

EVALUACIÓN GENOTOXICOLÓGICA *IN VITRO* DE FRITURAS DE RESTAURACIÓN COLECTIVA Y DE INGREDIENTES FUNCIONALES

A. ESTADO DE LA CUESTIÓN

La alimentación es la vía más importante de exposición a compuestos químicos en la vida diaria. Aparte de los nutrientes necesarios, los alimentos contienen sustancias de origen intencionado o no intencionado.

a. Sustancias de origen intencionado

El ejemplo más conocido son los aditivos alimentarios, que pueden tener diferentes funciones tecnológicas, tales como optimizar las cualidades organolépticas o mejorar la conservación de los alimentos. La seguridad de estos compuestos químicos es evaluada de forma exhaustiva antes de su comercialización y su uso es aprobado por agencias y autoridades competentes tanto a nivel nacional como internacional.

En los últimos años, se ha producido un auge en los denominados ingredientes funcionales o bioactivos; compuestos añadidos de forma intencionada con el fin de ejercer una acción beneficiosa sobre la salud del consumidor. Al igual que los aditivos alimentarios, la legislación actual obliga a evaluar su eficacia mediante ensayos validados y normalizados. En cambio, la estrategia para la evaluación de su seguridad no está actualmente suficientemente detallada. Muy recientemente, algunas de las investigadoras que forman parte del este proyecto han publicado criterios relativos a la evaluación de la toxicidad general, la genotoxicidad y los efectos sobre el sistema endocrino de este tipo de compuestos (Gil y col., 2015). De hecho, hay evidencia científica sobre el riesgo que conlleva consumir una cantidad excesiva de sustancias antioxidantes, omega 3 e isoflavonas de soja, utilizadas como ingredientes funcionales (Petrakis y col., 1996; Dees y col., 1997; Kris-Etherton y col., 2002; Bouayed y Bohn, 2010).

b. Sustancias de origen no intencionado

Este grupo lo forman los llamados contaminantes alimentarios. En la mayoría de los casos, la exposición humana a estas sustancias es prácticamente inevitable debido a su gran ubicuidad y al hecho de que su presencia es de origen natural o aparece durante el cocinado. Algunos compuestos como, por ejemplo, la acrilamida y las aminas aromáticas heterocíclicas (AAH), pueden aparecer o aumentar su concentración durante el cocinado de los alimentos. De hecho, Layton y col. cuantificaron en 1995 la aparición de ciertas AAH al freír alimentos como hamburguesas, filetes de ternera, bacon o pescado. Ya durante esos años, numerosos estudios demostraron que la administración oral de AAH inducía la aparición de diversos tumores en ensayos *in vivo* (Matsukura y col., 1981; Wakabayashi, 1992; Brooks y col., 1994). La temperatura, el tiempo de cocinado, el método de cocción y las grasas parecen tener un papel influyente en la aparición de estos mutágenos, siendo el primer factor el más importante. La fritura es un método agresivo que eleva la temperatura rápidamente y la mantiene entre 175 y 250 °C. Además, los periodos de cocinado varían desde unos pocos minutos hasta los 20 minutos

(Pariza y col., 1979; Jägerstad y Skog, 1991). Este método transmite el calor por conducción, es decir, en contacto directo con la superficie del alimento, creando una costra mucho más representativa (5-25% p/p) que en otros como el horneado (1-2% p/p). Todas estas condiciones hacen que la fritura sea un método de cocinado con aparición de altas concentraciones de AAH.

Con respecto a las frituras, a nivel estatal, la calidad de los aceites en restauración colectiva está regulada mediante la Orden de 26 de enero de 1989 por la que se aprueba la Norma de Calidad para los Aceites y Grasas Calentados. En ella se reúnen las características higiénico-sanitarias que deben cumplir los aceites y grasas calentados: a) estar exentos de sustancias ajenas b) poseer caracteres organolépticos que no comuniquen al alimento frito olor o sabor impropio, y c) que el contenido de componentes polares sea inferior al 25% (m/m). Respecto a este último punto, los aceites son mayoritariamente triglicéridos que con el calor pueden sufrir hidrólisis, formando monoglicéridos y diglicéridos. Así como los primeros son apolares, estos últimos son polares, es decir, se disuelven en disolventes acuosos. El método que también se describe en esta Orden, permite separar ambos grupos y calcular el % en masa del aceite. Sin embargo, esta legislación no hace ninguna referencia a compuestos que se hayan podido crear durante el cocinado más allá de este deterioro del aceite por hidrólisis de triglicéridos.

