



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE VETERINARIA DE LUGO
Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología

Nuevos retos en la industria alimentaria:
Elaboración de alimentos nutricionalmente
adecuados, con mínima alteración organoléptica
y alérgicamente seguros

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

POR:

Bernardo José Pérez Rodríguez

Lugo, 25 de Julio de 2015



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE VETERINARIA DE LUGO
Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología

Nuevos retos en la industria alimentaria:
Elaboración de alimentos nutricionalmente
adecuados, con mínima alteración organoléptica
y alergénicamente seguros

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
POR:**

Bernardo José Pérez Rodríguez

Bajo la dirección de los doctores:

José Manuel Miranda López
Carlos Manuel Franco Abuín

Lugo, 2015



**Departamento de Química Analítica,
Nutrición y Bromatología**

D. José Manuel Miranda López, profesor ayudante doctor, y D. Carlos Manuel Franco Abuín, profesor titular de universidad, integrantes del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela,

AUTORIZAN a D. Bernardo José Pérez Rodríguez a la presentación del trabajo titulado: “Nuevos retos en la industria alimentaria: Elaboración de alimentos nutricionalmente adecuados, con mínima alteración organoléptica y alérgicamente seguros”
Realizado bajo su dirección en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, firman la presente en Lugo, en Julio de 2015

Fdo: José Manuel Miranda López Fdo: Carlos Manuel Franco Abuín

Fdo: Bernardo José Pérez Rodríguez





AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero darle las gracias a la empresa CLAVO CONGELADOS S.A., por darme la oportunidad de hacer de mi pasión mi profesión y por enseñarme que no hay límites si se trabaja duro.

A los directores del presente trabajo, José Manuel Miranda López y Carlos Manuel Franco Abuín, por sus consejos, su dedicación y por no permitir que abandonara mi sueño.

A todo el personal del departamento de I+D+i de la empresa CLAVO CONGELADOS S.A., en particular a Xaquín Antón, Jacobo Fernández y Jorge Fernández por su apoyo y por su amistad.

A mis padres y mis hermanos. Mari, gracias por hacernos mejores personas.

A mi mujer Inma, y a mis hijos Sergio, Marcos y Carla por hacerme tan feliz y afortunado cada día.

A mis amigos, Jesús, Moro, Pedro y Rilo.

A todos aquellos que de alguna manera han contribuido a la elaboración de este trabajo, ¡GRACIAS!

Este trabajo de investigación fue financiado por la empresa CLAVO CONGELADOS S.A. y por el Plan Gallego de Investigación, Desarrollo e Innovación Tecnológica 2006-2010 (INCITE).



INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. La grasa en los alimentos. Perspectiva actual.....	9
1.1.2. Ácidos grasos esenciales. Funciones y metabolismo.....	10
1.1.3. Fuentes dietéticas y disponibilidad de los ácidos grasos esenciales y sus derivados.....	13
1.1.4. Importancia de los ácidos grasos poliinsaturados en la dieta.....	14
1.1.5. Ácidos grasos <i>trans</i> . Efectos adversos para la salud humana.....	21
1.1.6. El perfil lipídico de la dieta. Recomendaciones actuales.....	23
1.1.7. Declaraciones nutricionales en los alimentos.....	26
1.1.8. Declaraciones de propiedades saludables en los alimentos.....	36
1.1.9. Importancia de la calidad del aceite de fritura en el perfil lipídico de la grasa de los alimentos empanados.....	39
1.1.10. Efectos de la pre-fritura industrial y del cocinado doméstico en la composición nutricional y el perfil lipídico de los alimentos.....	42
1.2. Alergias alimentarias. Perspectiva actual.....	43
1.2.1. Aspectos clínicos de la alergia alimentaria.....	45
1.2.2. Epidemiología de las alergias alimentarias.....	47
1.2.3. Principales alimentos responsables de alergias alimentarias.....	48
1.2.4. Alergenos de origen animal.....	49
1.2.5. Alergenos de origen vegetal.....	52
1.2.6. Reactividad cruzada entre diversos alergenos alimentarios.....	56
1.2.7. Etiquetado de los alimentos respecto a la posible presencia de alergenos.....	61
2. OBJETIVOS.....	67

3. MATERIALES Y MÉTODOS	71
3.1. Evaluación de la influencia de la pre-fritura industrial y el cocinado doméstico en la composición nutricional y perfil Lipídico de alimentos empanados precocinados.....	73
3.1.1. Plan de muestreo.....	73
3.1.2. Recepción y preparación de las muestras.....	77
3.1.3. Métodos analíticos empleados.....	78
3.1.3.1. Humedad.....	78
3.1.3.2. Proteína.....	80
3.1.3.3. Grasa.....	83
3.1.3.4. Cenizas.....	85
3.1.3.5. Hidratos de carbono.....	86
3.1.3.6. Calorías.....	87
3.1.3.7. Perfil lipídico.....	87
3.1.3.8. Aceptabilidad de los productos por parte del consumidor.....	90
3.1.3.9. Análisis estadístico.....	91
3.2. Influencia del estado del aceite de fritura doméstico en el perfil lipídico de la grasa del alimento cocinado.....	91
3.2.1. Preparación de los productos.....	91
3.2.2. Análisis de la grasa y perfil lipídico del alimento.....	93
3.2.3. Determinación de los compuestos polares.....	93
3.2.4. Análisis estadístico.....	94
3.3. Presencia de alérgenos en alimentos elaborados y estudio de la posible contaminación cruzada en alimentos preparados en una planta de producción mixta.....	95

3.3.1. Plan de muestreo.....	95
3.3.2. Procedimiento de toma de muestras.....	109
3.3.3. Métodos analíticos empleados.....	110
3.3.3.1. Determinación de sulfitos (ALERT®).....	111
3.3.3.2. Método empleado para la detección de pescado (PCR).....	112
3.3.3.3. Método empleado para la determinación de moluscos (PCR).....	115
3.3.3.4. Método empleado para la detección de leche (ELISA).....	118
3.3.3.5. Método empleado para la detección de proteína de huevo (ELISA)....	122
3.3.3.6. Método empleado para la detección de gliadina (ELISA).....	125
3.3.3.7. Método empleado para la detección de crustáceos (ELISA).....	129
3.3.4. Interpretación de los resultados obtenidos.....	133
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	135
4.1. Efectos de la pre-fritura industrial y del cocinado doméstico en la composición nutricional y el perfil lipídico de los alimentos.....	137
4.2. Influencia de la reutilización del aceite de fritura doméstico en el perfil lipídico de la grasa del alimento cocinado.....	149
4.3. Contaminación cruzada por alérgenos en una planta de producción mixta. Control y prevención en la empresa.....	155
4.3.1. Estudio de contaminaciones cruzadas en la Línea 01.....	162
4.3.2. Estudio de contaminaciones cruzadas en la Línea 02.....	164
4.3.3. Estudio de contaminaciones cruzadas en la Línea 03.....	164
4.3.4. Estudio de contaminaciones cruzadas en la Línea 04.....	166
4.3.5. Estudio de contaminaciones cruzadas en la Línea 05.....	167
4.3.6. Estudio de contaminaciones cruzadas en la Línea 06.....	168
4.3.7. Estudio de contaminaciones cruzadas en la Línea 07.....	169
4.3.8. Estudio de contaminaciones cruzadas en la Línea 08.....	169

4.3.9. Estudio de contaminaciones cruzadas en la Línea 09.....	170
4.3.10. Estudio de contaminaciones cruzadas en la Línea 10.....	171
4.4. Estudio de la contaminación cruzada en las líneas de producción a través de los procesos de limpieza.....	172
5. CONCLUSIONES.....	179
6. BIBLIOGRAFÍA.....	183



ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AESAN	Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición
AGMI	Ácidos grasos monoinsaturados
AGPI	Ácidos grasos polinsaturados
AGS	Ácidos grasos saturados
AGT	Ácidos grasos <i>trans</i>
AOAC	American Organization of Analytical Chemists International
APPCC	Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico
Art	artículo
C	crudo
CE	Comunidad Europea
CEE	Comunidad Económica Europea
Cm ²	centímetro cuadrado
col.	colaboradores
DHA	Ácido docosaheptaenoico
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
ELISA	ensayo inmunoenzimático
EPA	Ácido eicosapentaenoico
ES	Extracto seco
FDA	Food and Drug Administration
FDE	Éter dietílico formalina
FID	detector de ionización de llama
g	gramo

HDL	Lipoproteínas de alta densidad
IgE	Inmunoglobulinas E
ISO	International Standard Organization
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LHICA	Laboratorio de Higiene, Inspección y Control de Alimentos
Kcal	Kilocaloría
Kg	Kilogramo
KJ	Kilojulio
l	Litro
M	Molar
µg	microgramo
µg/g	microgramo/g
µg/kg	microgramo/kg
µl	microlitro
ml	Mililitro
n	número de muestras
N	Normal
NAOS	Nutrición, Actividad Física y prevención de la Obesidad
nm	nanómetro
<i>n-3</i>	Omega-3
<i>n-6</i>	Omega-6
OMS	Organización Mundial de la Salud
<i>P</i>	nivel de significación
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PERSEO	Piloto Escolar de referencia para la Salud y Ejercicio, contra la Obesidad
PG	pre-frito en aceite de girasol

PGFG	pre-frito y frito en aceite de girasol
PGFO	pre-frito en aceite de oliva y horneado
PGH	pre-frito en aceite de girasol y horneado
PO	pre-frito en aceite de oliva
POFG	pre-frito en aceite de oliva y frito en aceite de girasol
POFO	pre-frito y frito en aceite de oliva
POH	pre-frito en aceite de oliva y horneado
ppm	Parte por millón
RD	Real Decreto
rpm	revoluciones por minuto
S.A.	Sociedad Anónima
SCIAC	Sociedad catalana de Alergia e Inmunología Clínica
seg	segundo
SENC	Sociedad Española de Nutrición Comunitaria
T ^a	temperatura
UE	Unión Europea
v/v	volumen en volumen
w/w	peso en peso



RESUMEN

En épocas pasadas, la alimentación se enfocaba hacia la supervivencia, la satisfacción del apetito y el ponerse a salvo de enfermedades causadas por deficiencias de ciertos nutrientes. Hoy en día, especialmente en los países del primer mundo, los alimentos deben además promocionar la salud y contribuir al bienestar del consumidor. No obstante, la situación actual ha llevado a la paradoja de que en dichos países, la obesidad, así como las comúnmente denominadas enfermedades crónicas no transmisibles, superen a la desnutrición como problema de salud pública.

Adicionalmente, otro fenómeno relacionado con la alimentación ha ido ganando importancia a lo largo de las últimas décadas: es el caso de las alergias alimentarias. En las últimas décadas, dichas alergias han aumentado de manera exponencial, tanto en lo referente a los ingresos hospitalarios causados por cuadros alérgicos secundarios a la ingesta de alimentos, como en lo referente a la preocupación entre la población por este tipo de alergias.

La existencia de alergias alimentarias en cada vez mayor en nuestra sociedad, tanto de manera cuantitativa como cualitativa. Las tasas de personas alérgicas en la población infantil son mayores que en la población adulta, por lo cual es de esperar que en un futuro cercano, este problema, lejos de resolverse, se acentúe. Además, la mayor penetración en nuestra sociedad de los productos elaborados precocinados, provoca que a menudo dichos alimentos contengan ingredientes o aditivos que no son físicamente reconocibles y que por lo tanto, no existe la sospecha de que pueden estar presentes en él.

Por todo ello, a través de la presente tesis doctoral pretendemos colaborar en la prevención de estos problemas de salud pública, siempre desde el punto de vista de la

empresa alimentaria. Para ello, en primer lugar, hemos estudiado la influencia de los procesos de pre-fritura y cocinado final en los alimentos congelados pre-cocinados, demostrando que el cocinado doméstico tiene una mayor influencia en la composición nutricional de los alimentos precocinados que el proceso de fabricación. En consecuencia, aquellas empresas que empleen en su proceso de fabricación aceites con mejores calidades nutricionales deben advertir a sus consumidores que dichos productos deben ser cocinados mediante fritura en el mismo aceite que se empleó en su fabricación, o mediante horneado. De lo contrario, los efectos beneficiosos para la salud de los consumidores que se persiguen mediante el empleo en la fabricación de los productos de este tipo de aceites, puede verse totalmente anulado por un cocinado casero inadecuado, además de representar un sobrecoste innecesario. Esto es también aplicable al grado de reutilización del aceite doméstico. Finalmente, hemos comprobado la efectividad de un protocolo APPCC en la prevención de contaminaciones cruzadas por alérgenos en una planta de producción mixta. Así, hemos comprobado que el seguimiento de dicho plan es francamente efectivo y que hace innecesario el “etiquetado defensivo” que muchas veces emplean las industrias alimentarias para prevenir problemas legales derivados de la presencia involuntaria de alérgenos en sus productos.



INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

El concepto de alimentación en el mundo desarrollado ha sufrido un cambio sustancial en las últimas décadas. En épocas pasadas la alimentación se enfocaba hacia la supervivencia, la satisfacción del apetito y el ponerse a salvo de enfermedades causadas por deficiencias de ciertos nutrientes, mientras que en la actualidad, en los países del primer mundo, los alimentos deben promocionar la salud y contribuir al bienestar del consumidor. Parece exigible que la “dieta saludable”, reflejada en las tradicionales “pirámides alimentarias” (Figura 1) sea eficaz en la protección frente a enfermedades cardiovasculares, diversos tipos de cánceres u obesidad. No obstante, en nuestros días, la nutrición humana en los países desarrollados se caracteriza por un excesivo consumo de proteínas, ácidos grasos saturados (AGS), ácidos grasos polinsaturados (AGPI) omega-6 (*n*-6), calorías y sodio, mientras que presenta deficiencias en el consumo de AGPI omega-3 (*n*-3), fibra y antioxidantes (Mata y Ortega, 2003). Estos desequilibrios son en parte responsables de la alta incidencia de obesidad (que ha alcanzado en estos países unos niveles alarmantes) así como de la aparición de enfermedades crónicas y degenerativas (Lo y col., 2008).



Figura 1. Pirámide alimentaria en la estrategia NAOS.

Fuente: AESAN.

En particular, las enfermedades cardiovasculares son a menudo causadas o exacerbadas por un alto consumo de AGPI *n*-6 y sodio, así como una baja ingesta de AGPI *n*-3. Con el fin de mejorar la salud pública, las autoridades científicas, como en nuestro país la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) y los organismos internacionales relacionados, como la Organización Mundial de la Salud (OMS), han recomendado persistentemente una reducción en la ingesta de alimentos con alto contenido en AGS, como las carnes rojas y de productos que contengan grasas hidrogenadas, como es el caso de la bollería industrial. Por otra parte, estas agencias recomiendan una dieta rica en frutas y verduras, cereales, legumbres, productos lácteos bajos en grasa, carnes magras y pescado, especialmente especies de pescados grasos con

alto contenido en AGPI *n*-3 (OMS, 2003). En el marco de estas recomendaciones, en el caso de nuestro país, en el año 2005 se puso en marcha la Estrategia NAOS (Estrategia para la Nutrición, Actividad Física y Prevención de la Obesidad), desde el Ministerio de Sanidad y Consumo, a través de la AESAN, con el objeto de sensibilizar a la población del problema que la obesidad representa para la salud, y de impulsar todas las iniciativas que contribuyan a lograr que los ciudadanos, y especialmente los niños y los jóvenes, adopten hábitos de vida saludables, principalmente a través de una alimentación saludable y de la práctica regular del deporte (AESAN; 2005). Este programa se complementó con el programa PERSEO (Programa Piloto Escolar de Referencia para la Salud y el Ejercicio, contra la Obesidad), cuyo principal objetivo es promover la adquisición de hábitos alimentarios saludables y estimular la práctica de actividad física regular entre los escolares, para prevenir la aparición de la obesidad y otras enfermedades relacionadas.

Aunque hoy en día existe un elevado grado de concienciación sobre este problema por parte de la población, y afortunadamente, la composición nutricional ya es un factor importante en la elección de los alimentos por parte del consumidor (Norton y Sun, 2008), éstos muestran reticencias a cambiar sus hábitos dietéticos. Este hecho sugiere que hay un gran mercado potencial para los alimentos que son consumidos de manera habitual, que sean modificados en su composición, ya sea para incluir ciertos ingredientes beneficiosos para la salud, o bien modificando la cantidad de algunos de los ingredientes o componentes habituales de los alimentos en cuestión para hacerlos más adecuados a las recomendaciones de los expertos en nutrición (Jiménez-Colmenero, 2007).

La aparición de estos alimentos ha supuesto un salto muy importante en la evolución de la manera de alimentarse en los países industrializados (Figura 2).

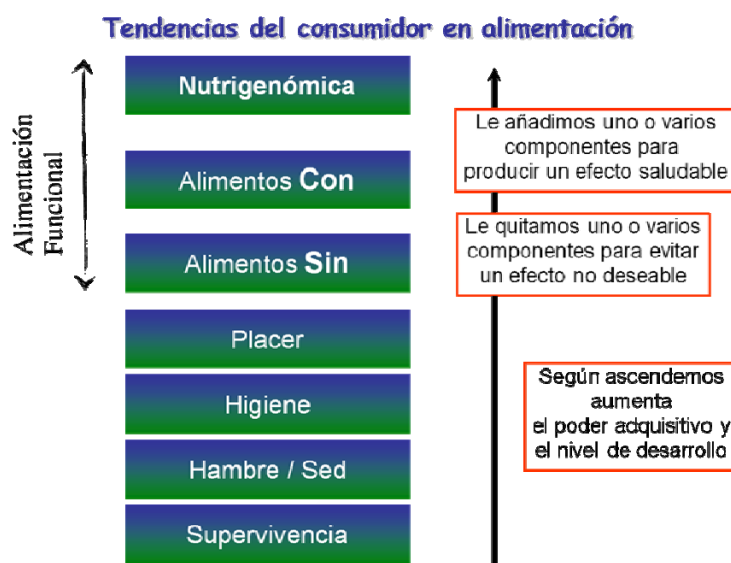


Figura 2. Tendencias históricas en la alimentación en los países industrializados.

De entre todos los nutrientes que están presentes en los alimentos, son sin duda las grasas las que han sido objeto de una mayor atención, tanto por parte de los expertos en nutrición, como de los consumidores. En la actualidad el interés por la grasa alimentaria en los países desarrollados abarca no sólo la cantidad de grasa que se ingiere, sino que también preocupa, a pesar de la dificultad que entraña su conocimiento, la calidad de la grasa ingerida.

Otro de los riesgos emergentes relacionados con la alimentación en las sociedades desarrolladas es la cada vez mayor prevalencia de las alergias alimentarias. En las últimas décadas ha aumentado de manera exponencial tanto los ingresos hospitalarios causados por cuadros alérgicos secundarios a la ingesta de alimentos, como la preocupación entre la población por este tipo de alergias (Gil, 2010). No obstante, debemos tener en cuenta que el término “alergia alimentaria” se ha utilizado abusivamente, aplicándolo de manera incorrecta a cualquier reacción adversa a un alimento o a un aditivo alimentario (Johansson y col., 2004), y particularmente se ha

confundido de manera muy frecuente tanto con las intolerancias alimentarias como con las reacciones de toxicidad alimentaria.

La existencia de alergias alimentarias en cada vez mayor en nuestra sociedad, tanto de manera cuantitativa (cada vez hay más personas que sufren este tipo de alergias) como cualitativo (el número de alimentos a los que las personas son potencialmente alérgicas es más amplio). Esto se debe a que los alimentos elaborados muchas veces contienen ingredientes o aditivos que no son físicamente reconocibles y que por lo tanto, no sospechamos que pueden estar presentes en él, y también al hecho de que la globalización ha traído consigo que cada vez haya más presencia en nuestros mercados de alimentos “exóticos”, que no consumíamos con regularidad hasta hace pocos años.

Los alimentos que con mayor frecuencia causan fenómenos alérgicos varían sustancialmente de un país a otro, debido tanto a los diferentes hábitos alimentarios como a la diferente predisposición genética o sensibilización adquirida por su población. También varía dentro de una población entre los diferentes subgrupos de edades, y es un hecho reconocido que los alimentos que causan de manera más frecuentemente alergias alimentarias en la edad infantil (en el caso de España los alérgenos más frecuentes son el huevo, le leche de vaca y los pescados (Crespo y col., 1995), que en la edad adulta, en la cual los alimentos que con mayor frecuencia causan alergias alimentarias son las frutas, los frutos secos y los crustáceos (Kanny y col., 2001) (Figura 3).

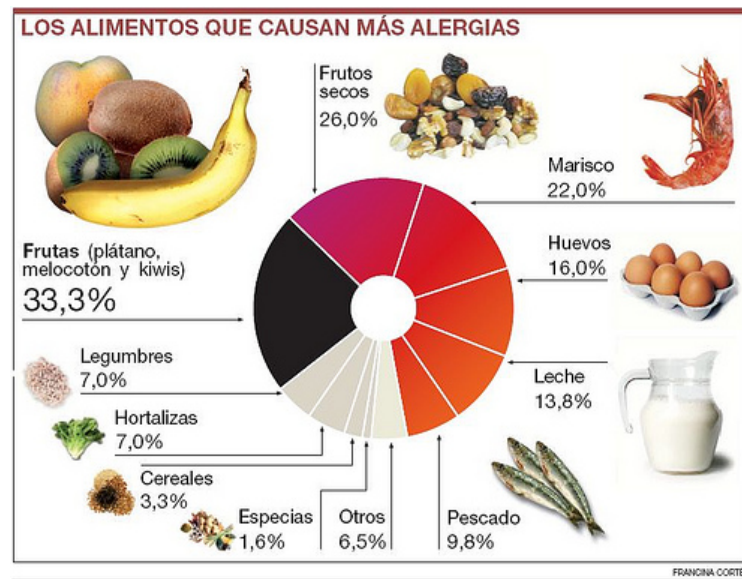


Figura 3. Alimentos que de manera más frecuente causan alergias en la población adulta española. Fuente: Sociedad Catalana de Alergia e Inmunología Clínica (SCIAC).

Así pues, desde nuestra empresa (Clavo Congelados, S.A., Pontevedra, España) hemos establecido estrictos mecanismos de control para prevenir en nuestros consumidores la aparición de alergias alimentarias, de fenómenos de contaminación cruzada de alérgenos, y también, dando un paso más, para fabricar alimentos con una composición nutricional más adecuada a las recomendaciones de los expertos en nutrición y de las autoridades sanitarias, tanto nacionales como internacionales. Sin embargo, consideramos que es de crucial interés comprobar la eficacia de estas medidas adoptadas, haciéndolo desde una perspectiva científica y no estrictamente comercial, y por qué no, también poder detectar fallos en nuestro sistema y elaborar propuestas para corregirlos.

1.1. La grasa en los alimentos. Perspectiva actual

El excesivo consumo de grasa, debido a su gran aporte energético, se relaciona con la gran prevalencia en las sociedades occidentales del sobrepeso y la obesidad, la gran epidemia nutricional del siglo XXI (Mataix y col., 2001a). En nuestro país, por ejemplo, las enfermedades cardiovasculares, tradicionalmente relacionadas con un consumo excesivo de grasa, ocupan el primer lugar entre las causas de muerte (Figura 4). Por dicho motivo, para gran parte de los consumidores, ajenos a conocimientos técnicos en el campo de la nutrición, la grasa de los alimentos tiene connotaciones negativas sobre la salud. Sin embargo, no debemos olvidar que la grasa, especialmente algunos ácidos grasos concretos, son nutrientes esenciales y por lo tanto, imprescindibles para la vida (Gil, 2010). Además de su función energética, la grasa presenta también una función plástica, incorporándose a los tejidos y órganos corporales y determinando la composición y funcionalidad de las membranas celulares (Garg y col., 2006).

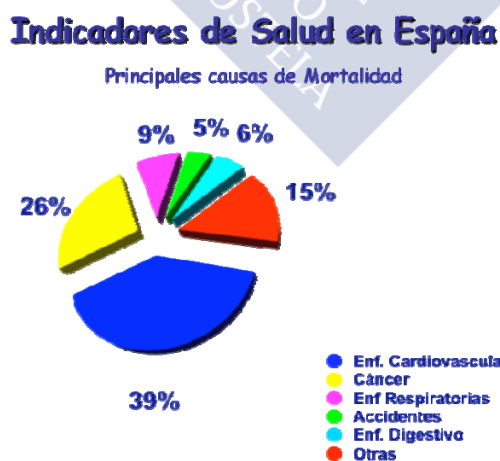


Figura 4. Principales causas de muerte en España. Fuente: AESAN.

Actualmente, existen recomendaciones dietéticas específicas para cada grupo de ácidos grasos, dado que los efectos beneficiosos (o potencialmente perjudiciales) que éstos pueden aportar al organismo, varían en función del grupo de ácidos grasos del que estemos hablando (AESAN; 2005; Mataix y col., 2001a). Para entender estas recomendaciones, es preciso que previamente aclaremos unos conceptos básicos sobre el papel que los ácidos grasos (especialmente en el caso de los ácidos grasos esenciales) desempeñan en nuestro organismo.

Tomando las alergias alimentarias propiamente dichas, en España los alimentos que causan alergias más habitualmente son las frutas, con un 33,3% de los casos, seguidos de los frutos secos, con 26% y los mariscos, con un 22% de los casos (AESAN, 2007b).

1.1.2. Ácidos grasos esenciales. Funciones y metabolismo

Los AGPI se agrupan fundamentalmente en tres familias o series: los pertenecientes a serie $n-3$, de los cuales su precursor es el ácido α -linolénico, la serie $n-6$, de los cuales el precursor es el ácido linoleico, y la serie omega-9 ($n-9$), de los cuales el precursor es el ácido oleico. Aunque existen otras series de AGPI, como es la serie omega-7 ($n-7$) o la serie omega-11 ($n-11$), éstas son minoritarias dentro de la grasa de los alimentos y no alcanzan la importancia nutricional de las tres series citadas anteriormente. Estos ácidos grasos pueden ser sintetizados por las células vegetales a partir de AGS o AGMI, pero en el caso de los mamíferos, nuestras células sólo pueden introducir insaturaciones a partir del carbono 9 en adelante y en dirección hacia el grupo carboxilo (Gil, 2010). Es decir, no pueden desaturar las posiciones $n-6$ y $n-3$. Por esta razón, para los mamíferos, el ácido linoleico y el α -linolénico son los únicos ácidos grasos considerados esenciales que, al no poder ser sintetizados dentro del organismo, deben estar en la dieta en

cantidades y proporciones adecuadas. El ácido oleico no se considera esencial para los mamíferos, ya que puede ser sintetizado a partir del ácido esteárico (Mataix y col., 2001a).

A priori, cabría pensar que un aporte adecuado de los dos ácidos grasos esenciales, al ser precursores de sus correspondientes series, proporcionarían un aporte adecuado de la serie de ácidos grasos completa. No obstante, en la práctica esto no es así, ya que dentro del organismo existen interacciones entre los distintos nutrientes que provocan tanto aumentos como descensos en los requerimientos de cada uno de los ácidos grasos (Gil, 2010). Tampoco es infrecuente, especialmente en niños y en adultos de edad avanzada, que debido a un déficit en alguna de las enzimas que catalizan las correspondientes vías enzimáticas, no se asegura con el aporte de estos dos ácidos grasos ya mencionados la síntesis adecuada de los distintos miembros de las familias de ácidos grasos correspondientes (Koletzko y col., 2010).

A partir de los tres ácidos grasos mencionados, se originan, a través de sucesivos procesos de elongación y desaturación, las tres principales familias de AGPI (Figura 5). Estas transformaciones ocurren principalmente en una primera etapa en el retículo endotelial liso (microsomas), y más tarde en los peroxisomas citoplasmático. Estas transformaciones son realizadas por enzimas denominadas elongasas, las cuales aumentan el tamaño de la cadena hidrocarbonada), y desaturasas, las cuales introducen nuevos dobles enlaces. Mediante la acción de estas enzimas, los ácidos grasos precursores pueden ser elongados en derivados de mayor tamaño (pudiendo alcanzar los 24 átomos de carbono), e insaturados (pudiendo llegar a contener hasta 6 dobles enlaces).

Las enzimas más relevantes desde el punto de vista metabólico en estos procesos son la $\Delta 5$ -desaturasa y la $\Delta 6$ -desaturasa, y en particular esta última. Su afinidad por los

diferentes ácidos grasos es muy distinta, siendo mayor por el α -linolénico que por el ácido linoleico, y por este motivo, si el aporte nutricional de α -linolénico es muy elevado, no habrá suficiente enzima para producir los derivados de la familia n -6 de mayor insaturación. No obstante, si tal y como suele suceder en los países occidentales, el aporte a través de la dieta de ácido linoleico es mucho mayor que el de α -linolénico, la transformación de éste último en sus derivados n -3 será insuficiente (lo cual ocurre muy frecuentemente) (Gil, 2010).

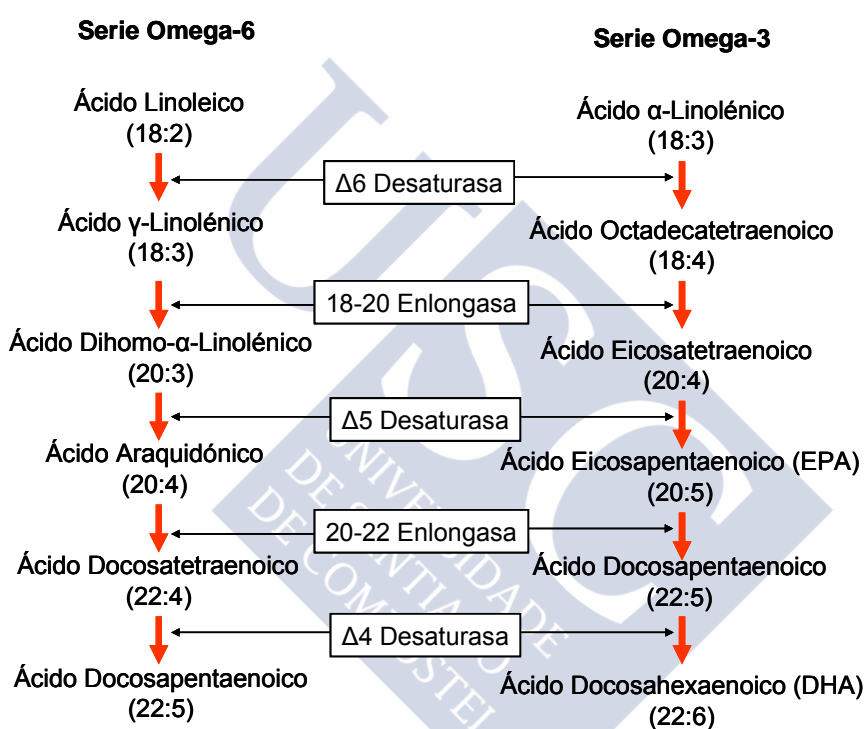


Figura 5. Rutas de la síntesis de los ácidos grasos omega-3 y omega-6.

Por otra parte, la afinidad de esta enzima por el ácido oleico es muy inferior a la apetencia por los ácidos α -linolénico y linoleico. Por este motivo sólo se van a producir sus compuestos de mayor número de carbonos y mayor insaturación cuando la concentración en la dieta de los ácidos α -linolénico y linoleico sea muy baja. Así, si la transformación de los ácidos α -linolénico y linoleico en sus respectivos ácidos grasos de cadena larga es inhibido totalmente, se formará a partir del ácido oleico una alta

proporción de un ácido graso de cadena larga de la serie *n*-9, el ácido eicosatrienoico, como un efecto compensatorio a la carencia de ácidos grasos de cadena pertenecientes a la serie *n*-3 y *n*-6. La presencia de este ácido graso puede tomarse, por lo tanto, como una clara señal de insuficiente aporte por la dieta de α -linolénico y linoleico en nuestra dieta (Valenzuela y Morgano, 1999).

Aproximadamente, el 95% del ácido linoleico que se aporta por la dieta es oxidado en las mitocondrias, con la finalidad de obtener energía, y sólo un pequeño porcentaje (5%) es transformado en ácido araquidónico, el principal producto metabólico de la serie *n*-6. Esta transformación ocurre sobre todo en el hígado, desde donde es transportado hacia los tejidos periféricos, principalmente hacia el cerebro, órganos visuales y en caso de los hombres hacia los testículos (Gil, 2010).

El α -linolénico aportado por la dieta es también oxidado en su mayor parte (alrededor de un 85%), y el resto se transforma fundamentalmente en ácido docosahexaenoico (DHA), su principal producto metabólico. Esta transformación también ocurre principalmente en el hígado, y desde este órgano sería transportado por la misma vía y hacia los mismos órganos que el ácido araquidónico. Durante el embarazo, además de en el hígado, éste ácido graso también se acumula en el tejido adiposo (Gil-Campos y col., 2010).

1.1.3. Fuentes dietéticas y disponibilidad de los ácidos grasos esenciales y sus derivados

Los tejidos animales aportan grasas y aceites con una composición rica en AGS (principalmente esteárico) y ácidos grasos monoinsaturados (AGMI), pero muy pequeñas cantidades de AGPI. Por otra parte, los aceites vegetales aportan, sobre todo,

ácido oleico y ácido linoleico, pero muy bajas cantidades de α -linolénico, de los cuales sus fuentes principales son, vegetales, frutos secos, y especialmente, los alimentos de origen marino entre los que destaca el pescado azul. Cabe señalar además que desde que a principios del siglo XX se introdujese el proceso de hidrogenación para lograr un mejor manejo y estabilidad de los aceites de origen vegetal y animal, se produjo una importante disminución en la cantidad de AGPI consumidos por el hombre, ya que éstos, por su mayor grado de insaturación, son los ácidos grasos más afectados por el proceso de hidrogenación (Mataix y col., 2001b). Este proceso de hidrogenación produce, además, isómeros *trans*, muy frecuentes hoy en día en nuestra dieta, y de los cuales más recientemente conocimos sus negativos efectos sobre nuestra salud. Estos ácidos grasos *trans* son aterogénicos y modifican la formación de ácidos grasos de cadena larga derivados de los ácidos α -linolénico y linoleico, principalmente, mediante la inhibición de la enzima $\Delta 6$ -desaturasa (Valenzuela y Morgado, 1999).

Por otra parte, el bajo consumo de productos del mar en algunos países, especialmente en las regiones de interior, ha desequilibrado todavía más la relación entre los ácidos grasos *n-6* y *n-3*, ya que, además del bajo consumo de ácido α -linolénico descrito antes, también se consume muy poco DHA y ácido eicosapentaenoico (EPA), presentes sobre todo en los productos de la pesca. Esta desproporción afecta mucho más al mundo occidental que al oriental, en el cual las tradiciones culinarias utilizan mucho más los productos del mar.

1.1.4. Importancia de los ácidos grasos poliinsaturados en la dieta

Los AGPI, especialmente los pertenecientes a la serie *n-3*, han sido objeto de un gran interés en los últimos años, a raíz del descubrimiento de que las poblaciones en las

cuales su consumo (por medio del consumo de pescado) es muy abundante, registran las tasas de mortalidad debidas a enfermedades cardiovasculares más bajas del mundo.

Una dieta regular y rica en ácidos grasos $n-3$ es recomendable para la población en general, pero existen determinados grupos poblacionales (como los niños y lactantes) y estados fisiológicos (como las personas con altos niveles de triglicéridos en sangre) para los cuales este aporte es más importante. En todo caso, es muy recomendable que en nuestra dieta incluyamos una buena cantidad de vegetales, frutos secos, y especialmente, pescado azul para poder aportar a nuestro organismo la cantidad necesaria de estos ácidos grasos tan importantes. No obstante, también debemos tener en cuenta que en algunos pescados azules, especialmente en los de escala trófica superior (túnidos, salmónidos, pez espada, etc), hay frecuentemente concentraciones elevadas de contaminantes como el metil-mercurio, que pueden afectar fundamentalmente al desarrollo cerebral y al crecimiento en la infancia, por lo que hay que limitar su consumo, especialmente en mujeres gestantes y niños (Gil-Campos y Dalmau-Serra, 2010). Por este motivo, a pesar de la enorme importancia que el consumo de estos ácidos grasos, y especialmente del DHA, como veremos más adelante, tiene en estas etapas de la vida, deben adoptarse precauciones a la hora de recomendar un elevado consumo de pescado azul, al menos de las especies de mayor talla. Por este motivo, una interesante alternativa para el consumo de estos alimentos sería el consumo de alimentos enriquecidos en ácidos grasos $n-3$, a través de los cuales podamos cubrir nuestras necesidades diarias sin necesidad de modificar nuestros hábitos alimenticios.

Cubrir las ingestas recomendadas de ácidos grasos $n-3$ a base de pescado u otros alimentos marinos representa una dificultad, especialmente en regiones del interior, lo cual justifica y plantea el empleo de alimentos enriquecidos en ácidos grasos $n-3$ para

suplir estas carencias. El consumo de este tipo de alimentos es especialmente recomendable para las poblaciones que por sus hábitos o edad, presenten un mayor riesgo de aparición de enfermedades cardiovasculares.

Desde que en los años 80 se establecieron las primeras relaciones científicamente probadas entre la grasa de la dieta y las enfermedades cardiovasculares, son muchos los estudios epidemiológicos que demuestran que un consumo habitual de pescado se asocia con una clara disminución del riesgo cardiovascular. De este modo, es un hecho probado que el consumo de 40-60 g diarios de pescado disminuye la probabilidad de aparición de enfermedades cardiovasculares en pacientes de riesgo en un 30% (Mataix y col., 2001).

El efecto más importante para la salud humana que se ha demostrado científicamente de los ácidos grasos *n*-3 es su capacidad para disminuir la aparición de las arritmias coronarias, dado que estos ácidos grasos tienen la capacidad de estabilizar eléctricamente la contracción de las células musculares (miocitos) cardíacos. No obstante, también juegan un papel importante en la modificación de los mecanismos relacionados con la disfunción endotelial, inflamación, trombosis y la arteriosclerosis, además de reducir la presión arterial sistólica y diastólica. Así pues, puede afirmarse que los ácidos grasos *n*-3 presentan un efecto antitrombótico, antiinflamatorio, vasodilatador y regulador de la tensión (Mataix y Gil, 2003, Mata y Ortega, 2003).

No obstante, a pesar de todos estos efectos extremadamente beneficiosos para la salud, el efecto más “mediático” que presentan estos ácidos grasos son su capacidad de reducir los niveles en sangre de colesterol LDL (colesterol “malo”), aumentar el colesterol HDL (colesterol “bueno”), y especialmente, de reducir la trigliceridemia. Se ha evidenciado en este sentido que estos ácidos grasos son extremadamente eficaces como reguladores de la hipertrigliceridemia, tanto es así que dosis de 3-4 g/ día de estos

ácidos grasos consiguen reducciones de hasta un 45% en las concentraciones de triglicéridos circulantes (Mataix y col., 2003). En la Tabla 1 podemos observar un resumen de los principales efectos beneficiosos de los ácidos grasos *n*-3, así como del ácido oleico.

Tabla 1. Efectos saludables de los ácidos grasos insaturados a nivel cardiovascular.

Ácidos grasos	Monoinsaturados	Poliinsaturados
En especial	Oleico	Omega-3
Mejora perfil lipídico	X	X
Reducción en la oxidación de las LDL	X	
Reducción de la presión arterial	X	X
Aumento de la vasodilatación arterial	X	X
Disminución de la trombosis	X	X
Mejora del metabolismo de la glucosa	X	
Prevención de arritmia y muerte súbita		X

Fuente: Mataix y col., 2001.

Otros efectos menos conocidos, aunque no menos importantes de los ácidos grasos *n*-3 son sus efectos antiinflamatorios. De este modo, estos ácidos grasos presentan efectos beneficios para pacientes fumadores, asmáticos, con neumonía y también en aquellos con enfermedad inflamatoria intestinal o artritis reumatoide, por poner sólo algunos ejemplos.

El consumo de ácidos grasos *n*-3 durante el embarazo y la lactancia (Tabla 2) es fundamental para el correcto desarrollo neurológico y el crecimiento del recién nacido. Los ácidos grasos *n*-3 reducen hasta en 2,6 veces el riesgo de hipertensión asociada al

embarazo, mejoran las funciones posturales, motoras y sociales de los bebés prematuros y tienen un efecto positivo en el desarrollo mental del recién nacido de bajo peso. Por el contrario, se sabe que la deficiencia de estos ácidos grasos condiciona una alta mortalidad perinatal y puede provocar serias alteraciones en el neonato, tales como alteraciones en el crecimiento, cambios en el comportamiento y disminución de la agudeza visual. También en algunos estudios se ha llegado a relacionar la carencia de estos ácidos grasos, conjuntamente con otros AGPI de cadena larga, en la dieta con una gestación más corta y menores perímetros cefálicos en el recién nacido (Mataix y Gil, 2003; Meyer y col., 2003).

Es también un hecho bien conocido el importantísimo papel que los AGPI, incluidos los *n*-3 desempeñan durante la gestación, lactación y la infancia, ya que son constituyentes de los fosfolípidos de las membranas celulares y por lo tanto forman parte de las estructuras neuronales. En consecuencia, las necesidades de estos ácidos grasos por parte de la mujer embarazada y el feto (especialmente durante el primer trimestre de la gestación, que es cuando se desarrollan y diferencian las neuronas), así como de los niños lactantes, son muy elevadas. Además, el contenido de AGPI de cadena larga en los tejidos se asocia positivamente con el crecimiento, sugiriendo este hecho que estos ácidos grasos pueden actuar como promotor del mismo durante la vida postnatal temprana (Gil, 2010, Mataix y Gil., 2003). Dentro de los ácidos grasos de la serie *n*-3, el que juega un papel más importante en estas fases tempranas de la vida es el DHA.

Existen estudios que demuestran que una dieta rica en ácidos grasos *n*-3, especialmente en DHA, en los primeros meses de vida mejora la capacidad de aprendizaje, así como el desarrollo del sistema visual (Gil-Campos y Dalmau-Serra, 2010). Además, se conoce que un déficit de DHA durante la gestación y los primeros

años de vida afecta de manera importante a la neurotransmisión, a la capacidad de unión con los sustratos de los enzimas de membrana, a la actividad de los canales iónicos, y a la expresión génica (Darios y col., 2006). Por otra parte, este ácido graso (y en menor medida también otros de la serie *n-3*), parece modular la respuesta inmune, y por lo tanto se cree que tiene un papel protector en alergias y otras enfermedades inflamatorias. Fundamentalmente, incrementa el nivel de resolvinas y lipoxinas, que son moléculas que intervienen en la resolución de la inflamación. De este modo, una deficiencia en DHA, puede alterar el balance entre los factores inflamatorios y antiinflamatorios, facilitando la aparición de enfermedades inflamatorias crónicas (Gil-Campos y Dalmau-Serra, 2010).

