

Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) sobre condiciones de uso de determinadas sustancias para ser empleadas en complementos alimenticios-3

Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición

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

Secretario técnico

Vicente Calderón Pascual

Número de referencia: AECOSAN-2014-002

Documento aprobado por la Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición del Comité Científico en su sesión plenaria de 21 de mayo de 2014

Grupo de trabajo

Emilio Martínez de Victoria Muñoz (Coordinador y coordinación de compuestos fenólicos)
Guillermina Font Pérez (coordinación de lactasa)
María Rosa Martínez Larrañaga (coordinación de melatonina y de metilsulfonilmetano)
Catalina Picó Segura (coordinación de fitosteroles)
José Luis Ríos Cañavate (coordinación de betaina)
Arturo Hardisson de la Torre, Cristina Nerín de la Puerta
Amelia Marti del Moral, Jordi Salas Salvadó

Resumen

Los complementos alimenticios son alimentos cuyo fin es complementar la dieta normal y que consisten en fuentes concentradas de nutrientes (vitaminas y minerales) o de otras sustancias que tienen un efecto nutricional o fisiológico, en forma simple o combinada. Los complementos se comercializan en forma dosificada, se entregan al consumidor final únicamente preenvasados. En ningún caso, deben sustituir al uso de medicamentos sin una supervisión médica adecuada. Sólo deben utilizarse para complementar la dieta y, de forma general, su uso no es necesario si se sigue una dieta variada y equilibrada, a la que no pueden reemplazar.

En España los complementos alimenticios están regulados por el Real Decreto 1487/2009 que traspuso a la legislación española la Directiva 2002/46/CE relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de complementos alimenticios. Sin embargo, actualmente sólo está regulado el uso de vitaminas y minerales, por lo que se ha solicitado al Comité Científico que realice una valoración de la propuesta de autorización de la utilización de determinadas sustancias distintas de vitaminas y minerales en la fabricación de complementos alimenticios.

Las seis sustancias propuestas por la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) son clorhidrato de betaina, fitosteroles, lactasa, melatonina, metilsulfonilmetano y polifenoles del aceite de oliva y de las hojas y frutos del olivo.

El Comité Científico ha valorado cada propuesta, analizando las características y fuentes de cada sustancia, así como la nutrición, metabolismo y seguridad y ha concluido, en cada caso, si la presentada por la AECOSAN era aceptable desde el punto de vista de su seguridad en su uso como complemento alimenticio. En ningún caso, la evaluación realizada supone un aval de la eficacia biológica de las sustancias y dosis valoradas.

El Comité Científico indica que, en todo caso es necesario que las personas que estén sometidas a tratamientos con medicamentos consulten con su médico la oportunidad o conveniencia de consumir complementos alimenticios dada la posibilidad de que existan interferencias en algunos casos. Además, en el caso de los complementos alimenticios con acción antioxidante, debe tenerse en cuenta que en ciertas condiciones y a dosis elevadas estos compuestos pueden comportarse como prooxidantes.

Palabras clave

Complementos alimenticios, betaína, fitosteroles, lactasa, melatonina, metilsulfonilmetano, compuestos fenólicos.

Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Consumer Affairs, Food Safety and Nutrition (AECOSAN) on the conditions of use of certain substances to be used in food supplements-3.

Abstract

Food supplements are foods, the purpose of which is to supplement the normal diet and which consist of concentrated nutrient sources (vitamins and minerals) or other substances with a nutritional or physiological effect, alone or in combination. The supplements are marketed in dosage form and are only supplied to the end consumer prepacked. In no event should they replace the use of medicines without suitable medical supervision. They should only be used to supplement the diet and, on the whole, their usage is not required if the individual has a varied and balanced diet, which cannot be replaced.

In Spain, food supplements are regulated by Royal Decree 1487/2009, which transposed Directive 2002/46/EC on the approximation of the laws of the Member States relating to food supplements into Spanish law. However, only the use of vitamins and minerals is currently regulated. Therefore the Scientific Committee has been asked to make an assessment of the proposal to authorise certain substances other than vitamins and minerals in the manufacture of food supplements.

The six substances proposed by the Spanish Agency for Consumer Affairs, Food Safety and Nutrition (AECOSAN) are betaine hydrochloride, phytosterols, lactase, melatonin, methylsulphonylmethane and polyphenols from olive oil, olive leaves and olives.

The Scientific Committee has assessed each proposal, analysing the characteristics and sources of each substance, and the nutrition, metabolism and safety and has concluded, in each case, whether that submitted by the AECOSAN is acceptable from a safety viewpoint for use as a food supplement. In no event is the assessment intended as a guarantee of the biological efficiency of the substances and the estimated doses.

The Scientific Committee states that, in any case individuals undergoing medical treatment must seek medical advice as to the suitability of taking food supplements, given the possibility of interactions in certain cases. In addition, in the case of food supplements with an antioxidant effect, it should be noted that in certain conditions and at high doses, these compounds may behave as pro-oxidants.

Key words

Food supplements, betaine, phytosterols, lactase, melatonin, methylsulphonylmethane, phenolic compounds.