A nivel europeo, la *European Food Safety Authority* (EFSA) consta de un panel de expertos (CONTAM PANEL) específicamente dedicado a la evaluación de la seguridad alimentaria de contaminantes. Además, el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos y Contaminantes Alimentarios (JECFA) y la Food and Drug Administration (FDA) realizan evaluaciones de riesgo a través de diferentes paneles de expertos. Estos se encargan de valorar si la exposición a dichos contaminantes alimentarios puede estar asociada con efectos adversos en la salud humana y establecen valores umbrales de exposición seguras, que servirán a los organismos regulatorios, como la Comisión Europea, a establecer límites máximos de dichos contaminantes en diferentes matrices alimentarias. Para este proceso, tanto para valorar la exposición humana a dicho contaminante como para caracterizar su toxicidad, el panel de expertos se basa principalmente en publicaciones científicas (EFSA, 2012a).

c. Seguridad alimentaria de contaminantes alimentarios y aditivos alimentarios

Dentro de la seguridad alimentaria, la evaluación de los posibles efectos en el ADN es fundamental; dichos efectos están relacionados con el desarrollo de tumores y de otras enfermedades. Para la evaluación del potencial genotóxico de aditivos alimentarios, la EFSA ha desarrollado una estrategia que combina varios ensayos validados de forma secuencial basándose en la estrategia S2R1 de la Conferencia Internacional sobre Armonización de los Requisitos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos (ICH, 2011; EFSA, 2012b). Esta combina un ensayo de mutaciones génicas en bacterias (test de Ames) y un ensayo de mutaciones cromosómicas (test del micronúcleo) *in vitro* y posteriormente una serie de ensayos *in vivo* (EFSA, 2012b). La importancia de los primeros reside en que, generalmente, resultados negativos son suficientes para considerar la sustancia no genotóxica, al igual que resultados positivos o ambiguos requieren de verificación *in vivo*. Este método de evaluación escalonada

viene a la par con la política de restricción de la utilización de animales de experimentación. Por ello, es fundamental que las técnicas *in vitro* permitan una evaluación de riesgo genotóxico lo más relevante posible.

Los dos test incluidos en la evaluación *in vitro* comentados anteriormente miden mutaciones, que son la consecuencia de lesiones en el ADN no reparadas o mal reparadas, pero no permiten detectar daño premutagénico, es decir, el tipo de lesiones que causa el compuesto evaluado. Además, los tiempos de tratamiento en los análisis son cortos, lo que no refleja la exposición actual a esta serie de alimentos en la sociedad. Hay que tener en cuenta que los aditivos alimentarios, y contaminantes, no suelen producir toxicidad de tipo agudo; los efectos de consumo se producen tras largos periodos de exposición.

El ensayo del cometa estándar *in vivo* se refleja en la OECD no. 489 mientras que la *in vitro* está siendo validada. La combinación de este ensayo con determinadas enzimas permite detectar lesiones premutagénicas y estudiar el mecanismo de acción de los diferentes compuestos, información indispensable para realizar una evaluación del riesgo. Por ello, la inclusión del ensayo del cometa modificado en la estrategia de la EFSA anteriormente expuesta permitiría una evaluación mucho más completa a la existente para los aditivos alimentarios.

Se ha de tener en cuenta que actualmente no existe ninguna estrategia específica para evaluar la seguridad de los ingredientes funcionales. Sin embargo, en los últimos años se han publicado muchos trabajos en los que se evalúa la genotoxicidad de este tipo de compuestos (Sabini y col., 2013, Farsi y col., 2013, Zan y col., 2013, Nunes y col., 2013, Demma y col., 2013), mostrándose en algunos casos resultados positivos (Zan y col., 2013, Demma y col., 2013). La evaluación toxicológica debería formar parte del proceso de desarrollo de ingredientes funcionales, no solo para demostrar la ausencia de efectos tóxicos tras el consumo de las dosis recomendadas sino tras el consumo de dosis superiores, algo muy común en alimentos funcionales. Hay que tener en cuenta que la exposición de la población a estos compuestos no está tan controlada como en el caso de los medicamentos; toda la población tiene acceso a ellos y muchos de los consumidores no son capaces de interpretar correctamente la información con respecto a las dosis recomendadas. Por lo tanto, al igual que con los aditivos, su seguridad debería tenerse en cuenta a la hora de su autorización.

La gran diferencia a la hora de evaluar los aditivos y los contaminantes es que los primeros necesitan una autorización previa a su salida al mercado mientras que, para los segundos, que se encuentran de forma no intencionada en los alimentos, se necesitan establecer niveles de medidas de control, en forma de límites máximos permitidos, para no poner en peligro la salud de los consumidores.