Es también conocido que un déficit de DHA durante la infancia está asociada con la aparición de enfermedades peroximales, hiperactividad, déficit de atención, fenilcetonuria y fibrosis quística durante la infancia, y posteriormente, cuando la persona llega a la edad adulta, a un envejecimiento más rápido y a una mayor probabilidad de aparición de la enfermedad de Alzheimer (Riediger y col., 2009). Por todos estos motivos, en los últimos años un comité de expertos ha concluido que, basados en las evidencias científicas, en la fórmula infantil se deben añadir al menos el 0,2% de los ácidos grasos como DHA, aunque éstos no deben exceder el 0,5% del total de ácidos grasos, ya que todavía no han sido suficientemente evaluados los efectos de una ingesta mayor. También es conocido que la cantidad de EPA no debe superar la de DHA (Lien y Clandinin, 2009; Gil-Campos y Dalmau-Serra, 2010). Teniendo en cuenta pues que introducción en la dieta de alimentos como el pescado no se produce normalmente hasta superar el primer año de vida, es muy importante prolongar la lactancia materna tanto tiempo como sea posible y/o asegurar un aporte suficiente de DHA a partir de fórmulas suplementadas, al menos hasta alcanzar los niveles de DHA

que sería normal obtener a través de alimentos como el pescado (Gil-Campos y Dalmau-Serra, 2010; Sarjuero-Crespo y col., 2008).

Otro de los efectos beneficiosos que se le conocen a los AGPI, y especialmente a los pertenecientes a la serie $n-3$, es su efecto en la prevención del cáncer, especialmente en el caso del cáncer de mama, colon y en el melanoma maligno, ya que, ralentizan el crecimiento de las células cancerígenas. Con respecto a este tema, existen además trabajos científicos que afirman que una ingesta adecuada de ácidos grasos $n-3$ hace posible una reducción de la dosis, tiempo y ciclos de quimioterapia, lo cual, mejora sustancialmente la vida de los pacientes con cáncer (Gil, 2010).

Tabla 2. Principales efectos saludables de los ácidos grasos omega-3 en la gestación y recién nacidos.

Gestación	Recién nacido
Disminuye el riesgo de hipertensión	Favorece la maduración sensorial y neurodesarrollo
Esencial para el desarrollo neurológico del feto	Mejora el crecimiento
Esencial para el desarrollo del tejido nervioso del feto en el tercer trimestre	Mejora las funciones posturales, motoras y sociales
	Efectos positivos en el desarrollo mental
	Mejora la solución de problemas en niños con retraso en crecimiento
	Aumento del desarrollo de la agudeza visual

Fuente: Mataix y col., 2001

1.1.5. Ácidos grasos *trans*. Efectos adversos para la salud humana.

Los ácidos grasos *trans* (AGT) son ácidos grasos no saturados con al menos un doble enlace en configuración *trans*, que se caracteriza porque los átomos de hidrógeno de los carbonos adyacentes al doble enlace se encuentran en direcciones opuestas. Lo más frecuentes son los monoinsaturados, pero también se pueden encontrar AGPI con configuración *trans*.

Estos ácidos grasos se originan de manera habitual procesos de biohidrogenación. Estos procesos pueden ocurrir de manera natural por la microbiota presente en los preestómagos de los rumiantes, pero fundamentalmente, su presencia en los alimentos es debida al procesado industrial de los alimentos, originándose fundamentalmente durante los procesos refinación, fritura, y especialmente, de hidrogenación catalítica (Griguol y col., 2007, Leal Orozco, 2010). Este proceso, desarrollado ya en los años 30, consiste en la introducción de gas hidrógeno en aceite vegetal líquido bajo ciertas condiciones de presión y temperatura, y mediante el uso de un metal catalítico. El proceso supone la modificación estructural de los dobles enlaces de AGMI y AGPI, y se aplicó con el fin de que los aceites vegetales pudieran transformarse en grasas sólidas a temperatura ambiente, como es el caso de la margarina (Valenzuela y Morgado, 1999).

A pesar de que algunos isómeros *trans* de ácidos grasos pueden tener efectos beneficiosos para la salud humana, tal y como hemos visto en el apartado anterior, la mayor parte de los ácidos grasos con configuración *trans* tienen efectos adversos para la salud, y deben ser evitados en nuestra dieta diaria. Entre estos efectos adversos, el más reconocido a nivel científico es la pérdida funcional de las propiedades de los ácidos grasos esenciales, ya que los AGT compiten con éstos e inhiben la actividad de la Δ -6-desaturasa. También es conocido que el consumo de éstos ácidos grasos trae consigo un

aumento en los niveles plasmáticos de LDL-colesterol, y de la relación LDL/HDL colesterol, en mayor medida incluso que el originado por el consumo de AGS. Otros efectos menos conocidos son que su consumo provoca incrementos en los niveles de Lipoproteína A (Stachowska y col., 2001), y aumenta el riesgo de desarrollar cálculos biliares (Tsai y col., 2005).

Los alimentos con mayor contenido en AGT originados de manera natural son la leche y derivados lácteos. No obstante, su contenido es prácticamente irrelevante si lo comparamos con el contenido en AGT en ciertos alimentos en los cuales estos ácidos grasos han sido originados por la acción de procedimientos industriales. Entre éstos, los que contienen una mayor proporción son los productos de panadería y pastelería industrial, que contienen hasta un 37% del total de ácidos grasos, las margarinas, que contienen hasta un 49%, y las aperitivos como las patatas fritas, que pueden contener un 25-40% de AGT sobre el total de ácidos grasos (AESAN, 2004; AESAN, 2006; Leal Orozco, 2010).

Recientemente, el panel de expertos de la AESAN (2004) emitió un informe en el cual se muestra que los efectos de los ácidos grasos *trans* sobre la salud cardiovascular son tan negativos, o más, que los de los AGS.

Históricamente, el consumo de AGT ha sufrido un incremento a lo largo de las últimas décadas, de forma paralela al consumo de margarinas, al desarrollo de la panadería industrial y al uso de aceites vegetales para freír. Actualmente, el consumo medio estimado en los países desarrollados es, aproximadamente, de un 6% del total de ácidos grasos consumidos, lo que equivale a unos 7-8 g/ persona y día, si bien se describen amplias variaciones según el área geográfica (Leal Orozco, 2010). En España la ingesta media se sitúa en torno a los 2,1 g/día (AESAN, 2010). Aunque no existe a día de hoy una recomendación específica para la población española, la OMS

recomienda que el consumo de AGT no supere el 1% de la ingesta energética total, la Food and Drug Administration (FDA) recomienda una ingesta de AGT tan baja como sea posible y en Europa algunos países como los nórdicos han recomendado que los AGT se limiten a una presencia máxima del 2% en aceites y alimentos procesados.

1.1.6. El perfil lipídico de la dieta. Recomendaciones actuales

Como ya hemos mencionado anteriormente, hoy en día es un hecho aceptado que para conseguir una alimentación saludable, es tanto o más importante la calidad de la grasa que ingerimos a través de la dieta que su cantidad.

Hasta hace no mucho tiempo, la calidad de la grasa alimentaria se cuantificaba estableciendo una relación entre la cantidad de AGS y AGPI. Hoy en día se conoce que esta relación no aporta suficiente información, y si bien se sigue considerando adecuado un bajo consumo de AGS, se hace un mayor hincapié en lograr un correcto equilibrio entre las distintas familias de ácidos grasos insaturados, especialmente los pertenecientes a las series *n-3*, *n-6* y *n-9*.

Para conocer el potencial para causar problemas cardiovasculares, Ulbricht y Southgate (1991) fijaron un índice al que denominaron índice de aterogenicidad (Figura 6), el cual se define como la razón del contenido de los ácidos grasos capaces de aumentar los niveles de colesterol sérico (ácidos láurico, mirístico y palmítico) y los ácidos grasos de acción protectora (mono y poliinsaturados). Este índice es hoy en día muy utilizado por los profesionales de la medicina y la nutrición.

$$\text{I.A.} = \frac{\text{ácido láurico} + 4 (\text{ácido mirístico}) + \text{ácido palmítico}}{\text{poliinsaturados } \omega\text{-3} + \text{poliinsaturados } \omega\text{-6} + \text{oleico} + \text{otros monoinsaturados}}$$

Figura 6. Fórmula de índice de aterogenicidad propuesto por Ulbricht y Southgate (1991)

De este modo, la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC, 2001; AESAN, 2006), ha establecido en sus guías alimentarias para la población española las siguientes recomendaciones:

1.- La grasa total debe ser aportada en un rango que oscile entre el 30-35% de la energía total de la dieta.

2.- Los AGS no deberán superar en ningún caso el 10% del valor calórico total de la dieta habitual, siendo aconsejable situar esos niveles, en último término, en aportes no superiores al 7-8%.

3.- El ácido graso que debe ser mayoritario en la dieta es el ácido oleico, presente principalmente entre otros alimentos en el aceite de oliva virgen. Dado que la grasa total debe suponer el 30-35% de la energía total de la dieta, el citado ácido oleico debe representar la mitad o más de esa cantidad, lo que representaría entre un 15-20% del aporte calórico total de la dieta.

4.- Los AGPI (especialmente los pertenecientes a la serie *n-6*) deben limitarse a un máximo de un 5% de la energía total de la dieta. De ese 5% la mayor parte debe corresponder al ácido linoleico.

A pesar de la dificultad de establecer las cantidades adecuadas de ácidos grasos *n-3*, esta agencia recomienda un aporte de 2 g/ día como ácido linolénico, y 200 mg/ día como ácido docosaheptaenoico (DHA). Además de estas recomendaciones, otras organizaciones y autores han propuesto recomendaciones más específicas referentes a la

relación entre los distintos tipos de grasas. De este modo, la OMS (2003), recomienda un ratio $n-6/n-3$ de menos de 4:1 y un ratio AGPI/AGS mínimo de 0,4.

Para conseguir estos objetivos, y basándose en los hábitos alimentarios de la población española en general, la SENC realizó una serie de recomendaciones alimentarias que hacen posible un aporte de ácidos grasos acorde a lo expuesto anteriormente (Mataix, 2001). Estas recomendaciones son:

- 1.- Limitar el consumo de grasa láctea, bien consumiendo variedades descremadas o semidesnatadas, y reducir el consumo de mantequilla.
- 2.- Limitar o evitar el consumo de alimentos que contengan cantidades apreciables de AGT.
- 3.- En el caso de consumir margarinas, debe hacerse en pequeñas cantidades y seleccionando aquellas que contengan menores cantidades de AGPI en su composición final.
- 4.- El aceite de elección será preferentemente aceite de oliva, quedando como segunda opción los aceites de semillas como girasol, maíz o soja. Dentro de los distintos aceites de oliva, se recomiendan especialmente los de tipo virgen, por su mayor capacidad antioxidante.
- 5.- Limitar el consumo de grasas procedentes de animales terrestres, seleccionando preferentemente piezas magras. Es más recomendable cualitativamente la grasa

procedente de aves y cerdo que la procedente de rumiantes. No obstante, con consumos moderados y eligiendo piezas magras, dichas diferencias no son significativas.

6.- Limitar los embutidos a excepción del jamón, y evitar en la medida de lo posible la porción grasa del mismo.

7.- Limitar el consumo de productos de pastelería, bollería y heladería que contengan grasa saturada.

8.- Mantener o incrementar el consumo de grasa procedente de pescados, fuente natural de ácidos grasos *n-3*.

Todas estas recomendaciones se establecieron conjuntamente con la recomendación de ejercicio diario moderado y una distribución adecuada entre las diferentes comidas del día (Programa Perseo, AESAN, 2007), ya que desgraciadamente es habitual entre nuestra población que se realice un desayuno insuficiente, mientras que se ingiera demasiada carga calórica tanto en la comida como en la cena.

1.1.7. Declaraciones nutricionales en los alimentos

Solamente se autorizará el uso de declaraciones nutricionales y de propiedades saludables si se cumplen las siguientes condiciones (art. 5 del Reglamento 1924/2006 y modificaciones posteriores):

- Se ha demostrado científicamente el efecto beneficioso.
- Está en el producto final en cantidad suficiente.

- Está en una forma asimilable por el organismo.
- La cantidad que razonablemente cabe esperar que se consuma proporciona una cantidad significativa de la sustancia activa.
- Cabe esperar que el consumidor medio “*comprenda*” los efectos beneficiosos tal como se expresan en la declaración

Según lo establecido en las normas europeas ya mencionadas (fundamentalmente en el Reglamento 1924/2006), las únicas declaraciones nutricionales admitidas en el etiquetado y publicidad de los alimentos que se comercializan en la Unión son los siguientes:

Bajo Valor energético

Solamente podrá declararse que un alimento posee un bajo valor energético, así como efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si el producto no contiene más de 40 kcal (170 kJ)/100 g en el caso de los sólidos o más de 20 kcal (80 kJ)/100 ml en el caso de los líquidos. Para los edulcorantes de mesa se aplicará un límite de 4 kcal (17 kJ) por porción, con propiedades edulcorantes equivalentes a 6 g de sacarosa (una cucharadita de sacarosa aproximadamente).

Valor energético reducido

Solamente podrá declararse que un alimento posee un valor energético reducido, así como efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si el valor energético se reduce, como mínimo, en un 30 %, con una

indicación de la característica o características que provocan la reducción del valor energético total del alimento.

Sin aporte energético

Solamente podrá declararse que un alimento carece de aporte energético, así como efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si el producto no contiene más de 4 kcal (17 kJ)/100 ml. Para los edulcorantes de mesa se aplicará un límite de 0,4 kcal (1,7 kJ) por porción, con propiedades edulcorantes equivalentes a 6 g de sacarosa (una cucharadita de sacarosa aproximadamente).

Bajo contenido en grasa

Solamente podrá declararse que un alimento posee un bajo contenido de grasa, así como efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si el producto no contiene más de 3 g de grasa por 100 g en el caso de los sólidos o 1,5 g de grasa por 100 ml en el caso de los líquidos (1,8 g de grasa por 100 ml para la leche semidesnatada).

Sin grasa

Solamente podrá declararse que un alimento no contiene grasa, así como efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si el producto no contiene más de 0,5 g de grasa por 100 g o 100 ml. No obstante, se prohibirán las declaraciones expresadas como «X % sin grasa».

Bajo contenido de grasas saturadas

Solamente podrá declararse que un alimento posee un bajo contenido de grasas saturadas, así como efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si la suma de AGS y de AGT en el producto no es superior a 1,5 g/100 g para los productos sólidos y a 0,75 g/100 ml para los productos líquidos, y en cualquier caso la suma de AGS y de AGT no deberá aportar más del 10 % del valor energético.

Sin grasas saturadas

Solamente podrá declararse que un alimento no contiene grasas saturadas, así como efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si la suma de grasas saturadas y de AGT no es superior a 0,1 g por 100 g o 100 ml.

Bajo contenido en azúcares

Solamente podrá declararse que un alimento posee un bajo contenido de azúcares, así como efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si el producto no contiene más de 5 g de azúcares por 100 g en el caso de los sólidos o 2,5 g de azúcares por 100 ml en el caso de los líquidos.

Sin azúcares

Solamente podrá declararse que un alimento no contiene azúcares, así como efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si el producto no contiene más de 0,5 g de azúcares por 100 g o 100 ml.

Sin azúcares añadidos

Solamente podrá declararse que no se han añadido azúcares a un alimento, así como efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si no se ha añadido al producto ningún monosacárido ni disacárido, ni ningún alimento utilizado por sus propiedades edulcorantes. Si los azúcares están naturalmente presentes en los alimentos, en el etiquetado deberá figurar asimismo la siguiente indicación: «CONTIENE AZÚCARES NATURALMENTE PRESENTES».

Bajo contenido de sodio/sal

Solamente podrá declararse que un alimento posee un bajo contenido de sodio/sal, así como efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si el producto no contiene más de 0,12 g de sodio, o el valor equivalente de sal, por 100 g o por 100 ml. Por lo que respecta a las aguas distintas de las aguas minerales naturales cuya composición se ajuste a las disposiciones de la Directiva 80/777/CEE, este valor no deberá ser superior a 2 mg de sodio por 100 ml.

Muy bajo contenido de sodio/sal

Solamente podrá declararse que un alimento posee un contenido muy bajo de sodio/sal, así como efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si el producto no contiene más de 0,04 g de sodio, o el valor equivalente de sal, por 100 g o por 100 ml. Esta declaración no se utilizará para las aguas minerales naturales y otras aguas.

Sin sodio o Sin sal

Solamente podrá declararse que un alimento no contiene sodio o sal, así como efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si el producto no contiene más de 0,005 g de sodio, o el valor equivalente de sal, por 100 g.

Fuente de fibra

Solamente podrá declararse que un alimento es fuente de fibra, así como efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si el producto contiene como mínimo 3 g de fibra por 100 g o, como mínimo, 1,5 g de fibra por 100 kcal.

Alto contenido de fibra

Solamente podrá declararse que un alimento posee un alto contenido de fibra, así como efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si el producto contiene como mínimo 6 g de fibra por 100 g o 3 g de fibra por 100 kcal.

Fuente de proteínas

Solamente podrá declararse que un alimento es fuente de proteínas, así como efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si las proteínas aportan como mínimo el 12 % del valor energético del alimento.

Alto contenido de proteínas

Solamente podrá declararse que un alimento posee un alto contenido de proteínas, así como efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si las proteínas aportan como mínimo el 20 % del valor energético del alimento.

Fuente de vitaminas y/o minerales

Solamente podrá declararse que un alimento es una fuente de vitaminas y/o minerales, así como efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si el producto contiene como mínimo una cantidad significativa tal como se define en el Anexo de la Directiva (CE) 496/1990 o una cantidad establecida por las excepciones concedidas en virtud del artículo 6 del Reglamento (CE) no 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre de 2006, [sobre la adición de vitaminas, minerales y otras determinadas sustancias a los alimentos].

Alto contenido de vitaminas y/o minerales

Solamente podrá declararse que un alimento posee un alto contenido de vitaminas y/o minerales, así como efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si el producto contiene como mínimo dos veces el valor de la «fuente de [NOMBRE DE LAS VITAMINAS] y/o [NOMBRE DE LOS MINERALES]».

Contiene....

Solamente podrá declararse que un alimento contiene un nutriente u otra sustancia, para los que no se establezcan condiciones específicas en el Reglamento 1924/2006, así

como efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si el producto cumple todas las disposiciones aplicables previstas en el Reglamento 1924/2006, y en particular en el artículo 5. Por lo que respecta a las vitaminas y minerales, se aplicarán las condiciones correspondientes a la declaración «fuente de».

Mayor contenido de...

Solamente podrá declararse que se ha incrementado el contenido de uno o más nutrientes, distintos de vitaminas o minerales, así como efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si el producto cumple las condiciones previstas para la declaración «fuente de» y el incremento de su contenido es de, como mínimo, el 30 % en comparación con un producto similar.

Contenido reducido de...

Solamente podrá declararse que se ha reducido el contenido de uno o más nutrientes, así como efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si la reducción del contenido es de, como mínimo, el 30 % en comparación con un producto similar, excepto para micronutrientes, en los que será admisible una diferencia del 10 % en los valores de referencia establecidos en la Directiva (CE) 496/1990, así como para el sodio, o el valor equivalente para la sal, en que será admisible una diferencia del 25 %.

Light/Lite/Ligero

Las declaraciones en las que se afirme que un producto es «light» o «lite» (ligero), y cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor,

deberán cumplir las mismas condiciones que las establecidas para el término «contenido reducido»; asimismo, la declaración deberá estar acompañada por una indicación de la característica o características que hacen que el alimento sea «*light*» o «*lite*» (ligero).

Naturalmente/Natural

Cuando un alimento reúna de forma natural la condición o las condiciones establecidas en el presente Anexo para el uso de una declaración nutricional, podrá utilizarse el término «naturalmente/natural» antepuesto a la declaración.

Además de estas declaraciones, fueron establecidas recientemente por el Reglamento 116/2010, las siguientes declaraciones nutricionales relativas a la calidad de la grasa del producto:

Fuente de ácidos grasos Omega-3

Solamente podrá declararse que un alimento es fuente de ácidos grasos *n-3* o efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si el producto contiene al menos 0,3 g de ácido α -linolénico por 100 g y por 100 kcal, o al menos 40 mg de la suma de EPA y DHA por 100 g y por 100 kcal.

Alto contenido de ácidos grasos Omega-3

Solamente podrá declararse que un alimento tiene un alto contenido de ácidos grasos *n-3* o efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si el producto contiene al menos 0,6 g de ácido α -linolénico por 100 g y por 100 kcal, o al menos 80 mg de la suma de EPA y DHA por 100 g y por 100 kcal.

Alto contenido de grasas monoinsaturadas

Solamente podrá declararse que un alimento tiene un alto contenido de grasas monoinsaturadas o efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si al menos un 45 % de los ácidos grasos presentes en el producto proceden de grasas monoinsaturadas y las grasas monoinsaturadas aportan más del 20 % del valor energético del producto.

Alto contenido de grasas poliinsaturadas

Solamente podrá declararse que un alimento tiene un alto contenido de grasas poliinsaturadas o efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si al menos un 45 % de los ácidos grasos presentes en el producto proceden de grasas poliinsaturadas y las grasas poliinsaturadas aportan más del 20 % del valor energético del producto.

Alto contenido de grasas insaturadas

Solamente podrá declararse que un alimento tiene un alto contenido de grasas insaturadas o efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si al menos un 70% de los ácidos grasos presentes en el producto proceden de grasas insaturadas y las grasas insaturadas aportan más del 20% del valor energético del producto.

1.1.8. Declaraciones de propiedades saludables en los alimentos

Se entiende por “declaración de propiedades saludables” cualquier declaración que afirme, sugiera o dé a entender que existe una relación entre una categoría de alimentos, un alimento o uno de sus constituyentes y la salud. En el art 13 del Reglamento 1924/2006 se regulan las declaraciones de propiedades saludables distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y salud de los niños. Se incluyen aquí las que se refieren a:

- la función de un nutriente o de otra sustancia en el crecimiento, el desarrollo y las funciones corporales.
- las funciones psicológicas y comportamentales.
- Al adelgazamiento, control de peso, aumento de la sensación de saciedad o a la reducción del aporte energético de la dieta.

Por otra parte, las normas europeas ya mencionadas anteriormente establecen que sólo se permitirá el uso de las alegaciones de propiedades saludables científicamente probadas, después de ser evaluadas por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), y que ésta haya dado su aprobación expresa a las declaraciones propuestas por las empresas.

Se prohíben las alegaciones de salud que no sean claras, precisas y basadas en evidencias científicas. En estos casos la UE publicará una lista de los productos que incumplan la regulación, y en un plazo de 18 meses se aplicará la medida correctora correspondiente, en el caso de que los productos que contengan las alegaciones no conformes a las normas ya hayan sido comercializadas con la alegación o declaración en su etiquetado o publicidad.

Asimismo, el Reglamento 1924/2006 también establece que se autorizarán las alegaciones de salud específicas científicamente demostradas y no se permitirá el uso de términos amplios y ambiguos que hagan alusión a beneficios sobre el bienestar general, y establece un procedimiento regulado para las solicitudes de autorización.

Según lo descrito en este procedimiento, cada empresa debe solicitar a la autoridad nacional competente (en el caso de nuestro país la AESAN), la autorización de la declaración de propiedades saludables que quiera incluir en su producto (Figura 7). Esta autoridad nacional (AESAN), será la encargada de vehicular dicha solicitud a la EFSA tanto la solicitud presentada como la información complementaria presentada por el solicitante.

Una vez recibida la solicitud por parte de la EFSA, ésta, informará sin demora a la Comisión y a los otros estados miembros de la Unión toda la documentación recibida y a disposición del público un resumen de la misma.

Una vez evaluada la solicitud por parte de la EFSA, lo cual debe realizarse en un plazo de cinco meses, emitirá su dictamen, o bien requerirá al solicitante para que presente información adicional en el caso de que tenga dudas acerca del dictamen a emitir. El dictamen a emitir por parte de la EFSA, se emitirá en función de un meta-análisis de toda la información científica disponible hasta el momento de la recepción de la solicitud.

A fin de preparar su dictamen, la EFSA verificará que la redacción propuesta de la declaración de propiedades saludables se fundamenta en propiedades científicas, así como se ajusta a todos los criterios explicados anteriormente acerca de que no debe resultar confusa, etc.

Posteriormente, la EFSA remitirá la misma a la Comisión, a los otros estados miembros y al propio solicitante, un informe acerca de su decisión y la información en

la que se basa dicho informe. Posteriormente la EFSA hará pública su decisión y el solicitante podrá realizar las alegaciones que considere oportunas.

Posteriormente, basado en ese dictamen y en la opinión de un comité especial designado al efecto, la Comisión será la encargada de informar al solicitante de su autorización y de publicar su decisión en el Diario Oficial de la Unión Europea.

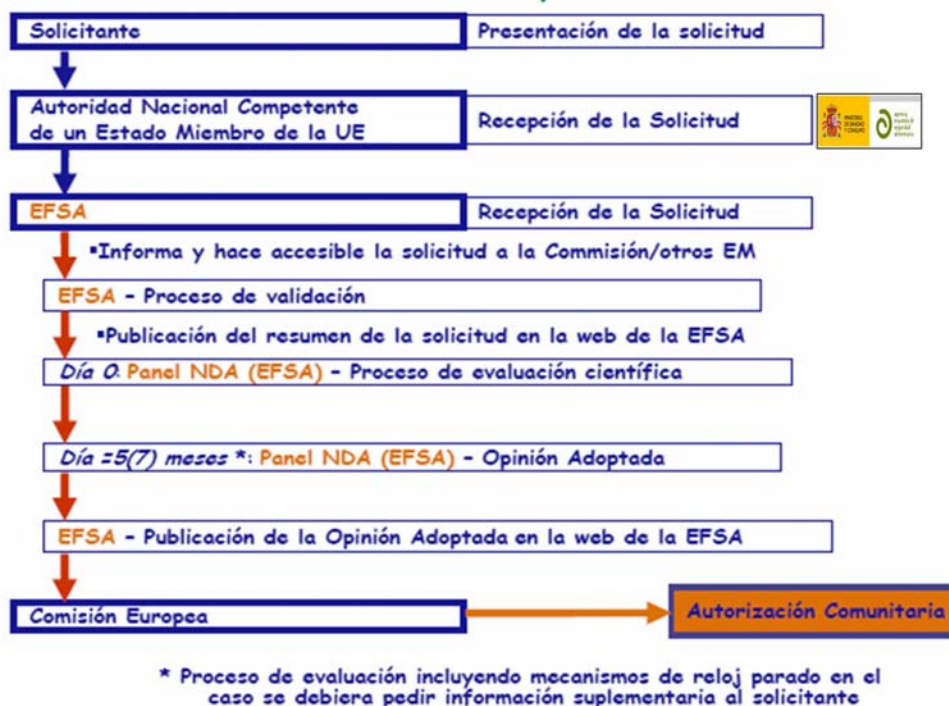


Figura 7: Esquema del proceso de solicitud, evaluación y autorización de las declaraciones de propiedades saludables (*health claims*).

Para ilustrar el procedimiento, se exponen algunos ejemplos de alegaciones de salud aceptadas y denegadas:

Ejemplo de declaración estimada:

Nutriente: Ácido α -linolénico y ácido linoleico.

Declaración solicitada: Los ácidos grasos esenciales son necesarios para el crecimiento y el desarrollo normales de los niños.

Decisión adoptada: Aceptada.

Condiciones o limitaciones impuestas: debe informarse al consumidor de que el efecto beneficioso se obtiene con una ingesta diaria de 2 g de ácido α -linolénico y con una ingesta diaria de 10 g de ácido linoleico.

Legislación aplicada: Reglamento 376/2010 de la Comisión, del 3 de mayo de 2010.

Ejemplo de alegación desestimada:

Nutriente: Té negro elaborado a partir de *Camellia sinensis*.

Declaración solicitada: El té negro le ayuda a concentrarse.

Decisión adoptada: Rechazada.

Motivo: No cumple las normas en tanto que, sobre la base de la evidencia presentada en el dossier, no se ha establecido una relación causa-efecto entre el consumo del alimento al que se refiere la declaración y el efecto que se declara.

Legislación aplicada: Reglamento 1025/2009 de la Comisión, del 29 de octubre de 2009.

1.1.9. Importancia de la calidad del aceite de fritura en el perfil lipídico de la grasa de los alimentos empanados.

La creciente tendencia en los países desarrollados a destinar cada vez menos tiempo a la preparación de los alimentos ha provocado un gran aumento en la demanda de productos congelados precocinados (Haizam y col., 2008). De este modo, hoy en día ese tipo de productos han alcanzado una gran tasa de penetración entre la población de las áreas urbanas de los países desarrollados (Varela y col., 2008).

Habitualmente, estos productos se encuentran en el mercado pre-fritos, y su composición nutricional declarada en el etiquetado se refiere a la composición del alimento tal y como éste se encuentra en el mercado. No obstante, cuando estos alimentos son posteriormente preparados por el consumidor (en la mayor parte de los casos mediante un proceso de fritura doméstica) se producen cambios significativos en su composición y propiedades nutricionales (Weber y col., 2008). Durante dicho procedimiento, el aceite de fritura se convierte en un importante ingrediente del alimento cocinado debido a la pérdida de agua del producto y a la penetración de grasa dentro de dicho alimento, principalmente reemplazando el espacio dejado por el agua del alimento al evaporarse (Varela y Ruiz Rosso, 2000; Ramírez y Col., 2005). De este modo, la grasa culinaria absorbida por el alimento durante el proceso de fritura puede llegar a suponer entre un 30-40% del peso total del producto (Houhoula y col., 2003; Mellena, 2003), y además de cambiar la composición nutricional del alimento cocinado, también puede modificar sustancialmente el perfil de ácidos grasos del alimento frito tal cual sale de la industria (Ramírez y col., 2005). Así, cualquier propiedad nutricional que el fabricante del producto pretenda incluir en el mismo (como un bajo contenido en grasa o un alto contenido en ácidos grasos *n*-3), podría verse inutilizado en el caso de que el consumidor cocine dicho producto de forma inadecuada

La composición final de los alimentos fritos depende así de numerosos factores además de la composición inicial del alimento, tales como la temperatura y el tiempo de fritura, el peso del alimento o el volumen del mismo, y el tipo y condiciones fisico-químicas del aceite de fritura utilizado por el consumidor (Sánchez Gimeno y col., 2008).

Además, es también conocido que durante el proceso de fritura, se produce una degradación térmica y oxidativa del aceite empleado en dicho proceso. Aunque se han

propuesto muchos índices para evaluar la calidad del aceite, el contenido en compuestos polares está considerado como el más fiable (Warner y Gupta, 2003), y se ha adoptado como método oficial. Estos compuestos polares comprenden diversos tipos de compuestos, tales como dímeros y polímeros de triglicéridos, productos de monómeros oxidados, así como mono- y diglicéridos y ácidos grasos libres formados mediante hidrólisis de los triglicéridos. Estos compuestos resultantes son fácilmente absorbibles por el alimento y presentan a menudo fenómenos de toxicidad (Márquez Ruiz y Dobarganes, 1996), además de disminuir la aceptabilidad por parte del consumidor debido a alteraciones organolépticas (Galeone y Col., 2006).

La acumulación de estos compuestos en los alimentos fritos ha sido estudiada previamente con resultados dispares. Algunos autores (Houhoula y col., 2003; Romero y col., 2007) concluyeron que las concentraciones de productos polares en la grasa del alimento y el aceite resultante son similares, mientras que otros estudios encontraron que la grasa extraída de los alimentos tiende a acumular una concentración de compuestos polares mayor que el aceite en el cual dicho alimento fue cocinado (Sánchez Muñiz, 2006). Para prevenir especialmente la acumulación de compuestos tóxicos en el alimento, se ha establecido como criterio de aceptabilidad del aceite empleado para la preparación de los alimentos, un límite cuantitativo para el nivel de compuestos polares en el aceite de fritura del 25% (Orden de 26 de Enero de 1989). No obstante, existe todavía un déficit marcado en lo referente a la realización de ensayos enfocados hacia la determinación de la influencia de la calidad del aceite de fritura doméstico (medido mediante la concentración de compuestos polares) en el contenido en grasa y el perfil lipídico de los alimentos precocinados congelados.

1.1.10. Efectos de la pre-fritura industrial y del cocinado doméstico en la composición nutricional y el perfil lipídico de los alimentos

En las dos últimas décadas, los productos congelados empanados se han hecho muy populares en los países occidentales (Varela y col., 2008). Este tipo de productos normalmente se cocinan mediante fritura en inmersión, lo cual hace que el aceite empleado en la fritura penetre en el alimento (Varela y Ruiz-Rosso, 2000; Ramirez y col., 2005) y se convierta en un importante ingrediente del producto final (puede llegar a representar 1/3 en peso del producto final). De este modo, como consecuencia de esta penetración del aceite, los productos, sufren importantes modificaciones en su composición nutricional durante su proceso de cocinado doméstico (Weber y col., 2008).

Como ya hemos visto en apartados anteriores, en los países occidentales la mayor parte de la población lleva una dieta inadecuada en lo que se refiere a la cantidad (exceso) y calidad (demasiados AGS y AGPI *n*-6) de la grasa alimentaria. Asimismo, también hemos comentado que una dieta con estas características está directamente relacionada con las altas tasas de obesidad y enfermedades coronarias que existe en estos países (Mata, Alonso, & Mata, 2002; Mellema, 2003; Ramírez & Cava, 2005).

Como consecuencia, en la última década se ha realizado un importante esfuerzo por parte de las empresas fabricantes de este tipo de alimentos encaminado a reducir el contenido en grasa de los alimentos precocinados (Altunakar, Sahin, & Sumnu, 2004; Mellema, 2003; Salvador, Sanz, & Fiszman, 2005), así como a producir alimentos con un perfil lipídico más saludable mediante la utilización de aceites de alto valor nutricional en la pre-fritura de los productos (Garg y col., 2006; Simopoulos y col., 1999). No obstante, en la literatura científica existen datos contradictorios acerca de la

influencia real del proceso de pre-fritura en la calidad nutricional final del producto, así como de cuál es el mejor método para cocinar este tipo de productos de manera que se combine la obtención de alimentos con mayor calidad nutricional con una adecuada aceptabilidad por parte del consumidor a los mismos. Es por este hecho que se considera de sumo interés la realización durante la presente tesis doctoral de un ensayo encaminado a dilucidar estas dudas.

1.2. Alergias alimentarias. Perspectiva actual.

Las alergias alimentarias representa una forma especial de las reacciones adversas a alimentos que se caracteriza por una respuesta inmune anormal de algunos individuos frente a las proteínas de alimentos que son perfectamente tolerados por la mayor parte de la población. No obstante, el término “alergia alimentaria” se ha utilizado abusivamente, aplicándola de forma incorrecta a cualquier reacción adversa a un alimento o aditivo alimentario. Las reacciones alérgicas a alimentos deben distinguirse de las reacciones de intolerancia alimentaria y de las reacciones tóxicas por alimentos (Johansson y col., 2003) (Tabla 3).

La intolerancia alimentaria es una forma de reacción adversa a un alimento o un aditivo alimentario en cuya patogenia no existe o no se ha demostrado, a diferencia de la alergia alimentaria, un mecanismo de base inmunológica. Por su parte, las reacciones tóxicas ocasionadas por alimentos (intoxicaciones alimentarias) comprenden aquellas enfermedades vehiculadas por alimentos y producidas por los agentes químicos o biológicos contenidos en los mismos. Su principal característica es que cualquier persona puede ser susceptible a sufrir intoxicación por estos productos.

Estos dos últimos síntomas se caracterizan por ser dosis-dependientes, es decir, las manifestaciones clínicas que producen son tanto más intensas cuanto mayor sea la cantidad de alimento o aditivo alimentario ingerido. No obstante, esta relación dosis-respuesta puede no existir en las alergias alimentarias, del tal manera que, en algunas de estas situaciones de alergia mediada por IgE, dosis muy pequeñas pueden dar lugar a una respuesta clínica exagerada, muchas veces imprevisible (AESAN, 2007b).

Tabla 3. Diferencias y similitudes entre reacciones alérgicas, reacciones de intolerancia y reacciones tóxicas a alimentos.

	Alergia	Intolerancia	Toxicidad
Dependencia de factores del individuo	(+)	(+)	(-)
Dependencia de factores del alimento	(-)	(-)	(+)
Patogenia	Inmunológica	Diversa, no inmunológica	
Ejemplos	Urticaria	Intol. Lactosa	Escombroidosis
	Anafilaxia	Favismo	Latirismo
	Enteropatías	Galactosemia	Botulismo
	Colitis	Fenilcetonuria	Síndrome aceite tóxico

Fuente: AESAN, 2007b.

1.2.1. Aspectos clínicos de la alergia alimentaria

Los síntomas clínicos de la alergia alimentaria son múltiples. Estos síntomas dependen de la especificidad del antígeno, de la predisposición genética del individuo y de otros factores, como la edad de la persona y del lugar donde tenga lugar la exposición al antígeno (el tracto digestivo es uno de los órganos diana de la alergia alimentaria, pero no el único) (Gil, 2010).

Asimismo, los síntomas clínicos también varían en función de los mecanismos patogénicos implicados (anticuerpos contra las IgE, inmunidad mediada por las células T, sistema del complemento). De este modo, si la sintomatología asociada a la reacción alérgica aparece en las primeras dos horas tras la ingestión del alimento desencadenante se considera que estamos ante una reacción inmediata, que son en su mayoría mediadas por IgE. Las alergias alimentarias en su gran mayoría pertenecen a este grupo, y pueden llegar a darse simplemente tras tocar u oler el alimento al que el consumidor presenta susceptibilidad. En el caso de que los síntomas aparezcan cuando hayan transcurrido más de dos horas de la ingestión del alimento desencadenante, se habla de *reacciones retardadas*, que son mayoritariamente desencadenadas por otros mecanismos diferentes (Pascual y col., 2002; Gil, 2010).

Aunque es raro que este tipo de alergias sean provocadas por alimentos, si pueden llegar a darse en ciertas situaciones como la dermatitis atópica, que puede ser tanto producida como agravada por los alimentos ingeridos, o la enterocolitis inducida por proteínas alimentarias que puede estar provocado tanto por la ingesta de proteínas lácteas como procedentes de otros alimentos sólidos, tales como soja o pescado (Crespo y col., 1995).

Las reacciones adversas más comunes son, por orden de frecuencia, los síntomas cutáneos como el prurito y la urticaria, seguidos por los síntomas digestivos como el dolor abdominal, vómitos y diarrea, y más esporádicamente, los síntomas respiratorios. Aunque son menos frecuentes, tienen una especial relevancia los casos de afectación multisistema con implicación circulatoria (choque anafiláctico), que puede llegar a ser mortal (Fernández y col., 1995; Codreanu y col., 2008).

Cuando una persona ha sido diagnosticada como alérgico a un alimento determinado, el tratamiento de eliminación del o de los alimentos responsables parece fácil económico y cómodo de llevar a cabo, pero muy difícil de conseguir en la vida real (Nowak-Wegrzyn, 2001), por lo que la aparición de episodios agudos por ingestión accidental es frecuente (Yu y col., 2006). Tampoco son infrecuentes la aparición de reacciones alérgicas por contaminación a través de instrumentos de cocina, equivocación de cubiertos, confusión con servilletas, etc. Todos estos factores motivan una atención continua y altamente estresante por parte tanto de los consumidores que parecen alergias alimentarias, como de las personas que conviven con ellas (Teufel y col., 2007)

Así pues, ante un caso conformado de alergia a un alimento o aditivo determinado, es necesario:

- 1) la eliminación del alimento responsable y de otros alimentos con reacción cruzada conocida en los que se haya comprobado que producen síntomas.
- 2) 2) Educación del paciente y su familia, acerca de la dieta de eliminación y posibles fuentes ocultas para evitar su ingestión accidental.
- 3) Tratamiento de los síntomas ante su ingestión accidental.
- 4) Pueden ser necesarios consejos nutricionales o buscar alternativas gastronómicas para evitar dietas monótonas.

1.2.2. Epidemiología de las alergias alimentarias

En contraste con la idea arraigada entre los profanos e, incluso, entre algunos médicos, es probable que la alergia alimentaria constituya sólo una parte cuantitativamente muy pequeña del conjunto de las reacciones adversas a alimentos (AESAN, 2007b). Aún así, la alergia a alimentos afecta a un número importante de niños y adultos en los países industrializados (2-10% de la población), y, al igual que sucede con otras enfermedades alérgicas, su prevalencia parece estar en aumento (Osterballe y col., 2005; Rona y col., 2007).

La mayoría de las alergias alimentarias suelen presentarse durante los dos primeros años de vida, si bien dado que algunos alimentos (como algunos frutos secos y los crustáceos) suelen introducirse en la dieta a edades más tardías, su aparición es también más tardía. Las alergias en la edad infantil presentan una gran variabilidad, incluso para aquellos alimentos que se consumen de manera habitual durante la infancia. En concreto, en España la prevalencia de alergias a proteínas lácteas durante la infancia oscilan entre diversos trabajos realizados entre un 0,5 y un 7,5% sobre el total de la población infantil.

En la mayor parte de los países desarrollados la alergia alimentaria es la mayor causa de ingresos hospitalarios de urgencia por reacciones anafilácticas. Y es una constante que la mayor parte de dichos ingresos son provocados por ingestiones inadvertidas del alimento al que el individuo presentaba susceptibilidad. Es, por desgracia habitual que existan ingredientes potencialmente causantes de alergias alimentarias ocultos en ciertos alimentos, tales como salsas y productos de repostería, heladería, etc. E incluso también como parte de medicamentos (normalmente como

excipiente), y muy especialmente en productos medicinales naturistas y productos de parafarmacia.

1.2.3. Principales alimentos responsables de alergias alimentarias

En total se han documentado casi 200 alimentos diferentes como posibles causas de alergia alimentaria. La frecuencia con la que cada uno de estos alimentos origina reacciones alérgicas varía mucho entre los distintos países, fundamentalmente debido a los diferentes hábitos nutricionales. En España, en la edad infantil, el huevo (proteínas de la clara) es el alergeno alimentario más frecuente, seguido de la leche de vaca y de los pescados (Crespo y col., 1995). Después de esa edad predominan las sensibilizaciones a vegetales, como frutos secos, frutas frescas, leguminosas y hortalizas, y también hacia los crustáceos (Figura 8). Es también frecuente encontrar en estos pacientes una sensibilización a pólenes (Kanny y col., 2001).