1. Introducción

La Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) ha elaborado una nueva propuesta de autorización de determinadas sustancias distintas de vitaminas y minerales para ser utilizadas en la fabricación de complementos alimenticios y sus correspondientes cantidades máximas diarias de cara a su inclusión en un nuevo anexo III del Real Decreto 1487/2009 (BOE, 2009). En este sentido, la Dirección Ejecutiva de la AECOSAN ha solicitado al Comité Científico que realice, tal como ha hecho en ocasiones anteriores, una valoración de la propuesta de autorización de la utilización de determinadas sustancias en la fabricación de complementos alimenticios tanto en lo referido a las cantidades máximas diarias propuestas como en cuanto a la pertinencia de su autorización.

De acuerdo con lo ya indicado en informes anteriores, los complementos alimenticios son alimentos cuyo fin es complementar la dieta normal y que consisten en fuentes concentradas de nutrientes (vitaminas y minerales) o de otras sustancias que tienen un efecto nutricional o fisiológico, en forma simple o combinada. Los complementos se comercializan en forma dosificable en cápsulas, pastillas, tabletas, píldoras, bolsas con polvo, ampollas de líquido, botellas con cuentagotas y otras formas similares de líquidos y polvos que deben tomarse en pequeñas cantidades unitarias.

Como alimentos, están sometidos a la legislación aplicable al resto de productos alimenticios tales como el Reglamento (CE) N° 178/2002 (UE, 2002a) que fija procedimientos que influyen en la seguridad alimentaria, el Reglamento (CE) N° 1924/2006 (UE, 2006a) sobre declaraciones de propiedades nutricionales y saludables y el Reglamento (CE) N° 258/1997 (UE, 1997) sobre nuevos alimentos. No requieren una autorización previa para su comercialización sino una notificación de puesta en el mercado, aunque en algunos Estados miembros de la Unión Europea como Austria, Holanda, Suecia o el Reino Unido la notificación no es obligatoria (FVO, 2011).

El Real Decreto 1487/2009, de 26 de septiembre, relativo a los complementos alimenticios traspuso a la legislación española la Directiva 2002/46/CE (UE, 2002b) relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de complementos alimenticios y estableció, entre otras cuestiones, los requisitos para la comercialización de complementos alimenticios, incluyendo su etiquetado, presentación y publicidad. Asimismo, determina en su anexo I las vitaminas y minerales que pueden utilizarse en la fabricación de los complementos alimenticios, especificando en su anexo II las sustancias o sales que pueden utilizarse como fuentes de vitaminas y minerales para que dichos nutrientes estén disponibles para el organismo.

Con respecto a las sustancias distintas de vitaminas y minerales, en el preámbulo del Real Decreto 1487/2009 se establece que hasta que no se fijen en la Unión Europea niveles máximos de nutrientes u otras sustancias con efecto nutricional o fisiológico, a efectos de los complementos alimenticios, se tendrán en cuenta los informes pertinentes del Comité Científico de la Alimentación Humana (SCF) y de otros organismos internacionales de reconocida solvencia científica.

Además, en el preámbulo de la Directiva 2002/46/CE, se indica que en la fabricación de los complementos alimenticios pueden emplearse las sustancias que hayan sido aprobadas por el Comité Científico de la Alimentación Humana, sobre la base de los criterios mencionados, para su utilización en la fabricación de alimentos destinados a lactantes y a niños de corta edad y otros alimentos para usos nutricionales particulares.

A este respecto, el Reglamento (CE) N° 953/2009 (UE, 2009) establece las sustancias que pueden añadirse para fines de nutrición específicos en alimentos destinados a una alimentación especial y la Directiva 2006/141/CE (UE, 2006b) relativa a los preparados para lactantes y preparados de continuación y su transposición en España a través del Real Decreto 867/2008 (BOE, 2008) regula la inclusión de determinadas sustancias en la composición básica de los preparados para lactantes.

Actualmente, el Real Decreto 1487/2009 sólo contempla vitaminas y minerales entre las sustancias autorizadas para la fabricación de los complementos alimenticios en España. Sin embargo, en él se indica que pueden regularse en una fase posterior, y una vez que se disponga de datos científicos adecuados, las normas específicas relativas a otros nutrientes e ingredientes utilizados en los complementos alimenticios tales como aminoácidos o ácidos grasos esenciales.

Por el momento, la Comisión Europea no tiene previsto regular la utilización de otras sustancias distintas de vitaminas y minerales en los complementos alimenticios por lo que algunos Estados miembros, entre los que se encuentran Bélgica, Dinamarca o Italia, aplican disposiciones anteriores a la Directiva 2002/46/CE o han elaborado disposiciones nacionales con posterioridad. También existen informes de evaluación de la seguridad de determinadas sustancias elaborados por organismos evaluadores nacionales, como es el caso de Francia, o de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA).

Por otra parte, la aprobación de una declaración de propiedades saludables para una determinada sustancia en el marco del Reglamento (CE) N° 1924/2006 no supone un aval de su seguridad puesto que EFSA únicamente valora la relación causa efecto entre la ingesta de una determinada cantidad de una sustancia y el efecto que se pretende alegar. Por ello, la autorización de una declaración de propiedades saludables no implica que se haya evaluado su seguridad y, tal como se indica en el Reglamento por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños (artículo 13.1), esta autorización de una declaración no constituye una autorización de comercialización de la sustancia a la que concierne la declaración, ni una decisión sobre la posibilidad de utilizar la sustancia en productos alimenticios ni la clasificación de un determinado producto como alimento (UE, 2012).

