imposex, 342
 Incineración de residuos, 376
 Indicadores de toxicidad, 97, 98
 Información toxicológica, 644
 en español, 648
 Infusiones exóticas, 201
 Ingesta diaria admisible, 125, 134, 455
 tolerable, 90
 máxima diaria tolerable, 90
 semanal tolerable, 90
 total, 126
 peor de los casos razonables, 127
 Ingredientes alimentarios, 568
 Inhibidores,
 de amilasas, 240
 de proteasas, 239
 enzimáticos, 238
 Inmunoquímica, métodos, 366
 Inmunoterapia, 588
 Inmunotoxicidad, 109
 Inositol, 246
- Insecticidas, 403
 Instalaciones radiactivas, 627
 medidas de higiene, 627
 Internet,
 búsquedas en, 650
 información en español, 648
 páginas de, 647
 Intestino delgado, 23
 Intolerancia,
 alimentaria, 109
 a setas, 234
 Intoxicación(es),
 alimentaria(s), 273, 661, 662
 antibióticos, 663
 anticolulsiones, 666
 bradicardia, 667
 convulsiones, 666
 fallo respiratorio, 666
 gastroenteritis, 663
 lavado gástrico, 662
 manejo clínico, 666
 terapia de soporte, 666
 tratamiento sintomático, 662
 amnésica, 154, 664
 B. Cereus, 258
 de origen bacteriano, 252
 diarreica, 145, 665
 estafilocócica, 256, 257
 neurológica, 665
 paralizante por moluscos, 665
 por hongos, 667
 terapias alimentarias, 669
 por setas, 221, 232
 síndrome(s),
 alucinógeno, 222, 224
 cardiovascular, 222, 225
 faloideo, 227, 228
 gastrointestinal, 222
 giromitriano, 227
 hemolítico, 222, 225
 muscarínico, 223
 neurológico, 223
 orellaniano, 227
- Iodo, 614
 Irradiación,
 de alimentos, 623
 resistencia, 634
 Islanditoxina, 601
 Isoflavonas, 201, 206, 557, 559

- Isomaltitol, 488
- Isotiocianatos, 241
- Isótopos radiactivos, 609

- Jabalí, 420
- JECFA, 455, 458
- Jenjibre, 206

- Kiwi, 582, 587

- Lactancia materna, 589
- Lactitol, 488
- Latas barnizadas, 439
- Latirismo, 198
- Latirógenos, 198
- Lavado,
 - de manos, 274
 - gástrico, 662
- Leche de vaca, 588
 - producción de, 400
- Lechugas, 508
- Lectinas, 32, 193, 245
- Legislación,
 - Española, 659
 - Europea, 659
 - Norteamericana, 659
- Leucemia, 614
- Ley Alimentaria, 409
- Lignanós, 55
- Limarina, 194
- Límites,
 - críticos, 279
 - de migración, 447
 - de tolerancia, 578
 - máximos,
 - de residuos, 616
 - de residuos de medicamentos, 654
 - permitidos, 133
 - tolerados, 417
- Lípidos, 517
 - insaturados, 533
 - irradiados, 632, 638
- Lipofucsina, 506
- Lisados proteicos, 506
- Lisinoalanina, 507
- Lista positivas, 463

- Lluvia,
 - ácida, 615
 - amarilla, 298
 - radiactiva, 611, 612, 615
- LMR, 368, 369, 395, 396, 398, 407
- LOAEL, 87
- Loción de afeitar, 275
- LOEL, 87
- Luteosquirina, 601
- Luz ultravioleta, 445

- Madera, 438
- Maillard, reacción de, 472, 505, 506
- Maíz, 194
 - transgénico, 569, 577
- Maltitol, 490
- Mandioca, 194, 195
- Mango, 587
- Manipuladores de alimentos, 274
- Manitol, 487
- Manual de calidad, 284
- Manzana, 303
- Manzanilla, 216
- Margaritas, 532
- Margen de seguridad (MOS), 137, 138, 456
- Mariscos, 154, 156
- Material genético, 575
- Medicamentos veterinarios, 10, 394, 646
 - alergia, 401
 - anabolizantes, 400
 - efectos tóxicos directos, 400
 - hipersensibilidad, 402
 - hormonas tiroideas, 400
 - esteroides, 400
 - ingesta diaria admisible, 397
 - límites máximos de residuos, 395
 - niveles tolerables, 400
 - producción de leche, 400
 - promotores del crecimiento, 400
 - reacción alérgica, 402
 - reacciones anafilácticas, 402
 - residuos de, 395
 - inaceptables, 400
 - tiempo de espera, 397
- Mejillón(es), 141, 145, 156, 157, 160, 178, 342, 344
- Melanoidinas, 472, 505
- Menopausia, 558
- Mercurio, 30, 70, 320, 339