Figura 8. Imagen de los alimentos más frecuentemente implicados en casos de alergias alimentarias en España. Fuente: AESAN

Dentro de los alimentos responsables de alergias alimentarias tenemos alimentos de origen animal, como la leche de vaca, el huevo, el pescado y los moluscos y crustáceos,

también originan problemas de alergias alimentarias una gran variedad tanto de verduras como de especias, y finalmente hay también alérgenos que si bien no forman parte de los alimentos, también juegan un papel muy importante dentro de las alergias alimentarias ya que habitualmente llegan al consumidor e través de los alimentos. Entre éstos, cabe destacar, por ser los más habituales el látex, los *anisakis* presentes en el pescado, los ácaros o los residuos de medicamentos empleados en los animales productores de alimentos (AESAN, 2007b). También son especialmente relevantes las alergias a algunos aditivos alimentarios, que son utilizados de manera muy frecuente por parte de las industrias que producen alimentos precocinados. Dentro de éstos nos merece una especial atención el caso de los sulfitos, denominación bajo la cual se incluyen numerosas moléculas diferentes que contienen un átomo de azufre y que se utilizan como antimicrobianos y antioxidantes en una amplia variedad de alimentos elaborados (e incluso en algunos no elaborados como son los productos de la pesca).

1.2.4. Alérgenos de origen animal

Leche de vaca

Aunque se ha demostrado que la leche de varios mamíferos causa reacciones alérgicas, la más frecuente y mejor estudiada es la leche de vaca. En la especie humana, la leche de vaca, o una fórmula derivada, suele ser el primer alimento, después de la leche materna, que el individuo recibe en cantidades importantes. Esto quiere decir que también es el primer antígeno alimentario con que el ser humano entra en contacto de forma conocida. Por ello, no es de extrañar que, en la primera infancia, sea el alimento que produce mayor número de reacciones adversas. En España, los datos de incidencia de alergia inmediata a proteínas de leche de vaca en lactantes oscilan entre el 0,4 y el

1,9 por 100 (Sanz y col., 2001) (García Ara y col., 2003).

Los principales componentes alergénicos se encuentran en las proteínas séricas de la leche de vaca (particularmente, beta-lactoglobulina, alfa-lactalbúmina y, en menor grado, seroalbúmina bovina) y en las caseínas (alfa, beta y kappa) (AESAN, 2007b)

Huevo

El huevo es un alimento ampliamente consumido y la primera causa de reacciones alérgicas en la infancia (Crespo y col., 1995). El principal alérgeno del huevo es el ovomucoide (Bernhisel-Broadbent y col., 1994), cuya principal característica es su extrema resistencia a la degradación por proteasas y la termoestabilidad, por lo que resulta alergénico en cantidades mínimas, y los tratamientos culinarios prácticamente no afectan a su alergenicidad.

Además, los componentes del huevo se emplean con distintos fines industriales como, por ejemplo, la lisozima en productos bactericidas en la industria alimentaria o en medicamentos y la lecitina como emulsionante, prácticas que pueden implicar riesgos para los pacientes alérgicos, ya que podemos encontrarlos con estos ingredientes en muchos productos alimenticios en los cuales a priori no esperaríamos que estuviese presente.

Pescado

La alergia a pescado es relativamente frecuente en países donde su consumo es elevado, como Japón, países escandinavos o España, en donde el consumo de pescado alcanza actualmente los 80 g/día. Las especies de pescados involucradas con mayor frecuencia en las reacciones alérgicas son los gadiformes (bacalao, merluza) y los pleuronectiformes (lenguado, gallo). Los que están implicados de manera menos

frecuente el salmón, los clupeiformes (sardina, boquerón) y el atún (Pascual y col., 1992). El primer alérgeno purificado y bien caracterizado de los pescados fue el *Gad c1*, que se encuentra en el bacalao (*Gadus callarias*) (Aas, 1966).

La similitud estructural de las parvalbúminas de los diferentes pescados hace que en los pacientes sensibilizados se presenten con gran frecuencia reacciones cruzadas entre diferentes especies de pescado (Pascual y col., 1992). Sin embargo, las diferencias existentes hacen que su importancia no sea igual en todas las especies de pescado, ya que se por ejemplo en los túnidos es menos frecuente la existencia de reacciones cruzadas que en los gadiformes.

Crustáceos y moluscos

Los crustáceos han sido reconocidos como una causa común de reacciones de hipersensibilidad por alimentos. Sus alérgenos son muy termoestables, y además, ha sido descrita la existencia de reactividad cruzada entre diferentes especies de crustáceos y en menor grado, con otros alérgenos presentes en insectos y ácaros (*Dermatophagoides* spp.) (AESAN, 2007b).

Los moluscos pueden ser gasterópodos como los caracoles, bivalvos como almejas, mejillones, ostras y cefalópodos como pulpo, calamar y sepia. Se han descrito alérgenos específicos de ostra y mejillón. El alérgeno más relevante parece ser, al igual que en el caso de los crustáceos, la tropomiosina, y en muchas ocasiones se asocian ambas sensibilizaciones y son también frecuentes las reacciones cruzadas (Leung y col., 1996).

1.2.5. Alergenos de origen vegetal

Legumbres

Las principales especies de legumbres responsables de reacciones alérgicas (lenteja, guisante, garbanzo, cacahuete, soja y altramuza) pertenecen a la familia *Papilionaceae*. Este grupo de vegetales son, tras el huevo, los alergenos alimentarios que con mayor frecuencia causan alergia inmediata en el niño en nuestro país y los países del arco mediterráneo (Pereira y col., 2002).

De entre todos ellos, el cacahuete (*Arachis hypogaea*) es responsable de muchas reacciones alérgicas graves, cuya frecuencia no sólo se ha incrementado en los últimos años, sino que también su aparición se hace más precoz, en parte debido al aumento de su consumo, ya sea como tal, incluido en diversos aperitivos o como aceite. Además, el cacahuete también es utilizado en la industria alimentaria como aditivo, lo que supone un riesgo para los pacientes alérgicos ya que pequeñas dosis son capaces de inducir manifestaciones graves (Beyer y col., 2001).

El cacahuete es el principal alergeno alimentario en USA, y la primera causa de anafilaxia. En Europa, más concretamente en países anglosajones, su importancia alérgica está aumentando en los últimos años por la similitud del patrón alimentario con EE.UU., debido tanto a los cambios en los hábitos dietéticos (aumento del consumo de comida rápida, inmigración y sus diferentes costumbres dietéticas), como a su papel como alergeno oculto. Se ha visto que el tueste aumenta su alergenidad, posiblemente debido a modificaciones de la estructura molecular o de la función enzimática (Beyer y col., 2001).

En el cacahuete se han identificado varios alergenos principales en pacientes sensibilizados. El alergeno *Ara h1* es una glicoproteína de 63,5 kDa que tiene gran

homología con las vicilinas (proteínas de almacenaje presentes en las semillas de muchas plantas). Este hecho podría explicar la amplia reactividad cruzada inmunológica existente entre el cacahuete y las distintas leguminosas.

Con respecto a la soja (*Glycine max*), al igual que en el caso del cacahuete, en los últimos años se ha incrementado notablemente su consumo en nuestra sociedad, ya sea como base de formulaciones sustitutivas de la leche, como fuente de proteínas o como ingrediente con potencial carácter funcional (como es el caso de las isoflavonas de la soja). La soja puede encontrarse en pan, pasteles, helados, cereales de desayuno, sopas de sobre, atún enlatado, perritos calientes, salsas, comida china, etc. También, su empleo en fórmulas dietéticas se ha considerado como posible causa de sensibilización en lactantes (Cordle, 2004) (Martín Esteban, 2006). Con respecto a los alérgenos que contiene, cabe señalar que las fracciones con peso molecular 13-14 kDa y 22-25 kDa han demostrado ser los alérgenos más potentes tanto por vía inhalatoria como por vía digestiva (González y col., 1995).

La lenteja, (*Lens sculenta*) es la legumbre más consumida en España, y por lo tanto las que con mayor frecuencia causan hipersensibilidad mediada por IgE, seguidas, en segundo lugar, por el garbanzo (Pereira y col., 2002). Las fracciones proteicas presentes en la lenteja capaces de producir respuesta inmune son múltiples y por ello es frecuente que se presenten con gran frecuencia casos de reacción cruzada. Otras legumbres que también son potenciales causas de alergia alimentaria son el garbanzo (*Cicer arietinum*), las judías (*Phaseolus vulgaris*) el altramuz (*Lupinus sativus*) y el guisante (*Pisum sativum*).

Cereales

Dentro de los cereales, los que con mayor frecuencia causan reacciones alérgicas en los consumidores son el trigo, la cebada y el centeno. A pesar de considerarse alergias alimentarias, la vía por la cual su contacto resulta más peligroso es la vía inhalatoria, y no la ingestión oral (Houba y col., 1998). Al ser un grupo de alimentos amplio, la cantidad de alérgenos que pueden ocasionar reacciones alérgicas es igualmente amplio.

Gluten

Se entiende por “gluten” una fracción de las proteínas procedentes de trigo, centeno, cebada, y avena, o sus variedades cruzadas y respectivos derivados y que es insoluble en agua y en ClNa 0,5 M. Según sus secuencias de aminoácidos, las gliadinas (fracciones proteicas) se subdividen en alfa, gamma y omega-gliadinas y son ricas en prolina y glutamina. Estas fracciones proteicas denominadas gliadinas son nocivas para determinados individuos y su ingesta desencadena en ellos la enfermedad celíaca o celiaquía. Suele decirse que estos consumidores presentan “sensibilidad al gluten”.

Frutas y hortalizas

En el área mediterránea las frutas son una causa frecuente de alergia a alimentos, particularmente del síndrome de alergia oral. Sólo se han identificado en estudios clínicos unas pocas especies como causa de alergia mediada por IgE. Las familias *Rosaceae* (manzana, pera, melocotón, albarcoque, ciruela, cereza) y *Cucurbitaceae* (melón, sandía, pepino, calabaza, calabacín) han recibido especial atención en estudios clínicos, así como el plátano (familia *Musaceae*) y el kiwi (familia *Actinidiaceae*) (AESAN, 2007b).

Entre las hortalizas, la alergia al apio tiene un interés particular, por su facilidad para producir reacciones anafilácticas (Ballmer-Weber y col., 2000), también el tomate es un importante alérgeno en el área mediterránea debido a su gran consumo (Reche y col., 2001). Con respecto al resto de hortalizas, han sido documentados muy pocos casos de sospecha de alergias causadas por este grupo de alimentos. Tan sólo se han confirmado algunos casos de dermatitis alérgicas de contacto causadas por el contacto con lechuga (Franck y col., 2001), pero ninguno en el que se demuestre alergia a esta hortaliza como consecuencia a su ingestión. Además, los alérgenos de frutas y verduras son termolábiles, lo que facilita la tolerancia de individuos sensibilizados tras determinados tratamientos que inactiven sus antígenos.

Frutos secos

Los frutos secos constituyen un grupo muy heterogéneo de alimentos, sin relación botánica entre sí, pero con grandes similitudes alérgicas y formas de consumo. Además, su estabilidad frente al calor y los procesos digestivos favorecen su elevada alérgenicidad, por lo que con frecuencia las reacciones alérgicas son intensas e inmediatas (AESAN, 2007b). La alergia a los frutos secos es una de las alergias alimentarias más frecuentes, aunque su prevalencia varía en función de la edad y la zona geográfica. Se presentan con más frecuencia en niños que en adultos (Ewan, 1996) y, a veces, pueden aparecer ante el primer contacto conocido con el fruto seco.

Sésamo

El *Sesamum indicum* es una planta originaria de África tropical, cuyo cultivo se ha generalizado, para la utilización de sus semillas. Su importancia alérgica es grande en aquellos lugares en los que su consumo es habitual. La prevalencia y gravedad de la

alergia a semilla de sésamo se ha visto incrementada en los últimos años en Europa (Gangur y col., 2005) debido a su introducción procedente de países asiáticos en la dieta, en forma de ingrediente alimentario o aceite, especialmente en productos de panadería, comida rápida, nuevos alimentos y productos vegetarianos. También se utiliza en la industria farmacéutica, en cosméticos o como vehículo de medicamentos de administración intramuscular. Las semillas de sésamo son difíciles de controlar para prevenir la contaminación cruzada, ya que se adhieren fácilmente a la superficie de otros alimentos y a la ropa.

Mostaza

La mostaza es una de las especias más alergénicas de las que se tiene constancia hasta la fecha, tanto por su prevalencia como por la potencia alergénica. Como para otros alimentos alergénicos, la sensibilización depende de los hábitos alimentarios de la población. La mostaza es un condimento habitual que puede encontrarse en salsas variadas y diferentes aliños como curry, mayonesas, vinagretas y Ketchup, o como aromatizante, y a menudo está oculta en alimentos en los que no se da razón de su presencia. En general, su acceso es por ingestión, pero se han descrito casos de alergia a mostaza por inhalación o contacto con la harina molturada (AESAN, 2007b).

1.2.6. Reactividad cruzada entre diversos alérgenos alimentarios

Una de las fuentes más importantes de alérgenos es la contaminación cruzada. El contacto con un alimento en cantidad incluso de trazas supone un grave problema para los pacientes alérgicos. La contaminación cruzada puede deberse a errores en el procesamiento de los alimentos, cuando se añaden ingredientes por error, cuando no se ha

limpiado el equipamiento correctamente o cuando se comparte una misma línea de producción para varios productos. Esta misma contaminación cruzada se puede producir cuando los alimentos son troceados o fileteados con los mismos utensilios que han sido utilizados para los alimentos alergénicos (quesos, carnes, jamón, etc).

Por motivo de las reacciones cruzadas entre antígenos, a menudo se encuentran respuestas IgE a una variedad de alergenos con los que, aparentemente, el individuo no ha tenido relación. Se puede reaccionar frente a un alergeno con clínica de alergia inmediata, sin que haya existido exposición previa al mismo, debido a una sensibilización preexistente a un alergeno altamente homólogo (Pascual y col., 1997a).

Para que aparezca reactividad cruzada, es suficiente que exista una homología proteica superior a un 35 % en una longitud de 80 aminoácidos o al menos identidad en 8 aminoácidos contiguos (Breiteneder y Clare Mills, 2005).

Se han descrito numerosas asociaciones entre sensibilización a distintos alimentos y de éstos con neumoalergenos. Entre los alimentos de origen vegetal, se ha descrito reactividad cruzada entre melón, plátano y polen de ambrosía; apio y polen de artemisa; patata y pólenes de gramíneas; manzana, cereza, pera y melocotón y polen de abedul y kiwi y polen de gramíneas y de abedul. Además, algunos pacientes sensibilizados a látex también reaccionan con aguacate, kiwi, albaricoque, uva, fruta de pasión, piña y castaña (Pascual y col., 2002).

En el caso concreto de los alimentos de origen animal, se ha descrito un panalergeno, la tropomiosina, responsable de la reactividad cruzada entre distintas especies de gamba, camarón, otros crustáceos y posiblemente insectos, arácnidos y parásitos (Pascual y col., 1997). En las parvalbúminas, alergeno principal de las diferentes especies de pescados, la reactividad cruzada supera el 60 %, aunque hay diferencias entre ellas: hay familias como los túnidos que desencadenan una respuesta

alergénica menor, de tal forma que en un tercio de los pacientes alérgicos a pescado esta familia es bien tolerada (Pascual y col. 1992).

La frecuencia con que aparecen sensibilizaciones (prueba cutánea positiva y/o IgE específica elevada) a múltiples alimentos que poseen proteínas homólogas es un problema clínico, muchas veces difícil de resolver. En la Tabla 4 se indica el grado aproximado de probabilidad de que una reactividad cruzada entre diversos alimentos se acompañe también de manifestaciones clínicas, según datos de Sampson (1999) y de Sicherer (2001).



Tabla 4. Riesgo de reactividad cruzada entre alimentos relacionados

Alimento problema	Alimento con posible reacción cruzada	% de riesgo aproximado
Leche de vaca	Carne de vacuno	10 %
Leche de vaca	Leche de cabra	90 %
Leche de vaca	Leche de yegua	4 %
Huevo	Carne de pollo	< 5 %
Carne de vacuno	Carne de cordero	50 %
Un pescado (salmón)	Otros pescados (pez espada, lenguado)	50 %
Un crustáceo (gamba)	Otros crustáceos (langosta, cangrejo)	75 %
Cacahuete	Legumbres	<10 %
Cacahuete	Otros frutos secos	35 %
Un fruto seco	Otros frutos secos	>50 %
Soja	Legumbres	<5 %
Trigo	Otros cereales	25 %
Melocotón	Otras rosáceas	55 %
Melón	Sandía, plátano, aguacate	90 %
Kiwi, aguacate, plátano	Látex	10 %
Látex	Kiwi, aguacate, plátano	35 %
Pólenes	Frutas, hortalizas	50 %

Fuente: AESAN, 2007b.

Debido a este grave problema emergente en nuestra sociedad, desde algunas empresas alimentarias se toman precauciones para evitar por una parte causar un daño físico importante a sus consumidores, y por otra parte, el posible daño económico que como consecuencia de la presencia de un alérgeno no declarado pudiese originar un proceso judicial. Así, estas empresas utilizan en sus productos un etiquetado precautorio con el fin de advertir a los consumidores de la posible presencia de alérgenos en sus productos, debido a contaminación cruzada. Este etiquetado precautorio, que tubo su origen en ciertos países anglosajones como USA, Australia o Reino Unido, puede aparecer de diversas formas, tales como “podría contener trazas de...” “podría contener...” o “elaborado en el mismo lugar que.....”. Este etiquetado precautorio no es a día de hoy obligatorio en nuestra legislación vigente, pero dado los pasos que tanto los legisladores nacionales como comunitarios están ya tomando (véase lo establecido en el Reglamento (CE) 41/2009 para el caso del gluten) es de preveer que no tarde muchos años en hacerse obligatorio para todos aquellos productos que sean susceptibles de sufrir contaminación cruzada con algún alérgeno de etiquetado obligatorio.

Este etiquetado, que no dudamos supondrá un importante coste para las empresas del sector, será no obstante una importante herramienta de seguridad alimentaria, y aportará una información muy útil que aumentaría de manera notable la seguridad alimentaria en los individuos que padecen alergias. Además contribuirá de manera notable a reducir el gasto sanitario del estado al reducir de manera notable las hospitalizaciones de urgencia que ya hemos mencionado anteriormente para los consumidores con shock anafiláctico.

1.2.7. Etiquetado de los alimentos respecto a la posible presencia de alérgenos

Como ya hemos señalado anteriormente, para una persona que sufra de alergia a un alimento evitar el contacto, ya sea directo o indirecto con ese alimento no es a menudo una tarea sencilla. De hecho, la mayor parte de los consumidores que tienen que ser ingresados de urgencia por un shock anafiláctico, ingieren o tienen contacto con el alimento causante de dicho shock de manera inadvertida. Es muy habitual que ingredientes que pueden ser potencialmente causantes de estas graves sintomatologías se encuentren de manera oculta en alimentos en los cuales a priori no cabría pensar en la posibilidad de que estuviesen presentes.

Por este motivo, ya en la norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los alimentos (RD 1334/1999) se empezó a considerar este problema. No obstante, no fue hasta la publicación de la Directiva 2003/89/UE, cuya transposición a la legislación nacional se realizó a través del Real Decreto 2220/2004, cuando se estableció la obligatoriedad de declarar todos aquellos ingredientes alimentarios potencialmente alérgicos.

Estas normas han sido modificadas posteriormente por un buen número de normas, tanto europeas como nacionales, de las cuales las más relevantes son las que se citan a continuación:

-Directiva 2005/26/CE de la Comisión, de 21 de marzo de 2005, por la que se establece una lista de sustancias o ingredientes alimentarios excluidos provisionalmente del anexo III bis de la Directiva 2000/13/CE.

-Directiva 2006/142/CE de la Comisión, de 22 de diciembre de 2006 por la que se modifica el anexo III bis de la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del

Consejo, en el que figura la lista de ingredientes que, en cualquier circunstancia, deben indicarse en el etiquetado de los productos alimenticios (altramuces y moluscos).

-Directiva 2008/5/CE de la Comisión, de 30 de enero de 2008 relativa a la indicación en el etiquetado de determinados productos alimenticios de otras menciones obligatorias distintas de las previstas en la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo.

-Decreto 1245/2008, del 18 de julio, por el que se modifica la norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios, aprobada por el Real Decreto 1334/1999, del 31 de Julio de 1999. Boletín Oficial del Estado, 184: 32976-32981.

-Decreto 36/2008, de 18 de enero, por el que se modifica la norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios, aprobada por el Real Decreto 1334/1999, de 31 de julio, en lo que respecta al etiquetado de determinados productos alimenticios que contienen altramuces y moluscos. Boletín Oficial del Estado, 23, 4980-4981.

-Real Decreto 2220/2004, de 26 de noviembre, por el que se modifica la norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios, aprobada por el Real Decreto 1334/1999, de 31 de julio.

-Real Decreto 1334/1999, de 31 de julio, por el que se aprueba la norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios.

Como resultado de esta intensa actividad legislativa, actualmente es obligatoria la declaración en el etiquetado y publicidad de los alimentos de los siguientes ingredientes potencialmente alergénicos:

1. Cereales que contengan gluten (trigo, centeno, cebada, avena, espelta, Kamet o sus variedades híbridas) y productos derivados, salvo:

-Jarabes de glucosa a base de trigo, incluida la dextrosa.

-Maltodextrinas a base de trigo.

-Jarabes de glucosa a base de cebada.

-Cereales utilizados para hacer destilados o alcohol etílico de origen agrícola para bebidas alcohólicas.

2. Crustáceos y productos a base de crustáceos.

3. Huevos y productos a base de huevo.

4. Pescado y productos a base de pescado, salvo:

-Gelatina de pescado utilizada como soporte de vitaminas o preparados de carotenoides.

-Gelatina de pescado o ictiocola utilizada como clarificante en la cerveza y el vino.

5. Cacahuets y productos a base de cacahuets.

6. Soja y productos a base de soja, salvo:

-Aceite y grasa de semilla de soja totalmente refinados.

-Tocoferoles naturales mezclados, d- α -tocoferol natural, así como su acetato y succinato derivados de la soja.

-Fitoesteroles y ésteres de fitoesterol derivados de aceites vegetales de soja.

-Ésteres de fitoestanol derivados de fitoesteroles de aceite de semilla de soja.

7. Leche y sus derivados (incluida la lactosa), salvo:

-Lactosuero utilizado para hacer destilados o alcohol etílico de origen agrícola para bebidas alcohólicas.

-Lactitol.

8. Frutos de cáscara, es decir, almendras, avellanas, nueces, anacardos, pacanas, castañas de Pará, pistachos o alfóncigos, macadamias o nueces de Australia y productos derivados, salvo nueces utilizadas para hacer destilados de alcohol etílico de origen agrícola para bebidas alcohólicas.

9. Apio y productos derivados.
10. Mostaza y productos derivados.
11. Granos de sésamo y productos a base de granos de sésamo.
12. Dióxido de azufre y sulfitos en concentraciones >10 mg/kg o 10 mg/l expresado en SO₂.
13. Altramuces y productos a base de altramuces.
14. Moluscos y productos a base de moluscos.

Todas estas normas ya mencionadas anteriormente, y que han permitido un gran avance en materia de seguridad alimentaria para los consumidores que padecen de alergias alimentarias, se verán en un futuro cercano complementadas por medio de lo establecido en el:

Reglamento (CE) 41/2009 de la Comisión, de 20 de enero de 2009, sobre la composición y etiquetado de productos alimenticios apropiados para personas con intolerancia al gluten.

Este Reglamento, en su artículo 3 establece:

1. Los productos alimenticios para personas con intolerancia al gluten, constituidos por uno o más ingredientes procedentes del trigo, el centeno, la cebada, la avena o sus variedades híbridas, que hayan sido tratados de forma especial para eliminar el gluten, no contendrán un nivel de gluten que supere los 100 mg/kg en los alimentos tal como se venden al consumidor final.

2. El etiquetado, la publicidad y la presentación de los productos mencionados en el apartado 1 llevarán la mención «contenido muy reducido de gluten». Pueden llevar el término «exento de gluten» si el contenido de gluten no sobrepasa los 20 mg/kg en total, medido en los alimentos tal como se venden al consumidor final.

3. La avena contenida en alimentos para personas con intolerancia al gluten debe ser producida, preparada o tratada de forma especial para evitar la contaminación por el trigo, el centeno, la cebada, o sus variedades híbridas y su contenido de gluten no debe sobrepasar los 20 mg/kg.

4. Los productos alimenticios para personas con intolerancia al gluten constituidos por uno o más ingredientes que sustituyan el trigo, el centeno, la cebada, la avena o sus variedades híbridas, no contendrán un nivel de gluten que supere los 20 mg/kg en los alimentos tal como se venden al consumidor final. El etiquetado, la presentación y la publicidad de esos productos deberá llevar la mención «exento de gluten».







OBJETIVOS



2. OBJETIVOS

Durante los últimos cinco años, en el Laboratorio de Higiene, Inspección y Control de Alimentos de la Facultad de Veterinaria de Lugo, conjuntamente con la empresa en la que desarrollo mi actividad profesional (Clavo Congelados, S.A., Caldas de Reis, Pontevedra), se han llevado a cabo trabajos referentes a la obtención de alimentos precocinados seguros y más saludables desde el punto de vista nutricional.

Durante la realización de dichos trabajos, han surgido interrogantes a los que se debe buscar una solución desde metodologías científicamente avaladas, para asegurar la calidad de dichos productos. Entre estos, podemos citar tres objetivos que son primordiales para industrias del sector en el que está incluida Clavo Congelados, y que se plantea determinar por medio de esta tesis doctoral:

- 1) Determinar la influencia del tipo de aceite que se emplea en la formulación, pre-fritura y fritura final de diferentes tipos de alimentos empanados precocinados en el perfil lipídico final del producto.
- 2) Determinar la influencia del grado de polarización del aceite de fritura en la composición final de los alimentos empanados precocinados, así como el número de frituras que puede alcanzar un aceite de modo seguro.
- 3) Determinar el riesgo de contaminación cruzada por alérgenos en una industria que utiliza como materias primas gran cantidad de productos que contienen alérgenos diferentes, y si el plan de limpieza y desinfección empleado en dicha empresa previene de modo efectivo dicho riesgo.





MATERIALES Y MÉTODOS



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Evaluación de la influencia de la pre-fritura industrial y el cocinado doméstico en la composición nutricional y perfil Lipídico de alimentos empanados precocinados.

3.1.1. Plan de muestreo

Para este ensayo fueron tomadas muestras de tres lotes de fabricación diferentes tanto de empanadillas de atún como de croquetas de jamón pre-cocinadas, congeladas y empanadas, en todos los casos elaborados en la planta de fabricación de la empresa Calvo Congelados S.A. tiene en Caldas de Reis (Pontevedra, España).

La composición de las empanadillas de atún (Figura 9) fue la siguiente: el recubrimiento (50% del peso total) se elaboró con margarina, sal, azúcar, harina de trigo y agua, mientras que el relleno (50% del peso total) se elaboró utilizando clara de huevo, pimienta, cebolla, sal, azúcar, aceite de girasol, tomate, atún, agua, harina de trigo, ácido cítrico (E-330) y carbonato ácido de sodio (E-500ii).



Figura 9. Empanadillas de atún elaboradas

Por su parte, las croquetas de jamón (Figura 10) se elaboraron a partir de la siguiente composición: el recubrimiento (20% del peso total) se elaboró utilizando harina de maíz, pan rallado, sal y harina de trigo, mientras que el relleno (80% del peso final) se elaboró utilizando jamón curado, dextrosa, rojo de cochinilla (E-124), margarina, cebolla, leche en polvo hidrogenada, sal, azúcar, agua y harina de trigo.



Figura 10. Croquetas de jamón elaboradas

Después de su elaboración, las muestras de ambos tipos de productos se dividieron en dos grupos diferentes para su pretritura en una freidora industrial (Movilfrit FA6, Barcelona, España) (Figura 11). Uno de los grupos de prefrió en aceite de oliva, con acidez máxima de 1° (Olitterra, Aceites Toledo, Toledo, España), con la siguiente composición: ácido palmítico: 10,2%, ácido palmitoleico: 1,2%; ácido esteárico: 2,6%; ácido oleico: 77,6% y ácido linoleico: 6,5% como ácidos grasos principales. El grupo restante se prefrió en aceite de girasol (Donsol, Aceites Toledo, Toledo, España), con la siguiente composición: ácido palmítico: 6,6%; ácido esteárico: 4,5%; ácido oleico: 23,4% y ácido linoleico: 60,8% como ácidos grasos principales.



Figura 11. Freidora industrial Movilfrit FA6

En ambos casos, los productos fueron pre-fritos a una temperatura de entre 175-180 °C durante 25 segundos. Una vez finalizado el proceso, tanto las empanadillas de atún como las croquetas de jamón pre-fritas, se dejaron enfriar a temperatura ambiente hasta que alcanzaron una temperatura adecuada y posteriormente se congelaron a -21 °C.

Posteriormente, cada uno de los dos grupos originados para las empanadillas de atún y las croquetas de jamón (pre-fritas en aceite de oliva y en aceite de girasol), se dividió en tres grupos a los que se les aplicó un método de cocinado diferente: fritura en aceite de oliva, fritura en aceite de girasol o horneado en horno convencional.

La fritura, tanto en aceite de oliva como en aceite de girasol, se realizó introduciendo de modo simultáneo 3 empanadillas o croquetas en una freidora industrial (Movilfrit FA6) de 3 l de capacidad a una temperatura de 175-180 °C durante 30 segundos (en el caso de las empanadillas de atún) o 4 minutos (en el caso de las croquetas de jamón). Todos los procesos de pre-fritura y fritura fueron realizados

utilizando aceite nuevo y la calidad de aceite (medida a través del contenido en compuestos polares) se controló periódicamente con un medidor Testo 925 (Testo, Lenzkirch, Alemania) (Figura 12) para controlar que en ningún caso alcanzase el 25% establecido como máximo por la legislación. Una vez sacadas de la freidora, los productos fueron ligeramente agitados para eliminar el exceso de aceite que quedase pegado en su superficie.



Figura 12. Sonda Testo 925

Por su parte, en el caso de los productos que fueron cocinados mediante horneado, éstos fueron introducidos en un horno convencional (Balay 3HT503XP, Barcelona, España) (Figura 13), precalentado a 225 °C durante un mínimo de 10 minutos, y permanecieron en el mismo durante un total de 12 minutos (en el caso de las empanadillas de atún) o de 11 minutos (en el caso de las croquetas de jamón).



Figura 13. Horno Balay 3HT503XP

Las temperaturas de las freidoras y el horno fueron controladas a través de sus propios termómetros y de un termómetro externo calibrado (Testo 925), equipado con dos diferentes sondas: una sonda de inmersión-penetración (tipo K 0628 1292) utilizada para medir la temperatura del aceite de la freidora, y una sonda aérea (tipo K 0602 1793) utilizada para medir la temperatura del horno.

Tanto los alimentos crudos, pre-cocinados como cocinados fueron atemperados a temperatura ambiente, homogenizados en una picadora convencional (Moulinex A320R1, Alençon, Francia), y posteriormente almacenados en congelación a $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ previamente a su análisis químico.

3.1.2. Recepción y preparación de las muestras

Las muestras de alimentos son recibidas en el LHICA mediante envíos por mensajería urgente, ya sea refrigeradas o congeladas, y procesadas inmediatamente o

guardadas hasta su procesamiento en las condiciones de temperatura adecuada a la naturaleza de la muestra (-21 °C para las muestras congeladas y 0-4 °C para las muestras refrigeradas). Posteriormente, la totalidad de la parte comestible es homogenizada mediante una picadora (Moulinex, Francia), durante por lo menos 5 minutos a intervalos de 30 segundos, a fin de evitar recalentamientos en la muestra que puedan alterar los resultados. Todas las determinaciones fueron realizadas como mínimo por triplicado, tomando como resultado final la media aritmética de los resultados obtenidos.

Una vez realizado este pre-procesamiento, se procedió al análisis de cada uno de los macronutrientes, siguiendo los métodos descritos a continuación:

3.1.3. Métodos analíticos empleados

Las determinaciones de composición nutricional fueron realizadas siguiendo métodos establecidos por la American Organization of Analytical Chemists International (AOAC, 2002). Para cada determinación se siguieron los métodos que se describen a continuación.

3.1.3.1. Humedad (Ref: AOAC 950.46)

3.1.3.1.1. Material e Aparatos

- Estufa de desecación a 102 °C (Selecta).
- Cápsulas de porcelana.
- Baño de agua (Memmert).
- Desecador PYREX.
- Balanza analítica modelo GA-200 (Ohaus).

-Material de vidrio de uso en laboratorio.

3.1.3.1.2. Reactivos

-Etanol al 95% (Panreac).

-Arena de mar lavada de grano fino (Sharlau).

3.1.3.1.3. Procedimiento

En primer lugar se desecó la cápsula de porcelana con una cantidad de arena de mar, lavada y de grano fino y con una varilla de vidrio en su interior, en una estufa de desecación a $102\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 30 segundos. Posteriormente las cápsulas fueron retiradas de la estufa y colocadas en un desecador hasta atemperarse, tras lo cual se pesaron y se registró su peso (P_1). Una vez registrado dicho peso, se introdujo en su interior una cantidad aproximada de 5 g de muestra y se pesó de nuevo, registrando el nuevo peso obtenido como P_2 . A esta muestra se le añadieron 5 mL de etanol al 95% y se removió con la varilla de vidrio hasta deshacer la muestra introducida en fragmentos lo más pequeños posibles. Una vez realizada esta operación, las cápsulas con la muestra en su interior se introdujeron en una estufa durante 24 horas a una temperatura de $102 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Una vez pasado este tiempo, la cápsula se retiró, se atemperó en un desecador e temperatura ambiente y se pesó, registrando el nuevo peso como P_3 . Posteriormente las cápsulas se volvieron a introducir en la estufa durante 4 horas y se repitió la operación mencionada anteriormente para comprobar que el peso de la muestra era constante y la muestra no sigue perdiendo humedad. En el caso de que siga perdiendo humedad, la muestra se deja en el interior de la estufa durante otras 24 horas.

El contenido (%) en Extracto Seco (ES) de la muestra se calculó mediante la siguiente fórmula:

Cálculos

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P_2 - P_3}{P_2 - P_1} \times 100$$

siendo:

P_1 = peso en g de la cápsula vacía.

P_2 = peso en g de la cápsula con la muestra.

P_3 = peso en g de la cápsula con la muestra desecada.

$$\% \text{ ES} = 100 - \% \text{ Humedad}$$

3.1.3.2. Proteína (Ref: AOAC 981.10)

3.1.3.2.1. Material y aparatos

- Digestor con capacidad para 6 tubos BUCUI B-426RD.
- Tubos Kjeldhal de 350 ml.
- Destilador BUCHII.
- Balanza analítica METTLER AE 2005.
- Perlas de vidrio.
- Material de vidrio de uso en laboratorio.

3.1.3.2.2. Reactivos

- Catalizador en tabletas con 5 g de sulfato potásico y 0,005 g de selenio por unidad (Thompson & Capper).
- Ácido sulfúrico al 96%.(Merck).
- Aua destilada.
- Hidróxido sódico al 33% (Panreac).
- Ácido bórico al 40% (Probus).
- Ácido clorhídrico 0,1 N de factor conocido (Panreac).
- Indicador mixto, preparado por disolución de 2 g en rojo de metilo (Panreac) y 1 g de azul de metileno (Panreac) en 1000 ml de aua destilada.

3.1.3.2.3. Procedimiento

Para esta determinación se pesó aproximadamente 5 g de muestra y se introdujeron sucesivamente en un tubo Kjeldahl 2 tabletas de catalizador y la cantidad de muestra pesada. Se añadieron 25 mL de ácido sulfúrico al 96% y se mezclaron suavemente. Cuando el líquido resultante quedó transparente, se retiró el matraz, que se dejó atemperar hasta temperatura ambiente. Una vez atemperado, se le añadieron con precaución 100 mL de agua destilada y se disolvió mediante agitación el sulfato potásico que pudiese haber cristalizado.

Posteriormente, en un matraz erlenmeyer de 250 mL se introjeron 25 mL de ácido bórico al 4% y unas gotas de indicador mixto, con el fin de que el material resultante adquiriese una coloración violeta. El matraz se colocó posteriormente en el destilador para recojer el líquido destilado, colocando el tubo Kjendahl en el destilador de manera que quede perfectamente ajustado. Una vez realizada dicha operación, se le añaden al tubo 100 mL de hidróxido sódico al 33%. Se destila hasta alcanzar un cantidad de 150

mL de destilado en el matraz erlenmeyer, produciéndose un viraje a color verde. Posteriormente se retiró el matraz y el líquido destilado se valoró con ácido clorídrico 0,1 N hasta la coloración violeta original. En cada uno de los ensayos se realizó también una determinación en blanco sustituyendo la muestra por 5 mL de agua destilada, y siguiendo el mismo procedimiento que el resto de muestras.

3.1.3.2.4. Cálculos

Los cálculos necesarios para determinar el % de nitrógeno total en cada una de las muestras analizadas se realizó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Nitrógeno total} = [(V_m - V_b) \times N \times f \times 1,4] / M$$

siendo:

V_m = volumen en ml de HCl gastado por la muestra.

V_b = volumen en ml de HCl consumido por la muestra en blanco.

N = normalidad del HCl.

f = factor de normalidad del HCl.

M = peso en gramos de la muestra.

El contenido en proteína (%) se calculó posteriormente a partir del contenido en nitrógeno total:

$$\% \text{ Proteína} = N_t \times 6,25 \text{ (factor aplicable a produtos cárnicos y de la pesca).}$$

siendo:

N_t = contenido en nitrógeno total.

3.1.3.3. Grasa (Ref: AOAC 991.36)

3.1.3.3.1. Principio

La extracción de la materia grasa de la muestra previamente hidrolizada y desecada, se realizó utilizando como disolvente éter de petróleo, y posterior eliminación de este por evaporación, desecación del residuo y posterior pesada despois de atemperar la muestra a temperatura ambiente. Para este procedimiento se utilizó un extractor semiautomático Soxtec da firma Tecator, que realiza la extracción basado en el procedimiento Soxhlet.

3.1.3.3.2. Material y Aparatos

- Unidad de extracción Soxtec Tecator 1043
- Unidad calefactora Soxtec Tecator 1046
- Cartuchos de celulosa de 22 mm de diámetro (Tecator)
- Recipientes de aluminio para extracción (Tecator)
- Estufa eléctrica (Selecta)
- Balanza analítica modelo GA-200 (Ohaus)
- Desecador PYREX
- Papel de filtro (Albet)
- Material de vidrio de uso en laboratorio (Afora)

3.1.3.3.3. Reactivos

- Ácido clorhídrico 3N (Panreac)
- Papel indicador pH1-11.(Panreac)
- Éter de petróleo 40-60 °C (Panreac)

3.1.3.3.4. Procedimiento

De cada una de las muestras se tomaron 3 g de muestra seca y se introdujeron en un cartucho de extracción, realizando dicha extracción en el equipo Soxtec con éter de petróleo 40-60 °C durante 4 horas. La grasa extraída se desecó posteriormente dentro del recipiente de aluminio para la extracción en un estufa durante media hora a 102°C. Posteriormente, los recipientes de aluminio con la grasa en el interior se retiraron de la estufa y se atemperaron a temperatura ambiente en el interior de un desecador. Una vez atemperada, la grasa en el interior del recipiente de aluminio se pesa y se registra dicho peso. En esta primera etapa se obtiene la grasa antes de su hidrólisis.

Posteriormente, se tomó la muestra del cartucho de celulosa y se introdujo en un matraz erlenmeyer de 500 mL, al cual se añadieron 60 mL de ácido clorhídrico 4 N, y se sometió a ebullición en un hornillo durante 1 hora. Posteriormente se dejó enfriar y una vez alcanzada la temperatura ambiente se filtra a través de un filtro doble. Luego se lavó el residuo con agua destilada hasta la desaparición de la reacción ácida (comprobado mediante papel indicador). El papel de filtro que contiene el residuo se desecó durante una hora y media en una estufa a una temperatura de 95-98 °C.

Una vez desecado el papel junto con el residuo, se sacó de la estufa y se dejó atemperar en un desecador, tras lo cual se volvió a introducir en un cartucho de extracción de celulosa. Esta muestra se volvió a someter a extracción con éter de petróleo 40-60 °C durante 4 horas en el equipo Soxtec. La grasa recojida de este modo en los recipientes de aluminio se desecó en estufa durante media hora a 125 °C. Posteriormente, se atemperó el recipiente con la grasa a temperatura ambiente en el desecador y posteriormente se secó, obteniendo así la grasa extraída tras la hidrólisis ácida.

3.1.3.3.5. Cálculos

El cálculo del porcentaje de grasa tanto antes como después de la hidrólisis ácida se realizó por la diferencia de peso del recipiente en el que se recoje dicha grasa.

$$\% \text{ Grasa} = [(P_2 - P_1)_{\text{a.h.}} + (P_2 - P_1)_{\text{d.h.}}] / M$$

siendo:

P_1 = peso en g del recipiente de recojida vacío.

P_2 = peso en g del recipiente con la grasa.

a.h. = antes de la hidrólisis.

d.h. = después de la hidrólisis.

M = peso en g de la muestra.

3.1.3.4. Cenizas (Ref: AOAC 920.153)

3.1.3.4.1. Principio

Las muestras se introdujeron en cápsulas de porcelana que posteriormente se introdujeron a su vez en un horno de mufla, a una temperatura de 550°C para su calcinación.

3.1.3.4.2. Materiales y Aparatos

- Cápsulas de porcelana.
- Mufla modelo SNOL 8.2/1100-1 (Umega)
- Desecador PYREX.
- Balanza analítica modelo GA-200 (OHAUS)

3.1.3.4.3. Procedimiento

Previamente, se calcinaron las cápsulas vacías en las mismas condiciones en las cuales se va a someter posteriormente la muestra, se enfriaron a temperatura ambiente en el interior de un desecador y se pesaron en una balanza analítica, tras lo cual se obtuvo un peso de la cápsula vacía (P_1) y se registró.