Actualmente, en España es posible comercializar complementos alimenticios que contengan sustancias autorizadas en otros Estados miembros por el principio de reconocimiento mutuo en la Unión Europea, que garantiza la libre circulación de mercancías y servicios sin que sea necesario armonizar las legislaciones nacionales de los Estados miembros. Así pues, la venta de un producto fabricado legalmente en un Estado miembro no puede estar prohibida en otro Estado miembro, aunque las condiciones técnicas o cualitativas difieran de las impuestas a los propios productos. La única excepción se produce en casos de interés general tales como la protección de la salud, los consumidores o el medio ambiente y es el caso de los complementos alimenticios que son considerados medicamentos por la autoridad competente de un Estado miembro y que, por tanto, no pueden ser comercializados como complemento alimenticio aunque tengan esa consideración en otro Estado miembro.

La falta de regulación relativa a la fabricación en España de complementos alimenticios que contengan sustancias distintas de vitaminas y minerales impide su fabricación a nivel nacional, pero no su comercialización a través de la autorización obtenida en otro Estado miembro y el correspondiente reconocimiento mutuo. Ello supone, además de una desventaja competitiva para las empresas españolas, que no se

cuenta con un instrumento legal que facilite que, en caso de discrepancia con la regulación de otro Estado miembro, se pueda proteger al consumidor utilizando un instrumento legal apropiado.

Referencias

- BOE (2008). Real Decreto 867/2008, de 23 de mayo, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria específica de los preparados para lactantes y de los preparados de continuación. BOE 131 de 30 de mayo de 2008, pp: 25121-25137.
- BOE (2009). Real Decreto 1487/2009, de 26 de septiembre, relativo a los complementos alimenticios. BOE 244 de 9 de octubre de 2009, pp: 85370-85378.
- FVO (2011). Food and Veterinary Office. Report on a desk study on official controls in the field of food supplements. Health & Consumer Directorate-General. European Commission.
- UE (1997). Reglamento (CE) N° 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de enero de 1997, sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios. DO L 43 de 14 de febrero de 1997, pp: 1-10.
- UE (2002a). Reglamento (CE) N° 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. DO L 31 de 1 de febrero de 2002, pp: 1-24.
- UE (2002b). Directiva 2002/46/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 10 de junio de 2002, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de complementos alimenticios. DO L 183 de 12 de julio de 2002, pp: 51-57.
- UE (2006a). Reglamento (CE) N° 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre de 2006, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos. DO L 404 de 30 de diciembre de 2006, pp: 9-25.
- UE (2006b). Directiva 2006/141/CE de la Comisión, de 22 de diciembre de 2006, relativa a los preparados para lactantes y preparados de continuación y por la que se modifica la Directiva 1999/21/CE. DO L 401 de 30 de diciembre de 2006, pp: 1-33.
- UE (2009). Reglamento (CE) N° 953/2009 de la Comisión, de 13 de octubre de 2009, sobre sustancias que pueden añadirse para fines de nutrición específicos en alimentos destinados a una alimentación especial. DO L 269 de 14 de octubre de 2009, pp: 9-19.
- UE (2012). Reglamento (UE) N° 432/2012 de la Comisión, de 16 de mayo de 2012, por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños. DO L 136 de 25 de mayo de 2012, pp: 1-40.

2. Propuesta

La AECOSAN ha elaborado la siguiente propuesta respecto a sustancias distintas de vitaminas y minerales que podrían ser autorizadas para su utilización en la fabricación de complementos alimenticios (Tabla 1).

Tabla 1. Sustancias y cantidades máximas propuestas por la AECOSAN para su utilización en la fabricación de complementos alimenticios

Sustancia propuesta	Cantidad máxima diaria propuesta
Clorhidrato de betaina	1,5 g
Fitosteroles	3 g
Lactasa	4 500 unidades FCC mínima
Melatonina	1 mg
Metilsulfonilmetano	1 g
Polifenoles del aceite de oliva y de las hojas y frutos del olivo	5 mg

3. Evaluación de las propuestas

3.1 Consideraciones generales

En los complementos alimenticios, como en el resto de los alimentos, no se pueden realizar ninguna declaración de propiedades nutricionales y/o saludables que no esté aprobada conforme al Reglamento (CE) N° 1924/2006.

La valoración que realiza EFSA en el marco del Reglamento (CE) N° 1924/2006 se centra únicamente en el estudio de la relación causa-efecto entre la ingesta de una determinada sustancia y el efecto que se pretende alegar (eficacia y dosis a las que se produce el efecto) y en ningún caso supone una aprobación de dicha sustancia para su uso en el ámbito alimentario ni una evaluación de su seguridad.

Por todo esto, la solicitud de informe realizada al Comité Científico respecto a las sustancias a incluir en un nuevo anexo III sobre otras sustancias que pueden utilizarse en la fabricación de complementos alimenticios (Real Decreto 1487/2009), se limita a su seguridad a las dosis propuestas para ser utilizadas en la fabricación de complementos alimenticios, dado que la eficacia de las mismas se valora y regula a nivel europeo en el ámbito del Reglamento (CE) N° 1924/2006.