- Mesas de despiece, 276
 Mescalina, 204
 Metabolito secundario, 289
 Metales, 62, 415, 437, 438, 439, 530, 656, 658
 aluminio, 64
 pesados, 418, 422
 Metilhidracina, 226, 227
 Metilmercurio, 70, 320, 321, 330, 339
 Métodos,
 alternativos, 96
 in vitro, 97
 inmunoanalíticos, 590
 inmunoquímicos, 366
 Metronidazol, 410
 Michaelis-Menten, 25
 Micotoxicosis, 290, 304
 Micotoxinas, 7, 32, 202, 289, 290, 291, 303, 304,
 429, 432, 601
 Microbiota intestinal, 39
 Microcistinas, 170, 173, 179, 181
 Microextracción en fase sólida, 361
 Microondas, 405, 445
 Microorganismos, 282
 Migración, 441, 443
 límites de, 447
 Miraculina, 486
 Miristicina, 204
 Modelos predictivos de cinética, 104
 Modificación genética de plantas, 568
 Moluscos bivalvos, 141, 145, 157, 161, 342
 Monelina, 485
 Monil fenol, 563
 Monitorización de residuos, 409
 Monoliformina, 300
 Monómeros, 447
 MOS (margen de seguridad) 137, 138
 MRL, 395
 Muscarina, 222, 223
 Mutagénesis, 637
 Mutagenicidad, 115
 Mutágenos, 501, 504
- Nabo, 195
 Naranja, 204
 Naringina, 45
 Natamicina, 473
 Nefrocalcinosis, 506
 Nefropatía endémica de los Balcanes, 296
 Neurotóxicos, 161
 Neurotoxinas, 151, 252
 Niacina, 547
 Níquel, 330, 605
 Níscalos, 226
 Nisina, 474
 Nitratos, 33, 459, 473, 508, 602
 Nitritos, 33, 459, 473, 508
 Nitrocompuestos, 53
 Nitrofuranos, 403, 410
 Nitro-HAP, 499
 Nitrosamidas, 509, 511
 Nitrosaminas, 33, 50, 54, 450, 459, 460, 506, 509,
 510, 512, 601, 602
 Niveles,
 de exposición, 124
 de fondo, 385
 NOAEL, 82, 87, 124, 398, 455
 (dosis sin efecto adverso observado), 133
 Nodularinas, 171
 NOEL, 82, 87
 Normas alimentarias, 646
 Normativa Europea carne de caza, 415
 Nuevas alergias, 587
 Nuevos alimentos, 15, 109, 567, 582, 658
 evaluación de los, 576
 Nuez moscada, 204, 206, 600
 Nutrientes y cáncer, 596
- OA, 151, 153
 Obesidad, 521, 522, 599
 Ocratoxina(s), 32, 290, 295
 A, 295
 Oliva, aceite de, 606
 Orellaninas, 227
 Organismos modificados genéticamente, 568
 Organoarsenicales, 335
 Organoclorados, 561
 Organoelementos, 331
 Organoestánicos, 341
 Organohalogenados, 103
 Organomercuriales, 339
 Ostras, 159
 Ovejas, 559
 Oxidación, estados de, 328
 Ozono, 445, 446
- Pan, 312
 Papa, 199