Una vez taradas dichas cápsulas, se pesaron sobre ellas aproximadamente 2 g de muestra liofilizada y se calcinaron a 550°C hasta la obtención de cenizas blancas o blanco-grisáceas. De nuevo se enfriaron en el desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente y posteriormente se pesaron, registrando nuevamente este peso (P_2). Los resultados se expresaron en % de materia seca.

3.1.3.4.4. Cálculos

Las cenizas se determinaron mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de cenizas} = [(P_2 - P_1)/W] \times 100$$

siendo:

W: peso en g de la muestra fresca.

P_1 : peso en g de la cápsula vacía.

P_2 : peso en g de la muestra calcinada.

3.1.3.5. Hidratos de carbono (Ref: Allison y Senti, 1983)

Calculamos la cantidad de hidratos de carbono restando al total de extracto seco la cantidad determinada por los métodos anteriormente descritos para los casos de la proteína, grasa y cenizas.

3.1.3.6. Calorías (Ref: Allison y Senti, 1983)

Realizamos el cálculo correspondiente según la metodología descrita por Allison y Senti (1983), consistente en realizar los cálculos según se describen a continuación:

-g de grasa/ 100 g muestra X 9 = Kcal en 100 g aportadas por la grasa.

-g de proteína/100 g muestra X 4 = Kcal en 100 g aportadas por la proteína.

-g de hidratos de carbono/100 g muestra X 4 = Kcal en 100 g aportadas por los hidratos de carbono.

La cantidad de Kcal totales para 100 de muestra se obtuvo mediante la suma de las Kcal aportadas por la grasa, proteína e hidratos de carbono presentes en la muestra.

3.1.3.7. Perfil lipídico (Bligh y Dyer, 1959)

3.1.3.7.1. Equipos y Material

- Cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama (FID)
- Columna capilar DB-WAX
- Horno de mufla (Hobersal)
- Baño termostático (Mettler)
- Evaporador TurboVap[®] (Zymark)
- Centrífuga H-103N (Kokusan)
- Micropipetas (Eppendorf)
- Agitador Vibramix (Ovan)
- Microjeringas (Hamilton)
- Material de vidrio Pirex (Afora)

3.1.3.7.2. Reactivos

- Ácido sulfúrico al 96% (Panreac)
- Metanol para cromatografía en fase líquida (Merck)
- N-Hexano para cromatografía en fase líquida (Merck)
- Acetona para cromatografía en fase líquida (Merck)
- Hidrógeno para cromatografía en fase líquida (Merck)

3.1.3.7.3. Extracción lipídica

Previamente a proceder a la extracción del material lipídico de las muestras, se obtuvo material libre de grasa, lo cual se consiguió lavando éste con acetona en baño ultrasonidos y posteriormente introduciéndolo en horno a 400 °C durante 12 horas. Con este material, se procedió a realizar la extracción de la grasa presente en la muestra mediante el siguiente método:

- Se introduce la muestra en Sulfúrico-Metanol al 2,5%.
- Se calienta en baño termostático a 80 °C durante 1 h.
- Se realiza posteriormente la dilución correspondiente según la cantidad de muestra añadida y el contenido en grasa de la misma previamente determinada hasta obtener una cantidad de 120 µg de grasa.
- Añadidos 0,4 ml de Hexano y 3 ml de agua MilliQ.
- Se agita en vórtex durante 5 minutos.
- Se centrifuga 10 minutos a 2000 rpm.
- Posteriormente se extrae el sobrenadante y se deposita en un vial de 1 mL.
- Este sobrenadante se evapora en corriente de nitrógeno y posteriormente resuspende en 1 mL de Hexano.

- De dicha resuspensión se extrae 1 μl de esta dilución y se procede a su inyección en el cromatógrafo de gases.

3.1.3.7.4. Cuantificación

La cuantificación de ácidos grasos en forma de metil ésteres así obtenidos se realizó utilizando un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 6890 (Figura 14) equipado con un detector de ionización de llama (FID), y empleando una columna capilar DB-WAX (30 m X 0.25 m, id., 0.25 μm de espesor de la película). La inyección se realizó en el modo splitless, utilizando para el inyector y el detector temperaturas de 230 $^{\circ}\text{C}$ y 250 $^{\circ}\text{C}$ respectivamente. Se utilizó hidrógeno como gas portador a un flujo de 1,9 mL/min.



Figura 14. Cromatógrafo Hewlett-Packard 6890

La identificación de los metil ésteres de ácidos grasos de las muestras se realizó por comparación con el tiempo de retención de un patrón de una mezcla de ácidos grasos inyectados previamente. La recuperación de los metil ésteres en el procesado se calculó mediante la adición de una cantidad conocida de un patrón interno (C:23) no presente en la muestra de forma natural

3.1.3.7.5. Cuantificación

Una vez obtenidas las áreas correspondientes y corregidas por el factor de recuperación e inyección correspondiente al patrón interno, realizamos los cálculos de los distintos tipos de ácidos grasos y expresamos el resultado en % de los mismos sobre el total obtenido en la muestra. Calculamos también el % obtenido de DHA (C22:6n-3) y EPA (C20:5n-3) sobre el total de ácidos grasos obtenidos. La suma de estos dos parámetros la consideraremos como “% de ácidos grasos Omega-3 sobre el total”. Asimismo, calculamos también el % de AGS, AGMS y AGPS presentes en la muestra. Los diferentes ácidos grasos se obtienen mediante un cromatograma como el mostrado en la Figura 15. El aceite de fritura absorbido por el alimento se determinó mediante el procedimiento descrito por Pérez-Camino y col. (1991).

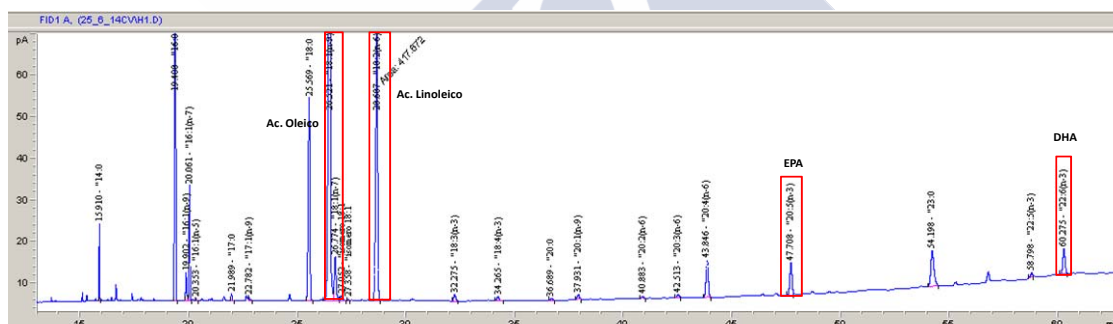


Figura 15. Cromatograma obtenido a partir de una muestra de empanadilla de atún

3.1.3.8. Aceptabilidad de los productos por parte del consumidor

Para la determinación de aceptabilidad por parte del consumidor fue seleccionado un panel de cuarenta y dos consumidores no entrenados entre los estudiantes y el personal del Departamento de Higiene y Inspección de Alimentos, Lugo, España. Todos los sujetos pertenecían a edades comprendidas entre los 23 y 58 años de edad (50% mujeres y 50% hombres) y eran consumidores habituales de alimentos congelados empanados. Los consumidores evaluaron la apariencia, aroma, sabor, sensación

crujiente y la aceptabilidad general en una escala hedónica de siete puntos como sigue: 7-me gusta extremadamente, 6-me gusta mucho, 5-me gusta moderadamente, 4-ni me gusta ni me disgusta, 3-me disgusta moderadamente, 2-me disgusta mucho, 1-me disgusta extremadamente. A todos ellos se les suministró agua mineral de bajo contenido en minerales y pan sin sal entre los distintos productos para eliminar el recuerdo del sabor de las muestras anteriores.

3.1.3.9. Análisis estadístico

El test t de *Student* se utilizó para determinar las diferencias entre los componentes nutricionales y los parámetros sensoriales de los diferentes tipos de alimentos. Las diferencias se consideraron significativas para un valor de $P < 0,05$. Todos los análisis estadísticos necesarios se realizaron utilizando el programa informático Statgraphics Plus versión 5.0 (SAS Institute, Carolina del Norte, USA).

3.2. Influencia del estado del aceite de fritura doméstico en el perfil lipídico de la grasa del alimento cocinado

3.2.1. Preparación de los productos

Muestras de tres tipos diferentes de alimentos congelados pre-cocinados industrialmente pertenecientes a tres diferentes lotes de fabricación (gambas rebozadas, nuggets de pollo empanados y anillas de calamar a la romana) fueron proporcionados por una industria local (Clavo Congelados, S.A., Pontevedra, España) (Figuras 16-18). Siete muestras de cada uno de los lotes fueron cocinadas de forma sucesiva en aceite de girasol en una freidora de planta piloto (Moviltrit FA 6+6 Barcelona, España) a 175-180

°C durante 4 minutos para simular un cocinado doméstico. Tras el cocinado de cada muestra, en aceites con distintos niveles de degradación, se tomó muestra del aceite restante para la determinación de su contenido en compuestos polares. Las muestras fueron agitadas mecánicamente inmediatamente después de salir de la freidora con el fin de eliminar los restos de aceite presentes en las superficies de los alimentos. Los productos cocinados fueron atemperados a temperatura ambiente, homogenizados mediante una picadora de uso doméstico y posteriormente guardados a -21 °C hasta a realización de su análisis químico.



Figura 16. Gambas rebozadas elaboradas



Figura 17. Nuggets de pollo elaborados



Figura 18. Calamares a la romana elaborados

3.2.2. Análisis de la grasa y perfil lipídico del alimento

El contenido en grasa fue determinado mediante extracción con éter de petróleo 40-60 °C mediante el método Soxhlet ya descrito en el apartado 3.1.3.3. Para la determinación del perfil de ácidos grasos, se utilizó el extracto lipídico obtenido a partir de una muestra de 3 g de peso, mediante el método descrito en el apartado 3.1.3.7.

3.2.3. Determinación de los compuestos polares

La determinación de los compuestos polares en el aceite de fritura se realizó de acuerdo al método oficial ISO 8420:2002. Los análisis fueron realizados en una columna de vidrio cargada con 25 g de gel de sílice, la cual había previamente desecada durante 4 h a 160 °C, y posteriormente llevada a un grado de humedad del 5% mediante la adición de agua desionizada. La grasa analizada (2,5 g), fue disuelta en una mezcla de éter de petróleo 40-60 °C y éter dietílico (87:13, v/v), e introducida en la columna (Figura 19). 150 ml de la mezcla anteriormente descrita fue utilizada también como

eluyente para los compuestos apolares, y posteriormente, se utilizó éter dietílico puro como eluyente para los compuestos polares. Estos compuestos polares fueron recogidos en un balón de vidrio esmerilado, y los restos de eluyente fueron eliminados mediante evaporación en rotavapor (Buchi, Flawill, Suiza) seguido de una segunda evaporación en corriente de nitrógeno.



Figura 19. Columna de vidrio empleada en la determinación de los compuestos polares

3.2.4. Análisis estadístico

Todas las determinaciones de grasa, perfil lipídico y compuestos polares fueron realizadas por triplicado ($n=3$). Tanto la evolución de la cantidad de grasa en el alimento cocinado como su perfil lipídico fue comparada mediante análisis de la varianza (ANOVA) unifactorial. Las diferencias obtenidas fueron consideradas significativas para un nivel de significación de $P<0,05$. Los análisis fueron realizados mediante el programa Statgraphics versión 5.1 para Windows (SAS Institute, NC, USA).

3.3. Presencia de alergenos en alimentos elaborados y estudio de la posible contaminación cruzada en alimentos preparados en una planta de producción mixta

El objetivo de este trabajo fue controlar la posible contaminación cruzada entre los diferentes alergenos recogidos en el Anexo V del Real Decreto 2220/2004 en una planta de elaboración mixta de alimentos pre-cocinados.

Para ello, tomamos muestras de alimentos finales así como de superficies de trabajo en la planta de producción que la empresa Clavo Congelados, S.A. tiene en Caldas de Reis (Pontevedra, España), y comprobamos la efectividad del plan de limpieza y desinfección establecido en el manual de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC) de dicha empresa para la prevención de la contaminación cruzada entre alergenos.

3.3.1. Plan de muestreo

La empresa tiene la distribución que se muestra a continuación (Figura 20), en la que se pueden observar un total de 10 líneas de producción diferentes, cuyos diagramas de flujo también se muestran a continuación.

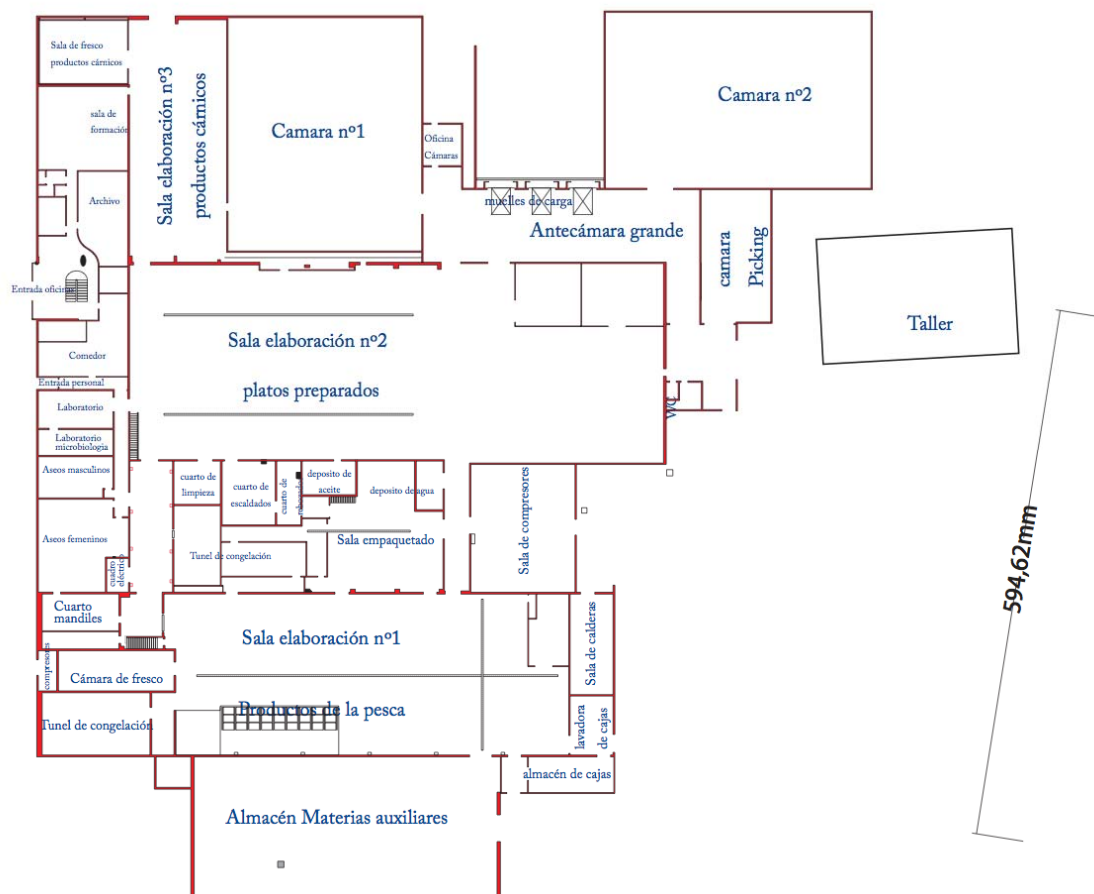


Figura 20. Plano general de la empresa Clavo Congelados S.A

La línea número 1 está dedicada a la elaboración de pescado fileteado y envasado de diferentes especies, y tiene el siguiente diagrama de flujo (Figura 21):



Figura 21. Diagrama de flujo de la línea 1 (elaboración de pescado fileteado)

La línea número 2 está dedicada a la elaboración de productos basados en calamar y chipirón. En ella se elaboran dos productos diferentes (chipirón relleno y anillas de pota limpias congeladas y envasadas). La elaboración de estos dos productos sigue los siguientes diagramas de flujo (Figuras 22-23):

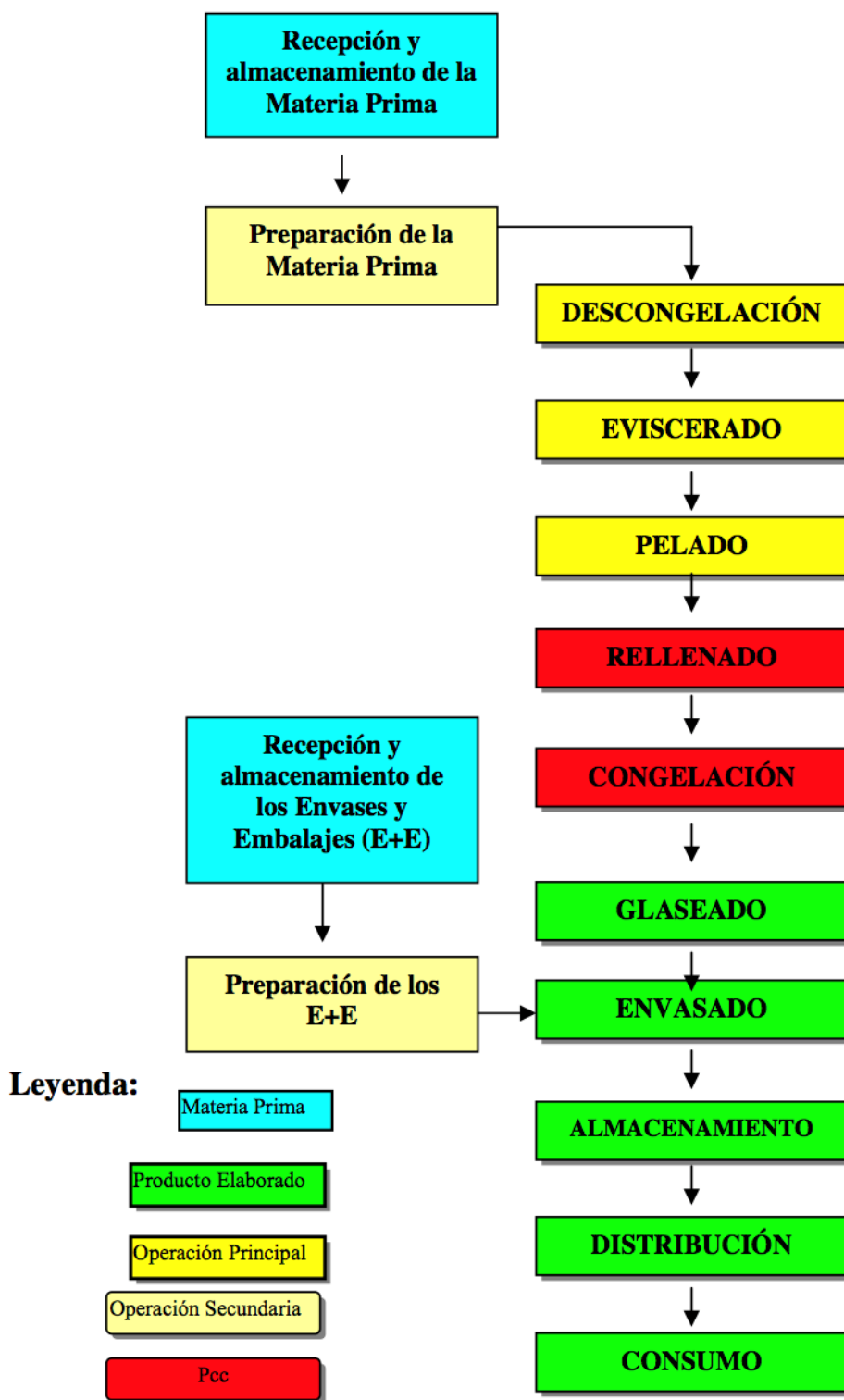


Figura 22. Diagrama de flujo de la línea 2 (elaboración de chipirón relleno)

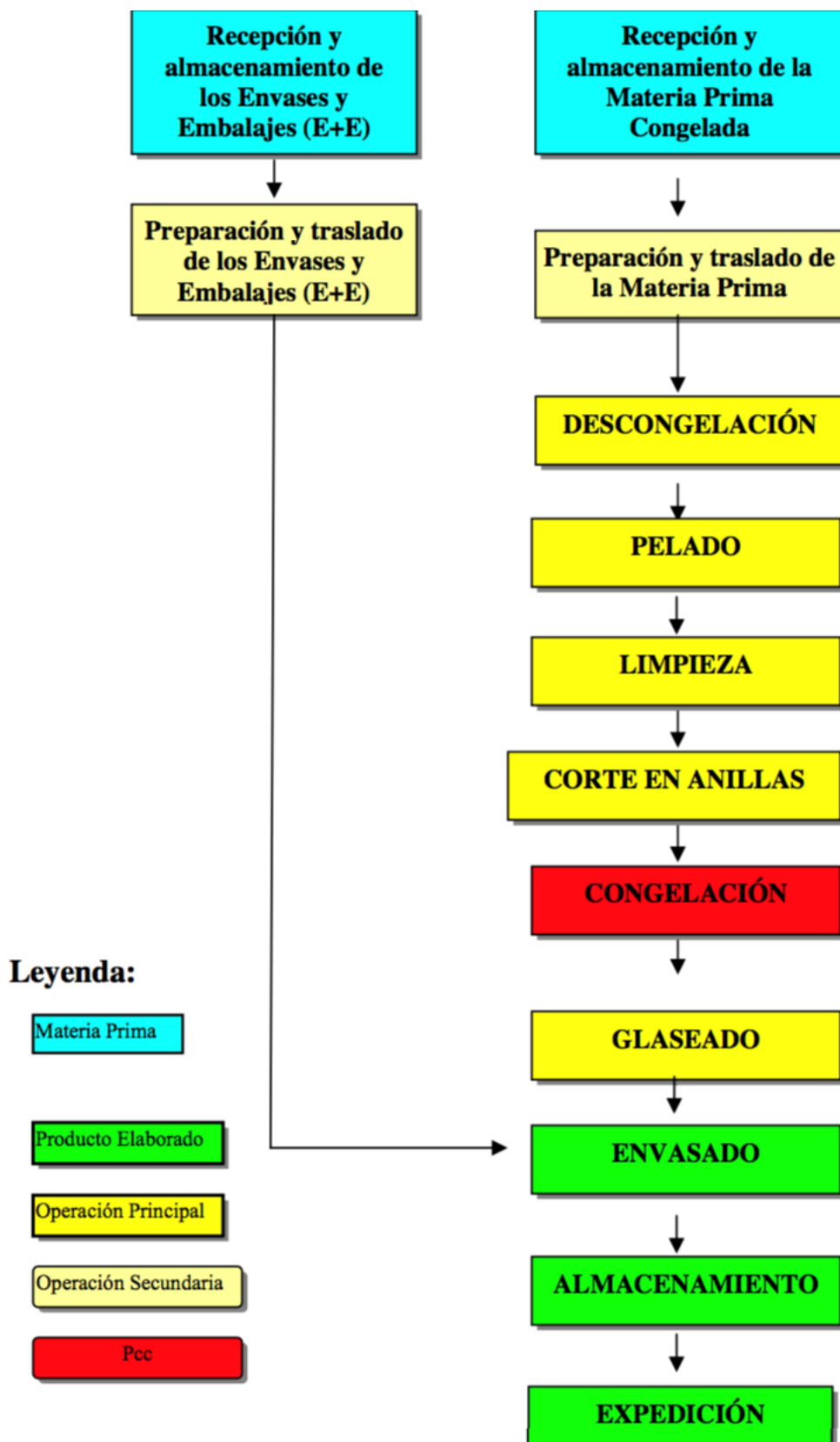


Figura 23. Diagrama de flujo de la línea 2 (elaboración de anillas de pota glaseadas)

La línea número 3 está dedicada a la elaboración de alimentos prefritos, como nuggets, o croquetas. La elaboración de los diferentes productos que se elaboran en esta línea se realizó siguiendo el diagrama de flujo que se muestra a continuación (Figura 24):

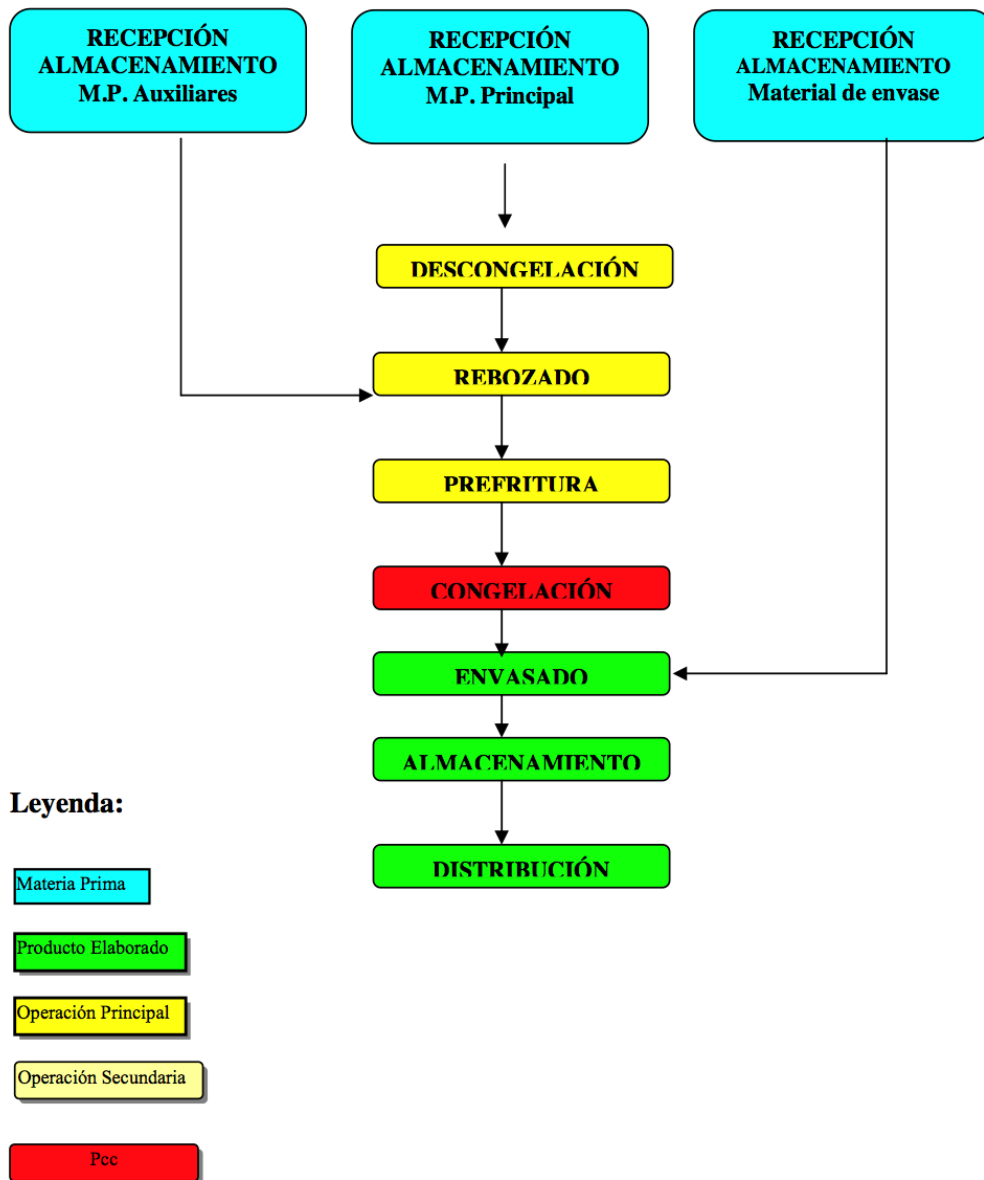


Figura 24. Diagrama de flujo de la línea 3 (elaboración de productos prefritos)

La línea número 4 está dedicada a la elaboración de alimentos empanados. En dicha línea se elaboraron en días alternos productos de pescado empanados y productos de

carne empanados. La elaboración de los diferentes productos que se elaboran en esta línea sigue los siguientes diagramas de flujo (Figuras 25-26):

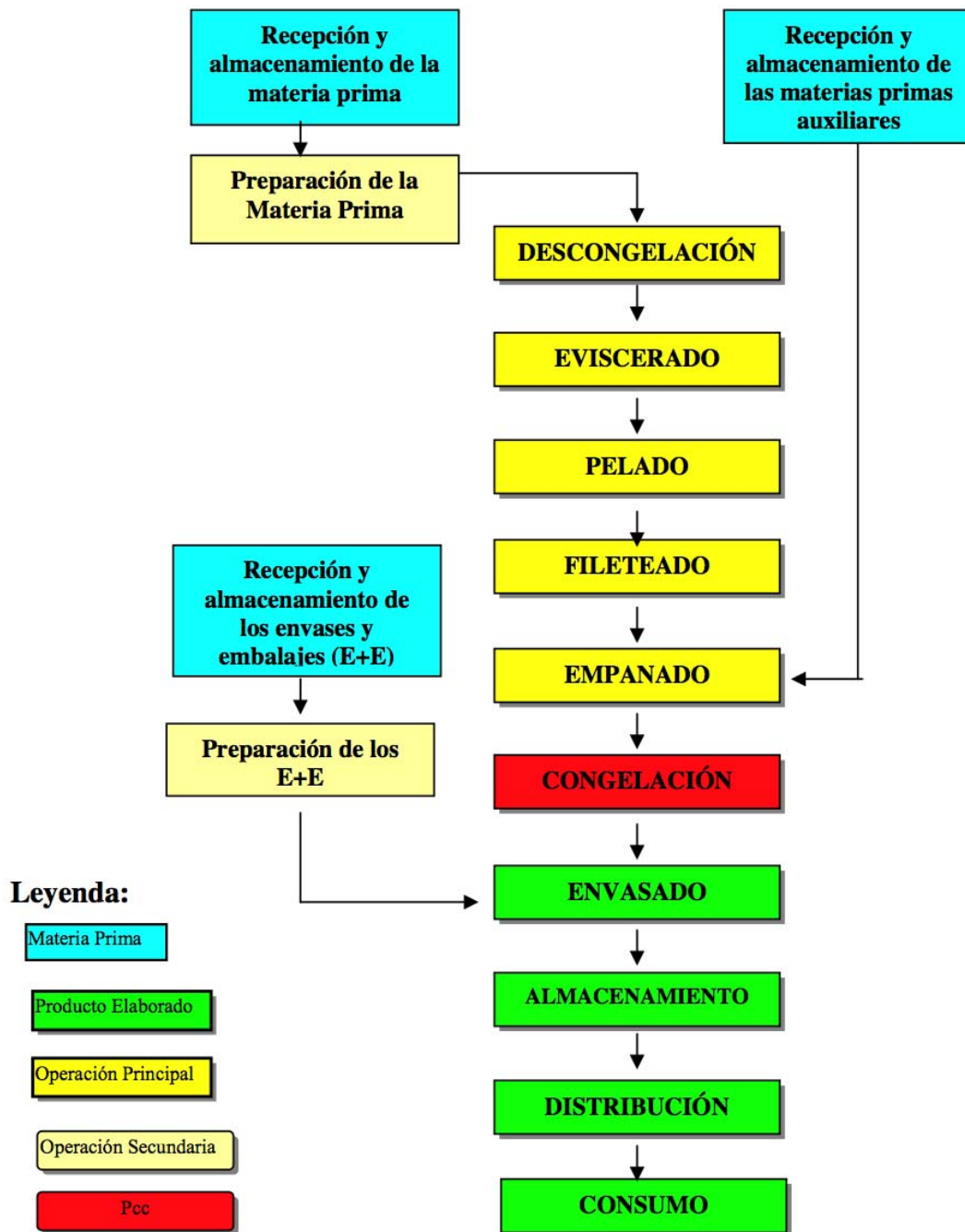


Figura 25. Diagrama de flujo de la línea 4 (elaboración de productos de pescado empanado)

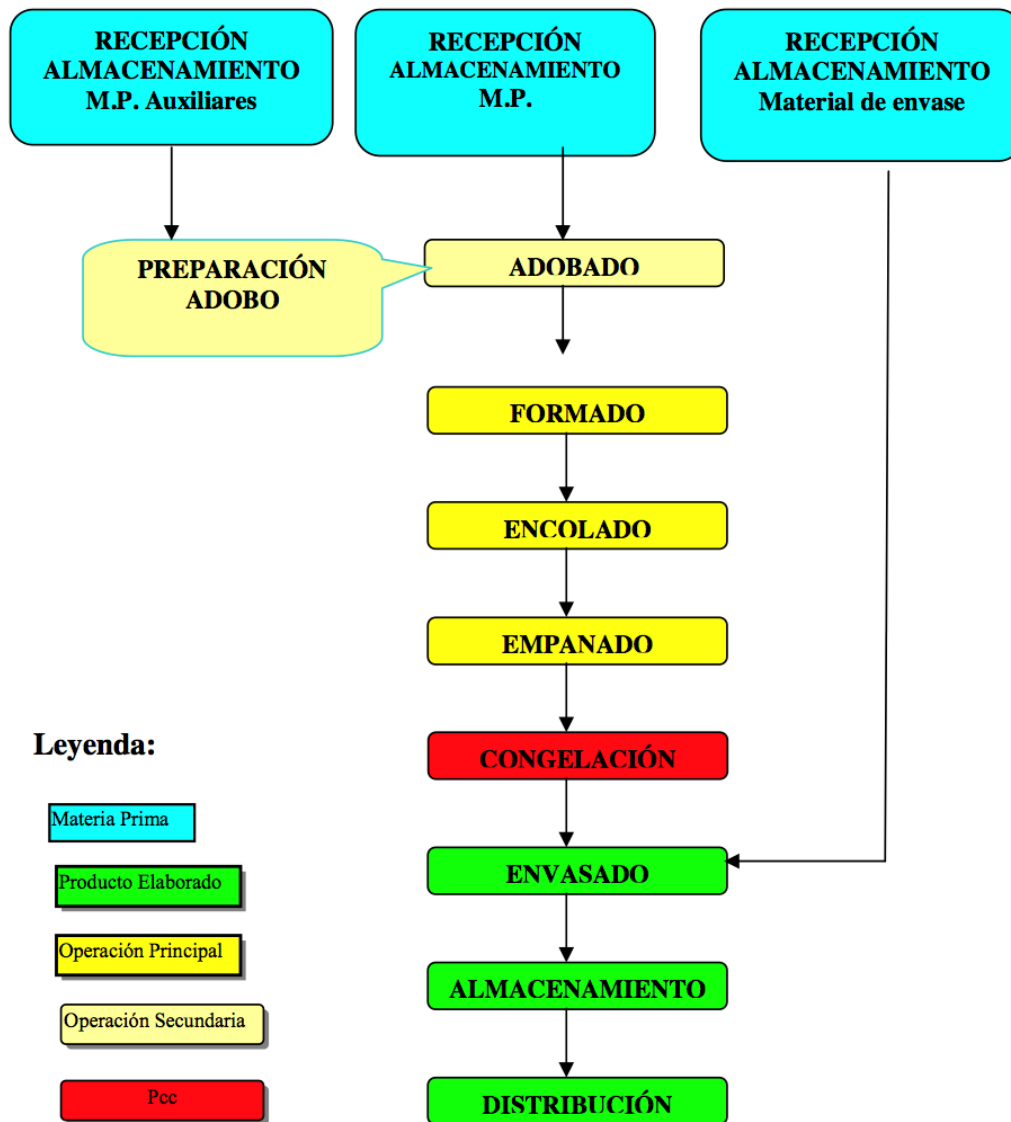


Figura 26. Diagrama de flujo de la línea 4 (elaboración de productos de carne empanados)

La línea número 5 está dedicada a la elaboración de preparados para paellas, en los que se incluyen tanto pescados como mariscos de modo habitual. La elaboración de los preparados para paellas que se elaboraron en esta línea siguió el siguiente diagrama de flujo (Figura 27):

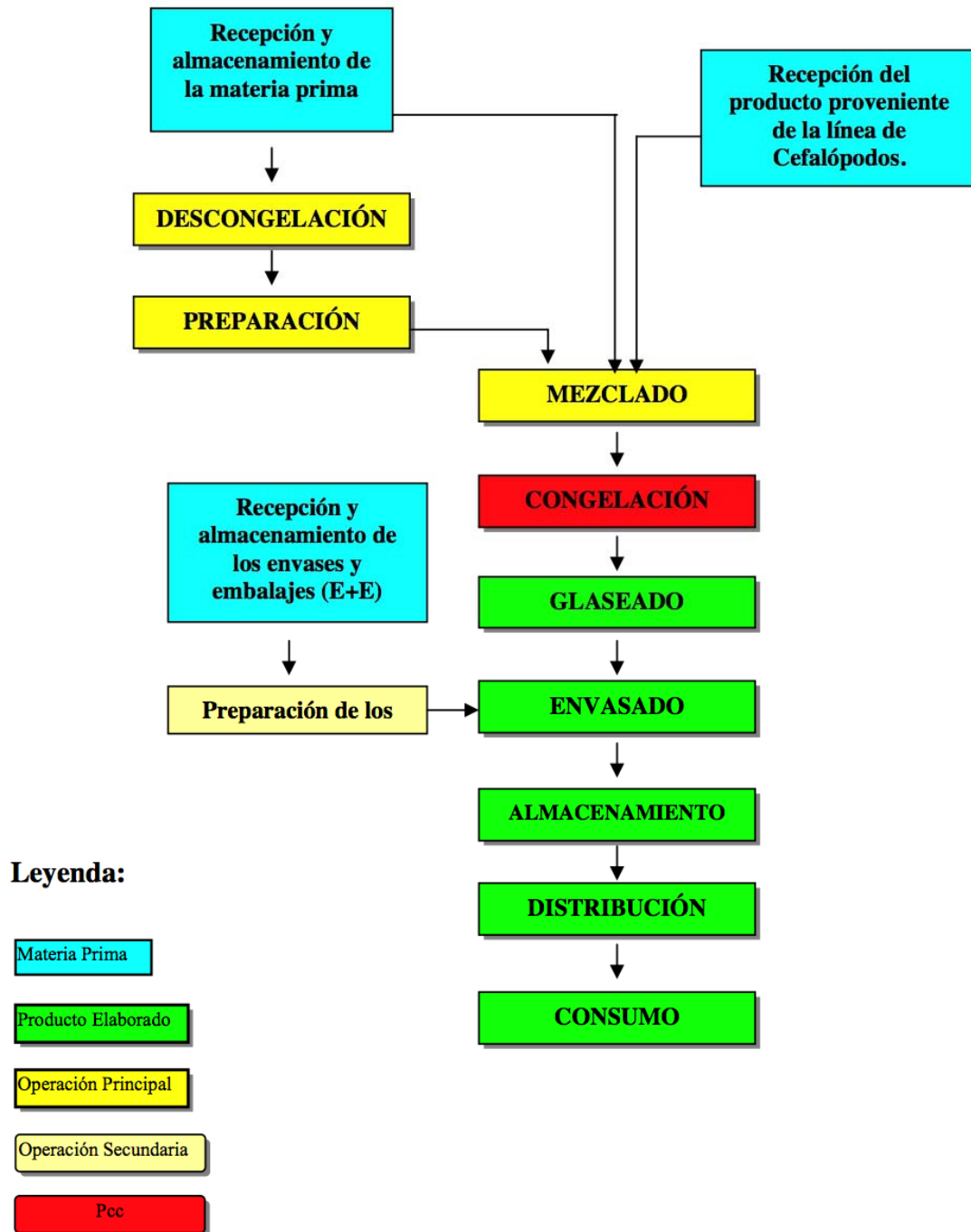


Figura 27. Diagrama de flujo de la línea 5 (elaboración de preparados para paellas)

La línea número 6 está dedicada a la elaboración de productos asados, tales como alitas de pollo a la barbacoa o brochetas de pescado y marisco. La elaboración de los productos que se elaboraron en esta línea siguió el siguiente diagrama de flujo (Figura 28):

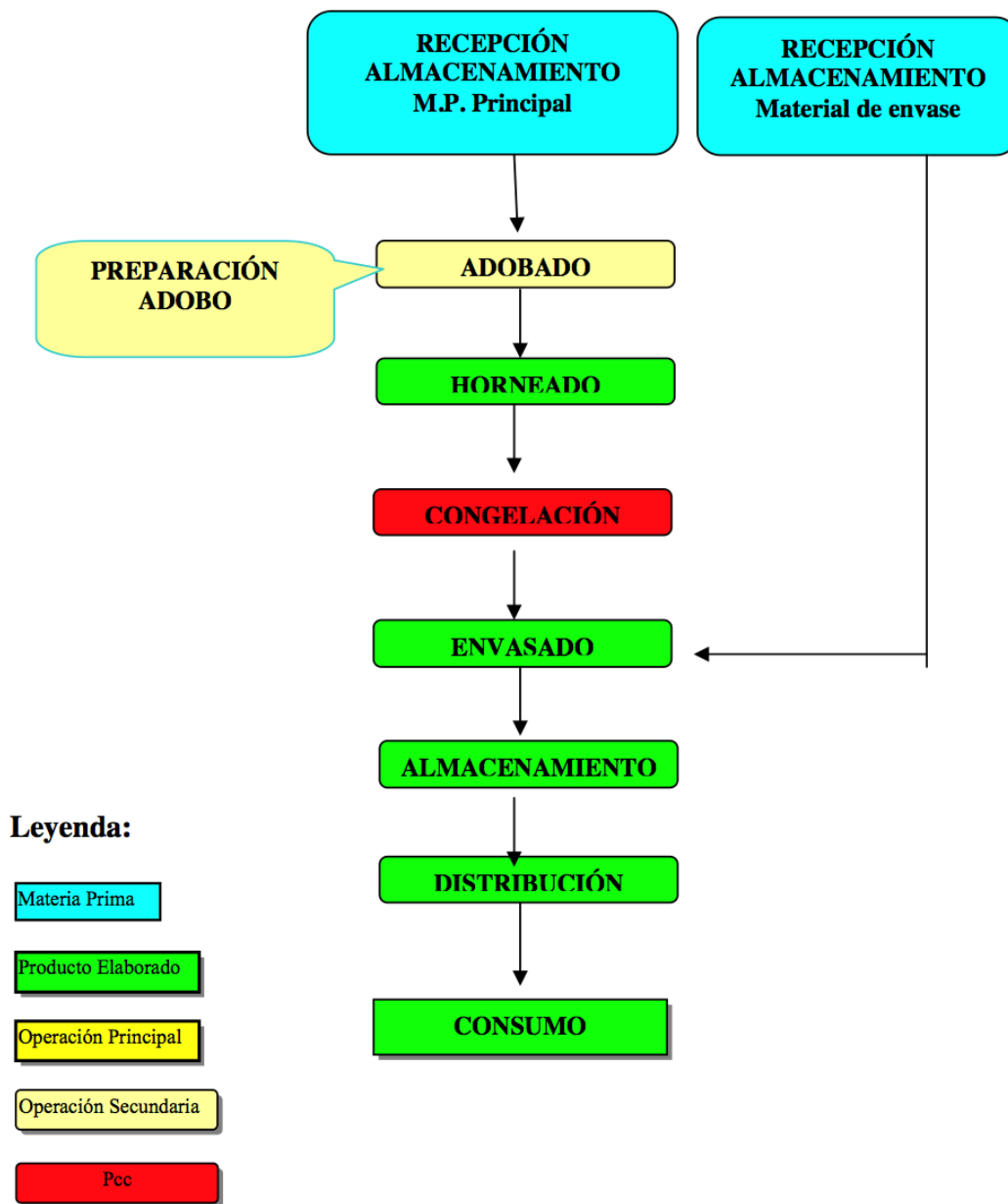


Figura 28. Diagrama de flujo de la línea 6 (elaboración de productos asados)