Los complementos alimenticios tienen la finalidad de complementar la dieta normal y suponen un aporte adicional de vitaminas, minerales u otras sustancias con efecto nutricional o fisiológico. La aportación de una cantidad concentrada de nutrientes u otras sustancias puede suponer un riesgo de exceso de su ingesta por parte de la población que los consume. Además, en el caso de mujeres embarazadas o lactantes, niños, ancianos y enfermos, el uso de complementos alimenticios sólo debe realizarse si existen razones que lo justifiquen y bajo control médico, ya que la evaluación de la seguridad de su uso se refiere a adultos con una situación fisiológica normal.

En ningún caso deben sustituir al uso de medicamentos sin una supervisión médica adecuada. Sólo deben utilizarse para complementar la dieta y, de forma general, su uso no es necesario si se sigue una dieta variada y equilibrada, a la que no pueden reemplazar.

En el caso de los complementos alimenticios con acción antioxidante, debe tenerse en cuenta que en ciertas condiciones como son: consumo de dosis elevadas, cambios en el pH o la presencia de determinadas sustancias, estos compuestos pueden comportarse como prooxidantes.

En todo caso es necesario que las personas que estén sometidas a tratamientos con medicamentos consulten con su médico la oportunidad o conveniencia de consumir complementos alimenticios dada la posibilidad de que existan, en algunos casos, interferencias o efectos no deseables.

Para la elaboración de este informe se han tenido en cuenta informes elaborados por otras agencias y otros trabajos publicados posteriormente o que se refieren a datos existentes en España. Es posible que las conclusiones que se exponen deban ser revisadas en el futuro a la luz de nuevas evidencias científicas.

4. Clorhidrato de Betaina

4.1 Propuesta

La AECOSAN ha propuesto una cantidad máxima diaria para el clorhidrato de betaina de 1,5 g.

Esta propuesta se basa en la autorización de una declaración de propiedad saludable en relación a que la betaina contribuye al metabolismo normal de la homocisteína. Esta declaración solo puede utilizarse con alimentos que contengan un mínimo de 500 mg de betaina por porción cuantificada. Para que un producto pueda llevar esta declaración, se informará al consumidor de que el efecto beneficioso se obtiene con una ingesta diaria de 1,5 g de betaina (UE, 2012).

En Italia la betaina está autorizada en complementos alimenticios en una cantidad máxima diaria de 1,5 g (Italia, 2013). En Bélgica el clorhidrato de trimetilglicina está autorizado en complementos alimenticios (Bélgica, 2013).

4.2 Características y fuentes

La trimetilglicina o (carboximetil) trimetialamonio es un compuesto natural conocido como betaina, que está presente en multitud de organismos donde cumple diferentes funciones fisiológicas, especialmente como agente metilante o modificando la ósmosis (Craig, 2004). El hombre la obtiene a través de la dieta u oxidando la colina fisiológica que se transforma en betaina. En los mamíferos, la betaina cumple dos funciones principales: su función como osmolito ya comentada, que permite regular el volumen de la célula, y su función como donante de metilos, fundamentalmente para la remetilación de homocisteína a metionina, transformándose en N,N-dimetilglicina (Lever y Slow, 2010). La función como osmolito de betaina significa que las concentraciones tisulares son mayores que las plasmáticas, especialmente en la médula renal donde la concentración puede ser superior a 100 mM. Además, cumple un efecto compensatorio y modulador, que permite mejorar la estabilidad de las proteínas, siendo particularmente efectivo al contrarrestar el efecto desnaturalizante de la urea, función importante en la función de la médula renal (Lever y Slow, 2010).

La deficiencia de betaina en el organismo se ha asociado con diferentes patologías o alteraciones fisiológicas, como el síndrome metabólico, dislipemias y diabetes. Por tanto, se considera que la betaina es importante en el desarrollo del hombre, desde el embrión a la infancia. Aunque se han hecho estudios con suplementación de betaina en animales como ergogénico en deportistas, no se conocen los efectos de la suplementación a largo plazo en humanos.

4.3 Nutrición y metabolismo

El consumo medio de betaína procedente de alimentos no enriquecidos está alrededor de los 145 mg/día en adultos y 100 mg/día en niños, siendo los consumos máximos de 439 y 317 mg/día para adultos y niños, respectivamente (AFSSA, 2008). La absorción de la betaína en el duodeno y su distribución son rápidas, alcanzando picos máximos plasmáticos de 20-70 μM a las 1-2 h (Craig, 2004). Es posible determinar la posible necesidad de betaína del organismo, ya que la pérdida excesiva por orina puede ser detectada en pruebas de laboratorio. Las concentraciones plasmáticas son variables en función del propio individuo, siendo de 20-60 mol/l en mujer y 25-75 mol/l en hombre. La eliminación urinaria sin metabolizar es mínima, incluso en personas que reciben altas dosis del compuesto. Sí aparece el metabolito dimetilglicina a concentraciones inferiores a 10 mol/l (Lever y Slow, 2010). El principal mecanismo de eliminación es el catabolismo vía reacción de transmetilación en el ciclo de la metionina, proceso mitocondrial realizado principalmente en hígado y riñón (Shwahn et al., 2003) (Craig, 2004).