La seguridad alimentaria compete bajo el lema *from field to fork*, es decir, desde la producción alimentaria hasta el momento de su ingestión. Por ello, aun teniendo un estricto control en todas las fases en la cadena de alimentación, el último paso puede influenciar negativa e irremediabilmente todo el trabajo hecho hasta ese momento. Los compuestos tóxicos que se forman durante el cocinado de los alimentos se escapan de las medidas de control ya que su aparición va a depender de las maniobras culinarias. Este no tendría por qué ser el caso de la

restauración colectiva, donde una evaluación específica y periódica podría controlar los niveles a los que se expone a la población a estos compuestos.

Este proyecto se va a centrar en una completa evaluación *in vitro* de la genotoxicidad de los ingredientes funcionales y extractos de frituras y aceites tras el cocinado de productos cárnicos y patatas en restauración colectiva. Para ello, se partirá de la evaluación de seguridad actual de la EFSA de aditivos alimentarios, incluyendo las modificaciones indicadas en este mismo apartado.

B. HIPÓTESIS

Actualmente existe información sobre la genotoxicidad de algunos compuestos que aparecen durante el tratamiento culinario de los alimentos, sin embargo, no existen datos consistentes sobre la genotoxicidad de los alimentos después del cocinado en condiciones reales, como las utilizadas en empresas de restauración colectiva. Por otro lado, aunque existen ingredientes funcionales que se añaden de forma intencionada a los alimentos por parte de la industria alimentaria, actualmente, la legislación obliga a los productores a evaluar la eficacia de los mismos (EC No 1926/2006), mientras que la estrategia de evaluación de su seguridad no está lo suficientemente definida.

Además, la estrategia actual de evaluación de genotoxicidad no contempla ensayos específicos que permitan detectar el mecanismo de acción de los compuestos en el ADN. Esta información se podría estudiar mediante la adición del ensayo del cometa a la evaluación de seguridad actual de la EFSA de aditivos alimentarios explicada en apartado anterior.

C. DEFINICIÓN DE OBJETIVOS

El objetivo de este proyecto es evaluar la genotoxicidad *in vitro* de extractos de aceites y de alimentos cocidos en medio oleoso (carne y patatas) obtenidos en cocinas de restauración colectiva de Navarra, así como de ingredientes funcionales, mediante la aplicación de una estrategia completa en la que se contempla la detección de mutaciones (génicas y cromosómicas) y lesiones premutagénicas. El fin último es proteger a la población general de la exposición a compuestos que puedan generar problemas graves a largo plazo.

Para llevar a cabo este objetivo se han planteado los siguientes objetivos secundarios:

- Objetivo 1: Puesta a punto de la obtención de extractos de aceites y de alimentos fritos para su posterior evaluación *in vitro*.
- Objetivo 2: Selección de cocinas de restauración colectiva de Navarra para la obtención de muestras.
- Objetivo 3: Evaluación *in vitro* de la genotoxicidad de los extractos obtenidos de alimentos y aceites cocinados en cocinas de restauración colectiva.
- Objetivo 4: Selección de ingredientes funcionales a testar
- Objetivo 5: Evaluación *in vitro* de la genotoxicidad de los ingredientes funcionales seleccionados

D. BIBLIOGRAFÍA

- Bouayed y col., *Oxid. Med. Cell Longev* 2010, 3(4): 228–237.
- Brooks y col., *Cancer Res.* 1994, 54:1665-1671.
- Coecke y col., *Altern. Lab. Anim.* 2005, 33:261-287.
- Dees y col., *C, Environ. Health Perspect.* 1997, 105 Suppl 3:633-636.
- Demma y col., *Phytother. Res.* 2013, 27(4):507-514.
- EC No. 1924/2006, OJ L 404, 30.12.2001, p 9-25.
- EFSA Journal 2012a: 10: s1004.
- EFSA Journal 2012b;10(7):2760.
- Farsi y col., *Clinics (Sao Paulo)* 2013, 68(6):865-875.
- Gil y col., *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 2015, 66 (S1):13-21.
- Hartung y col., *Altern. Lab. Anim.* 2002, 30:407-414.
- ICH Publishing 2011, Guideline S2 (R1)
- Jägerstad y Skog, *Adv. Exp. Med. Biol.* 1991, 289:83-105.
- Kris-Etherton y col., *Circulation* 2002, 106(21):2747-2757.
- Layton y col., *Carcinogenesis* 1995, 16(1):39-52.
- Matsukura y col., *Science* 1981, 213:346-347.
- Nunes y col., *Phytother. Res.* 2013, 27(10):1495-1501.
- Pariza y col., *Cancer Lett.* 1979, 7:63-69.
- Petrakis y col., *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1996, 5(10):785-794.
- Sabini y col., *Food Chem. Toxicol.* 2013, 60:463-670.
- Wakabayashi y col., *Cancer Res.* 1992, 52:2092-2098.
- Zan y col., *J. Food Sci.* 2013, 78(2): T367-371.