La línea número 7 está dedicada a la elaboración de productos empanados y refrigerados envasados en atmósfera modificada. En esta línea se elaboran tanto conformados de carne como de pescado empanados o rebozados que van a ser comercializados refrigerados y envasados en atmósfera protectora. La elaboración de los productos que se elaboraron en esta línea siguió el siguiente diagrama de flujo:

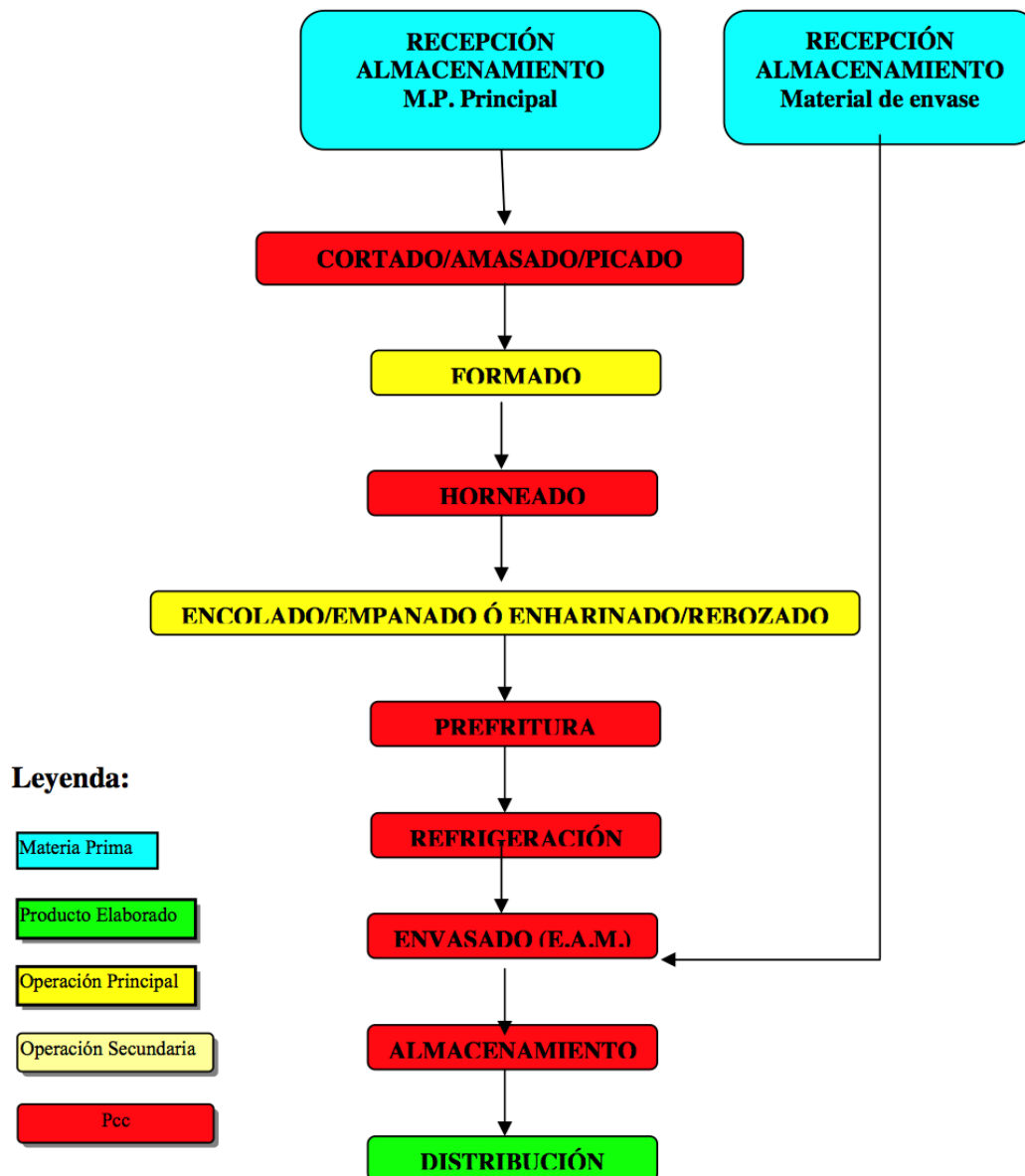


Figura 29. Diagrama de flujo de la línea 7 (elaboración de productos empanados y refrigerados envasados en atmósfera protectora)

La línea número 8 está dedicada a la elaboración de elaborados cárnicos, que pueden ser productos totalmente terminados, como albóndigas de carne o pueden ser productos intermedios, como por ejemplo San Jacobos. La elaboración de los productos que se elaboraron en esta línea siguió el siguiente diagrama de flujo (Figura 30):

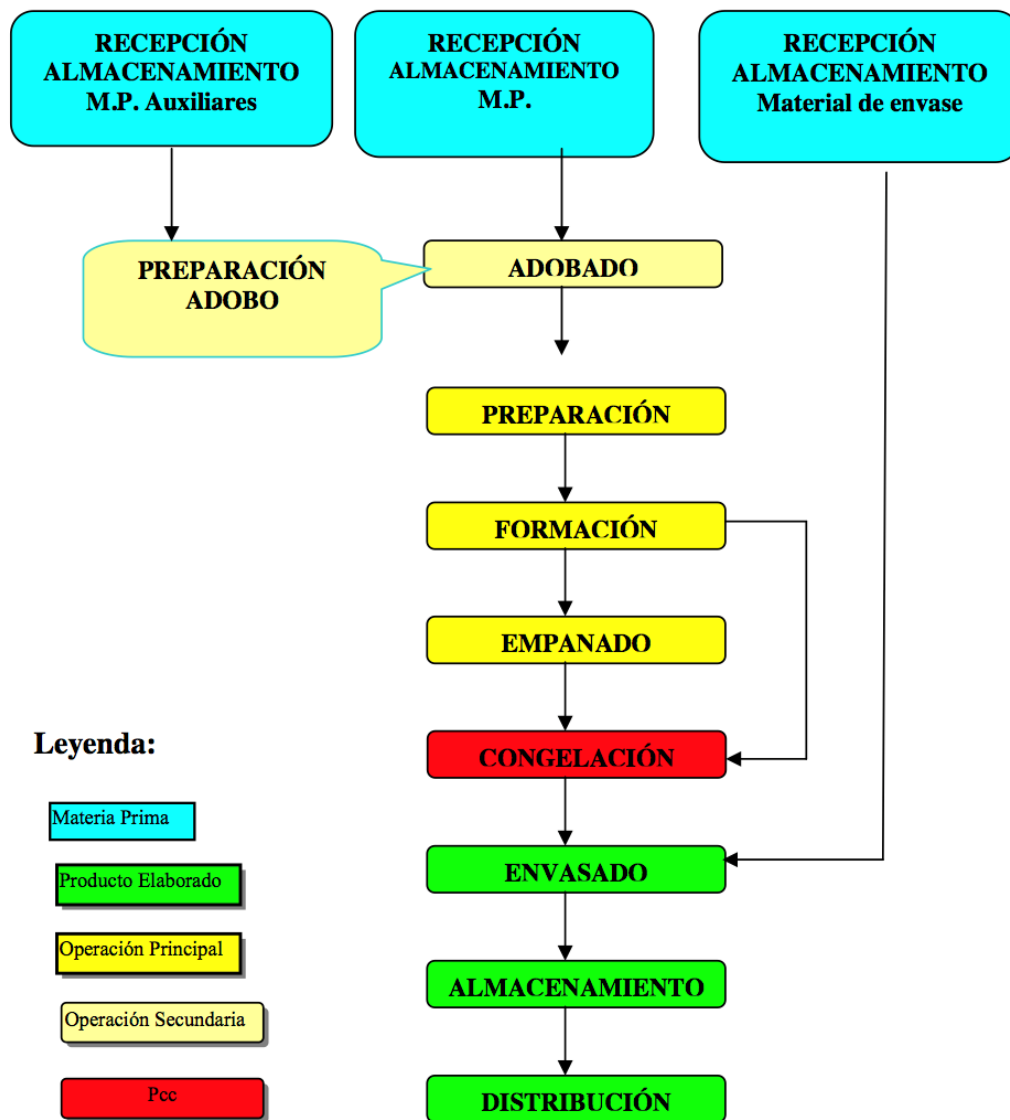


Figura 30. Diagrama de flujo de la línea 8 (producción de elaborados cárnicos)

La línea número 9 está dedicada a la elaboración de productos empanados o rebozados que lleven huevo como ingrediente (huevos con bechamel, productos rebozados con témpura a base de huevo, etc). La elaboración de los productos que se elaboraron en esta línea siguió el siguiente diagrama de flujo (Figura 31):

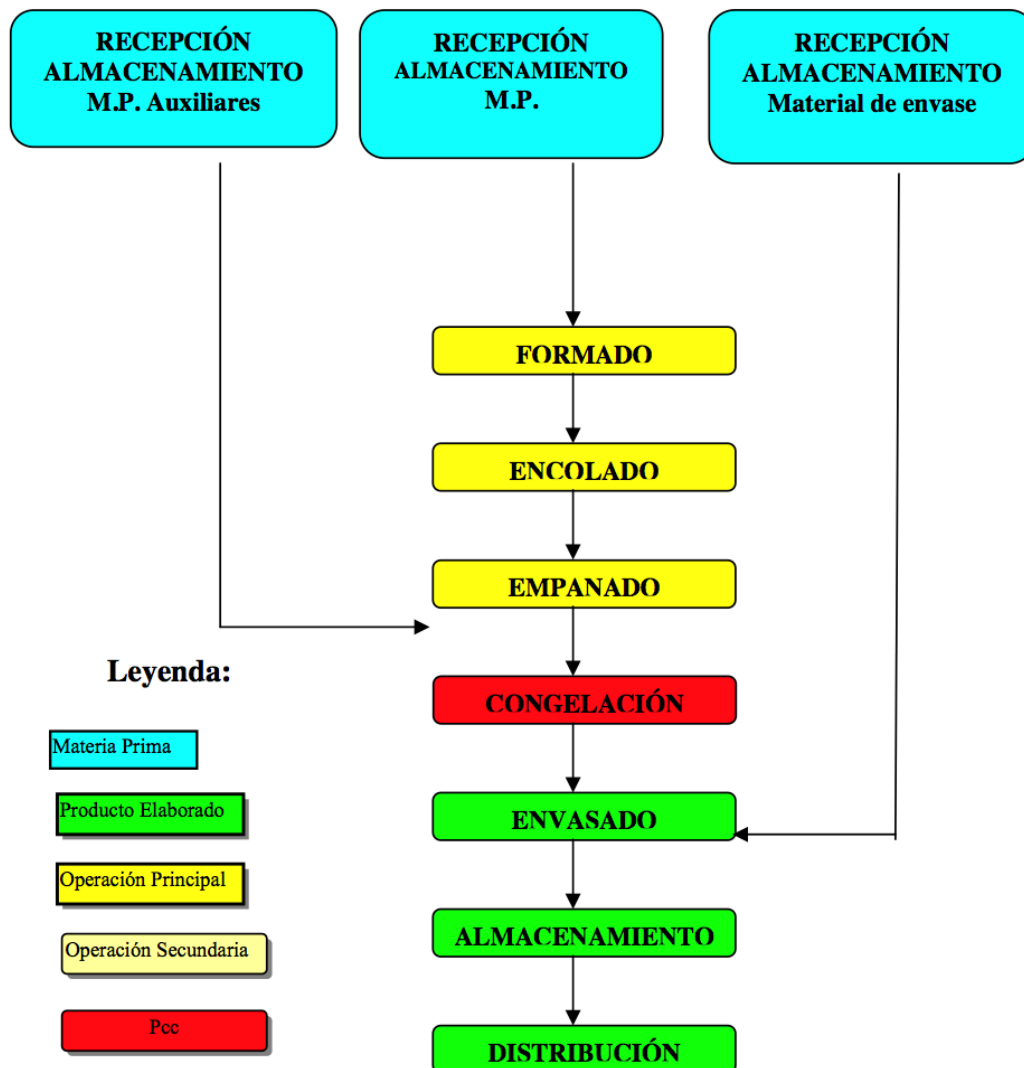


Figura 31. Diagrama de flujo de la línea 9 (elaboración de productos empanados o rebozados que lleven huevo como ingrediente)

Finalmente, la línea número 10 está dedicada a la elaboración de productos empanados o rebozados que lleven leche o bechamel como ingrediente (huevos con bechamel, productos tipo Villeroy, etc). La elaboración de los productos que se elaboraron en esta línea siguió el siguiente diagrama de flujo (Figura 32):

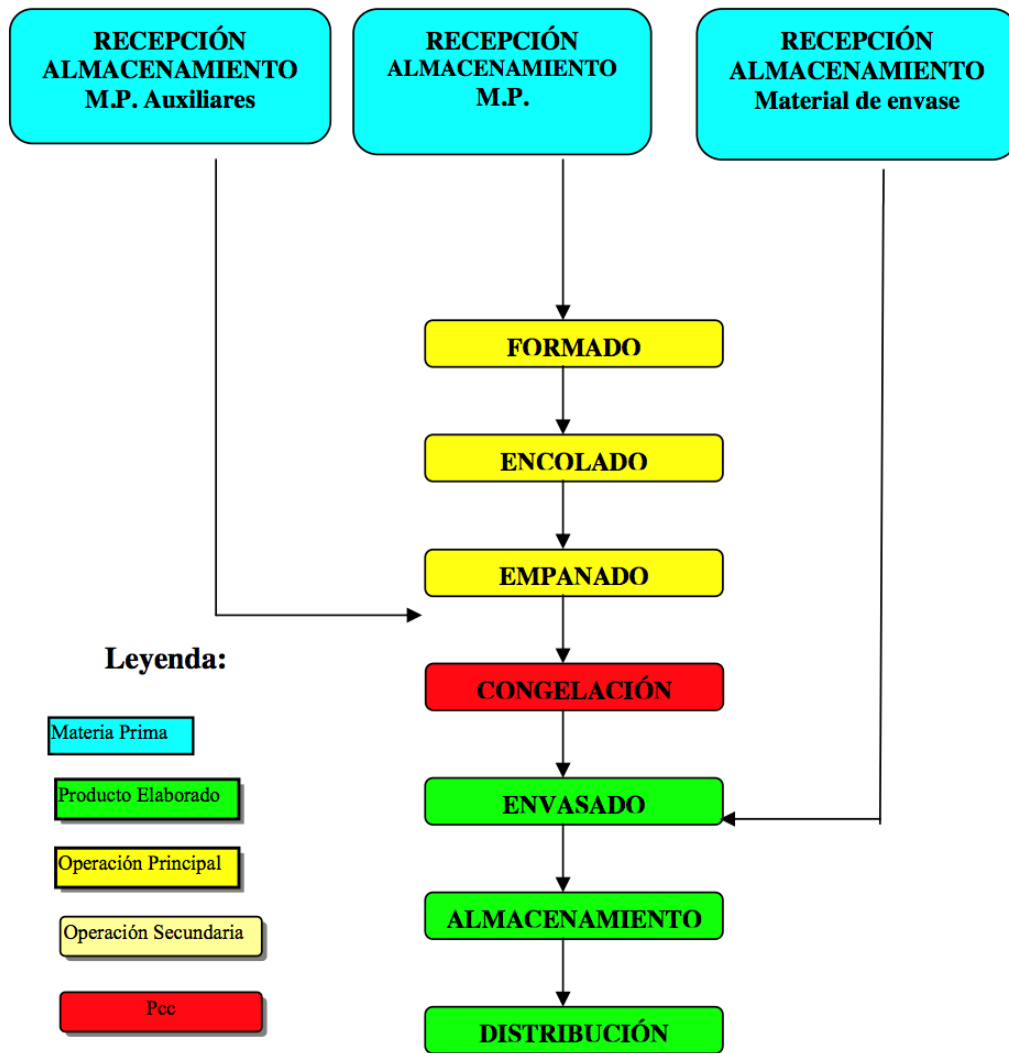


Figura 32. Diagrama de flujo de la línea 10 (elaboración de productos empanados o rebozados que lleven huevo como ingrediente)

Las mencionadas líneas, se considera que son especialmente susceptibles de sufrir contaminación cruzada entre líneas aquellas que se sitúan a una distancia entre ellas inferior a 10 metros. La distribución y separación entre las diferentes líneas se muestra en la Tabla siguiente (Tabla 5):

Tabla 5. Distancia entre las diferentes líneas de producción de la empresa Clavo Congelados S.A. en Caldas de Reis

LÍNEA	DISTANCIAS A LAS LÍNEAS EN m									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0	3	23	33	33					
2	3	0	26	36	36					
3			0	10	10	18	15	24	15	15
4			10	0	0	9	7	11		
5			10	0	0	9	7	11		
6			18	9	9	0	4	2		
7			15	7	7	4	0	3		
8			24	5	5	2	3	0		
9			15	0	0				0	
10			15	0	0					0

3.3.2. Procedimiento de toma de muestras

En cada una de las líneas de producción se tomaron muestras de todos los productos elaborados en la misma (en un número variable), para comprobar si en dichos productos existían alérgenos que no estuviesen incluidos en la composición del producto.

Adicionalmente, en todas las líneas de fabricación, tras terminar el proceso de limpieza y desinfección, se tomaron muestras de 10 cm² de superficie con hisopos de algodón que se introducen dentro de tubos Falcon de 25 mL en solución salina al 0,85%.

Las muestras, tanto de alimentos como de superficies fueron analizadas siguiendo para cada alérgeno los procedimientos que se describen a continuación.

3.3.3. Métodos analíticos empleados

Para la determinación de la presencia de los alérgenos estudiados tanto en los alimentos como en las muestras de superficies de instrumental, se realizaron determinaciones según el caso mediante ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) o bien mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En todos los casos se utilizaron kits comerciales siguiendo las instrucciones del fabricante. En la Tabla 6 podemos ver un resumen del tipo del ensayo empleado para cada determinación, su fabricante y el equipo empleado en la lectura de los resultados.

Tabla 6. Modelos y fabricantes de los kits empleados para la determinación de los diferentes alérgenos estudiados

Análisis	Kit	Método	Fabricante (ciudad, país)	Equipo lectura
Sulfitos	Alert [®] Sulfites Detection Kit	Colorimetría	Neogen (Lansing, USA)	Ninguno
Extracción ADN	SureFood [®] PREP Allergen	PCR	R-biopharm (Darmstadt, Alemania)	ABI PRISM 7000 SDS Applied Biosystems (USA)
Moluscos	SureFood [®] Allergen Mollusc			
Pescado	SureFood [®] Allergen Fish			
Crustáceos	Enzyme immunoassay for the detection of crustacean protein			
Leche	Enzyme immunoassay for the detection of milk proteins	ELISA	Tecna (Trieste, Italia)	Lector de placas Das (Roma, Italia)
Soja	Enzyme immunoassay for the detection of soya proteins			
Gluten	Ridascreen [®] Gliadin		R-biopharm (Darmstadt, Alemania)	
Huevo	Ridascreen [®] Fast Ei/Egg Protein			

3.3.3.1. Determinación de sulfitos (ALERT[®])

Este ensayo semi-cuantitativo permite la detección rápida de residuos de sulfitos en determinados alimentos. Dichos residuos producen cambios de coloración en la reacción, los cuales son indicativos del nivel de sulfitos que presenta la muestra problema.

3.3.3.1.1. Materiales empleados

- Solución de activación
- Reactivo de tinción
- Escala de color

3.3.3.1.2. Procedimiento

El procedimiento empleado siguió los pasos especificados por el fabricante del método, que se enumeran a continuación:

- Dejar la muestra a temperatura ambiente
- Echar una gota de la solución de activación en la superficie de la muestra.
- Inmediatamente después, añadir una gota del reactivo de tinción en el mismo lugar donde se aplicó la gota anterior y esperar un minuto.
- Después de esperar un minuto, observar el color del área donde se echaron los reactivos.
- Usar la escala de color para determinar el nivel de sulfitos que existe en la muestra.



Figura 33. Ejemplo de resultados obtenidos con el Kit Alert®.

3.3.3.1.3. Interpretación de los resultados

- Si el reactivo de tinción no ha cambiado de color, la muestra no ha sido tratada con sulfitos
- Si el reactivo ha virado a violeta, la muestra presenta unos niveles de sulfitos de entre 10 y 100 µg/g.
- Si el reactivo de tinción adopta una coloración clara quiere decir que el nivel de sulfitos excede las 100 µg/g.

3.3.3.2. Método empleado para la detección de pescado (PCR)

Para este análisis se ha empleado el kit comercial SureFood® Allergen Fish (R-Biopharm), el cual detecta ADN de pescado con un límite de detección de ≤ 5 copias de ADN.

3.3.3.2.1. Materiales empleados

- Master mix para muestras de pescado
- Master mix de control de inhibición
- Control positivo

- Taq Polimerasa
- Éter dietílico formalina (FDE)
- Equipo de PCR cuantitativa (termociclador)
- Placas ópticas
- Láminas ópticas para cubrir la placa
- Micropipetas de volumen variable
- Puntas con filtro

3.3.3.2.2. Preparación de la master mix

Se calculó el número total de reacciones a realizar (muestras y controles), siendo recomendados un control negativo, uno positivo y un control de inhibición para cada muestra. Para este último se añadió el ADN de la muestra en los pocillos de reacción que contenían la master mix de control de inhibición. Para observar el funcionamiento de este reactivo se seleccionó un tubo de reacción al que no se añadió ADN. Este fue el control positivo de la master mix de inhibición. Los componentes de cada pocillo de reacción para un volumen de 25 μ l fueron:

- Master Mix de pescado: 18,8 μ l (para las muestras)
- Master Mix de control de inhibición : 18,8 μ l (para los controles de inhibición)
- FDE: 1,1 μ l
- Taq Polimerasa: 0,1 μ l
- DNA: 5 μ l

Antes de usar los reactivos éstos fueron agitados y centrifugados brevemente.

3.3.3.2.3. Preparación de la mezcla de PCR

Para la preparación de las muestras que posteriormente se sometieron a PCR se siguieron las instrucciones del fabricante, que se especifican a continuación:

- Pipetear 20 μ l de master mix para muestras de pescado en los pocillos o tubos elegidos.
- Pipetear 20 μ l de master mix de control de inhibición en los pocillos o tubos elegidos.
- Cerrar el tubo designado como control negativo.
- Pipetear 5 μ l de ADN de la muestra a los tubos seleccionados.
- Pipetear 5 μ l de ADN del control positivo en los tubos seleccionados.
- Centrifugar los tubos, o la placa de reacción, brevemente a baja velocidad.
- Situar los pocillos en el termociclador y poner las condiciones de reacción descritas en el siguiente apartado.

Las condiciones de reacción dependerán del equipo utilizado. En este caso se ha empleado un ABI 7000 SDS (Applied Biosystems) (Tabla 7).

Tabla 7. Condiciones de reacción para la determinación de la presencia de pescado.

Desnaturalización inicial	5 minutos, 95 °C
Ciclos	45
Desnaturalización	15 segundos, 95 °C
Annealing/Extension	30 segundos, 60 °C
Detección de fluorescencia	Detección: Al final de la fase de extensión Reporter: FAM Quencher: TAMRA Referencia pasiva: ninguna

3.3.3.2.4. Interpretación de los resultados

En primer lugar, se observaron los controles de reacción para ver si arrojaron los resultados esperados. Las muestras se consideraron positivas si existió amplificación (Figura 34). Sin embargo, en el caso de que las muestras fuesen negativas, el control de inhibición debió ser positivo para garantizar que no existen inhibidores de la reacción y que, por lo tanto, el resultado es correcto. De otro modo, se realizó de nuevo la extracción y purificación del ADN de la muestra.

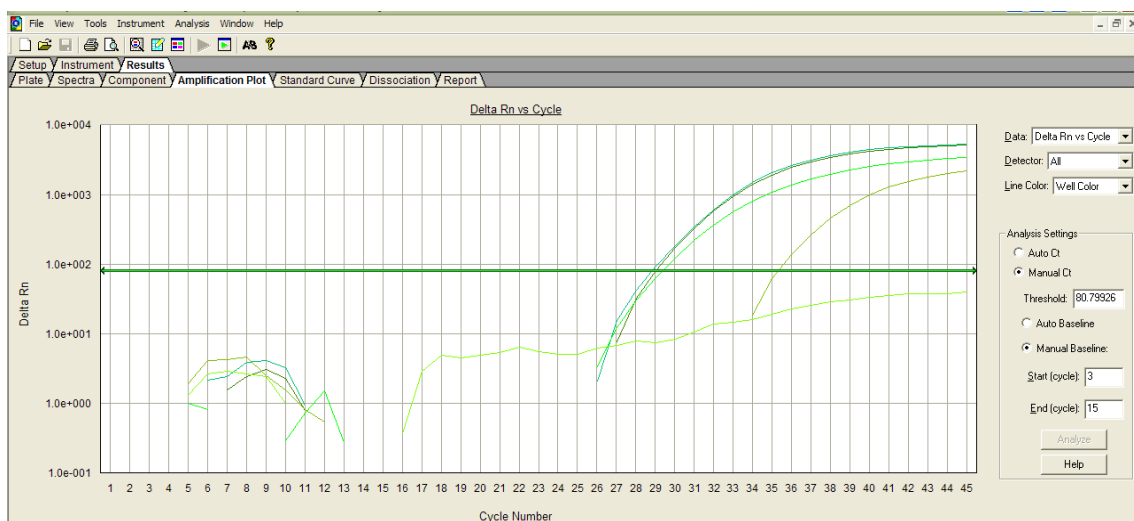


Figura 34. Imagen de PCR en tiempo real de una muestra positiva de pescado

3.3.3.3. Método empleado para la determinación de moluscos (PCR)

Para esta determinación se ha empleado el kit comercial SureFood® Allergen Molluscs (R-Biopharm), el cual detecta el ADN de moluscos (caracoles, mejillones, cefalópodos) con un límite de detección de ≤ 5 copias de ADN.

3.3.3.3.1. Materiales empleados

- Master mix para muestras de moluscos
- Master mix de Control de Inhibición
- Control Positivo

- Taq Polimerasa
- FDE
- Equipo de PCR cuantitativa (termociclador)
- Placas ópticas
- Láminas ópticas para cubrir la placa
- Micropipetas de volumen variable
- Puntas con filtro

3.3.3.3.2. Preparación de la master mix

Se calculó el número total de reacciones necesarias (muestras y controles), siendo recomendados un control negativo, uno positivo y un control de inhibición para cada muestra. Para este último se añadió el ADN de la muestra en los pocillos de reacción que contenían la master mix de control de inhibición. Para observar el funcionamiento de este reactivo se seleccionó un tubo de reacción al que no se añadió ADN. Este fue el control positivo de la master mix de inhibición.

Los componentes de cada pocillo de reacción para un volumen de 25 μ l fueron:

- Master mix de moluscos: 18,8 μ l (para las muestras)
- Master mix de Control de Inhibition: 18,8 μ l (para los controles de inhibición)
- FDE: 1,1 μ l
- Taq Polimerasa: 0,1 μ l
- ADN: 5 μ l

Antes de usar los reactivos éstos fueron agitados y centrifugados brevemente.

3.3.3.3.3. Preparación de la mezcla de PCR

- Pipetear 20 µl de master mix para muestras de moluscos en los pocillos o tubos elegidos.
- Pipetear 20 µl de master mix de control de inhibición en los pocillos o tubos elegidos.
- Cerrar el tubo designado como control negativo
- Pipetear 5 µl de ADN de la muestra a los tubos seleccionados.
- Pipetear 5 µl de ADN del Control Positivo en los tubos seleccionados.
- Centrifugar los tubos, o la placa de reacción, brevemente a baja velocidad.
- Situar los pocillos en el termociclador y poner las condiciones de reacción descritas en el siguiente apartado.

3.3.3.3.4. Condiciones de la reacción

Las condiciones de reacción dependen del equipo utilizado. En este caso se ha empleado un ABI 7000 SDS (Applied Biosystems) (Tabla 35).

Tabla 8. Condiciones de reacción para la determinación de la presencia de moluscos

Desnaturalización inicial	5 min, 95 °C
Ciclos	35
Desnaturalización	15 seg, 95 °C
Anillamiento/Extension	30 seg, 60 °C
Detección de fluorescencia	Detección: Al final de la fase de extensión Reporter: FAM Quencher: TAMRA Referencia pasiva: ninguna

3.3.3.3.5. Interpretación de los resultados

En primer lugar, se observaron los controles de reacción para ver si arrojaron los resultados esperados. Las muestras se consideraron positivas si existió amplificación. Sin embargo, en el caso de que las muestras fuesen negativas, el control de inhibición debe ser positivo para garantizar que no existen inhibidores en la reacción y que, por lo tanto, el resultado es correcto. De otro modo, se realizó de nuevo la extracción y purificación del ADN de la muestra.

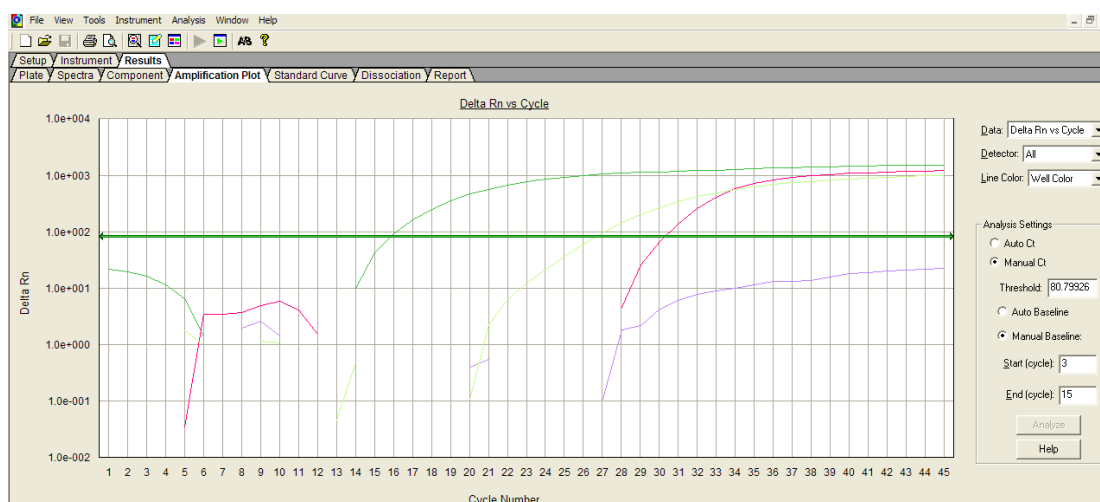


Figura 35. Imagen de PCR en tiempo real de una muestra positiva de moluscos

3.3.3.4. Método empleado para la detección de leche (ELISA)

Para la determinación de la presencia de leche se utilizó un kit comercial de ELISA de la marca Tecna (Trieste, Italia). Este ensayo inmunoenzimático permite el análisis cuantitativo de las proteínas de la leche presentes en productos alimenticios. Esto se debe a una serie de reacciones antígeno - anticuerpo que, una vez terminado el procedimiento, pueden ser leídas mediante espectrofotometría.

3.3.3.4.1. Material de trabajo

- Placa de microtitulación.

- Tapa de plástico.
- Microtubos.
- Patrones de concentración: 0 µg/g, 1 µg/g, 6 µg/g, 18 µg/g y 30 µg/g.
- Anticuerpo 10x.
- Enzima conjugado 10x.
- Buffer de ensayo 10x.
- Solución de desarrollo.
- Solución de parada de la reacción.
- Buffer de extracción 20x.
- Picadora.

3.3.3.4.2. Preparación de muestras sólidas

La preparación de las muestras siguió el procedimiento especificado por el fabricante que se describe a continuación:

- Picar 5 g muestra.
- Añadir 10 ml de buffer de extracción 1x, previamente calentado a 60 °C, a 1 g de la muestra triturada.
- Mezclar y agitar en vórtex hasta obtener una suspensión homogénea.
- Incubar 15 minutos en baño termostático a 60°C, agitando cada 5 minutos para mantener la muestra en suspensión.
- Enfriar las muestras hasta que alcancen la temperatura ambiente y, si es necesario, ponerlas en hielo.
- Centrifugar a 10.000 x g durante 10 minutos. Una alternativa a la centrifugación sería filtrar el extracto con papel de filtro.

- Después de la centrifugación es preferible transferir 1 ml de sobrenadante a un tubo limpio.

- Usar 100 μ l del extracto para el ensayo.

3.3.3.4.3. Procedimiento

Para el análisis de las muestras se siguió el procedimiento que se describe a continuación:

- Diseñar el ensayo teniendo en cuenta que los patrones y las muestras deben hacerse por duplicado.

- Agitar los patrones en vórtex durante 5 minutos.

- Añadir 100 μ l de muestra en los microtubos.

- Añadir 100 μ l de anticuerpo en todos los tubos, pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces mientras se mezcla. Cubrir con la tapa de plástico e incubar 30 minutos a temperatura ambiente.

- Prelavar los pocillos de la placa de microtitulación de la siguiente manera:

a) Llenar completamente todos los pocillos con buffer de ensayo 1x y vaciar el contenido de los pocillos.

b) Repetir la secuencia de lavado 5 veces.

c) Quitar todas las gotas restantes volcando la microplaca en un papel absorbente.

d) Mezclar otra vez el contenido de los microtubos, pipeteando 10 veces, y transferir 100 μ l al correspondiente pocillo de la placa previamente lavada. Cubrir con la tapa y agitar suavemente varios segundos.

- Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.

- Vaciar el contenido de los pocillos y repetir la secuencia de lavado descrita anteriormente.

- Sin dejar que se sequen los pocillos, añadir 100 μl de enzima conjugado 1x a todos los pocillos. Cubrir con la tapa y agitar la placa suavemente varios segundos.
- Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
- Repetir el lavado del mismo modo que las veces anteriores.
- Añadir 50 μl de solución de desarrollo a cada pocillo y agitar la placa minuciosamente.
- Incubar 15 min. a temperatura ambiente protegiendo la placa de la luz directa.
- Añadir 150 μl de solución de parada de reacción a cada pocillo y agitar la placa suavemente durante varios segundos.
- Esperar 5 minutos.
- Medir la absorbancia a 450 nm.

3.3.3.4.3. Cálculo de resultados

Para el cálculo de los resultados obtenidos se siguió el procedimiento que se describe a continuación:

- Calcular la media de absorbancia de los patrones y de las muestras
- Dividir la media de los valores de absorbancia de cada muestra y de cada patrón entre la media de los valores de absorbancia del patrón de 0 $\mu\text{g/g}$ y multiplicar por 100, así la “Máxima Unión” es igual al 100% y los valores de absorbancia se expresan en porcentaje.
- Introducir los valores calculados para cada estándar en un sistema semilogarítmico de coordenadas y dibujar la curva estándar.
- Interpolar los valores de cada muestra a partir de la curva de calibrado.
- Los resultados se expresarán en $\mu\text{g/g}$ de leche en polvo desnatada en la muestra problema.

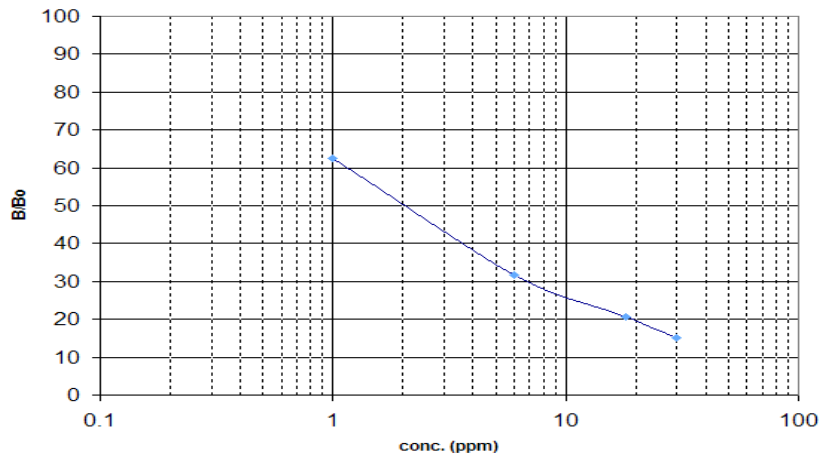


Figura 36. Imagen de recta de calibrado para la determinación de la presencia de proteínas de leche

3.3.3.5. Método empleado para la detección de proteína de huevo (ELISA)

Para este propósito se empleó el test RIDASCREEN® FAST Ei/ Egg Protein (R-Biopharm), que consiste en un ensayo inmunoenzimático tipo sandwich que permite el análisis cuantitativo de huevo en productos alimenticios. Esto se debe a una serie de reacciones antígeno - anticuerpo que, una vez terminado el procedimiento, pueden ser leídas por espectrofotometría.

3.3.3.5.1. Materiales empleados

- Placa de microtiter.
- 5 Patrones: 0 $\mu\text{g/g}$, 0,5 $\mu\text{g/g}$, 1,5 $\mu\text{g/g}$, 4,5 $\mu\text{g/g}$, 13,5 $\mu\text{g/g}$ y 80 $\mu\text{g/g}$ de huevo en polvo en solución acuosa.
- Enzima conjugado.
- Substrato/ Solución cromogénica.
- Solución de parada de reacción.
- Buffer de extracción.

- Buffer de lavado.
- Agitador.
- Centrífuga y viales de centrífuga.
- Picadora.
- Baño termostático.
- Micropipetas de volumen variable 20 - 1000 μ l.

3.3.3.5.2. Extracción de las muestras

- Triturar 5 g de la muestra cuidadosamente y mezclar minuciosamente.
- Pesar 1 g de la muestra, añadir 20 ml de buffer de extracción previamente diluido con agua destilada (1:20) y extraer durante 10 minutos a 60 °C. El buffer de extracción debe usarse a una temperatura de 60 °C.
- Centrifugar la muestra, al menos 10 min/ 2500 g.
- Filtrar el sobrenadante.
- Usar 100 μ l por pocillo del sobrenadante filtrado.

3.3.3.5.3. Procedimiento

El procedimiento seguido consistió en realizar los pasos siguientes, siguiendo las indicaciones del fabricante:

1. Todos los ensayos, tanto patrones como muestras, fueron realizados por duplicado.
2. Añadir 100 μ l de cada estándar o muestra en los pocillos, agitar suavemente e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente.

3. Vaciar el contenido de los pocillos volcando la microplaca y sacudiéndola contra un papel absorbente varias veces. Llenar con 250 μl de buffer de lavado previamente diluido y vaciar el contenido de los pocillos otra vez. Repetir 2 veces más.

4. Añadir 100 μl del enzima conjugado previamente diluido (1:11) a cada pocillo, agitar suavemente e incubar 10 minutos a temperatura ambiente.

5. Repetir la secuencia de lavado descrita anteriormente.

6. Añadir 100 μl de sustrato/ solución cromogénica a cada pocillo. Mezclar suavemente e incubar 10 minutos a temperatura ambiente, protegiendo la placa de la luz.

7. Añadir 100 μl de la solución de parada a cada pocillo. Agitar la microplaca suavemente y medir la absorbancia a 450 nm en un plazo de 10 minutos.

3.3.3.5.4. Interpretación de resultados

La concentración de huevo se obtuvo a partir de la “función de interpolación polinómica” después de ser multiplicado el resultado obtenido por el factor de dilución: 20. El resultado se expresó en $\mu\text{g/g}$ de huevo en polvo. Multiplica por 0,49 entonces se expresó en $\mu\text{g/g}$ de proteína total de huevo pero, mientras que multiplica por 0,163 entonces se obtuvieron $\mu\text{g/g}$ de proteína de clara de huevo.

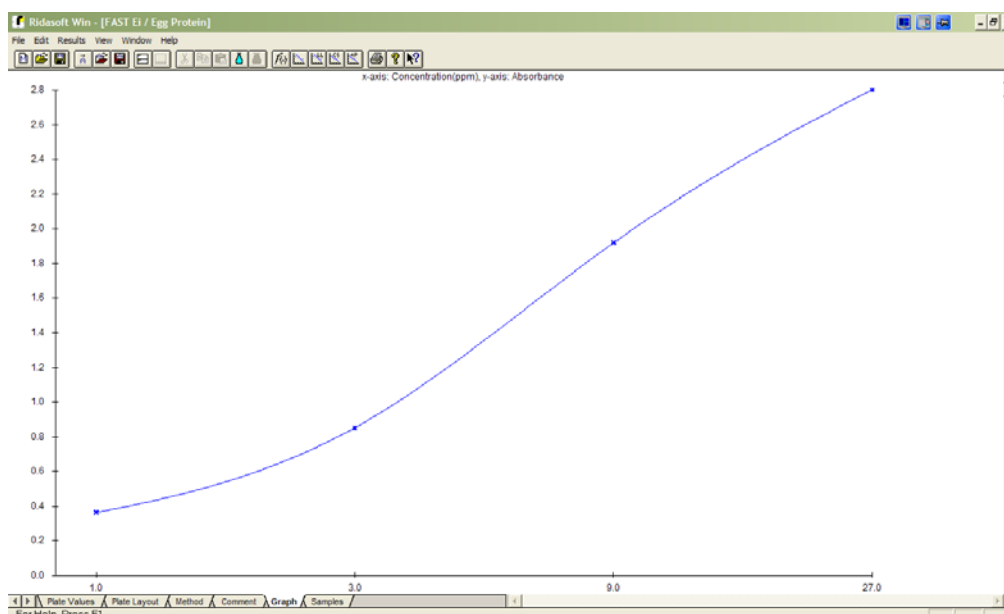


Figura 37. Imagen de curva de calibrado para la determinación de la presencia de proteínas de huevo

3.3.3.6. Método empleado para la detección de gliadina (ELISA)

Para esta determinación se utilizó el kit comercial RIDASCREEN® Gliadin (R-Biopharm), que consiste en un ensayo inmunoenzimático tipo sandwich que permite el análisis cuantitativo de prolaminas como la gliadina del trigo, entre otras. Esto se debe a una serie de reacciones antígeno - anticuerpo que, una vez terminado el procedimiento, pueden ser leídas mediante espectrofotometría.