La función como agente metilante de homocisteína es realizada por la betaína-homocisteína metiltransferasa (BHMT), enzima que es osmoregulada por los osmolitos presentes, incluyendo la propia betaína. Por ello, estas dos funciones no se pueden considerar aisladas, ya que actividad enzimática disminuye cuando la concentración del osmolito decrece (Lever y Slow, 2010). Elevados niveles de homocisteína han sido relacionados con alto riesgo de enfermedad cardiovascular (Rajaie y Esmailzadeh, 2011). Puesto que la metionina es un aminoácido de vital importancia fisiológica, la conversión de homocisteína a metionina es muy importante para la regulación de este aminoácido, además la generación hepática de S-adenosilmetionina producida por betaína en hígado se ha relacionado con la detoxificación del organismo (Craig, 2004) (Kharbanda, 2009).

El Reglamento (UE) N° 432/2012 que establece la lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños, autoriza una declaración para la betaína respecto a que contribuye al metabolismo normal de la homocisteína, especificando que esta declaración solo puede utilizarse con alimentos que contengan un mínimo de 500 mg de betaína por porción cuantificada. Para que un producto pueda llevar esta declaración, se informará al consumidor de que el efecto beneficioso se obtiene con una ingesta diaria de 1,5 g de betaína, y que una ingesta diaria superior a 4 g puede aumentar considerablemente los niveles de colesterol sanguíneo (UE, 2012).

4.4 Seguridad

En estudios de toxicidad subcrónica realizados en rata durante 90 días, con regímenes de 0, 1, 2 y 5 % de betaína, correspondientes a 0, 800, 1 600 y 4 000 mg/kg/día en ratas macho y 0, 900, 1 800 y 4 400 mg/kg/día en ratas hembra se ha observado que en todos los casos hubo hepatomegalia y daño microvascular en las ratas tratadas con betaína, aunque el efecto fue reversible y desaparece tras la eliminación de la suplementación (EFSA, 2005a). También se observó la reducción del volumen corpuscular medio en hematíes y disminución de concentración de hemoglobina, así como una nefromegalia en el grupo que consumió la dosis más elevada de betaína (5 %), por lo que no se pudo determinar la inocuidad del suplemento a ninguna de las dosis estudiadas (AFSSA, 2008). Sin embargo, en otros estudios de toxicidad subaguda y subcrónica citan la posible inocuidad a esas

mismas dosis estudiadas, aunque se observaron también modificaciones del volumen corpuscular medio (Hayes et al., 2003).

Los ensayos realizados con humanos se han centrado en determinar el posible daño hepático y renal, ya que el metabolismo en estos órganos es básico para la eliminación de betaína en el organismo. En los ensayos clínicos se han comprobado las funciones hepáticas y renales en diferentes condiciones, así como los efectos sobre el metabolismo lipídico, variando los protocolos de 2 a 20 g/día, con periodos de duración comprendidos entre 18 semanas y 13 años, si bien en todos los casos el número de pacientes ha sido relativamente reducido. En los estudios realizados con 4 g/día (McGregor et al., 2002) y de 6 g/día (Schwab et al., 2002), ambos de 3 meses de duración, se observó un incremento de colesterol-total y colesterol-LDL respectivamente del 7 y 10 % (4 g/día) y del 12 y 23 % (6 g/día). Un metaanálisis posterior confirmó este incremento, demostrándose que la suplementación con betaína (6 g/día) provoca el incremento plasmático de triglicéridos (13 %) y colesterol-LDL (10 %), posiblemente provocado por el incremento de la síntesis de fosfatidilcolina, favoreciendo la producción hepática de VLDL (Olthof et al., 2005). Debido a estos datos, se llega a la conclusión de que una ingesta diaria superior a 4 g de betaína puede aumentar considerablemente los niveles de colesterol sanguíneo (EFSA, 2011) (UE, 2012).

En 2008, la Agencia francesa AFSSA (*Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments*) emitió una opinión desfavorable al uso de betaína en complementos alimenticios debido a que no se podía garantizar la seguridad del consumidor con una dosis de 250 mg/día. Las razones aportadas fueron que no podía descartarse un riesgo de daños hepáticos, a la vista de los datos y de la falta de determinación de un NOAEL (nivel sin efecto adverso observable) en los animales; al riesgo de aumento del colesterol y colesterol-LDL plasmático en humanos y a la falta de evaluación del riesgo potencial de la deficiencia de metionina (AFSSA, 2008).

Aunque algunas fuentes de betaína, como son su forma anhidra y el monohidrato recibieron un informe negativo en su evaluación conforme al Reglamento (CE) N° 258/1997 (UE, 2005), el solicitante acreditó que, en forma de clorhidrato, la betaína se comercializa desde 1982 en el mercado europeo de complementos alimenticios y en los Estados Unidos desde la década de los años 60 del siglo XX.

4.5 Conclusión

Los estudios de toxicidad subcrónica realizados en rata durante 90 días no han permitido establecer un NOAEL y, además, en ensayos clínicos con humanos se han observado efectos negativos sobre el perfil lipídico causados por cantidades diarias de betaína algo superiores a la propuesta. Por ello, el Comité Científico concluye que, en función de la información disponible en la actualidad y teniendo en cuenta las consideraciones generales reflejadas en el presente informe, no existe actualmente información suficiente para avalar la seguridad de la propuesta de la AECOSAN de una cantidad máxima diaria de clorhidrato de betaína de 1,5 g en complementos alimenticios.