- Papaya, 587
- Papel,
 blanqueado de, 377
 reciclad, 450
 y cartón reciclado, 437, 563
- Parámetros de toxicidad, 86
- Pasiflora, 217
- Patata, 199
- Patulina, 303
- PCB, 374, 375, 381, 386, 387, 426, 430, 604
 coplanares, 375, 377, 379, 383
- PCC (punto crítico de control), 278
- PCDD, 605
- PCDD/F, 382
- PCDF, 605
- PEC, 138
- Pectenotoxinas, 145, 148
- Pelagra, 548
- Peligro, 2
- Peligrosidad, 124
 de sustancia en el etiquetado, 133
- Penicilina, 402
- Penicillium*, 295, 303
- Perdigones, 423
 de plomo, 425
- Perejil, 204
- Perfumes, 275
- Pescado,
 a la brasa, 496
 crudo, 269
- Pesticidas, 403, 534
- Pimienta negra, 204
- Pinnatoxinas, 160
- Pintura de barcos, 342
- Pirólisis, 496, 499, 503, 505
 productos de, 504
- Pirosíntesis, 494
- Pirrolidina, 510
- Pirrolizidinas, 510
- Plaguicidas, 9, 349, 403, 561, 604, 658
 autorización de, 128
 clorados, 430
 residuos de, 356, 370, 655
- Plan de residuos, 408
- Plancton, 157
- Planta superiores, 191
- Plantas,
 modificación genética de, 568
 medicinales, 211, 212
 superiores, 192
 tóxicas, 654
- Plaquicidas, 656
- Plásticos, 11, 439, 440, 443, 447, 534, 563
 cañerías de, 450
- Plastificantes, 441, 444, 449, 564
- Plátano, 204
- Plomo, 30, 72, 310, 332, 418, 420, 422, 423, 424,
 425, 426, 438
- Plumbismo de las aves acuáticas, 423
- PMTDI, 90
- PNEC, 138
- Podofilotoxinas, 212
- Poleo, 214
- Policarbonato, 563
- Polietileno, 450
- Polímeros, 439, 442
- Polimorfismos genéticos, 105
- Poliolos, 486
- Pollo, piel de, 606
- Porfiria cutánea, 381
- Principio de precaución, 124, 404
- Procedimientos *in vitro*, 96
- Productos seguros, 279
- Progestágenos, 408, 553
- Promotores del crecimiento, 403, 410
- Procentrolidas, 158
- Proteínas, 597
- Protocolos,
 de ensayo, 658
 evaluación de efectos, 112
- Pseudoalergias, 15
- Psilocibina, 224
- PSP, 141, 142
 toxinas, 143, 144
- PTWI, 90
- PTX, 145, 148
- Punto crítico de control (PCC), 278
- PVC, 448, 450
- Quercitina, 206
- Queso, 204, 303
- Quimioprotección, 304
- Quinoxalina, 403
- Rábanos, 195
- Radiación electromagnética, 624

- Radiaciones, 445
 - ionizantes, 623
- Radiactividad en los alimentos, 630
- Radiocesio, 611
- Radioisótopos, límites de incorporación anual por ingestión, 616
- Radiólisis del agua, 630
- Radionúclidos, 609, 610, 614, 617
 - en alimentos, 617
 - vida media, 613
- Rancidez, 524, 632
- Rastreabilidad, 283
- Ratones, bioensayo con, 144
- Rayos,
 - X, 623
 - Y, 623
- Reacción
 - de Maillard, 472, 505
 - histamínica, 665
- Receptor AhR, 379, 380
- Receptores eméticos, 257
- Reducción ácidos grasos, 52
- Regaliz, 47, 217
- Registro de datos, 280
- Regla del 25%, 589
- Residuos, 11
 - control de, 405, 415
 - de antibióticos, 404
 - de componentes plásticos en alimentos, 437
 - de medicamentos,
 - límites máximos, 654
 - veterinarios, 395
 - de plaguicidas, 356, 370, 655
 - exposición a, 127
 - extracción de, 357
 - incineración de, 376
 - límites máximos de, 395, 616
 - marcador, 396
 - monitorización de, 409
- Resinas, 448
 - epoxi, 448
- Resistencia,
 - a la radiación, 634
 - al calor, 262
 - cruzada, 404
- Retinol, 539
- Riboflavina, 467, 545
- Riesgo,
 - caracterización del, 133
 - de cáncer, 91
 - de efectos tóxicos, 123
 - gestión de, 133
 - por alimentos, 657
 - radiológico, 617
 - razón de caracterización de, 138
- Rodenticidas, 431
- Rubescenslisina, 222, 226
- Rutina, 45

- Sacarina, 478, 603
- Sacarosa, 477
- Safrol, 206, 600
- Salados, alimentos, 599
- Salatrin, 570
- Salazones, 599
- Salchichas, 603
- Salmón, 342
- Salmonelosis, 260
 - generalizadas, 262
 - tifoparatíficas, 260
- Salubridad de los alimentos, 273
- Santinas, 204
- Saxitoxinas, 142, 172, 666
- Seguridad alimentaria, 1, 15, 269, 393, 646
 - de la granja a la mesa*, 647
 - niveles permitidos, 646
- Seguridad microbiológica, 636
- Selenio, 72, 343, 598
- Senecios, 600
- Sésamo, 582
- Setas, 221, 611
 - alergia a, 234
 - hepatotóxicas, 228
 - intoxicaciones por, 221
 - nefotóxicas, 227
 - reacciones de intolerancia, 234
 - tóxicas, 221, 667
- Seveso, 374, 383, 385
- Sighelas, 266
- Siliconas, 440, 450
- Síndrome,
 - alucinógeno, 222, 224
 - cardiovascular, 222, 225
 - de Fanconi, 213
 - de *scratching*, 156
 - del aceite tóxico, 534
 - del restaurante chino, 550