3.3.3.6.1. Materiales empleados

- Placa de microtitulación microplacas para ensayos.
- Solución combinada para extracción.
- 6 Patrones: 0 $\mu\text{g/g}$, 5 $\mu\text{g/g}$, 10 $\mu\text{g/g}$, 20 $\mu\text{g/g}$, 40 $\mu\text{g/g}$ y 80 $\mu\text{g/g}$ de gliadina.
- Enzima conjugado.
- Substrato.
- Reactivo cromogénico.

- Solución de parada de reacción.
- Diluyente de muestras.
- Tampón de lavado.
- Centrífuga de sobremesa.
- Micropipetas automáticas de 100, 200 y 1000 μ l de volumen.
- Agitador vortex.
- Agua destilada.
- Balanza analítica.
- Picadora.
- Campana de flujo.
- Baño termostático.
- Etanol 60% y 80%.
- Lector de microplacas de ELISA .

3.3.3.6.2. Preparación de controles

Los controles de reacción fueron preparados siguiendo el procedimiento que se describe a continuación:

- Extraer 1 g de muestra con 10 ml etanol 60 %.
- Agitar 30 segundos en vortex y posteriormente mantener en agitación constante durante 10 min.
- Centrifugar 10 minutos al menos a 2500 g a temperatura ambiente.
- Diluir el sobrenadante 1:50 con el diluyente de muestras, previamente diluido en agua destilada (1:5).
- Echar 100 μ l en cada pocillo de la placa de microtitulación.

3.3.3.6.3. Extracción de las muestras

- Pesar 50 g muestra y homogeneizar.
- Pesar 0,25 g de la muestra homogeneizada en microtubo y añadir 2,5 ml de solución combinada en campana con extracción de aire.
- Agitar bien.
- Incubar 40 min/ 50 °C.
- Dejar enfriar y mezclar con 7,5 ml etanol 80 %.
- Agitar durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Centrifugar durante 10 minutos al menos a 2500 x g.
- Pasar el sobrenadante a otro vial.
- Diluir la muestra al menos 1:12,5 con diluyente de muestra previamente diluido.
- Echar 100 µl en cada pocillo.

3.3.3.6.4. Procedimiento

El procedimiento seguido consistió en realizar los pasos siguientes, siguiendo las indicaciones del fabricante:

- Todos los ensayos fueron realizados por duplicado.
- Echar 100 µl patrón o muestra en cada pocillo.
- Incubar 30 minutos a T^a ambiente.
- Vaciar los pocillos y rellenar con 250 µl de buffer de lavado previamente diluido (1:10 en agua destilada) y volver a vaciar los pocillos. Repetir 2 veces más.
- Añadir 100 µl enzima conjugado.
- Incubar 30 minutos a T^a ambiente.
- Volver a lavar 3 veces.
- Añadir 50 µl sustrato y 50 µl reactivo cromogénico en cada pocillo y agitar suavemente.

- Incubar 30 minutos a T^a ambiente en la oscuridad.
- Añadir 100 µl solución de parada de reacción en cada pocillo.
- Agitar suavemente y medir la absorbancia a 450 nm.
- Leer los resultados antes de 30 minutos

3.3.3.6.5. Interpretación de resultados

La concentración de gliadina expresado en µg/g se obtuvo a partir de la curva de calibración (Figura 38), tras ser multiplicado el resultado obtenido por el factor de dilución: 500. El resultado se multiplicó por 2 para obtener la concentración de gluten, ya que la gliadina suele representar la mitad de la cantidad total de gluten presente en el alimento.

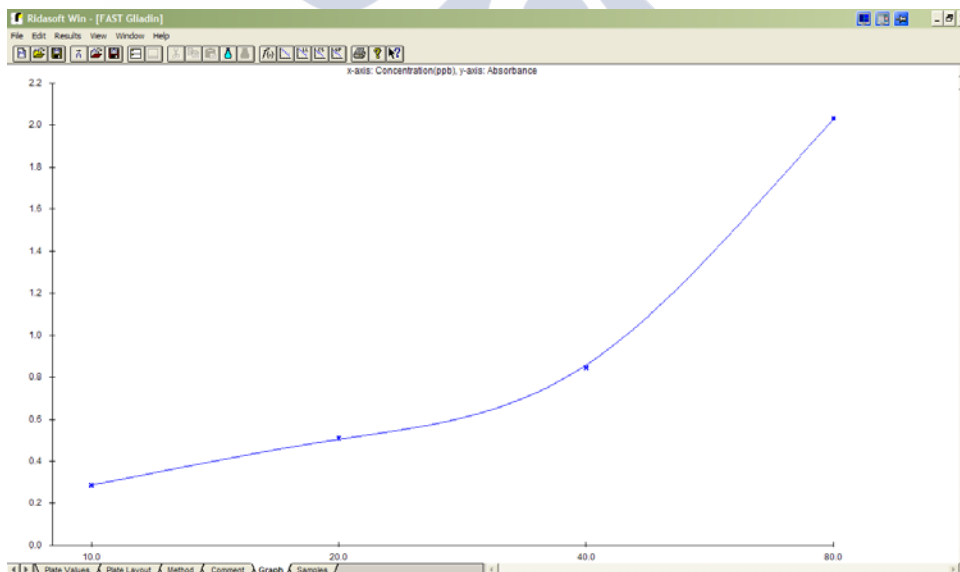


Figura 38. Imagen de la curva de calibrado para la determinación de la presencia de gliadina

3.3.3.7. Método empleado para la detección de crustáceos (ELISA)

Para este propósito fue utilizado un ensayo inmunoenzimático que permitió el análisis cuantitativo de proteínas de crustáceos presentes en productos alimenticios (Tecna). El fundamento de este kit comercial se basa en una serie de reacciones antígeno - anticuerpo que, una vez terminado el procedimiento, pueden ser leídas por espectrofotometría.

3.3.3.7.1. Materiales utilizados

- Placa de microtiter.
- Tapa de plástico para placa de microtiter.
- Microtubos.
- Patrones de concentración: 0 µg/g, 0,5 µg/g, 2,5 µg/g y 12,5 µg/g.
- Anticuerpo 10x.
- Enzima conjugado 10x.
- Buffer de ensayo 10x.
- Solución de desarrollo.
- Solución de parada de la reacción.
- Buffer de extracción 20x.
- Agua destilada.
- Picadora.
- Viales de 15 ml.
- Baño termostático.
- Vórtex.
- Micropipetas de 100-1000 µl de volumen variable.
- Papel de filtro.

- Lector de microplacas y software.
- Balanza granatario.

3.3.3.7.2. Preparación de muestras sólidas

Las muestras fueron preparadas mediante el procedimiento siguiente:

- Picar 5 g muestra.
- Añadir 10 ml de buffer de extracción 1x, previamente calentado a 60 °C, a 0,5 g de muestra triturada.
- Mezclar y agitar en vórtex hasta obtener una suspensión homogénea.
- Incubar 15 minutos en baño termostático a 60 °C, agitando cada 5 minutos para mantener la muestra en suspensión.
- Enfriar las muestras hasta que alcancen temperatura ambiente.
- Centrifugar a 10.000 x g durante 10 minutos. Una alternativa a la centrifugación sería filtrar el extracto con papel de filtro.
- Después de la centrifugación se transfiere 1 ml de sobrenadante a un tubo limpio.
- Usar 100 µl del extracto para el ensayo.

3.3.3.7.3. Procedimiento

Todos los ensayos realizados, tanto muestras como patrones, fueron realizados por duplicado, siguiendo el siguiente procedimiento:

- Agitar los patrones en vórtex durante 5 minutos.
- Añadir 100 µl de muestra en los microtubos.
- Añadir 100 µl de anticuerpo en todos los tubos, pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces mientras se mezcla. Cubrir con la tapa de plástico e incubar 30 minutos a temperatura ambiente.

- Prelavar los pocillos de la placa de microtitulación de la siguiente manera:
 - a) Llenar completamente todos los pocillos con buffer de ensayo 1x y vaciar el contenido de los pocillos.
 - b) Repetir la secuencia de lavado 5 veces.
 - c) Quitar todas las gotas restantes volcando la microplaca en un papel absorbente.
- Mezclar otra vez el contenido de los microtubos, pipeteando 10 veces, y transferir 100 μ l al correspondiente pocillo de la placa previamente lavada. Cubrir con la tapa y agitar suavemente varios segundos.
- Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
- Vaciar el contenido de los pocillos y repetir la secuencia de lavado descrita anteriormente.
- Sin dejar que se sequen los pocillos, añadir 100 μ l de enzima conjugado 1x a todos los pocillos. Cubrir con la tapa y agitar la placa suavemente varios segundos.
- Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
- Repetir el lavado del mismo modo que las veces anteriores.
- Añadir 50 μ l de solución de desarrollo a cada pocillo y agitar la placa cuidadosamente.
- Incubar 15 min. a temperatura ambiente protegiendo la placa de la luz directa.
- Añadir 150 μ l de solución de parada de reacción a cada pocillo y agitar la placa suavemente durante varios segundos.
- Esperar 5 minutos.
- Medir la absorbancia a 450 nm.

3.3.3.7.4. Cálculo de los resultados

El cálculo de los resultados obtenidos se consiguió a través del siguiente procedimiento:

- Calcular la media de absorbancia de los patrones y de las muestras.
- Dividir la media de los valores de absorbancia de cada muestra y de cada patrón entre la media de los valores de absorbancia del patrón de 0 $\mu\text{g/g}$ y multiplicar por 100, así la “Máxima Unión” es igual al 100% y los valores de absorbancia se expresan en porcentaje. La intensidad de color en la reacciones es inversamente proporcional a la concentración de antígeno en la muestra así, a mayor absorbancia, menor concentración de proteína de crustáceos.
- Introducir los valores calculados para cada estándar en un sistema semilogarítmico de coordenadas y dibujar la curva estándar.
- Interpolarse los valores de cada muestra a partir de la curva de calibrado (Figura 39).
- Los resultados se expresarán en $\mu\text{g/g}$ de proteína de crustáceos en la muestra problema.

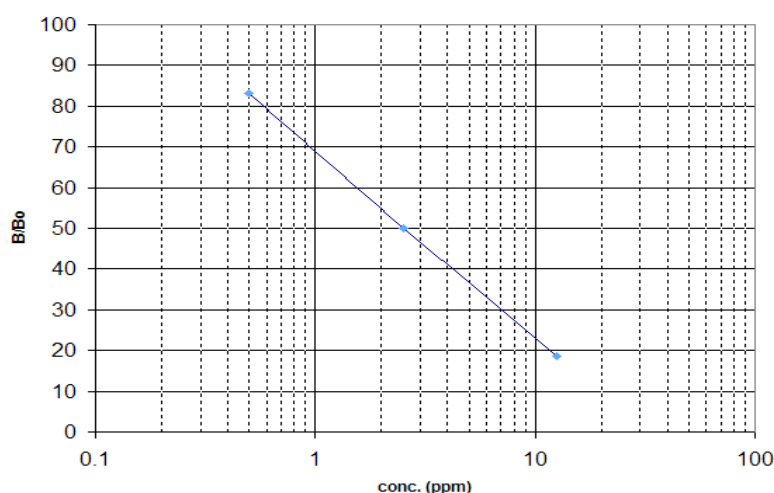


Figura 39. Imagen de recta de calibrado para la determinación de la presencia de crustáceos

3.3.4. Interpretación de los resultados obtenidos

Para la consideración de la presencia de un alérgeno en un alimento determinado como problema relevante o presencia irrelevante, se tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones:

a) La legislación aplicable (Real Decreto 2220/2004) obliga a la inclusión de los alérgenos en el etiquetado de un siempre que se empleen en al elaboración del producto.

b) Con respecto a la presencia en un alimento de trazas de alérgenos no incluidos como ingredientes, existen dos casos para los cuales están especificados valores de referencia (gluten y sulfitos). En el caso del gluten, para que un alimento pueda ser considerado como “exento de gluten”, debe contener menos de 20 $\mu\text{g/g}$ de producto terminado. En el caso de los sulfitos, el valor umbral para no tener que incluir su mención en el etiquetado del producto es de 10 $\mu\text{g/g}$.

c) No obstante, para el resto del los alérgenos, la legislación no indica cantidades mínimas de un modo específico, por lo cual existe un vacío legal que los integrantes de la industria alimentaria deben solucionar mediante la realización de análisis, y lo que es más difícil, una posterior interpretación.

Por lo tanto, para considerar que la presencia de un alérgeno en un alimento constituye una contaminación preocupante, tomamos como referencia el valor más bajo establecido en la legislación aplicable (10 $\mu\text{g/g}$), considerando que cantidades inferiores a dicho umbral no son significativas.





RESULTADOS Y DISCUSIÓN



4.1. Efectos de la pre-fritura industrial y del cocinado doméstico en la composición nutricional y el perfil lipídico de los alimentos

La composición de las empanadillas de atún y de las croquetas de jamón, así como los cambios ocurridos durante el proceso de pre-fritura y cocinado se muestran en la Tabla 9 (en el caso de las empanadillas de atún), y en la Tabla 10 (en el caso de las croquetas de jamón). En ambos casos, la humedad disminuyó de manera significativa durante el proceso de pre-fritura con respecto a los productos crudos. Tras el proceso de pre-fritura, no se encontraron descensos significativos en el contenido en humedad entre las muestras pre-fritas y las horneadas, mientras que en los productos fritos, si se observó un nuevo descenso en el contenido en humedad con respecto a los productos pre-fritos. Este descenso en el contenido en humedad (Tabla 10), es de manera indirecta el causante que otros componentes tales como las proteínas, grasas o cenizas se incrementen de manera significativa tanto durante la pre-fritura como posteriormente durante la fritura, tal y como previamente habían descrito otros autores como Castrillón, Navarro y Álvarez- Pontes (1997) o Weber y col. (2008) en productos de la pesca fritos, o bien como García-Arias, Pontes, García-Linares, García-Fernández y Sánchez-Muniz (2003) en el caso de pollo frito. De este modo, cuando los resultados son expresados sobre materia seca, la grasa es el único componente que aumenta en los productos pre-fritos con respecto a los crudos, así como en los productos fritos con respecto a los pre-fritos, en ambos casos debido a la absorción del aceite de fritura que penetra en el alimentos durante estos procesos, tal y como anteriormente publicaron otros autores (Varela y col., 2008).

Cabe señalar que este aumento observado en los distintos parámetros se produce como un efecto indirecto del descenso en humedad, en todos los casos excepto en el

contenido en grasa, el cual, a diferencia de la proteína o las cenizas, aumenta significativamente si expresamos los datos sobre extracto seco en lugar de sobre producto total. Dado que la grasa es el componente de mayor importancia en un alimento a la hora de determinar el contenido calórico del mismo, el aumento en la proporción de materia grasa en los alimentos pre-fritos con respecto a los crudos, y en los fritos con respecto a los pre-fritos, de manera indirecta provoca que el contenido calórico del alimento varíe en la misma dirección. Es importante señalar que en el caso de los productos horneados, no se observaron diferencias significativas ni en el contenido en grasa ni en el contenido calórico con respecto a los productos pre-fritos, lo cual resulta especialmente interesante desde el punto de vista nutricional.

Por lo que respecta al perfil lipídico de los productos, éste podemos observarlo en la Tabla 11 (para el caso de las empanadillas de atún) y en la Tabla 12 (para el caso de las croquetas de jamón). Tal y como otros trabajos relacionados habían documentado previamente para los casos del lomo de cerdo (Ramírez y Cava, 2005; Haark y col., 2007), o pescado (Sioen y col., 2006), tanto los procesos de pre-fritura como de fritura conllevan un intercambio de ácidos grasos entre el producto cocinado y el aceite en el cual se fríen, por lo que tras el cocinado, ambas grasas terminan presentando un perfil lipídico similar. No obstante, en el presente estudio, se encontró una menor presencia en los alimentos de ácidos grasos procedentes del aceite de fritura (entre un 36 y un 52% de los ácidos grasos principales) que los obtenidos por Romero, Sánchez-Muniz y Cuesta (2000) en patatas pre-fritas congeladas o por Pérez-Camino y col. (1991) en patatas pre-fritas congeladas y merluza empanada. En este sentido, es un hecho conocido que existen muchos factores que pueden afectar al intercambio de ácidos grasos entre el aceite de fritura y la grasa presente en el alimento frito, como la

temperatura y duración del proceso de fritura, el área de la superficie del alimento frito, o su composición en macronutrientes (Cuesta, Romero y Sánchez-Muniz, 2001).

De este modo, en el caso de los alimentos pre-fritos en aceite de oliva, se pudo observar que el 46,8% del ácido oleico encontrado en las empanadillas de atún y el 39,7% del encontrado en las croquetas de jamón procedía del aceite de oliva empleado en la pre-fritura (que contenía 77,6 mg de ácido oleico/ 100 mg aceite). Por otra parte, en el caso de los alimentos pre-fritos en aceite de girasol, se pudo determinar que el 46,8% del ácido linoleico encontrado en las empanadillas de atún y el 39,7% del encontrado en las croquetas de jamón procedía del aceite de girasol empleado en la pre-fritura (que contenía 60,8 mg de ácido linoleico/ 100 mg aceite). Para el caso de mayor parte de los restantes ácidos grasos presentes en los alimentos crudos, debido a la dilución que representa la penetración de aceite de fritura en el alimento, éstos se encontraron en menor concentración en los productos pre-fritos y posteriormente en los cocinados. Además, en el presente trabajo encontramos que tanto en el caso de las empanadillas de atún como en el caso de las croquetas de jamón, el perfil lipídico se asemejó más al del aceite en el cual fueron fritos que en el que fueron fritos. De este modo, el ácido graso predominante en los alimentos fritos en aceite de oliva fue el ácido oleico y el predominante en los alimentos fritos en aceite de girasol fue el ácido linoleico.

Por otra parte, diversos autores señalaron que como el uso de altas temperaturas en el cocinado de los alimentos puede tener como consecuencia la aparición de ácidos grasos poliinsaturados con conformación *trans* (Cuesta y col., 2001; Romero y col., 2000). No obstante, en ninguna de las muestras analizadas en el presente trabajo los AGT alcanzaron concentraciones superiores a 0,25 mg/100 g. De este modo, los resultados obtenidos sugieren que los AGT son constituyentes minoritarios de este tipo

de productos tanto crudos como tras su cocinado y que los posibles procesos de transisomerización causados por el tratamiento térmico aplicado son insignificantes (Cuesta y col., 2001; Romero y col., 2000).

Además, las Tablas 11 y 12 muestran que la fritura en aceite de oliva originó un marcado descenso en la proporción en la muestra de ácidos grasos saturados (AGS) y un incremento en la proporción de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI), mientras que la fritura en aceite de girasol originó un marcado descenso en la proporción en la muestra de ácidos grasos saturados y un incremento en la proporción de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), con independencia del tipo de aceite empleado en la pre-fritura. De este modo, la información mostrada en las Tablas 11 y 12 indica que el ratio AGPI/AGS aumentó en el caso de los productos fritos en aceite de girasol con respecto a los crudos, y que alcanzó niveles significativamente superiores en los fritos en aceite de girasol que en los fritos en aceite de oliva. Además, el contenido total de AGPI *n*-6 descendió en las empanadillas de atún fritas en aceite de oliva o bien pre-fritas en aceite de oliva y posteriormente horneadas con respecto a las empanadillas crudas. Con respecto a las croquetas de jamón, no se encontró ningún cambio en el contenido total de AGPI *n*-6 entre las croquetas crudas y aquellas que fueron fritas en aceite de oliva o bien pre-fritas en aceite de oliva y posteriormente horneadas. No obstante, si se encontró un aumento espectacular en el contenido total de AGPI *n*-6 tanto en las empanadillas de atún como en las croquetas de jamón que fueron fritas en aceite de girasol, o bien pre-fritas en este tipo de aceite y posteriormente horneadas, debido a la incorporación a dichos alimentos de ácido linoleico procedente del aceite de fritura. Desde el punto de vista nutricional, los productos fritos en aceite de girasol mostraron mayores proporciones de AGPI y mayores ratios AGPI/AGS y AGMI+AGPI/AGS, que tradicionalmente se asocian con una buena calidad nutricional de la grasa alimentaria.

En este sentido, el ratio AGPI/AGS obtenido en las empanadillas de atún fritas en aceite de girasol fue mayor de 2, lo cual excede claramente las recomendaciones para este ratio, situadas entre 0,4-1 (Jiménez-Colmenero, 2007). No obstante, los productos fritos en aceite de girasol mostraron también una importante desventaja desde el punto de vista nutricional, debido a su elevado ratio $n-6/n-3$. Niveles elevados de este ratio en la grasa ingerida se ha relacionado de manera notable con la aparición de enfermedades cerebrocardiovasculares, cáncer y enfermedades inflamatorias y autoinmunes (Hoz y col., 2004). Por este motivo, actualmente los expertos en nutrición recomiendan para este ratio inferiores a 4:1 (Valencia y col., 2006). Aunque tanto los productos fritos en aceite de oliva o bien pre-fritos en aceite de oliva y posteriormente horneados mostraron niveles de este ratio superiores a los valores recomendados (4:1), resultaron entre 3 y 6 veces inferiores a los ratios obtenidos para los productos fritos en aceite girasol o pre-fritos en aceite de girasol y posteriormente horneados.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y las recomendaciones de los expertos en nutrición, podemos llegar a la conclusión de que los productos fritos en aceite de oliva presentan perfiles lipídicos y características nutricionales más recomendables que los fritos en aceite de girasol, aunque en algunos casos no se encuentren totalmente dentro de los límites recomendables. Además, debido al hecho de que el horneado no provoca efectos significativos sobre el perfil lipídico ni sobre los ratios AGPI/AGS, AGMI+AGPI/AGS o $n-6/n-3$ que los alimentos presentaron previos a su horneado, podemos concluir que debido a la menor cantidad de grasa y contenido calórico los productos pre-fritos en aceite de oliva y posteriormente horneados presentaron las mejores propiedades nutricionales de todos los que se analizaron en el presente estudio, ya que combinan el hecho de que presenten una mayor cantidad de grasa total, con el hecho de que dentro de ésta, el ácido graso predominante sea el oleico, el cual según las

recomendaciones de la SENC y la AESAN debe suponer entre el 15-20% del contenido calórico de la dieta.

Con respecto a la aceptabilidad por parte del consumidor, trabajos previos (Romero y col., 2001), obtuvieron como resultado un mayor gusto de los consumidores por los productos empanados fritos en aceite de oliva que por productos similares fritos en aceite de girasol. No obstante, en nuestro caso, sobre un total de 42 consumidores que participaron en el estudio, a nivel general no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la aceptabilidad de ambos tipos de productos (Tabla 13). Por otra parte, tal y como previamente habían encontrado Antonova y col. (2003), los consumidores sí encontraron una peor sensación crujiente en los productos horneados que en los cocinados mediante fritura en inmersión.

En conclusión, el cocinado juega un papel más importante que la pre-fritura en el perfil lipídico, y por ende en la calidad nutricional de los productos precocinados empanados. La fritura en aceite de girasol incrementa notablemente el contenido en AGPI, pero también incrementa sustancialmente en contenido en ácidos grasos *n*-6, y como consecuencia, el ratio *n*-6/*n*-3. Este es un serio inconveniente nutricional que hace más recomendable el empleo de aceite de oliva tanto en la pre-fritura del alimento como en su fritura. Además, el horneado, a diferencia de la fritura en inmersión, no aumenta significativamente el contenido graso ni calórico del producto final, por lo que es un método de cocinado que debe recomendarse, máximo teniendo en cuenta que la aceptabilidad general por parte del consumidor no disminuye con respecto a los productos fritos.

Resulta también especialmente importante que aquellas empresas que empleen en su proceso de fabricación aceites con mejores calidades nutricionales (tales como el aceite de oliva o el aceite de girasol alto oleico), adviertan a sus consumidores que

dichos productos deben ser cocinados mediante fritura en el mismo aceite que se empleó e su fabricación, o mediante horneado. De lo contrario, los efectos beneficiosos para la salud de los consumidores que se persiguen mediante el empleo en la fabricación de los productos de este tipo de aceites, puede verse totalmente anulado por un cocinado casero inadecuado, además de representar un sobrecoste inútil (estos aceites son más caros) para la industria fabricante de los dichos productos.



Tabla 9. Composición nutricional de empanadillas de atún, crudas, pre-fritas y cocinadas (g o Kcal/100 g muestra).

Parámetro	C	PO	PG	POFO	POFG	POH	PGFO	PGFG	PGH
Humedad	56,4±1,2 ^a	51,9±1,46 ^b	50,8±1,67 ^b	45,9 ±1,34 ^c	46,1±1,89 ^c	48,9±2,22 ^b	49,4±2,04 ^b	49,9±1,86 ^b	50,3±1,46 ^b
Cenizas	1,9±0,02 ^b	2,2±0,09 ^a	2,2±0,07 ^a	2,2±0,09 ^a	2,1±0,10 ^a	2,2±0,13 ^a	2,1±0,11 ^a	2,2±0,08 ^a	2,2±0,06 ^a
Proteínas	4,7±0,26 ^b	4,8±0,42 ^b	5,2±0,23 ^a	5,1±0,21 ^a	5,0±0,23 ^{a,b}	4,9±0,14 ^b	4,5±0,17 ^b	4,9±0,07 ^b	4,8±0,13 ^b
Carbohidratos	35,7±1,17 ^a	27,1±1,34 ^c	27,4±1,33 ^c	29,2±1,48 ^b	28,3±1,34 ^{b,c}	28,8±1,43 ^{b,c}	27,4±1,33 ^c	26, ±1,85 ^c	28,4±1,15 ^{b,c}
Grasa	1,3±0,23 ^c	13,8±1,76 ^b	14,1±1,26 ^b	17,7±1,12 ^a	18,5±1,42 ^a	15,2±1,46 ^b	16,6±1,43 ^a	16,3±1,65 ^a	14,3±0,97 ^b
Calorías	17,14±4,17 ^d	254,1±5,11 ^c	256,7±4,12 ^c	296,3±4,12 ^a	299,2±5,34 ^a	271,3±6,03 ^b	277,0±5,82 ^b	273,3±5,76 ^b	261,2±3,83 ^c

C, crudo; PO, pre-frito en aceite de oliva; PG, pre-frito en aceite de girasol; POFO, pre-frito y frito en aceite de oliva, POFG, pre-frito en aceite de oliva y frito en aceite de girasol; POH, pre-frito en aceite de oliva y horneado; PGFO, pre-frito en aceite de girasol y frito en aceite de oliva; PGFG, pre-frito y frito en aceite de girasol; PGH, pre-frito en aceite de girasol y horneado. Los valores son medias ± desviación estándar (n=9), ^{a,b,c} Los valores en la misma fila con letras diferentes presentan diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 10. Composición nutricional de croquetas de jamón, crudas, pre-fritas y cocinadas (g o Kcal/100 g muestra).

Parámetro	C	PO	PG	POFO	POFG	POH	PGFO	PGFG	PGH
Humedad	63,5±0,56 ^a	57,3±1,11 ^b	57,7±1,27 ^b	53,5±1,21 ^c	54,1±1,56 ^c	55,7±1,43 ^{b,c}	55,9±1,87 ^b	55,8±1,81 ^{b,c}	57,2±1,12 ^b
Cenizas	1,9±0,03 ^c	2,2±0,08 ^a	2,0±0,09 ^b	2,0±0,11 ^b	2,2±0,06 ^a	2,0±0,10 ^b	2,0±0,11 ^b	2,0±0,08 ^b	2,0±0,08 ^a
Proteínas	6,3±0,26 ^b	6,5±0,42 ^{a,b}	6,5±0,23 ^a	6,4±0,21 ^{a,b}	6,5±0,23 ^{a,b}	6,5±0,14 ^{a,b}	6,2±0,17 ^b	6,2±0,07 ^b	6,4±0,13 ^{a,b}
Carbohidratos	23,3±0,63 ^a	21,9±1,11 ^b	21,1±1,06 ^b	23,8±1,10 ^a	23,3±1,36 ^a	23,0±1,31 ^{a,b}	21,9±1,51 ^{a,b}	22,1±1,43 ^{a,b}	21,8±0,97 ^b
Grasa	5,0±0,33 ^c	12,2±1,26 ^b	12,7±1,07 ^b	14,3±0,86 ^a	13,9±0,56 ^a	12,4±1,26 ^b	14,0±1,43 ^a	13,9±1,65 ^a	12,7±0,97 ^b
Calorías	163,2±2,11 ^c	223,0±4,13 ^b	224,8±3,72 ^b	249,2±3,02 ^a	243,9±3,04 ^a	229,4±3,13 ^b	238,3±4,15 ^a	238,4±4,26 ^c	226,7±2,91 ^b

C, crudo; PO, pre-frito en aceite de oliva; PG, pre-frito en aceite de girasol; POFO, pre-frito y frito en aceite de oliva, POFG, pre-frito en aceite de oliva y frito en aceite de girasol; POH, pre-frito en aceite de oliva y horneado; PGFO, pre-frito en aceite de girasol y frito en aceite de oliva; PGFG, pre-frito y frito en aceite de girasol; PGH, pre-frito en aceite de girasol y horneado. Los valores son medias ± desviación estándar (n=9), ^{a,b,c}Los valores en la misma fila con letras diferentes presentan diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 11. Perfil lipídico de empanadillas de atún crudas, pre-fritas, y cocinadas (mg/100 mg de grasa total).

Parámetro	C	PO	PG	POFO	POFG	POH	PGFO	PGFG	PGH
Σ AGS	36,4±0,48 ^a	23,3±0,95 ^b	20,9±0,03 ^c	21,1±1,35 ^c	20,1±0,69 ^c	21,2±1,18 ^c	19,5±0,47 ^c	19,3±0,85 ^c	21,1±0,31 ^c
Σ AGMI	35, ±0,38 ^c	57,0±1,36 ^a	35,1±0,15 ^c	58,0±1,11 ^a	38,0±0,58 ^c	59,1±3,18 ^a	52,7±0,88 ^b	34,2±0,59 ^c	34,1±0,36 ^c
Σ AGPI	28,0±0,55 ^c	19,7±1,02 ^d	44,1±0,37 ^a	20,9±0,31 ^d	41,3±0,91 ^b	19,7±0,63 ^d	27,8±0,51 ^c	46,5±0,88 ^a	44,8±0,37 ^a
Σ n-6	25,8±0,48 ^d	18,4±0,52 ^c	43,3±0,15 ^b	16,9±0,35 ^f	37,4±1,37 ^c	18,1±0,44 ^e	27,2±0,31 ^d	45,8±0,98 ^a	43,6±0,28
Σ n-3	2,2±0,04 ^a	1,4±0,08 ^c	0,8±0,02 ^e	1,5±0,12 ^c	0,7±0,01 ^f	1,8±0,13 ^b	0,9±0,11 ^e	0,7±0,15 ^{e,f}	1,1±0,12 ^d
AGPI/AGS	0,8±0,02 ^f	0,9±0,03 ^e	2,1±0,02 ^b	1,0±0,06 ^d	2,1±0,14 ^b	0,9±0,08 ^{d,e}	1,4±0,08 ^c	2,4±0,07 ^a	2,1±0,03 ^b
AGMI+AGPI/AGS	1,7±0,02 ^d	3,3±0,11 ^c	3,8±0,03 ^b	3,7±0,09 ^b	3,9±0,20 ^b	3,7±0,11 ^b	4,1±0,10 ^a	4,2±0,11 ^a	3,7±0,05 ^b
n-6/n-3	11,8±0,49 ^f	13,2±0,88 ^e	52,8±0,34 ^b	11,0±1,50 ^f	54,3±1,51 ^b	10,3±0,71 ^f	32,0±1,14 ^d	64,4±1,45 ^a	38,3±0,79 ^c

C, crudo; PO, pre-frito en aceite de oliva; PG, pre-frito en aceite de girasol; POFO, pre-frito y frito en aceite de oliva, POFG, pre-frito en aceite de oliva y frito en aceite de girasol; POH, pre-frito en aceite de oliva y horneado; PGFO, pre-frito en aceite de girasol y frito en aceite de oliva; PGFG, pre-frito y frito en aceite de girasol; PGH, pre-frito en aceite de girasol y horneado, Los valores son medias \pm desviación estándar (n=9), ^{a,b,c}Los valores en la misma fila con letras diferentes presentan diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 12. Perfil lipídico de croquetas de jamón crudas, pre-fritas, y cocinadas (mg/100 mg de grasa total)

Parámetro	C	PO	PG	POFO	POFG	POH	PGFO	PGFG	PGH
Σ AGS	50,2±0,23 ^a	33,5±0,27 ^b	32,2±0,09 ^b	33,6±0,06 ^b	33,4±0,35 ^b	35,6±0,34 ^b	33,8±0,18 ^b	30,8±0,13 ^c	33,4±0,35 ^b
Σ AGMI	38,2±0,19 ^b	55,2±0,24 ^a	36,6±0,31 ^c	55,5±0,41 ^a	35,0±0,31 ^d	53,2±0,81 ^a	53,6±0,69 ^a	36,1±0,17 ^c	35,1±0,20 ^d
Σ AGPI	11,2±0,12 ^d	11,2±0,26 ^d	31,3±0,27 ^b	10,9±0,19 ^d	31,6±0,15 ^b	11,1±0,46 ^d	12,6±0,15 ^c	33,1±0,09 ^a	31,5±0,15 ^b
$\Sigma n-6$	10,0±0,13 ^d	10,1±0,30 ^d	30,7±0,15 ^b	1,0±0,23 ^d	30,6±0,31 ^b	10,1±0,46 ^d	11,8±0,13 ^c	32,6±0,11 ^a	31,0±0,35 ^b
$\Sigma n-3$	1,2±0,03 ^a	1,0±0,03 ^b	0,5±0,03 ^f	0,9±0,02 ^c	0,6±0,03 ^e	1,1±0,02 ^b	0,8±0,03 ^d	0,6±0,04 ^{e,f}	0,5±0,06 ^f
AGPI/AGS	0,2±0,01 ^e	0,3±0,02 ^d	1,0±0,02 ^b	0,3±0,00 ^d	1,0±0,01 ^b	0,3±0,01 ^d	0,4±0,02 ^c	1,1±0,03 ^a	0,9±0,01 ^b
AGMI+AGPI/AGS	1,0±0,02 ^e	2,0±0,03 ^c	2,1±0,04 ^b	2,0±0,02 ^c	2,0±0,03 ^c	1,8±0,03 ^d	2,0±0,03 ^c	2,3±0,03 ^a	2,0±0,03 ^c
$n-6/n-3$	8,7±0,78 ^d	9,8±0,68 ^c	56,9±1,78 ^a	10,8±0,45 ^c	56,6±3,34 ^a	9,4±0,49 ^c	14,2±0,82 ^b	57,1±1,67 ^a	58,5±1,56 ^a

C, crudo; PO, pre-frito en aceite de oliva; PG, pre-frito en aceite de girasol; POFO, pre-frito y frito en aceite de oliva, POFG, pre-frito en aceite de oliva y frito en aceite de girasol; POH, pre-frito en aceite de oliva y horneado; PGFO, pre-frito en aceite de girasol y frito en aceite de oliva; PGFG, pre-frito y frito en aceite de girasol; PGH, pre-frito en aceite de girasol y horneado, Los valores son medias \pm desviación estándar (n=9), ^{a,b,c}Los valores en la misma fila con letras diferentes presentan diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 13. Aceptabilidad por parte del consumidor de empanadillas de atún (1) y croquetas de jamón (2) cocinadas mediante distintos métodos

Parámetro	POFO	POFG	POH	PGFO	PGFG	PGH
Apariencia (1)	5,23±1,23	5,12±1,11	4,92±1,32	5,19±0,92	5,27±1,31	4,88±1,32
Olor (1)	5,31±1,45	5,04±1,23	5,09±1,12	5,08±1,67	5,12±0,93	5,03±1,08
Sabor (1)	6,02±1,23 ^a	5,21±1,42 ^{a,b}	5,76±1,32 ^{a,b}	5,92±1,54 ^{a,b}	5,18±1,32 ^{a,b}	4,69±1,21 ^b
Sensación crujiente (1)	5,62±1,23 ^a	5,43±1,45 ^{a,b}	4,12±0,89 ^b	5,43±1,34 ^{a,b}	5,61±1,24 ^{a,b}	4,23±1,03 ^b
Aceptabilidad general (1)	5,54±1,19	5,21±1,23	5,23±1,11	5,43±1,32	5,18±1,21	4,92±1,23
Apariencia (2)	5,43±1,21	5,32±1,41	5,21±1,12	5,35±1,16	5,54±1,43	5,11±1,41
Olor (2)	5,52±1,43	5,44±1,32	5,38±1,34	5,34±1,56	5,15±1,21	5,12±1,20
Sabor (2)	5,98±1,34	5,41±1,18	5,82±1,23	5,87±1,34	5,02±1,32	5,07±1,26
Sensación crujiente (2)	5,91±1,32 ^a	5,78±1,23 ^a	4,24±1,21 ^b	5,56±1,56 ^{a,b}	5,71±1,23 ^a	4,14±1,21 ^b
Aceptabilidad general (2)	5,84±1,31	5,46±1,23	5,23±1,31	5,61±1,25	5,21±1,30	5,05±1,43

POFO, pre-frito y frito en aceite de oliva, POFG, pre-frito en aceite de oliva y frito en aceite de girasol; POH, pre-frito en aceite de oliva y horneado; PGFO, pre-frito en aceite de girasol y frito en aceite de oliva; PGFG, pre-frito y frito en aceite de girasol; PGH, pre-frito en aceite de girasol y horneado, Los valores son medias \pm desviación estándar (n=42), ^{a,b,c}Los valores en la misma fila con letras diferentes presentan diferencias estadísticamente significativa

4.2. Influencia de la reutilización del aceite de fritura doméstico en el perfil lipídico de la grasa del alimento cocinado

Aunque previamente se han realizado muchos trabajos encaminados a determinar los cambios en la composición nutricional de los alimentos causados por el proceso de fritura (Clausen y Oversen, 2005), muy pocos trabajos se han enfocado hacia la determinación de la influencia de la calidad del aceite de fritura doméstico (medido mediante la concentración de compuestos polares) en el contenido en grasa y el perfil lipídico de los alimentos precocinados congelados. Para comprobar esta influencia hemos estudiado la evolución del perfil lipídico de varios tipos de alimentos empanados (gambas rebozadas, nuggets de pollo empanados y anillas de calamar a la romana), después de freírlos en un aceite reutilizado y con diferentes niveles de contenido en compuestos polares (Miranda y col., 2009).

Los resultados obtenidos a este respecto pueden observarse en las Tablas 14-16. Al igual que lo observado anteriormente por Makison y col. (1987), los productos con cobertura más gruesa (nuggets de pollo empanados y gambas rebozadas) absorbieron una mayor cantidad de grasa durante el proceso de fritura y en consecuencia, presentaron un mayor contenido en grasa que las anillas de calamar, en las cuales, el grosor de la capa de cobertura es sensiblemente inferior.

Tabla 14. Perfil lipídico de la grasa de gambas rebozadas fritas en aceite de girasol con diferentes niveles en el contenido en compuestos polares (mg/100 g grasa total).

	Porcentaje de compuestos polares en el aceite de fritura							Nivel de significación
	16,87±0,21	18,6±0,34	21,11±0,23	23,21±0,24	26,4±0,32	27,43±0,45	29±0,36	
Grasa total	5,67±0,23	7,5±0,45	7,36±0,24	7,61±0,43	8,07±0,45	9,57±0,32	9,14±0,52	***
∑AGS	13,64±0,31	14,24±0,24	14,14±0,43	15,40±0,23	14,31±0,36	19,73±0,34	20,89±0,41	**
∑AGMI	24,16±0,32	24,39±0,34	24,87±0,36	23,54±0,45	25,03±0,42	24,14±0,38	22,28±0,42	***
∑AGPI	62,20±0,54	61,37±0,46	60,98±0,56	61,06±0,60	60,65±0,56	56,13±0,42	56,83±0,45	*
∑n-6	60,65±0,56	60,04±0,45	59,61±0,49	59,50±0,63	59,33±0,60	55,34±0,40	55,35±0,48	**
∑n-3	1,50±0,34	1,33±0,39	1,37±0,40	1,56±0,37	1,33±0,42	0,78±0,40	1,48±0,34	*
AGPI/AGS	4,45±0,03	4,31±0,03	4,31±0,02	3,96±0,01	4,24±0,03	2,84±0,03	2,72±0,03	ns
AGMI+AGPI/AGS	6,33±0,04	6,02±0,05	6,07±0,02	5,49±0,03	5,98±0,07	4,07±0,06	3,79±0,04	***
n-6/n-3	40,43±0,37	45,14±0,34	43,51±0,49	38,14±0,57	44,60±0,71	70,95±0,32	37,40±0,34	**

AGS: ácidos grasos saturados, AGMI: Ácidos grasos monoinsaturados, AGPI: Ácidos grasos polinsaturados. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar. ns, no significativo ($P>0,05$), * $P<0,05$, ** $P<0,01$, * $P<0,001$.**

Tabla 15. Perfil lipídico de la grasa de nuggets de pollo fritas en aceite de girasol con diferentes niveles en el contenido en compuestos polares (mg/100 g grasa total).