Referencias

AFSSA (2008). *Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments*. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments sur un Project d'arrêté relatif à l'emploi de substances à but nutritionnel ou physiologique et des plantes et préparations de plantes dans la fabrication de compléments alimentaires. Afssa. Saisine N° 2007-SA-0231.

- Bélgica (2013). Novel foods. Indicative list of plants/plant parts/substances and their novel food status (non-exhaustive list). Substances not novel food supplements. Federal Public Service (FPS) Health, Food Chain Safety and Environment. Disponible en: <http://www.health.belgium.be/eportal/foodsafety/foodstuffs/novelfoods/index.htm> [acceso: 4-12-13].
- Craig, S.A. (2004). Betaine in human nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 80 (3), pp: 539-549.
- EFSA (2005a). European Food Safety Authority. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to an application concerning the use of betaine as a novel food in the EU. *The EFSA Journal*, 191, pp: 1-17.
- EFSA (2011). European Food Safety Authority. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to betaine and contribution to normal homocysteine metabolism (ID 4325) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *The EFSA Journal*, 9 (4): 2052, pp: 1-14.
- Hayes, K.C., Pronczuk, A., Cook, M.W. y Robbins, M.C. (2003). Betaine in sub-acute and sub-chronic rat studies. *Food and Chemical Toxicology*, 41 (12), pp: 1685-1700.
- Italia (2013). Elenco sostanze ad effetto nutritivo o fisiologico impiegabili negli integratori alimentari. Disponible en: http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pagineAree_1268_listaFile_itemName_4_file.pdf [acceso: 4-12-13].
- Kharbanda, K.K. (2009). Alcoholic liver disease and methionine metabolism. *Seminars in Liver Disease*, 29 (2), pp: 155-165.
- Lever, M. y Slow, S. (2010). The clinical significance of betaine, an osmolyte with a key role in methyl group metabolism. *Clinical Biochemistry*, 43 (9), pp: 732-744.
- McGregor, D.O., Dellow, W.J., Robson, R.A., Lever, M., George, P.M. y Chambers, S.T. (2002). Betaine supplementation decreases post-methionine hyperhomocysteinemia in chronic renal failure. *Kidney International*, 61 (3), pp: 1040-1046.
- Olthof, M.R., van Vliet, T., Verhoef, P., Zock, P.L. y Katan, M.B. (2005). Effect of homocysteine-lowering nutrients on blood lipids: results from four randomised, placebo-controlled studies in healthy humans. *PLoS Medicine*, 2 (5), pp: e135.
- Rajaie, S. y Esmailzadeh, A. (2011). Dietary choline and betaine intakes and risk of cardiovascular diseases: review of epidemiological evidence. *ARYA Atherosclerosis*, 7 (2), pp: 78-86.
- Schwab, U., Torronen, A., Toppinen, L., Alfthan, G., Saarinen, M., Aro, A. y Uusitupa, M. (2002). Betaine supplementation decreases plasma homocysteine concentrations but does not affect body weight, body composition, or resting energy expenditure in human subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76, pp: 961-967.
- Schwahn, B.C., Hafner, D., Hohlfeld, T., Balkenhol, N., Laryea, M.D. y Wendel, U. (2003) Pharmacokinetics of oral betaine in healthy subjects and patients with homocystinuria. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 55 (1), pp: 6-13.
- UE (2005). Decisión 2005/580/CE de la Comisión, de 25 de Julio de 2005, por la que se deniega la autorización de comercialización de la betaina como nuevo alimento o nuevo ingrediente alimentario con arreglo al Reglamento (CE) N° 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo. DO L 199 de 25 de julio de 2005, pp: 89.
- UE (2012). Reglamento (UE) N° 432/2012 de la Comisión, de 16 de mayo de 2012, por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños. DO L 136 de 25 de mayo de 2012, pp: 1-40.

5. Fitosteroles

5.1 Propuesta

La AECOSAN ha propuesto una cantidad máxima diaria para los fitosteroles de 3 g.

Esta propuesta se basa en que el Reglamento (CE) N° 608/2004 relativo al etiquetado de alimentos e ingredientes alimentarios con fitosteroles, ésteres de fitosterol, fitostanoles o ésteres de fitostanol añadidos establece que en el etiquetado se debe indicar que debe evitarse un consumo superior a 3 g/día de esteroides o estanoles vegetales añadidos (UE, 2004).

En Italia los fitosteroles están autorizados en complementos alimenticios en una cantidad máxima diaria de 3 g (Italia, 2013).

5.2 Características y fuentes

Los fitosteroles o esteroides vegetales y sus formas reducidas, los fitostanoles o estanoles vegetales, son esteroides de origen vegetal, miembros de la familia de los triterpenos, y cuya estructura y función es muy similar a la del colesterol presente en animales (Moreau et al., 2002).