- diarreico, 258
- emético, 258
- faloideo, 227, 228
- gastrointestinal, 222
- giromitriano, 227
- hemolítico, 222, 225
 - urémico, 265, 266
- muscarínico, 222, 223
- neurológico, 223
- orellaniano, 227
- Sinigrina, 241
- Sistema,
 - de alerta, 409
 - de calidad, 273
- Soja, 557, 558
 - resistente, 568
 - transgénica, 569
- Solanina, 45, 199
- Sorbitol, 489
- Stevia Rebandiana, 570
- Sucralosa, 482
- Sulfitos, 460, 461, 472
- Sulfonamidas, 405
- Superficies de trabajo, 276
- Susceptibilidad del huésped, 262
- Sustancias,
 - antinutritivas, 6, 237
 - carcinógenas, 136
 - carcinogénicas, 134
 - genotóxicas, 134
 - GRAS, 463
 - orgánicas, 9
 - prohibidas, 406, 409
- Sustitutos de la grasa, 573, 569

- Tabaco, 317
- Tablas de composición de alimentos europeas, 649
- Tanina, 244
- Taninos, 207, 245
- Tartrazina, 460
- Taumatinas, 485
- TCDD, 382, 383, 384
- TDI, 90
- Té, 204, 600
- Tejido-diana, 396
- Tejidos, contaminantes en, 415
- Tensioactivos, 563
- Teobromina, 204

- Terapias sustitutivas, 559
- Teratógenos, 403
- Test de Ames, 84
- Testosterona, 553
- Tetrodotoxina, 665
- Textiles, 438
- Tiamina, 544
- Tinta de impresión, 450
- Tiocarbamato, 604
- Tiocianatos, 241
- Tiourea, 603
- Tiramina, 204
- Tireostáticos, 406
- Tocoferoles, 529
- Tolerancia, límites de, 578
- Tolerancia cero, 405, 410
- Tomate, 199, 204
 - de maduración retardada, 569
- TOX, 138
- Toxicidad,
 - aguda, 106
 - de dosis repetidas, 89
 - de exposición, razón de, 138
 - de los colorantes, 470
 - indicadores de, 97, 98
- Toxicocinética, 378
- Toxicología,
 - alimentaria,
 - peligro, 2
 - riesgo, 2
 - búsqueda de información, 645
 - del desarrollo, 111
 - de la reproducción, 111
 - estudios, 572
 - información, 644
- Tóxicos,
 - derivados, 12, 13
 - naturales, 3
 - potenciales, 4
- Toxiinfección(es), 261, 262, 268, 282
 - alimentarias, 7, 251, 260, 264, 266, 267, 661, 662
- Toxinas
 - amanitinas, 227
 - amnésicas, 102, 155
 - botulínicas, 101, 254, 473
 - bufotenina, 222
 - colérica, 268
 - coprina, 222
 - cortinarinas, 227

- de cianobacterias, 102
- diarreica, 101, 145
- DSP, 147, 148
- eméticas, 259
- estafilocócicas, 282
- falosinas, 227
- falotoxinas, 227
- incrementos, 634
- lipofílicas, 154
- metilhidracina, 227
- muscarina, 222, 223
- orellaninas, 227
- panterinina, 222
- paralizantes, 102, 141
- psilocina, 222
- PSP, 143, 144
- rubescensilsina, 222
- Shiga, 266
- virotaxinas, 227
- Tranquilizantes, 408
- Trazabilidad, 282, 283
- Trébol, 557
- Tricotecenos, 290, 296, 298
- Tricresil fosfato, 449
- Triglicéridos, 517, 519
- Trimetilestano, 341
- Trimetilsclenonio, 344
- Triptófano, 51
- Trombosis, 522

- Ultrasonidos, 446
- Uranio, 614

- Valeriana, 216
- Validación, 99
- Vancomicina, 404
- Vectores, 575
- Vegetarianos, 558

- Verde malaquita, 410
- Verocitotoxina, 266
- Verotoxina, 266
- Vidrio, 438
- Vietnam, 374
- Vigilancia radiológica, 618
- Vinos, 204, 342
- Virginiamicina, 410
- Virotaxinas, 227
- Vitamina(s), 511, 521, 539
 - A, 598, 599
 - B₁, 544
 - B₂, 545
 - B₆, 548
 - C, 550, 598
 - D, 541
 - E, 542, 598
 - liposolubles, 573
 - PP, 545, 547
 - pérdidas de, 633
- VLDL, 522
- Vomitoxina, 297
- Vulcanización, 450

- Xilitol, 489

- Yessotoxinas, 145, 149, 151, 153
- Yodo, 241, 598, 606, 613, 614
 - radiactivo, 615
- YTX, 145, 151, 152, 153

- Zanahoria, 204
- Zearalenona, 202, 290
- Zeranol, 298
- Zinc, 598
- Zoonosis, 414