	Porcentaje de compuestos polares en el aceite de fritura							Nivel de significación
	16,15±0,31	18,62±0,34	21,45±0,42	23,93±0,38	25,64±0,43	29,3±0,59	34,1±0,70	
Grasa total	13,83±0,76	15,17±0,78	14,48±0,67	13,99±1,12	14,19±1,21	14,46±0,98	14,23±1,07	ns
∑AGS	23,97±0,42	24,45±0,43	24,63±0,56	25,15±0,62	26,28±0,43	26,59±1,18	26,59±0,47	*
∑AGMI	32,44±0,67	31,89±0,69	31,92±0,45	32,09±0,98	32,34±0,67	31,28±1,28	32,29±0,88	ns
∑AGPI	43,59±0,54	43,66±0,43	43,45±0,53	42,76±0,61	41,38±0,56	42,13±0,63	41,12±0,51	*
∑n-6	42,44±0,57	42,52±0,45	42,31±0,57	41,61±0,59	40,68±0,61	41,10±0,44	40,39±0,53	*
∑n-3	1,06±0,43	1,06±0,32	1,09±0,34	0,99±0,43	0,71±0,22	1,02±0,23	0,73±0,11	*
AGPI/AGS	1,82±0,03	1,79±0,04	1,76±0,04	1,70±0,03	1,57±0,05	1,59±0,08	1,55±0,08	***
AGMI+AGPI/AGS	3,17±0,07	3,09±0,06	3,06±0,04	2,98±0,10	2,81±0,06	2,76±0,11	2,76±0,10	**
n-6/n-3	40,04±0,67	40,11±0,98	38,82±0,45	42,03±0,49	57,29±0,76	40,29±0,71	55,33±1,14	*

AGS: ácidos grasos saturados, AGMI: Ácidos grasos monoinsaturados, AGPI: Ácidos grasos polinsaturados. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar. ns, no significativo ($P>0,05$), * $P<0,05$, ** $P<0,01$, * $P<0,001$.**

Tabla 16. Perfil lipídico de la grasa de anillas de calamar fritas en aceite de girasol con diferentes niveles en el contenido en compuestos polares (mg/100 g grasa total).

	Porcentaje de compuestos polares en el aceite de fritura							Nivel de significación
	13,90±0,34	16,82±0,45	17,84±0,46	18,49±0,34	20,12±0,59	23,14±0,63	25,82±0,62	
Grasa total	4,67±0,45	5,67±0,43	6,54±0,67	6,17±0,69	7,18±0,51	7,12±0,97	6,98±1,12	**
∑AGS	11,69±0,48	11,34±0,95	12,05±0,03	11,75±1,35	13,29±0,69	13,42±1,18	13,32±0,47	***
∑AGMI	21,95±0,38	20,13±1,36	22,03±0,15	21,30±1,11	23,92±0,58	23,93±3,18	24,31±0,88	**
∑AGPI	66,36±0,55	68,53±1,02	65,92±0,37	66,95±0,31	62,79±0,91	62,65±0,63	62,37±0,51	**
∑n-6	60,98±0,48	61,28±0,52	62,47±0,15	63,18±0,35	58,78±1,37	58,81±0,44	56,83±0,31	*
∑n-3	5,38±0,04	7,25±0,08	3,45±0,02	3,78±0,12	4,01±0,01	3,84±0,13	5,54±0,11	ns
AGPI/AGS	5,68±0,02	6,04±0,03	5,47±0,02	5,70±0,06	4,72±0,14	4,67±0,08	4,68±0,08	***
AGMI+AGPI/AGS	7,55±0,02	7,82±0,11	7,30±0,03	7,51±0,09	6,52±0,20	6,45±0,11	6,51±0,08	**
n-6/n-3	11,33±0,49	8,45±0,88	18,11±0,34	16,71±1,50	14,66±1,51	15,32±0,74	10,26±0,87	ns

AGS: ácidos grasos saturados, AGMI: Ácidos grasos monoinsaturados, AGPI: Ácidos grasos polinsaturados. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar. ns, no significativo ($P>0,05$), * $P<0,05$, ** $P<0,01$, * $P<0,001$.**

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran claramente que para todos los casos estudiados, la acumulación de compuestos polares en el aceite de fritura tuvo un efecto directo en la cantidad total de grasa presente en el producto cocinado. Así, tanto en el caso de las gambas rebozadas (Tabla 3), nuggets de pollo empanados (Tabla 4) o anillas de calamar (Tabla 5), la cantidad de grasa del alimento frito fue significativamente mayor en las muestras que fueron fritas en aceite con mayor cantidad de compuestos polares. Este aumento fue más pronunciado en aquellas muestras que presentaban una menor cantidad de grasa en su composición, como las gambas rebozadas o las anillas de calamar, que en el caso de los nuggets de pollo empanados, en los que este aumento en función del aceite utilizado fue más moderado. Este hecho es compatible con lo descrito previamente por otros autores, como Sébédio y col. (1996), el cual encontró una gran similitud entre la grasa extraída de las patatas fritas y el aceite utilizado en su fritura. Esto puede ser atribuido a la mínima cantidad de grasa presente en la muestra inicial, lo cual provoca que la inmensa mayoría de la grasa presente en el producto final sea aceite absorbido por el alimento durante el proceso de fritura doméstica. No obstante, cuanto más cantidad de grasa contenga el alimento previo al proceso de fritura doméstica, menor va a ser la penetración en el mismo de la grasa procedente del aceite del cocinado doméstico.

Además del aumento de la cantidad total de grasa en el alimento, también se observó en todos un aumento en la cantidad relativa de ácidos grasos saturados, el cual, del mismo modo que la grasa total, también fue más marcado en las muestras que presentaban una cantidad de grasa inicial menor. De este modo, el aumento en la cantidad de AGS y el descenso en la cantidad de AGPI, provocó que en todos los casos se encontrara un aumento significativo en los ratios AGPI/AGS y AGPI+AGMI/AGS, los cuales se utilizan habitualmente para valorar la calidad nutricional de un alimento y

tienen sus valores óptimos entre 0,4-1 y 1-2 respectivamente (Jiménez Colmenero, 2007).

Los AGPI, como es el caso de los $n-6$ y $n-3$ están considerados como los más susceptibles de alteración oxidativa durante el proceso de fritura (Sant'Ana y Mancini-Filho, 2000). En el caso de todos los alimentos estudiados en este trabajo se encontró un descenso significativo en la cantidad de ácidos grasos $n-6$. No obstante, en parte debido a que este descenso no fue tan marcado como los descritos anteriormente, y en parte al comportamiento un tanto errático del contenido en ácidos grasos $n-3$, este descenso no se vio traducido en un aumento significativo del ratio $n-6/n-3$.

Así pues, a tenor de los resultados obtenidos, el proceso de fritura doméstica en aceite con un mayor contenido en compuestos polares, causa importantes modificaciones en el perfil de ácidos grasos del alimento, modificando por tanto la calidad del alimento desde el punto de vista de la alimentación saludable. Hoy en día, con el fin de hacer frente a la cada vez mayor demanda en el mercado de alimentos saludables desde el punto de su composición nutricional, las empresas han desarrollado productos con bajos contenidos en materia grasa, así como otros con perfiles lipídicos (como los mencionados ratios AGPI/AGS y $n-6/n-3$) adecuados a las recomendaciones de los expertos en nutrición. Por lo tanto, sería recomendable que las empresas alimentarias que utilizan en sus procesos de producción aceites de alta calidad nutricional, con el fin de promover la salud sus los consumidores, adviertan a los mismos que dichos productos deben ser cocinados en aceite de calidad al menos similar al empleado en el proceso de fabricación. De otro modo, los beneficios nutricionales buscados por el fabricante podrían ser parcial o totalmente anulados por un cocinado doméstico incorrecto.

4.3. Contaminación cruzada por alérgenos en una planta de producción mixta.

Control y prevención en la empresa.

Las alergias alimentarias son consideradas un problema sanitario a nivel mundial, ya que aproximadamente el 4% de la población mundial está actualmente afectada por alguna de estas alergias (van Hengel, 2007; Sicherer y col., 2004). Además, es un problema que se incrementará en las próximas décadas ya que la prevalencia entre los niños a nivel mundial supera el 8% (Helm y Burks, 2000), y dichos niños seguirán siendo alérgicos cuando sean adultos.

Uno de los mayores riesgos alimentarios a los que enfrentan en su vida cotidiana los consumidores que padecen algún tipo de alergia alimentaria es la posible omisión en el etiquetado de los alimentos de la presencia del alimento al cual son alérgicos (van Hengel, 2007a). Por este motivo, dentro de la Unión Europea, las Directivas 2000/13/EC y 2003/89/CE establecieron la obligatoriedad de incluir en el etiquetado de los alimentos la presencia de los alérgenos más importantes. Posteriormente, la Directiva 2006/142/CE incluyó el altramuz y los moluscos en la lista de los alérgenos cuya presencia en los alimentos debe ser declarada en el etiquetado. No obstante, el etiquetado referente a la presencia de alérgenos en los productos alimenticios es a menudo confuso e insuficiente por la laxitud existente en lo referente a las concentraciones de alérgenos que pueden incluir los alimentos para tener la obligación legal de incluir la presencia del mismo en el etiquetado (Ford y col., 2010). Este hecho genera una importante frustración e inseguridad entre los consumidores, que a menudo no saben si pueden fiarse con total seguridad de las menciones que impone el regulador y a menudo se sobreprotegen renunciando al consumo de alimentos que a en base a

criterios epidemiológicos, si podrían consumir con total seguridad (Pieretti y col., 2009; Hefle y col. 2007).

Para los consumidores que padecen alergias alimentarias, el evitar consumir los alimentos a los cuales son alérgicos a menudo resulta difícil y entraña enormes cambios en sus hábitos de vida (Crotty y Taylor, 2010). Para la industria alimentaria, la prevención de la contaminación cruzada entre materias primas es muy costosa y a menudo no está lo suficientemente ayudada por medidas impulsadas desde el legislador que ayuden a su cumplimiento. En muchos casos, los tratamientos térmicos severos a los que son sometidos los alimentos durante su proceso de elaboración inducen la desnaturalización de las proteínas y las reacciones de dichas proteínas con la matriz alimentaria en la que ven incluidas reduciendo el potencial de alergenidad de dichas proteínas (Koppleman y col., 1999; Koppleman y col., 2000). No obstante, en algunos casos, estos tratamientos térmicos no reducen el potencial de alergenidad, sino que incluso lo incrementan o pueden revelar otros alérgenos que estaban ocultos en la forma original del alimento, y que posteriormente se hacen accesibles como resultado de la desnaturalización y posterior re-naturalización del alimento al enfriarse (Jankiewicz y col., 1979; Crespo y col., 1995). Kato y col (2000), y Jankiewicz (1979), demostraron que una vía posible para reducir la alergenidad de algunos tipos de alimentos es el uso de altas presiones, si bien esta tecnología no mostró eficacia alguna sobre otros tipos de alérgenos diferentes.

De este modo, la presencia en los alimentos de estos alérgenos “ocultos” puede afectar a la seguridad de los productos, dado que a veces dosis muy pequeñas de alérgenos son capaces de desarrollar en las personas sensibles a los mismos reacciones muy graves. Además, dicha presencia, aunque se produzca de manera involuntaria,

puede ser en algunos casos considerada como una infracción de la legislación vigente y puede conllevar sanciones para el fabricante del producto (van Hengel, 2007b).

Este hecho es un problema especialmente grave para las empresas productoras de alimentos pre-cocinados congelados, en las cuales es habitual la coexistencia de numerosos tipos de materias primas, que de modo natural contienen alérgenos de diferentes tipos. Además, a menudo estas materias primas son procesadas por los mismos operarios y utilizando la misma maquinaria e instrumental. Esta circunstancia aumenta sustancialmente la posibilidad de que ocurran problemas derivados de contaminación cruzada, ya que contar con un protocolo de limpieza y desinfección que garantice que los compuestos alérgicos son totalmente eliminados de las instalaciones es sumamente difícil y conlleva unos costes muy elevados (Ford y col., 2010).

La actual legislación de etiquetado de los alimentos sólo afecta a aquellos ingredientes que de modo consciente e intencionado forma parte de la composición de los alimentos, pero también hay que tener en cuenta, especialmente en el caso de las plantas de alimentos procesados, que a través de contaminaciones accidentales, se pueden encontrar alérgenos en productos en los que a priori no debiesen estar, dado que no forman parte de la composición natural del alimento. De este modo, la presencia de estos alérgenos “ocultos”, que puede llegar a ocasionar problemas serios de salud a un posible consumidor alérgico, puede además suponer un importante problema para la empresa productora del mismo, ya que en ocasiones, puede ser considerada por el regulador como un incumplimiento de la normativa vigente en materia de etiquetado (Van Hengel, 2007). Por este motivo, para evitar los problemas legales derivados de la presencia de estos alérgenos ocultos, las industrias alimentarias a menudo optan por adoptar un “etiquetado defensivo”, advirtiendo de modo sistemático sobre la presencia potencial de algunos tipos de alérgenos en sus productos a fin de evitar problemas

legales (van Hengel, 2007). Si bien esta práctica es una buena estrategia de defensa de la salud de los consumidores, también es contraproducente para la industria, ya que convealla perder parte de sus consumidores potenciales debido al miedo que estas declaraciones tipo “puede contener trazas de...” pueden ocasionar en aquellos consumidores alérgicos.

Para verificar el etiquetado de los alimentos con el objetivo de identificar la presencia de alérgenos ocultos, especialmente en el caso de los alimentos procesados, es importante disponer de métodos de detección muy sensibles y específicos. En general, estos métodos se basan en la detección de proteínas específicas mediante ELISA y fragmentos de ADN específicos de cada especie por medio de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Holzhauser, 2006; Tanabe, 2008). A menudo, la determinación analítica de la presencia de alérgenos en alimentos puede verse complicada por dificultades en su extracción a partir de la matriz alimentaria, o bien por la presencia de otros alérgenos de modo mucho más abundante que enmascare de este modo la presencia de aquellos alérgenos que son minoritarios (Poms y col., 2006). En otros casos, los alérgenos se encuentran en unas cantidades muy pequeñas en alimentos que proceden de una fuente que originalmente contenía dichos alérgenos. Este es el caso de las grasas y aceites refinados, en los cuales pueden existir ciertas trazas de proteínas pero que están en muy pequeñas cantidades y en matrices de las cuales son difíciles de extraer (van Hengel, 2007). Además, existen casos de alimentos que potencialmente pueden contener multitud de proteínas con potencial alergénico, como el caso del cacahuete, en el que al menos ocho moléculas diferentes pueden causar alergias, o la leche, en la cual todas sus fracciones proteicas poseen potencial alergénico, ya sea en mayor o menor medida dependiendo de la proteína de la cual se trate (Mittag y col., 2004; Monaci y col., 2006).

Los métodos inmunológicos a menudo presentan reacciones cruzadas a diferentes alergénicos, como en el caso de los pescados y crustáceos. A menudo, los test inmunológicos diseñados para la detección de proteínas alergénicas procedentes de estas matrices, dan reacciones cruzadas con otros tipos de proteínas, por lo que es habitual que a pesar de que dichos métodos son muy sensibles, los problemas de especificidad hacen que se produzcan falsos positivos, lo cual también es un problema importante para las empresas fabricantes de alimentos procesados (van Do y col., 2005).

Por el contrario, los métodos basados en la detección de ADN, presentan tanto ventajas como desventajas con respecto a los métodos inmunológicos basados en la detección de proteínas. Por una parte, mientras que la concentración de las proteínas diana en los alimentos depende en gran medida de múltiples factores como la especie, variedad y condiciones de crecimiento y/o cultivo, las concentraciones de ADN son muy estables. Por el contrario, su mayor limitación es que aunque la presencia del ADN es un indicio de la presencia del ingrediente o alimento que contiene las proteínas alergénicas, no detecta ni cuantifica el alérgeno en sí, sino la especie animal o vegetal portadora (van Hengel, 2007). Además, también existe otra serie limitación en el hecho de que existen algunos alimentos muy proteicos que por el contrario tienen unas cantidades de ADN bastante bajas (como es el caso de los huevos). Por este motivo, para este caso no son nada recomendables los métodos basados en la detección del ADN, mientras que sí serían en cambio adecuados para el análisis de alérgenos en alimentos con bajos contenidos de proteínas, como por ejemplo el apio (van Hengel, 2007).

La eficiencia en la extracción de las proteínas o ADN marcador de alérgenos afecta de un modo un importante a los resultados cuantitativos que se pueden obtener en un análisis de alérgenos (Poms y col., 2004; Monaci y Visconti, 2010). Otro factor

importante es la reactividad del método hacia el la proteína o ADN utilizado como estándar en el kit con respecto al analito diana real en la muestra, ya que en ocasiones la molécula empleada como estándar puede tener una reactividad muy diferente, como ocurre de modo frecuente en el caso de las diferentes especies de pescado (van Do y col., 2005).

Un ejemplo claro de reactividad cruzada son el pescado y los crustáceos. El hecho de que existan muchas especies tanto de pescados como de crustáceos que posean propiedades alergénicas, hace que los métodos empleados para su detección no deban ser muy específicos, ya que una gran especificidad conllevaría que habría que usar un método diferente para cada especie de pescado y crustáceo. De este modo, es más habitual que los métodos empleados posean reactividad cruzada con proteínas que no pertenecen al ingrediente buscado (van Do y col., 2005; van Hengel y col., 2007b).

Para la realización de este estudio de posible contaminación cruzada entre alérgenos hemos realizado un muestreo en la planta que la empresa Clavo congelados, S.A. posee en Caldas de Reis (Pontevedra), en el que las líneas de producción tienen la conformación ya descrita en el apartado de Material y Métodos (Figura 20).

Para este estudio, investigaremos la posible contaminación cruzada entre los productos fabricados en líneas de producción que presentan una distancia inferior a 10 metros con las demás. Como valores indicadores de contaminación cruzada, debemos tener en cuenta que para la mayor parte de los alérgenos no existe un valor de referencia que nos indique los niveles a partir de los cuales debemos declarar en el etiquetado la presencia de los mismos. Únicamente se cita en la legislación dos límites: En el caso del gluten, se establece como “exento de gluten” aquellos productos que contengan menos de 20 mg de gluten/ kg de producto acabado. Este valor está consensuado con las asociaciones de celíacos, conscientes de que la ausencia total de gluten es

tecnológicamente difícil de conseguir en muchos productos. Además, también está regulado en la legislación comunitaria aplicable a través del Reglamento (CE) N° 41/2009. En el caso de los sulfitos, el valor máximo establecido por la legislación es 10 mg/kg de producto terminado.

En el resto de los alérgenos, la legislación no indica cantidades mínimas, por lo cual existe un vacío legal que los fabricantes deben solucionar con la realización de análisis y su interpretación. Precisamente, mediante el presente trabajo queremos comprobar, si los protocolos de limpieza y desinfección utilizados en una planta de procesamiento industrial de alimentos, que elabora multitud de productos diferenciados, supone un elevado riesgo de contaminación cruzada si se siguen los protocolos establecidos en el manual APPCC, a fin de que no se producen contaminaciones cruzadas entre líneas. En el caso de esta empresa (Clavo Congelados, S.A.), se establecen medidas preventivas relativas al control de alérgenos en las siguientes etapas del proceso de fabricación:

- 1.-Almacenamiento de las materias primas.
- 2.- Manipulación de alérgenos durante el proceso de fabricación.
- 3.-Planificación de fabricación de productos con riesgos
- 4.-Vigilancia del sistema

Para tomar el valor de referencia de los alérgenos, como mínimo valor a tener en cuenta para su declaración, tomamos como ejemplo dos casos.

Primero: el gluten. En la determinación de gluten en el producto Eurogamba (especie de gamba rebozada con una tempura a base de harina de trigo), el valor de gluten detectado es de 50 mg/kg, muy por encima de las 20 mg/kg que marca la legislación.

Para el resto de los alérgenos, tomamos la referencia de un producto de la Línea 09, los Fingers de pollo, producto elaborado con una tempura a base de huevo en polvo. El valor de la presencia de huevo en este producto, es de más de 13,50 mg/kg.

Entonces, como valor de referencia mínimo para la declaración tomaremos un valor de 10 mg/kg para considerar que un producto contiene una cantidad significativa de un alérgeno determinado.

Es sumamente importante resaltar que la presencia de alérgenos no sólo es debida a la presencia de trazas en los ingredientes o por la contaminación cruzada entre las líneas, que son más probables en aquellas que se encuentran más cercanas físicamente (Tabla 5). Los procesos de limpieza son muy importantes para eliminar cualquier contaminación posterior de los productos una vez iniciados los procesos de fabricación post-limpieza.

4.3.1. Estudio de contaminaciones cruzadas en la Línea 01

El análisis de resultados de la Línea 01 pueden observarse en la Tabla 17.

Tabla 17. Resultados de la determinación de alérgenos en diferentes alimentos elaborados en la línea 1.

Tipo de muestra	Alérgeno							
	Crustáceos	Gluten	Huevo	Leche	Moluscos	Pescado	Soja	Sulfitos
Rodaja Salmón	0,56	<0,5	<1	<1	Presencia	Presencia	8,56	<10
Filete halibut	2,06	<0,5	<1	3,25	Presencia	Presencia	NSD	<10
Platija	1,31	<0,5	<1	8,98	Presencia	Presencia	<1,25	<10
Panga	1,92	<0,5	<1	2,03	Presencia	Presencia	NSD	<10

En el caso de los valores numéricos, los resultados están expresados en mg/kg. En el caso de resultados presencia/ausencia, están referidos a 250 .g

Como se puede observar en la Tabla 18, se detectan en todos los casos la presencia de moluscos y pescado. En el caso del pescado es obvio, ya que forma parte de la composición de los platos preparados. Por su parte, en el caso de los moluscos, podría deberse a una contaminación desde la Línea 02, (situada a menos de 3 metros) o debido a la propia alimentación de los animales (van Hengel, 2007b). No obstante, al ser determinados mediante PCR, sólo puede realizarse una determinación cualitativa, y no podemos conocer a ciencia cierta si dicha contaminación es relevante. En el caso de la soja, por un lado vemos que las concentraciones encontradas nos hacen pensar que no se percibe contaminación cruzada relevante entre la Línea 01 y las que utilizan soja como ingrediente, (principalmente la Línea 08, de derivados cárnicos). Sin embargo llama la atención el valor encontrados en la Rodaja de Salmón, muy alto y totalmente discordante con el resto. En este caso creemos que el valor se deba a la alimentación del salmón, ya que es habitual que se utilice aceite de soja en la elaboración de piensos para acuicultura (Bakke, 2011).

4.3.2. Estudio de contaminaciones cruzadas en la Línea 02

El análisis de resultados de la Línea 02 pueden observarse en la Tabla 18.

Tabla 18. Resultados de la determinación de alérgenos en diferentes alimentos elaborados en la Línea 02.

Tipo de muestra	Alérgeno							
	Crustáceos	Gluten	Huevo	Leche	Moluscos	Pescado	Soja	Sulfitos
Gamba pelada	>12,5	<0,5	<1	17,98	Ausencia	Ausencia	NSD	<10
Chipirón relleno	6,79	<0,5	<1	2,53	Presencia	Presencia	NSD	<10

En el caso de los valores numéricos, los resultados están expresados en mg/kg. En el caso de resultados presencia/ausencia, están referidos a 250 g.

En línea tiene la particularidad de que se pueden manipular, minoritariamente, algunos crustáceos que se usan después en las preparaciones para paellas, en la Línea 05. En el caso de la leche, encontramos un contenido alto en una de las muestras analizadas (Gamba pelada). Dicho alérgeno sólo podría llegar hasta ahí por contaminación cruzada desde la Línea 10, que se encuentra muy alejada, por lo que se considera que únicamente podría llegar mediante la acción de algún operario, o bien por una contaminación cruzada en el origen del producto. Destaca también la ausencia de sulfitos, pese a que su uso es habitual en gambas.

4.3.3. Estudio de contaminaciones cruzadas en la Línea 03

El análisis de resultados de la Línea 03 pueden observarse en la Tabla 19.

Tabla 19. Resultados de la determinación de alérgenos en diferentes alimentos elaborados en la Línea 03.

Tipo de muestra	Alérgeno							
	Crust.	Gluten	Huevo	Leche	Moluscos	Pescado	Soja	Sulfitos
Eurogamba	>12,50	<0,5	<1	5,69	Ausencia	Ausencia	NSD	<10
Gamba rebozada	>12,50	<0,5	<1	3,09	Ausencia	ND	NSD	<10
Calamar romana	6,45	<0,5	<1	4,16	Presencia	Ausencia	NSD	<10
Rabas enharinadas	4,49	<0,5	<1	2,00	Presencia	Ausencia	NSD	<10
Palito merluza	11,75	<0,5	<1	6,66	Presencia	Presencia	NSD	<10

En el caso de los valores numéricos, los resultados están expresados en mg/kg. En el caso de resultados presencia/ausencia, están referidos a 250 g. Crust: Crustáceos.

En esta línea de producción interesa saber si puede haber contaminación cruzada en la misma línea, por ejemplo con crustáceos o saber si se puede dar contaminación con una línea cercana, a 10, que usa leche como ingrediente. En el caso de los crustáceos no se puede hablar de contaminación cruzada en base a los resultados obtenidos; en el caso de las gambas, es obvio su valor alto. Al igual que en el caso de la línea 1, en el caso de las Rabas enharinadas y Palito de merluza las pequeñas concentraciones encontradas es posible que se deba a la alimentación de los animales. En el caso de la leche, no se observa que exista contaminación cruzada desde la línea 10, y en lo referente al resto de resultados puede afirmarse que no existe evidencia de contaminaciones cruzadas relevantes con el resto de las líneas de trabajo.

4.3.4. Estudio de contaminaciones cruzadas en la Línea 04

El análisis de resultados de la Línea 04 pueden observarse en la Tabla 20.

Tabla 20. Resultados de la determinación de alérgenos en diferentes alimentos elaborados en la Línea 04.

Tipo de muestra	Alérgeno							
	Crust.	Glut.	Hue.	Leche	Molusc.	Pescado	Soja	Sulf.
Pechuga corn flakes	4,40	<0,5	<1	< 1	Ausencia	Ausencia	NSD	<10
Librito jamón y queso	9,50	<0,5	<1	>30	Presencia	Ausencia	<1,25	<10
Raba de pavo	8,33	<0,5	<1	3,91	Presencia	Ausencia	NSD	<10
Milanesa de ternera	2,65	<0,5	<1	6,33	Presencia	Ausencia	NSD	<10
Pechuga de pollo empanada	1,34	<0,5	<1	3,70	Presencia	Ausencia	NSD	<10

En el caso de los valores numéricos, los resultados están expresados en mg/kg. En el caso de resultados presencia/ausencia, están referidos a 250 g. Crust.: Crustáceos; Glut.: Gluten; Molusc.: Moluscos; Sulf.: sulfitos.

Los resultados obtenidos en esta línea de trabajo son especialmente interesantes, ya que debido a su disposición, probablemente sea la línea con mayor riesgo de contaminación cruzada de todas las existentes en la planta. No se determinó el contenido en gluten de los productos elaborados, por ser éste parte integrante de sus ingredientes. En el caso del huevo, todas las analíticas de productos fueron realizadas después de jornadas donde se trabajaron productos derivados de huevo. En el caso del huevo, como en el caso de la leche, los productos de la Línea 09, pueden usar los mismos medios de producción, con lo cual podemos afirmar que no hay posible contaminación cruzada relevante por ovoproductos en los productos fabricados por la Línea 04. En el caso de la leche, no es relevante el contenido encontrado en el Librito de jamón y queso, ya que la leche forma parte de su composición. En el resto de muestras en todos los casos han salido valores inferiores a 10 mg/kg, por lo que no existe evidencia de contaminación cruzada desde la Línea 10, que utiliza, incluso, las mismas

máquinas. Con lo cual, podemos afirmar que en la Línea 04, no hay contaminación cruzada relevante por productos con ingredientes alérgenos muy sensibles, como el huevo y leche, que se usan en la misma Línea de procesado.

4.3.5. Estudio de contaminaciones cruzadas en la Línea 05

El análisis de resultados de la Línea 05 pueden observarse en la Tabla 21.

Tabla 21. Resultados de la determinación de alérgenos en diferentes alimentos elaborados en la Línea 05

Tipo de muestra	Alérgeno							
	Crust.	Gluten	Huevo	Leche	Moluscos	Pescado	Soja	Sulfitos
Preparado de paella	>12,50	<0,5	<1	2,25	Presencia	ND	NSD	<10

En el caso de los valores numéricos, los resultados están expresados en mg/kg. En el caso de resultados presencia/ausencia, están referidos a 250 g. Crust.: Crustáceos.

Interesa saber si podemos fabricar productos “sin gluten”; esto quiere decir que trabajando con productos de las Líneas 03 y 04, no se producen contaminaciones cruzadas en la misma Línea. A tenor de los resultados obtenidos puede comprobarse que se pueden fabricar productos libres de gluten, a pesar de estar muy cerca de la Línea 03 que utiliza gluten como ingrediente. En el caso de los sulfitos, el análisis realizado no demostró su presencia en el producto final, a pesar de que en la composición del plato hay crustáceos que son tratados con metabisulfitos como antimelanósicos.

4.3.6. Estudio de contaminaciones cruzadas en la Línea 06

El análisis de resultados de la Línea 06 pueden observarse en la Tabla 22.

Tabla 22. Resultados de la determinación de alérgenos en diferentes alimentos elaborados en la Línea 06

Tipo de muestra	Alérgeno							
	Crustáceos	Gluten	Huevo	Leche	Moluscos	Pescado	Soja	Sulfitos
Fajitas asadas	0,81	<0,5	<1	< 1	Ausencia	Ausencia	NSD	<10
Brocheta	>12,50	<0,5	<1	1,10	Presencia	Ausencia	NSD	<10
Alitas Barbacoa	5,65	<0,5	<1	6,75	Ausencia	Ausencia	NSD	<10
Alitas Barbacoa	8,48	<0,5	<1	5,91	Ausencia	Ausencia	NSD	<10

En el caso de los valores numéricos, los resultados están expresados en mg/kg. En el caso de resultados presencia/ausencia, están referidos a 250 g

En el caso de los crustáceos, en el cual si aparece un valor elevado en el caso de las brochetas, al igual que en el caso de los moluscos, que en la misma muestra también se encuentra presencia, no puede considerarse contaminación cruzada, ya que ambos son ingredientes del producto, aunque minoritarios. En el resto de los casos, a pesar de la presencia de pequeñas concentraciones en el caso de la leche, no puede deducirse que exista contaminación cruzada desde ninguna de las otras líneas de elaboración.

4.3.7. Estudio de contaminaciones cruzadas en la Línea 07

El análisis de resultados de la Línea 07 pueden observarse en la Tabla 23.

Tabla 23. Resultados de la determinación de alérgenos en diferentes alimentos elaborados en la Línea 07

Tipo de muestra	Alérgeno							
	Crustáceos	Gluten	Huevo	Leche	Moluscos	Pescado	Soja	Sulfitos
Nuggets de pollo	3,75	<0,5	<1	1,79	Ausencia	Ausencia	60,6	<10

En el caso de los valores numéricos, los resultados están expresados en mg/kg. En el caso de resultados presencia/ausencia, están referidos a 250 g

En el caso de la línea 7 interesa estudiar posibles contaminaciones cruzadas desde otras líneas y especialmente, desde las líneas 09 y 10, con las que comparte medios de fabricación. A tenor de los resultados obtenidos, en los que sólo se encuentra presencia significativa de soja, que es ingrediente de los nuggets, no puede deducirse que exista ningún tipo de contaminación cruzada. Destaca el hecho de que a pesar de utilizar los mismos medios de producción, no aparezcan restos de proteínas de huevo.

4.3.8. Estudio de contaminaciones cruzadas en la Línea 08

El análisis de resultados de la Línea 08 pueden observarse en la Tabla 24.

Tabla 24. Resultados de la determinación de alérgenos en diferentes alimentos elaborados en la Línea 08

Tipo de muestra	Alérgeno							
	Crustáceos	Gluten	Huevo	Leche	Moluscos	Pescado	Soja	Sulfitos
Fajitas de pollo	2,37	<0,5	<1	<0,5	Ausencia	Ausencia	<1,25	<10

En el caso de los valores numéricos, los resultados están expresados en mg/kg. En el caso de resultados presencia/ausencia, están referidos a 250 g.

Al igual que en el caso anterior, en el caso de la línea 8 interesa estudiar posibles contaminaciones cruzadas desde otras líneas y especialmente, desde las líneas 09 y 10, con las que comparte medios de fabricación. Al igual que en el caso anterior, a tenor de los resultados obtenidos no puede deducirse que en la Línea 08, se produzcan contaminaciones cruzadas con ovoproductos o leche, a pesar de usar los mismos medios de producción.

4.3.9. Estudio de contaminaciones cruzadas en la Línea 09

El análisis de resultados de la Línea 06 pueden observarse en la Tabla 25.

Tabla 25. Resultados de la determinación de alérgenos en diferentes alimentos elaborados en la Línea 09.

Tipo de muestra	Alérgeno							
	Crustáceos	Gluten	Huevo	Leche	Moluscos	Pescado	Soja	Sulfitos
Huevo bechamel	1,73	<0,5	<1	>30	Ausencia	Ausencia	NSD	<10
Pop corn	3,10	<0,5	<1	10,46	Ausencia	Ausencia	<1,25	<10
Finger	4,38	<0,5	<1	4,86	Ausencia	Ausencia	NSD	<10

En el caso de los valores numéricos, los resultados están expresados en mg/kg. En el caso de resultados presencia/ausencia, están referidos a 250 g.

La leche en el caso del Pop corn es ingrediente, por lo que su presencia no resulta relevante. A tenor del resto de resultados obtenidos, no puede afirmarse que en esta línea se produzcan contaminaciones cruzadas con los ingredientes alérgicos procedentes de otras líneas de elaboración.

4.3.10. Estudio de contaminaciones cruzadas en la Línea 10

El análisis de resultados de la Línea 10 pueden observarse en la Tabla 26.

Tabla 26. Resultados de la determinación de alérgenos en diferentes alimentos elaborados en la Línea 06.

Tipo de muestra	Alérgeno							
	Crustáceos	Gluten	Huevo	Leche	Moluscos	Pescado	Soja	Sulfitos
Mini Villeroy	0,72	<0,5	<1	>30	Presencia	Ausencia	NSD	<10
Cordero Villeroy	0,86	<0,5	<1	>30	Presencia	Ausencia	NSD	<10
Pechuga Villeroy	1,08	<0,5	<1	>30	Presencia	Ausencia	13,29	<10
Gamba Villeroy	>12,50	<0,5	<1	>30	Ausencia	Ausencia	NSD	<10
Finger de pollo	4,38	<0,5	<1	4,86	Presencia	Presencia	NSD	<10

En el caso de los valores numéricos, los resultados están expresados en mg/kg. En el caso de resultados presencia/ausencia, están referidos a 250 g

En el caso de la línea 10, si resulta extraño la elevada presencia de muestras en las cuales se detecta la presencia de moluscos, así como una en la cual aparece de modo sorpresivo la presencia de pescado. Al ser ambos determinados mediante PCR, no podemos determinar la cantidad en la cual están presentes y si por lo tanto resultan un riesgo para los consumidores. Es de destacar que a pesar de utilizar los mismos medios de producción, no se aprecia la presencia de ovoproductos en esta línea de producción.

4.4. Estudio de la contaminación cruzada en las líneas de producción a través de los procesos de limpieza

En esta parte del trabajo se trató de demostrar la influencia de los procesos de higiene, limpieza y desinfección concretamente, encuadrados en el APPCC, en la posible contaminación cruzada por alérgenos presentes en las líneas de producción.

Todos los muestreos se realizaron una vez practicadas las labores habituales de limpieza y desinfección que están protocolizados en el sistema APPCC de Clavo Congelados. La maquinaria e instalación estudiadas tratan de incluir todas las fases de fabricación de los productos y las líneas de fabricación implicadas, con el fin de determinar la eficacia del sistema de limpieza (Tablas 27-31). Como valor crítico máximo para considerar contaminación cruzada, tomamos 10 mg/cm^2 .



Tabla 27. Resultados obtenidos en la toma de muestras de superficies para la determinación de la contaminación cruzada por gluten en la planta de elaboración.

Línea	Punto de muestreo	Gluten
6	Horno	<1,5 mg/cm ²
1	Sierras	<1,5 mg/cm ²
1	Peladoras	<1,5 mg/cm ²
1	Haratek Paella	<1,5 mg/cm ²
5	Banastas Azules Glaseo	<1,5 mg/cm ²
1	Línea Fileteado	<1,5 mg/cm ²
2	Línea Chipirón	<1,5 mg/cm ²
1	Cinta de Glaseo	<1,5 mg/cm ²
2	Cinta de Glaseo	<1,5 mg/cm ²
1	Túnel Congelación G-1	<1,5 mg/cm ²
2	Túnel Congelación G-2	<1,5 mg/cm ²
4	Frigoscandia nº3	2,82 mg/cm ²
1	Empaquetado Ulmas	<1,5 mg/cm ²
2	Empaquetado Ulmas	<1,5 mg/cm ²
3	Multicabezal 3	<1,5 mg/cm ²

Según los resultados obtenidos, podemos afirmar que el protocolo de limpieza y desinfección aplicados en esta empresa siguiendo los criterios establecidos en su manual APPCC, cumplen con los niveles de exigencia marcados y previenen de modo efectivo contaminaciones relevantes por gluten a los productos fabricados, ya que sólo se encontraron trazas en una de las líneas y en una cantidad muy baja (2,82 mg/cm²).

Tabla 28. Resultados obtenidos en la toma de muestras de superficies para la determinación de la contaminación cruzada por crustáceos en la planta de elaboración.

Línea	Punto de muestreo	Crustáceos
8	Inyectora (Interior cala medición depósito salmuera)	<0.5 mg/cm ²
8	Pilo plástico (Interior pilo plástico amarillo)	<0.5 mg/cm ²
8	Amasadora al vacío (Interior inox)	<0.5 mg/cm ²
6	Plancha horno (Cinta teflón entrada)	<0.5 mg/cm ²
8	Bomba grande (Interior boca salida inox)	<0.5 mg/cm ²
8	Fileteadora trío (Cintas verdes)	<0.5 mg/cm ²
8	Carro cutter (Interior inox)	<0.5 mg/cm ²
8	Fileteadora Grasielli (Cinta teflón entrada cuchillas corte)	<0.5 mg/cm ²
8	Banastas (Gris cuarto lavadora)	<0.5 mg/cm ²
4	Frigoscandia 3	<0.5 mg/cm ²
3	Pycmesa	<0.5 mg/cm ²

Como puede observarse claramente en la Tabla 28, no existe ninguna evidencia de contaminación cruzada por crustáceos en ninguna de las líneas de producción muestreadas. Del mismo modo, lo mismo puede concluirse para el caso de la leche, para cuyo estudio se tomaron muestras en los mismos lugares que para el caso de los crustáceos y cuyos resultados obtenidos pueden observarse en la Tabla 30:

Tabla 29. Resultados obtenidos en la toma de muestras de superficies para la determinación de la contaminación cruzada por leche en la planta de elaboración.

Línea	Punto de muestreo	Leche
8	Inyectora (Interior cala medición depósito salmuera)	<1 mg/cm ²
8	Pilo plástico (Interior pilo plástico amarillo)	<1 mg/cm ²
8	Amasadora al vacío (Interior inox)	<1 mg/cm ²
6	Plancha horno (Cinta teflón entrada)	<1 mg/cm ²
8	Bomba grande (Interior boca salida inox)	<1 mg/cm ²
8	Fileteadora trío (Cintas verdes)	<1 mg/cm ²
8	Carro cutter (Interior inox)	<1 mg/cm ²
8	Fileteadora Grasielli (Cinta teflón entrada cuchillas corte)	<1 mg/cm ²
8	Banastas (Gris cuarto lavadora)	<1 mg/cm ²
4	Frigoscandia 3	<1 mg/cm ²
3	Pycmesa	<1 mg/cm ²

Tabla 30. Resultados obtenidos en la toma de muestras de superficies para la determinación de la contaminación cruzada por huevo en la planta de elaboración.

Línea	Punto de muestreo	Huevo
9	Cinta entrada F3	<0,250 mg/cm ²
9	Cinta entrada F3	<0,250 mg/cm ²
9	Cinta entrada F3	<0,13 mg/cm ²
9	Cinta salida F3	<0,250 mg/cm ²
9	Cinta salida F3	0,80 mg/cm ²
9	Cinta salida F3	<0,250 mg/cm ²
9	Cinta entrada freidora	<0,250 mg/cm ²
9	Cinta entrada freidora	<0,13 mg/cm ²

9	Chapa cinta entrada freidora	<0,250 mg/cm ²
9	Rodillos cinta entrada freidora	1,22 mg/cm ²
9	Teflón entrada encoladora	<0,250 mg/cm ²
9	Cinta entrada encoladora	<0,250 mg/cm ²
9	Rodillo encoladora	<0,250 mg/cm ²
9	Cinta encoladora	<0,250 mg/cm ²
9	Paredes depósito encoladora	<0,250 mg/cm ²
9	Conducto encoladora	<0,250 mg/cm ²
9	Bomba encoladora	<0,250 mg/cm ²
9	Bandeja encoladora	<0,250 mg/cm ²
9	Peneiro	<0,250 mg/cm ²
9	Paredes enharinadora	<0,250 mg/cm ²
9	Bandeja superior enharinadora	<0,250 mg/cm ²
9	Cinta inferior enharinadora	<0,250 mg/cm ²
9	Cinta superior enharinadora	<0,250 mg/cm ²
9	Depósito enharinadora	<0,250 mg/cm ²
9	Teflones cinta después enharinadora	0,70 mg/cm ²
9	Rodillos salida enharinadores	<0,250 mg/cm ²
9	Rodillos cinta después enharinadora	<0,250 mg/cm ²
9	Tapa cinta después enharinadora	<0,250 mg/cm ²
9	Cinta después enharinadora	<0,250 mg/cm ²
9	Cinta salida F3 limpia	<0,250 mg/cm ²
9	Cinta salida F3 limpia	<0,250 mg/cm ²

Este muestreo fue realizado justo después de una jornada completa de fabricación del producto denominado “Pop Corn”, que consiste básicamente en trozos de pechugas de pollo rebozadas con una tempura a base de huevo. Por este motivo,

todas las superficies de trabajo tuvieron previamente contacto directo con el huevo. Una vez terminada la producción, se procedió a realizar la limpieza y desinfecciones rutinarias, siguiendo el protocolo señalado en el manual APPCC de la empresa. Lógicamente, por ser el huevo un potente alérgeno, este es un caso muy importante de estudio. En base a los resultados obtenidos, puede afirmarse que el sistema de limpieza aplicado es efectivo para prevenir las posibles contaminaciones cruzadas por huevo inter-líneas.

Tabla 31. Resultados obtenidos en la toma de muestras de superficies para la determinación de la contaminación cruzada por soja en la planta de elaboración.