El término fitosteroles hace referencia a más de 250 compuestos diferentes. Todos ellos tienen un núcleo esteroide, un grupo hidroxilo en el carbono 3 y un doble enlace localizado mayoritariamente entre los átomos de carbono 5 y 6 en el anillo B. Las principales diferencias se encuentran en la cadena lateral alquilo, que puede variar por la ausencia o presencia de un grupo metilo o etilo en el C24, la saturación y la posición de un doble enlace, y la geometría de la sustitución en el C24. Los estanoles vegetales son las formas saturadas de esteroides vegetales, que carecen de los dobles enlaces en el núcleo esteroide y en la cadena lateral alquilo (Piironen et al., 2000).

Los esteroides vegetales más abundantes en la dieta humana son el beta-sitosterol (con un aporte del 56-79 %), el campesterol (18 %), el estigmasterol (9 %) y el brasicasterol. El beta-sitostanol y el campestanol, que corresponden a las formas saturadas del beta-sitosterol y el campesterol, son los principales estanoles, aunque se encuentran en menores cantidades que los esteroides (Figura 1).

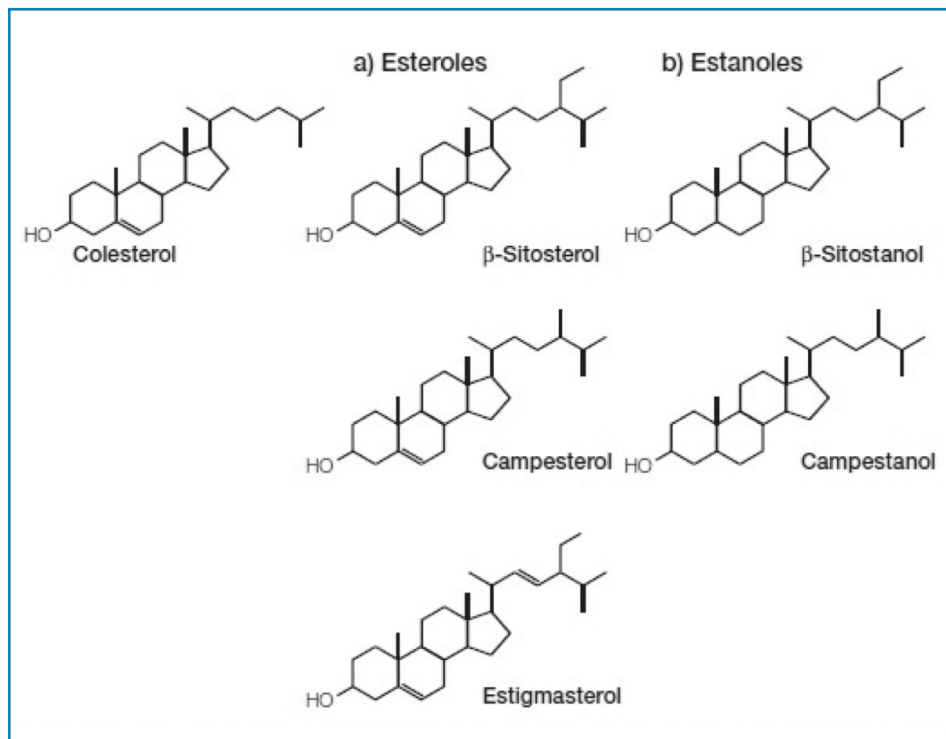


Figura 1. Estructura del colesterol y de algunos esteroides y estanoles vegetales más comunes. **Fuente:** (Palou et al., 2005).

En la naturaleza, además de en la forma libre, los esteroides vegetales pueden aparecer como compuestos conjugados, en los cuales el grupo hidroxilo en posición 3 del anillo A del esteroide está esterificado por un ácido graso, ácido ferúlico, o bien está glicosilado (Moreau et al., 2002). Los ésteres con ácidos grasos están presentes en la mayoría de las plantas y constituyen cerca del 50 % del total de esteroides vegetales en algunos alimentos, como el aceite de maíz. Por su parte, los ésteres de ferulato también aparecen en cantidades apreciables en muchos alimentos, mientras que los esteroides vegetales glicosilados son un componente minoritario en los alimentos vegetales, salvo algunas excepciones, ya que constituyen el 82 % del total de esteroides vegetales de las patatas (Palou et al., 2005).

5.2.1 Fuentes

En general, los aceites vegetales y productos derivados, como la margarina, son considerados como las fuentes naturales más ricas en esteroides (Piironen et al., 2000). Los aceites vegetales, como los de maíz, girasol, soja, colza y oliva contienen entre un 0,15 y 1,5 % de fitosteroides. Estas concentraciones disminuyen en el aceite refinado. Otros alimentos que contribuyen a la diaria ingesta de esteroides vegetales son los granos de cereales y productos a base de cereales, frutos secos, legumbres, y en menor proporción las verduras y frutas. Los estanoles también se encuentran en algunos alimentos como el centeno, el maíz y

el trigo, y en aceites vegetales no hidrogenados. En las dietas occidentales la ingesta diaria de esteroides vegetales se estima en unos 150-400 mg (aproximadamente la misma que la ingesta de colesterol), siendo mayor en algunas dietas vegetarianas y en la dieta japonesa, en las cuales puede llegar a 300-500 mg/día. La ingesta diaria de estanoles es del orden de 25 mg (Ling y Jones, 1995).