Línea	Punto de muestreo	Soja
8	Inyectora (Interior)	<1,25 mg/cm ²
8	Pilo plástico (Interior)	<1,25 mg/cm ²
8	Amasadora al vacío (Interior)	<1,25 mg/cm ²
6	Plancha horno (Cinta teflón)	<1,25 mg/cm ²
8	Bomba grande (Interior)	<1,25 mg/cm ²
8	Carro cutter (Interior inox)	<1,25 mg/cm ²
8	Fileteadora Grasielli (Cinta teflón)	<1,25 mg/cm ²
8	Banastas (Grisés)	<1,25 mg/cm ²
4	Frigoscandia 3	<1,25 mg/cm ²
3	Pycmesa	<1,25 mg/cm ²

Al igual que en los casos anteriores, este caso también se ha podido comprobar la total eliminación de los ingredientes a base de soja, tanto en la propia línea en la que se utiliza como ingrediente (Línea 08) y también se ha podido comprobar, así mismo, que no hay contaminación cruzada relevante con las líneas 03 y 04. Por lo tanto, el

sistema de limpieza asociado al manual APPCC de la empresa es totalmente efectivo para la eliminación de restos de soja.





CONCLUSIONES



5. CONCLUSIONES

A tenor de los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, se puede llegar a las siguientes conclusiones:

1) El cocinado juega un papel más importante que la prefritura en el perfil lipídico, y por ende en la calidad nutricional de los productos precocinados empanados.

2) El horneado, a diferencia de la fritura en inmersión, no aumenta significativamente el contenido graso ni calórico del producto final, por lo que es un método de cocinado que debe recomendarse, máximo teniendo en cuenta que la aceptabilidad general por parte del consumidor no disminuye con respecto a los productos fritos.

3) Las empresas que empleen en su proceso de fabricación aceites con mejores calidades nutricionales (tales como el aceite de oliva o el aceite de girasol alto oleico), deben advertir a sus consumidores que dichos productos deben ser cocinados mediante fritura en el mismo aceite que se empleó en su fabricación, o mediante horneado. De lo contrario, el empleo de dichos aceites, representa un sobre costo inútil para la industria.

4) El proceso de fritura doméstica en aceite con un mayor contenido en compuestos polares, causa importantes modificaciones en el perfil lipídico del alimento cocinado, modificando por tanto la calidad del alimento desde el punto de vista de la alimentación saludable.

5) El empleo de ingredientes con multitud de agentes alergénicos en una planta de elaboración mixta es perfectamente posible sin incrementar los riesgos para los consumidores alérgicos si se adoptan unas buenas prácticas preventivas.

6) En el caso estudiado, el protocolo de APPCC instaurado por la empresa para prevenir la aparición de contaminaciones cruzadas de alergenios entre las diferentes líneas de producción funciona adecuadamente. Muy ocasionalmente, aparecen algunas pequeñas concentraciones de alergenios en otras líneas diferentes, pero siempre por debajo de los valores considerados significativos.





BIBLIOGRAFÍA



5. Bibliografía

Aas, K. (1996). Studies of hypersensitivity to fish: clinical study. *International Archives of Allergy and Immunology*, 29, 346-363.

Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). (2007). *Alimentación Saludable, guía para las familias*. Programa PERSEO. Ed. Agencia Española de Seguridad Alimentaria, Madrid.

Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). (2007). Informe del Comité Científico de la AESAN sobre alergias alimentarias. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 2007, 5: 19-76.

Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). (2005). *Estrategia para la nutrición, actividad física y prevención de la obesidad (NAOS)*.

Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). (2005). *Estrategia para la nutrición, actividad física y prevención de la obesidad (NAOS)*. Ed. Agencia Española de Seguridad Alimentaria, Madrid.

Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). (2010). Informe del comité científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre el riesgo asociado a la presencia de ácidos grasos *trans* en alimentos. Ed. Agencia Española de Seguridad Alimentaria, Madrid.

Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). (2004). Opinion of the scientific panel on dietetic products, nutrition and allergies on *trans* fatty acids in foods and the effect on human health of the consumption of *trans* fatty acids.

www.efsa.eu.int

Alasalvar, C., Taylor, K.D.A., Zubcov, E., Shahidi, F., Alexis, M. (2002). Differentiation of cultured and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*): total lipid content, fatty acid and trace mineral composition. *Food Chemistry*, 79, 145-150.

Allison, R. G., Senti, F. R. (1983). A perspective on the application of the atwater system of food energy assessment. Bethesda, USA: Life Sciences Research Office, Federation of American Societies for Experimental Biology. FASEB.

American Dietetic Association (ADA) (2007) Position of the American Dietetic Association and Dieticians of Canada: dietary fatty acids. *Journal of the American Dietetic Association*, 107, 1599-1611.

Antonova, I., Mallikarjunan, P., Duncan, S. E. (2003). Correlating objective measurements of crispness in breaded fried chicken nuggets with sensory crispness. *Journal of Food Science*, 68, 1308–1315.

AOAC. (2002). Official Methods of Analysis, 17th ed., Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD.

Aubourg S.P., Losada V. and Prego R. (2007). Distribution of lipids and trace minerals in different muscle sites of farmed and wild turbot (*Psetta maxima*). *International Journal of Food Science and Technology*, 42, 1456-1464.

Bakke, A.M. (2011). Soybean meal in diets for cultured fishes. In *Soybeans: cultivation, uses and nutrition* (Maxwell, J.E.). Nova Science Publishers, INC, pp.125-153.

Ballner-Weber, B.K., Vieths, S., Luttkopf., D., Heuschmann, P., Wüthrich, B. (2000). Celery allergy confirmed by double-blind, placebo-controlled food challenge: a clinical study in 32 subjects with a history of adverse reactions to celery root. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 93, 1047-1059.

Barroeta, A., Calsamiglia, S., Cepero, R., López-Bote, C., Hernández, J.M. (2002). Óptima nutrición vitamínica de los animales para la producción animal. Pulso ediciones, Barcelona.

Barroeta, A.C., Cortinas, L. (2004). Estrategias genéticas y nutricionales en la modificación de la composición de la carne. En: La carne y productos cárnicos como alimentos funcionales. Jiménez Colmenero, F., Sánchez-Muniz, F.J., Olmedilla Alonso, B. (eds.). Fundación Española de la Nutrición y edictec@red, Madrid.

Barroso, M., Grande, I. (2003). Estructura de consumo y alimentación en las dietas atlántica y mediterránea. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 2, 416-421.

Berhisel-Broadbent, J., Dintzis, R.Z., Sampson, H.A., (2001). Allergenicity and antigenicity of chicken egg ovomucoid (Gal d III) compared with ovoalbumin (Gal d I) in children with egg allergy and in mice. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 93, 1047-1059.

Beyer, K., Morrow, E., Li, X.M., Bardina, L., Bannon, G.A., Burks, A.W., Sampson, H.A. (2001). Effects of cooking methods on peanut allergenicity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 107, 1077-1081.

Bligh, E.G., Dyer, W.J. (1959). A rapid method for total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911-917.

Breiteneder, H., Clare Mills, E.N. (2005). Molecular properties of food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115, 14-23.

Calder, P.C. (2006). *n*-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *American Journal of Clinical Nutrition*, 83, 1505S-1519S.

Candela, M., Astiasaran, I., Bello, J. (1996). Effect of frying on the fatty acid profile of some meat dishes. *Journal of Food Composition and Analysis*, 9, 277-282.

Capita, R., García-Linares, M.C., Tomé, M., García-Fernández, M.C., García-Arias, M.T., Sánchez-Muniz, F.J. (2003). Deep-frying of chicken meat and chicken-based product. Changes in the proximate and fatty acid composition. *Italian Journal of Food Science*, 15, 225-240.

Castrillón, A.M., Navarro, P., Álvarez-Pontes, E. (1997). Changes in chemical composition and nutritional quality of fried sardine (*Cuplea pilchardus*) produced by frozen storage and microwave reheating. *Journal of the Science of Food and agriculture*, 75, 1125-1132.

Cepeda, A. (2006). Alimentos funcionales y salud. ¿serán necesarios en el futuro?. Servicio de publicaciones de la Diputación Provincial de Lugo, Lugo.

Clausen, I., Oversen, L. (2005). Changes in fat content of pork and beef after pan-frying under different conditions. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 201-211.

Codreanu, F., Renaudin, J., Morisset, M., Beaudoin, E., Kanny, G., Moneret-Vautrin, D. (2008). Severe food anaphylaxis: survey of case reports by the Allergy Vigilance Network. *Allergy*, 63, 9-9.

Cordle, S.K. (2004). Soy protein allergy: incidence and relative severity. *Journal of Nutrition*, 134, 1213S-1219S.

Crespo, J.F., Pascual, C., Burks, A.W., Helm, R.M., Martín Esteban, M. (1995). Frequency of food allergy in a pediatric population from Spain. *Pediatric Allergy and Immunology*, 6, 39-43.

Crotty, M.P., Taylor, S.L. (2010). Risks associated with foods having advisory milk labelling. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125, 935-937.

Cuesta, C., Romero, A., & Sánchez-Muniz, F. J. (2001). Fatty acid changes in high oleic acid sunflower oil during successive deep-fat fryings of frozen foods. *Food*

Science and Technology International, 7, 317-328.

Darios, F., Davletov, B. (2006). Omega-3 and omega-6 fatty acids stimulate cell membrane expansion by acting on syntaxin 3. *Nature*, 440, 813-817.

Directiva 2003/89/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 10 de noviembre de 2003, por la que se modifica la Directiva 2000/13/CE en lo que respecta a la indicación de los ingredientes presentes en los productos alimenticios. DOUE, L308: 15-18.

Directiva 2008/5/CE de la Comisión, de 30 de enero de 2008 relativa a la indicación en el etiquetado de determinados productos alimenticios de otras menciones obligatorias distintas de las previstas en la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo. DOUE, 27: 12-15.

Directiva 2005/26/CE de la Comisión, de 21 de marzo de 2005, por la que se establece una lista de sustancias o ingredientes alimentarios excluidos provisionalmente del anexo III bis de la Directiva 2000/13/CE. DOUE, 75, 33-34.

Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, del 20 de marzo de 2000, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios. D.O.U.E., L109, 29-42.

Directiva 2006/142/CE de la Comisión, de 22 de diciembre de 2006 por la que se modifica el anexo III bis de la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, en el que figura la lista de ingredientes que, en cualquier circunstancia, deben indicarse en el etiquetado de los productos alimenticios (altramuces y moluscos) DOUE 368, 110-111.

Directiva 496/1990/CE del Consejo, de 24 de septiembre de 1990, relativa al etiquetado sobre propiedades nutritivas de los productos alimenticios. D.O.U.E., L276, 40-44.

Decreto 1245/2008, del 18 de julio, por el que se modifica la norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios, aprobada por el Real Decreto 1334/1999, del 31 de Julio de 1999. Boletín Oficial del Estado, 184: 32976-32981.

Decreto 36/2008, de 18 de enero, por el que se modifica la norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios, aprobada por el real Decreto 1334/1999, de 31 de julio, en lo que respecta al etiquetado de determinados productos alimenticios que contienen altramuces y moluscos. Boletín Oficial del Estado, 23, 4980-4981.

Dzudie, T., Kouebou, C.P., Essia-Ngang, J.J. Mbofung, C.M.F. (2004). Lipid sources and essential oils effects on quality and stability of beef patties. *Journal of Food Engineering*, 65, 67-72.

Eckhardt, R.B. (2001). Genetic research and nutritional individuality. *Journal of Nutrition*, 131, 336S-339S.

Ewan, P.W. (1996). Clinical study of peanut and nut allergy in 62 consecutive patients: new features and associations. *British Medical Journal*, 312, 1074-1078.

Feroli, F., Caboni, M.F., Dutta, P.C. (2008). Evaluation of cholesterol and lipid oxidation in raw and cooked minced beef stored under oxygen-enriched atmosphere. *Meat Science*, 80, 681-685.

Fernández, J., Pascual, C.Y., Caballero, R., Romualdo, L., Martín Esteban, M. (2004). Espectro clínico de las reacciones alérgicas a alimentos en la infancia. *Anales Españoles de Pediatría*, 42, 328-332.

Franck, P., Kanny, G., Dousset, B., Nabet, P., Moneret-Vautrin, D.A. (2000). Lettuce allergy. *Allergy*, 55, 201-202.

Galeone, C., Talamini, R., Levi, F., Pelucchi, C., Negri, E., Giacosa, A., Montella, M., Franceschi, S., Vecchi, C. (2007). Fried foods, olive oil and colorectal cancer. *Annals of Oncology*, 18, 36-39.

Gallardo, J.M. (2004). Los productos marinos: alimentos para la salud en: Retos de la investigación alimentaria en el nuevo siglo. Real Academia de Medicina y Cirugía de Galicia. Instituto de España.

Gangur, V., Kelly, C., Navuluri, L. (2005). Sesame allergy: a growing food allergy of global proportions?. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 4, 123-129.

García-Ara, M.C., Boyano, M.T., Díaz-Pena, J.M., Matín-Muñoz, F., Pascual, C., García, G., Martín Esteban, M. (2003). Incidencia de alergia a proteínas de leche de vaca en el primer año de vida y su repercusión en el consumo de hidrolizados. *Anales de Pediatría*, 58, 100-105.

García-Arias, M. T., Pontes, E.Á., García-Linares, M. C., García-Fernández, M. C., Sánchez-Muniz, F. J. (2003). Cooking-freezing-reheating (CFR) of sardine (*Sardine pichardus*) fillets. Effect of different cooking and reheating procedures on the proximate and fatty acid compositions. *Food Chemistry*, 83, 349-356.

Garg, M.L., Wood, L.G., Singh, H., Moughan, P.J. (2006) Means of delivering recommended levels of long chain n-3 polyunsaturated fatty acids in human diets. *Journal of Food Science*, 71, R66-R71.

Gaullier, J.M., Breven, G., Blankson, H., Gudmundsen, O. (2002). Clinical trial results support a preference for using CLA preparations enriched with two isomers rather than four isomers in human studies. *Lipids*, 37, 1019-1025.

Gil, A. (2010). Tratado de nutrición, Tomo II. Composición y calidad nutritiva de los alimentos. Ed. Médica panamericana, Madrid.

Gil-Campos, M., Dalmau Serra, J. (2010). Importancia del ácido docosahexaenoico (DHA): funciones y recomendaciones para su ingesta en la infancia. *Anales de Pediatría*, 73, 142.e1-142.e2.

Givens, D.I., Klien, K.E., Gibbs, R.A. (2006) The role of meat as a source of *n-3* polyunsaturated fatty acids in the human diet. *Meat Science*, 74, 209-218.

González, R., Varela, J., Carreira, J., Polo, F. (1995). Soybean hydrophobic protein and soybean hull allergy. *Lancet*, 346, 48-49.

Grigorakis, K. (2007). Compositional and organoleptic quality of farmed and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and factors affecting it: A review. *Aquaculture*, 27, 55-75.

Griguol, V., León-Camacho, M., Vicario, I.M. (2007). Revisión de los niveles de ácidos grasos *trans* encontrados en distintos tipos de alimentos. *Grasas y Aceites*, 58, 87-98.

Haizam, A., Tarmizi, A., Ismail, R. (2008). Comparison of the frying stability of standard palm olein and special quality palm olein. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85, 245-251.

Haak, L., Sioen, I., Raes, K., Van Camp, J., De Smet, S. (2007). Effect of pan-frying in different culinary fats on the fatty acid profile of pork. *Food Chemistry*, 102, 857-864.

Hariri, N., Gougeon, R., Thiabault, L. (2010). A highly saturated fat-rich is more obesogenic than diets with lower saturated fat content. *Nutrition Research*, 30, 632-643.

Hefle, S.L., Furlong, T.J., Niemann, L., Lemon-Mule, H., Sicherer, S., Taylor, S.L. (2007). Consumer attitudes and risks associated with packaged foods having advisory

labelling regarding the presence of peanuts. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120, 171-176.

Helm, R.M., Buks, A.W. (2000). Mechanisms of food allergy. *Current Opinion in Immunology*, 12(6), 647-653.

Holzhauser, T., Stepahn, O., Vieths, S. (2006). Polymerase chain reaction (PCR) methods for the detection of allergenic foods. In "Detecting Allergens in Food". CRC Press, Boca Rtaón, Florida, USA, pp. 125-143.

Houba, R., Doekes, G., Heederik, D. (1998). Occupational respiratory allergy in bakery workers: a review of the literature. *American Journal of Industrial Medicine*, 34, 529-546.

Houben, J.H., van Dijk, A., Eikelenboom, G. (2002). Dietary vitamin E supplementation, an ascorbic acid preparation, and packaging effects on colour stability and lipid oxidation in mince made from previously frozen lean beef. *European Food Research and Technology*, 214, 186-191.

Houhoula, D.P., Oreopoulou, V., Tzia, C. (2003). The effect of process time and temperature on the accumulation of polar compounds in cottonseed oil during deep-fat frying. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 314-9.

Hoz, L., D'Arrigo, M., Cambero, I., Ordóñez, J.A. (2004) Development of an *n-3* fatty acid and α -tocopherol enriched dry fermented sausage. *Meat Science*, 67, 485-495.

Hur, S.J., Park, G.B., Joo, S.T. (2008) A comparison of the meat qualities from the Hanwoo (Korean native cattle) and Holstein steer. *Food and Bioprocess Technology*, 1, 196-200.

International Life Sciences Institute (ILSI) (1999) "Safety assessment and potential health benefits of food components based on selected scientific criteria". ILSI North

America Technical Committee on Food Components for Health Promotion. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*; 39: 203-316.

Ford, L.S., Taylor, S., Pacenza, R., Niemann, L.M., Lambrecht, D.M., Sicherer, S.H. (2010). Food allergen advisory labeling and product contamination with egg, milk, and peanut. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126(2), 384-385.

Jakobsen, M., Bertelsen, G. (2000). Colour stability and lipid oxidation of fresh beef. Development of a response surface model for predicting the effects of temperature, storage time, and modified atmosphere composition. *Meat Science*, 54, 49-57.

Jiménez-Colmenero, F. (2007) Healthier lipid formulation approaches in eat-based functional foods. Technological options for replacement of meat fats by non-meat fats. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 567-578.

Jiménez-Colmenero, F. (1996). Technologies for developing low-fat meat products. *Trends in Food Science and Technology*, 7, 41-48.

Johansson, S.G., Bieber, T., Dahl, R., Friedmann, P.S., Lanier, B.Q., Lockey, R.F., Motala, C., Ortea Martell, J.A., Platts-Mills, T.A., Ring, J., Thien, F., Van Cauwenderge, P., Willians, H.C. (2004). Revised nomenclature of allergy for global use: Report of the nomenclature review committee of the World Allergy Organization. *Journal of allergy Clinical Immunology*, 113, 832-836.

Jankiewicz, A., Baltes, W., Bögl, K.W., Dehne, L., Jamin, A., Hoffmann, A., Haustein, D., Vieths, S. (1979). Influence of food processing on the immunochemical stability of celery allergens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 75, 359-370.

Joo, S.T., Lee, J.I., Hah, K.H., Ha, Y.L., Park, G.B. (2000). Effect of conjugated linoleic acid additives on quality characteristics of pork patties. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 32, 62-68.

Kanny, G., Moneret-Vautrin, D.A., Flabbee, J., Beaudouin, E., Morisset, M., Thevenin, F. (2001). Population study of food allergy in France. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 108, 133-140.

Kato, T., Katayama, E., Matsubara, S., Omi, Y., Matsuda, T. (2000). Release of allergenic proteins from rice grains induced by high hydrostatic pressure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3124-3129.

Koletzko, B., Uauy, R., Palou, A., Hornstra, G., Eilander, A., Moretti, D., Osendarp, S., Zock, P., Innis, S. (2010). Dietary intake of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) in children- a workshop report. *British Journal of Nutrition*, 103, 923-928.

Koppleman, S.J., Bruijnzeel-Koomen, C.A., Hessing, M., De Jongh, H.H. (1999). Heat-induced conformational changes of the Ara h 1, a major peanut allergen, do not affect its allergenic properties. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 4770-4777.

Koppleman, S.J., van Koningsveld, G.A., Knulst, A., Gruppen, H. (2000). Effect of heat-induced aggregation on the IgE binding patatin (Sol t 1) is dominated by other potato proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1562-1568.

Lamarque, B. (2008). Review of the effect of dairy products on non-lipid risk factors for cardiovascular disease. *Journal of the American College of Nutrition*, 27, 741S-746S.

Leal Orozo, A. (2005). Ácidos grasos trans, cobs y lops: evidencia actual de su influencia sobre la salud infantil. *Acta Pediátrica Española*, 63, 22-26.

Lee, A., Hernández, P., Djordjevic, D., Faraji, H., Hollender, R., Faustman, C., Decker, E.A. (2006). Effect of antioxidants and cooking on stability of n-3 fatty acids in fortified meat products. *Journal of Food Science*, 71, C233-C238.

Leung, P.S., Chow, W.K., Duffey, S., Kwan, H.S., Gershwin, M.E., Chu, K.H. (1996). IgE reactivity against a cross-reactive allergen in crustacea and mollusca: evidence for tropomyosin as the common allergen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 98, 954-961.

Li, C.B., Zhou, G.H., Xu, X.L. (2008). Dynamical changes of beef intramuscular connective tissue and muscle fiber during heating and their effects on beef shear force. *Food and Bioprocess Technology*, DOI: 10.1007/s11947-008-0117-3, in press.

Lien, V.W., Clandinin, M.T. (2009): Dietary assessment of arachidonic acid and docosahexaenoic acid intake in 4-7 year-old children. *Journal of the American College of Nutritionists*, 28, 7-15.

Lo, S.K., Tan, C.P., Long, K., Affandi Yusoff, M.S., Lai, O.M. (2008) Diacylglycerol oil-properties, processes and products: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 1, 223-233.

Makinson, J. H., Greenfield, M. L., Wong, M. L., Wills, R. B. (1987). Fat uptake during deep-fat frying of coated and uncoated foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 1, 13. 15.

Marquez Ruiz, G., Dogarganes, M. C. (1996). Nutritional and physiological effects of used frying fats, in *Deep Frying Chemistry, Nutrition and Practical Applications*, Ed. By Perkins EG and Erickson MD, AOAC Press, Champaign, IL, pp 160-182.

Martín Esteban, M. (2006). Alergia a formulas de sustitución en alérgicos a proteínas de leche de vaca. *Pediátrika*, 12-15.

Martínez, B., Miranda, J.M., Nebot, C., Rodríguez, J.L., Cepeda, A., Franco, C.M. (2010). Differentiation of farmed and wild turbot (*Psetta máxima*): proximate chemical composition, fatty acid profile, trace minerals and antimicrobial resistance of contaminant bacteria. *Food Science and Technology International*, DOI 10.1177/1082013210367819 In press.

Martínez, B., Miranda, J.M., Vázquez, B.I., Fente, C.A., Franco, C.M., Rodríguez, J.L., Cepeda, A. (2009). Development of a hamburger patty with healthier lipid formulation and study of its nutritional, sensory and stability properties. *Food and Bioprocess Technology*, DOI 10.1007/s11947-009-0268-x.

Mata, P., Alonso, R., & Mata, N. (2002). Los omega-3 y omega-9 en la enfermedad cardiovascular. In Fundación Puleva e Instituto Omega-3. (Ed.), *Libro blanco de los omega-3* (pp. 49-63). Granada, Spain: Puleva Food.

Mataix, J., Aranceta, J. (2002). Recomendaciones Nutricionales. En: Mataix j. ed. *Nutrición y Alimentación Humana*. Ed. Hergón, Madrid.

Mataix, A., Gil, A. (2003). *Libro blanco de los omega-3*. Ediciones Puleva Food, Granada.

Mataix, J., Mataix, B., Serra, Ll. (2001a). Aceite de oliva y alimentación mediterránea. En: Mataix y col. *Aceite de oliva virgen: nuestro patrimonio alimentario*. Universidad de Granada. Ediciones Puleva. Granada.

Mataix, J. Quiles, J.L. *Aceites y Grasas*. (2001b). En Sociedad Española de Nutrición Comunitaria. *Guías prácticas para la población española*. Madrid.

Mata, P., Ortega, R.M. (2003) Omega-3 fatty acids in the prevention and control of cardiovascular disease. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57(Suppl. 1), S22-S25.

Mellema, M. (2003). Mechanism and reduction of fat uptake in deep-fat fried foods. *Trends in Food Science and Technology*, 14, 364–373.

Meyer, B.J., Mann, N.J., Lewis, J.L., Milligan, G.C., Sinclair, A.J., Howe, P.R.C. (2003). Dietary intakes and food sources of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Lipids*, 38, 391-398.

Miranda, J.M., Martínez, B., Pérez, B., Antón, X., Rodríguez, J.L., Cepeda, A. (2009). Influencia en la degradación del aceite de fritura. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 243, 26-30.

Miranda, J.M., Martínez, B., Pérez, B., Antón, X., Vázquez, B.I., Fente, C.A., Franco, C.M., Rodríguez, J.L., Cepeda, A. (2010). The effects of industrial pre-frying and domestic cooking methods on the nutritional compositions and fatty acid profiles of two different frozen breaded foods. *LWT-Food Science and Technology*, 43, 1271-1276.

Mittag, D., Akkerdaas, J., Ballmer-Weber, B.K., Vogel, L., Wensing, M., Becker, W.M., Koppelman, S.J., Knulst, A.C., Helbling, A., Hefle, S.L., Van Ree, R., Vieths, S. (2004). Ara h 8, a Bet v 1-homologous allergen from peanut, is a major allergen in patients with combined birch pollen and peanut allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114(6), 1410-1417.

Monaci, L., Tregoeat, V., van Hengel, A.J., Anklam, E. (2006). Milk allergens, their characteristics and their detection in food: a review. *European Food Research and Technology*, 223, 149-179.

Monaci, L., Visconti, A. (2010). Immunochemical and DNA-based methods in food allergen analysis and quality assurance perspectives. *Trends in Food Science and Technology*, 21, 272-283.

Morrison, W. R., Smith, L. M. (1964). Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipid with boron fluoride-methanol. *Journal of Lipid Research*, 5, 600-608.

Muguerza, E., Gimeno, O., Ansorena, D., Bloukas, J.G., Astiasarán, I. (2001) Effect of replacing pork backfat with pre-emulsified olive oil on lipid fraction and sensory quality of “Chorizo de Pamplona” a traditional Spanish fermented sausage. *Meat Science*, 59, 251-258.

Norton, T., Sun, D.W. (2008) Recent advances in the use of high pressure as an effective processing technique in the food industry. *Food and Bioprocess Technology*, 1, 2-34.

Nowak-Wegrzyn, A., Conover-Walker, M., Wood, R.A. (2001). Food-allergic reactions in schools and preschools. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 155, 790-795.

Okuyama, H., Ikemoto, A. (1999). Needs to modify the fatty acid composition of meats for human health. En: *Proceeding of the International Congress of Meat Science and Technology* (Vol. II) (pp. 638-640). Yokohama, Japan, 1-6 August, 1999.

Orden de 26 de Enero de 1989, por la que se aprueba la norma de calidad para los aceites y grasas calentados. *Boletín Oficial del Estado*, 26, 2665-2667

Organización Mundial de la Salud (OMS) (2003) *Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases*; WHO technical report series 916: Ginebra.

Osterballe, M., Hansen, T.K., Moritz, C.G., Host, A., Binslev-Jensen, C. (2005). The prevalence of food hypersensitivity in a unselected population of children and adults. *Pediatric Allergy and Immunology*, 16, 567-573.

Palou, A., Picó, C., Bonet, M.L. (2004). Food safety and functional foods in the European Union: Obesity as a paradigmatic example for novel food development. *Nutrition Reviews*, 62, S169-S181.

Palou, A., Serra, F., Pico, C. (2003). General aspects on the assessment of functional foods in the European Union. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57, S12-S17.

Pariza, M. W. (2004). Perspective on the safety and effectiveness of conjugated linoleic acid. *American Journal Clinical of Nutrition*, 79, 1132S-1136S.

Park, Y., Storkson, J.M., Albright, K.J., Liu, W., Pariza, M.W. (1999). Evidence that the trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic induces body composition changes in mince. *Lipids*, 34, 235-241.

Paschke, A. (2009). Aspects of food processing and its effect on allergen structure. *Molecular Nutrition and Food Reserach*, 53, 959-962.

Pascual, C.Y., Crespo, J.F., Martín Esteban, M. (2002). Alergenos. Carcaterísticas biológicas, físicas e inmunológicas. Neumoalergenos, alergenos alimentarios, alergenos de origen animal, alergenos de origen farmacológico. En: *Tratado de alergología pediátrica*. Ed. Ergon, Madrid, 49-66.

Pascual, C.Y., Crespo, J.F., Martín Esteban, M. (1997). The relevance of cross-reactivity in pediatric allergy. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 15, 449-460.

Pascual, C. Y., Martín Esteban, M., Fernández Crespo, J., (1992). Fish allergy: evaluation of cross-reactivity in pediátrico allergy. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 15, 449.460.

Pereira, M.J., Belver, M.T., Pascual, C.Y., Martín Esteban, M. (2002). The allergic significance of legumes. *Allergologia et Immunopatologia*, 30, 346-353.

Pérez-Camino, M. C., Márquez-Ruiz, G., Ruiz-Méndez, M. V., Dobarganes, M. C.

(1991). Lipid changes during frying of frozen prefried foods. *Journal of Food Science*, 56, 1644-1650.

Pieretti, M.M., Chung, D., Pacenza, R., Slotkin, T., Sicherer, S.H. (2009). Audit of manufactured products: use of allergen advisory labels and identification of labeling ambiguities. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 124, 337-341.

Poms, R.E., Capelletti, C., Anklam, E. (2004). Effect of roasting history and buffer composition on peanut protein extraction efficiency. *Molecular Nutrition and Food Research*, 48, 459-464.

Poms, R.E., Emons, H., Anklam, E. (2006). In Koppelman, S.J., Hefle, S.L. (eds) *Detecting allergens in foods*. Woodhead, Cambridge, UK, pp. 348-356.

Ramírez, M. R., Cava, R. (2005). Changes in colour, lipid oxidation and fatty acid composition of pork loin chops as affected by the type of culinary frying fat. *LWT-Food Science and Technology*, 29, 94-99.

Ramirez, M, R., Morcuende, D., Estévez, M., Cava López, R. (2005). Fatty acid profiles of intramuscular fat from pork loin chops fried in different culinary fats following refrigerated storage. *Food Chemistry*, 92, 159-167.

Rasmussen, R.S., Ostefeld, T.H., Rosholt, B., Mc Lean, E. (2000). Manipulation of end-product quality in rainbow trout with finishing diets. *Aquaculture Nutrition*, 6, 17-23.

Real Decreto 2220/2004, de 26 de noviembre, por el que se modifica la norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios, aprobada por el Real Decreto 1334/1999, de 31 de julio. *Boletín Oficial del Estado*, 286: 39355-39357.

Real Decreto 1334/1999, de 31 de julio, por el que se aprueba la norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios. Boletín Oficial del Estado, 202: 31410-31418.

Reche, M., Pascual, C.Y., Vicente, J., Caballero, T., Martín Muñoz, F., Sánchez, S., Martín Esteban, M. (2001). Tomato allergy in children and young adults: cross-reactivity with latex and potato. *Allergy*, 56, 1197-1201.

Reglamento (CE) 41/2009 de la Comisión, de 20 de enero de 2009, sobre la composición y etiquetado de productos alimenticios apropiados para personas con intolerancia al gluten. DOUE, L16: 3-5.

Reglamento (CE) 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre de 2006, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos. D.O.U.E. L404, 9-25.

Reglamento (CE) 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre de 2006, sobre la adición de vitaminas, minerales y otras determinadas sustancias a los alimentos. D.O.U.E., L404, 26-38.

Reglamento (CE) 116/2010 de la Comisión, de 9 de febrero de 2010, por el que se modifica el Reglamento 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a la lista de declaraciones nutricionales. D.O.U.E. L37, 16-18.

Reglamento (CE) 107/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo de 15 de enero de 2008, por el que se modifica el Reglamento 1924/2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos por lo que se refiere a las competencias de ejecución atribuidas a la Comisión. D.O.U.E. L39, 8-10.

Reglamento 109/2008 del Parlamento Europeo y su Consejo del 15 de Enero de 2008, por el que se modifica el Reglamento 1924/2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos. DOUE, 39, 14-15.

Reglamento 983/2009 de la Comisión, del 21 de Octubre de 2009, sobre la autorización o la denegación de autorización de determinadas declaraciones de propiedades saludables en los alimentos relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y el desarrollo y la salud de los niños. D.O.U.E. L277, 3-8.

Reglamento 276/2010 de la Comisión, de 2 de mayo de 2010, por el que se modifica el Reglamento (CE) 983/2009, sobre la autorización o la denegación de autorización de determinadas declaraciones de propiedades saludables en los alimentos relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y el desarrollo y la salud de los niños. D.O.U.E., L111, 3-4

Riediger, N.D., Othman, R.A., Suh, M., Moghadasian, M.H. (2009). A systematic review of the roles of n-3 fatty acids in health and disease. *Journal of the American Dietetic Association*, 109, 668-679.

Rodríguez, J.L., Añorve, J. (2006). *Desarrollo de una leche natural enriquecida en ácidos grasos omega-3*. En Cepeda, A. *Alimentos funcionales y salud. ¿serán necesarios en el futuro?*. Servicio de publicaciones de la Diputación Provincial de Lugo.

Romero, A., Bastida, S., Sánchez-Muniz, F.J. (2007). Cyclic fatty acids in sunflower oils during frying of frozen foods with oil replenishment. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 165-173.

Romero, A., Cuesta, C., Sánchez-Muniz, F.J. (2001). Utilización de freidora doméstica entre universitarios madrileños. Aceptación de alimentos congelados fritos en aceite de oliva virgen extra, girasol y girasol alto oleico. *Grasas y Aceites*, 52, 38-44.

Romero, A., Sánchez-Muniz, F. J., Cuesta, C. (2000). Deep fat frying of frozen foods in sunflower oil. Fatty acid composition in fryer oil and frozen prefried potatoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 2135-2141.

Rona, R.J., Keil, T., Summers, C., Gislason, D., Zuidmeer, L., Sodergren, E., Sigurdardottir, S.T., Lindner, T., Goldhahn, K., Dahlstrom, J., McBride, D., Madsen, C. (2007). The prevalence of food allergy: a meta-analysis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120, 638-646.

Salvador, A., Sanz, T., Fiszman, S. (2005). Effect of the addition of different ingredients on the characteristics of a batter coating for fried seafood prepared without a pre-frying step. *Food Hydrocolloids*, 19, 703-708.

Sampson, H.A., (1999). Food allergy. Part 2: Diagnosis and management. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 103, 981-989.

Sánchez-Gimeno, A.C., Negueruela, A.I., Benito, M., Vercet, A., Oria, R. (2008). Some physical changes in Bajo Aragón extra virgin olive oil during the frying process. *Food Chemistry*, 110, 654-658.

Sánchez-Muñiz, F.J. (2006). Oils and fats: Changes due to culinary and industrial processes. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 76, 230-237.

Sánchez-Muniz, F. J., Viejo, J. M., Medina, R. (1992). Deep-frying of sardines in different culinary fats. Changes in the fatty acid composition of sardines and frying fats. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 40, 2252-2256.

Sanjurgo Crespo, P., Trebolazabala Quirante, N., Aldámiz-Echevaría Azuara, L., Castaño González, L., Prieto Perera, J.A., Andrade Lodeiro, F. (2008). N-3 and n-6 fatty acids in plasma at birth and one year of age and relationship with feeding. *Anales de Pediatría*, 68, 570-575.

Sant'Ana, L.S., Mancini-Filho, J. (2000). Influence of the addition of antioxidants in vivo on the fatty acid composition of fish fillets. *Food Chemistry*, 68, 175-178.

Sanz Ortega, J., Martorell Aragonés, A., Michavila Gómez, A. (2001). Estudio de la alergia mediada por IgE frente a la proteína de leche de vaca en el primer año de vida. *Anales Españoles de Pediatría*, 545, 36-39.

Scollan, N., Hocquette, J.F., Nuernberg, K., Dannenberger, D., Richradson, I. Moloney, A. (2006). Innovations in beef production systems that enhance the nutritional and health value of beef lipids and their relationship with meat quality. *Meat Science*, 74, 17-33.

Sébédio, J. L., Dobarganes, M. C., M'zuqez, G., Wester, I., Christie, W. W., Dobson, G., Zwobada, F., Chardigny, J. M., Mairot, Th. Lahtinen, R. (1996). Industrial production of crisps and prefried french fried using sunflower oil. *Grasas y Aceites*, 47, 5-13.

Shearer, K.D. (1994). Factors affecting the proximate composition of cultured fishes with emphasis on salmonids. *Aquaculture*, 119, 63-88.

Sicherer, S.H. (2001). Clinical implications of cross-reactive food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 108, 881-890.

Sicherer, S.H. Muñoz-Furlong, A., Sampson, H.A. (2004). Prevalence of seafood allergy in the United States determined by a random telephone survey. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114(1), 159-165.

Sioen, I., Haak, L., Raes, K., Hermans, C., De Henauw, S., De Smet, S., Van Camp, J. (2006). Effects of pan frying in margarine and olive oil on the fatty acid composition of cod and salmon. *Food Chemistry*, 98, 609-617.

Simopoulos, A. P., Leaf, A., Salem, N. (1999). Workshop on the essentiality and recommended dietary intakes for Omega-6 and Omega-3 fatty acids. *Journal of the American College of Nutrition*, 18(5), 487-489.

Simopoulos, A. P. (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3

essential fatty acids. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 56, 365-379.

Simopoulos, A.P. (1997). The return of w-3 fatty acids into the food supply. I. Land-based animal food products and their health effects. *World Reviews of Nutrition and Dietetics*. Vol 83. Karger, Basel.

Sioen, I., Haak, L., Raes, K., Hermans, C., De Henauw, S., De Smet, S., Van Camp, J. (2006). Effects of pan frying in margarine and olive oil on the fatty acid composition of cod and salmon. *Food Chemistry*, 98, 609-617.

Stachowska, E., Chlubek, D., Ciechanowski, K. (2001). *Trans* isomers of unsaturated fatty acids-metabolic action and clinical effects. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 70, 59-66.

Storelli, M.M. (2009). Intake of essential minerals and metals via consumption of seafood from the Mediterranean Sea. *Journal of Food Protection*, 72, 1116-1120.

Tanabe, S. (2008). Analysis of food allergen structures and development of foods for allergic patients. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 72(3), 649-654.

Taylor, S.L., Hefle, S.L., Farnun, K., Rizk, S., Yeung, J., Barnett, M.E., Busta, M., Shank, F.R., Newsome, R., Davis, S., Bryant, C.M. (2006). Analysis and evaluation of food manufacturing practices used to address allergen concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Technology*, 5, 138-156.

Teufel, M., Biedermann, T., Rapps, N., Hausteiner, C., Henningsen, P., Enck, P., Zipfel, S. (2007). Psychological burden of food allergy, *World Journal of Gastroenterology*, 13, 3456-3465.

Tsai, C.J., Leitzmann, M.F., Willett, W., Giovannucci, E.L. (2005). Long-term intake of trans-fatty acids and risk of gallstone disease in men. *Archives of Internal Medicine*, 165, 1011-1015.

Ulbricht, T.L.V. Southgate, D.A.T. (1991). Coronary heart disease: seven dietary factors. *Lancet*, 228, 985-992.

Valencia, I., Ansorena, D., Astiasarán, I. (2006). Nutritional and sensory properties of dry fermented sausages enriched with *n*-3 PUFAs. *Meat Science*, 72, 727-733.

Valenzuela, A., Morgano, N. (1999). Trans fatty acid isomers in human health and in the food industry. *Biological Research*, 32, 273-287.

Valenzuela, A., Uauy, R. (2005). Funciones biológicas y metabolismo de los ácidos grasos esenciales y de sus derivados activos. En: Gil, A. Tratado de Nutrición, tomo I. Acción édia: Madrid.

Van der Werf, M.J., Schuren, F.H.J., Bijlsma, S., Tas, A.C., van Ommen, B. (2001). Nutrigenomics: Application of genomics technologies in nutritional sciences and food technology, *Journal of Food Science*, 66, 772-780.

Van Do, T., Elsayed, S., Florvaag, E., Hodvik, I., Endresen, C. (2005). Allergy to fish parvalbumins: studies on the cross-reactivity of allergens from 9 commonly consumed fish. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 116(6), 1314-1320.

Van Hengel, A. (2007). Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389, 111-118.

Van Hengel, A. (2007). Declaration of allergens on the label of food products purchased on the European market. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 96-100.

Varela, G., Moreiras, O., Carbajal, A., Campo, M. (1995). Estudio nacional de nutrición y alimentación. Instituto Nacional de Estadística, Madrid.

Varela, G., Ruiz-Rosso, B. (2000). Some nutritional aspects in olive oil. In J. Harwoo & R. Aparicio (Eds.), *Handbook of olive oil, analysis properties* (pp. 565). Aspen Publisher Inc, Gaithersburg, Maryland

Varela, P., Salvador, A., Fisman, S.M. (2008). Methodological developments in crispness assessment: effects of cooking method on the crispness of crusted foods. *LWT-Food Science and Technology*, 41, 1252-1259.

Vázquez, J., Sánchez-Muniz, F.J., (1994). Revisión: Proteína de pescado y metabolismo del colesterol. *Revista Española de Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 34, 589-608.

Warner, K., Gupta, M. (2003). Frying quality and stability of low and ultra-low linolenic acid soybean oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80, 275–280

Weber, J., Bochi, V.C., Ribeiro, C.P., Victório, A.M., Emanuelli, T. (2008). Effect of different cooking methods on the oxidation, proximate and fatty acid composition of silver catfish (*Rhamdia quelen*) fillets. *Food Chemistry*, 106, 140-146.

Wilkinson, A.L., Sun, Q., Senecal, A., Faustman, C. (2001) Antioxidant effects on TBARS and fluorescence measurements in freeze-dried meats. *Journal of Food Science*, 66, 20–24.

WHO. (2003). Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. WHO Technical Report Series 916, Geneva, Switzerland.

Wood, J.D., Enser, M., Fisher, A.V., Nute, G.R., Sheard, P.R., Richardson, R.I., Hughes, S.I., Whittington, F.M. (2008). Fat deposition fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Science*, 78, 343-358.

Yu, J.W., Kagan, R., Verreault, N., Nicolas, N., Joseph, L., StPierre, Y., Clarke, A. (2006). Accidental ingestions in children with peanut allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 118, 466-472.