5.3 Nutrición y metabolismo

Tanto los fitosteroides como los fitostanoles han cobrado en los últimos años un gran interés desde el punto de vista nutricional, ya que la similitud estructural con el colesterol les da la capacidad de disminuir la absorción de este compuesto, disminuyendo así su concentración plasmática total y el ligado a LDL (Quilez et al., 2003) (Palou et al., 2005).

A pesar de que su estructura química es semejante a la del colesterol, la absorción de los fitosteroides y fitostanoles ingeridos es mucho menor que la del colesterol. Mientras que el grado de absorción del colesterol es del 40-60 %, el de los fitosteroides es del orden de 0,4-3,5 %, y aun menor para los fitostanoles (0,02-0,3 %), aunque depende del tipo concreto de esteroide (Ostlund et al., 2002). Parece ser que la absorción no se incrementa linealmente cuando la dosis de fitosteroides se incrementa, indicando que se trata de un proceso saturable (Ostlund et al., 2002). La absorción de fitosteroides en las mujeres se ha descrito que es un poco más alta que en los hombres (Tilvis y Miettinen, 1986) y mayor en los niños que en los adultos (Mellies et al., 1976).

Los fitosteroides son absorbidos por las células absorbentes del intestino en forma de micelas mixtas, que contienen típicamente mezclas de colesterol libre, mono y diglicéridos, ácidos grasos, fosfolípidos y ácidos biliares. Los ésteres de fitosteroides, al igual que el colesterol esterificado necesitan ser hidrolizados por la enzima colesterol esterasa pancreática para poder ser absorbidos. La baja absorción de fitosteroides en comparación con la del colesterol se explica, en parte, por su eflujo desde las células intestinales hacia el lumen del intestino a través de los transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) G5 y G8 (Berge et al., 2000).

Los fitosteroides absorbidos son transportados por los quilomicrones y las VLDL, captados por el hígado y luego excretados en la bilis. Los fitosteroides circulantes son transportados en la sangre principalmente en las fracciones de LDL y HDL. Los tejidos con receptores de LDL como el hígado, las glándulas suprarrenales y los testículos pueden captar los fitosteroides y convertirlos en hormonas esteroideas (Ikeda y Sugano, 1978). Ya que su concentración en estos tejidos es mucho menor que la del colesterol, parece ser que no contribuyen significativamente a la síntesis de hormonas (SCF, 2000). El sitosterol y campesterol no absorbidos se convierten por la microflora del colon humano en sitostanol/estigmasteno y campestanol/campestenona, respectivamente (Wilkins y Hackman, 1974).

Se ha descrito que, en adultos sanos, después de la ingesta de 8,6 g/día de fitosteroides, las concentraciones fecales de esteroides y metabolitos de esteroides aumentan aproximadamente de 40 a 190 mg/g de peso seco y de 30 a 50 mg/g de peso seco, respectivamente (SCF, 2000). Los principales metabolitos de esteroides excretados son metabolitos saturados en la posición 5,6 en configuración β o metabolitos formados por la oxidación en la posición 3. La concentración fecal de 4-colesten-3-ona incrementa ligeramente, aunque de manera significativa (alrededor de 2 mg/g). La concentración fecal de ácidos biliares secundarios se ve reducida. No puede excluirse la formación de pequeñas cantidades de oxisteroides, pero se ha considerado que es poco probable (SCF, 2000).

5.3.1 Efectos de los esteroides y estanoles vegetales sobre la absorción intestinal de colesterol

Los fitosteroides y fitostanoles tienen la capacidad de inhibir la absorción intestinal de colesterol, tanto el procedente de la dieta (unos 300 mg/día) como el colesterol endógeno recirculante procedente de la bilis (unos 1 000 mg/día). Esto resulta en una disminución del colesterol total en suero y del colesterol-LDL (Ling y Jones, 1995) (Moreau et al., 2002), incluso en aquellas personas que ya están en una dieta baja en colesterol (Moreau et al., 2002). Los niveles de colesterol-HDL, por lo general, no se reducen con el consumo de fitosteroides dietéticos. Como consecuencia, se incrementa la excreción fecal de colesterol y sus productos de degradación intestinal. Diversos estudios en humanos han medido el efecto de la ingesta de esteroides vegetales en la dieta sobre la absorción intestinal de colesterol (Katan et al., 2003) (Demonty et al., 2009). En general, los estudios realizados ponen de manifiesto que una ingesta de 2 g/día de fitosteroides reduce la absorción de colesterol en un 30-40 %, lo que conduce a una reducción del colesterol-LDL de un 10 % (Katan et al., 2003). Por ello, se considera que podrían ser útiles para prevenir las enfermedades cardiovasculares, aunque no existen ensayos clínicos al respecto que lo evidencien. Se ha estimado que el consumo de 2 g/día de esteroides o estanoles puede reducir el riesgo de enfermedad coronaria en un 25 % (Law, 2000). Otros autores también han estimado que el consumo de 3 g/día de esteroides o estanoles podría reducir el riesgo de enfermedad cardíaca en un 15-40 %, dependiendo de la edad y otros factores de la dieta (Weststrate y Meijer, 1998). Este efecto se considera más significativo a efectos hipocolesterolemicos que la reducción de la ingesta de grasa saturada.

EFSA ha aprobado las correspondientes declaraciones de propiedades saludables referentes a los efectos de los esteroides (EFSA, 2008a) y estanoles vegetales (EFSA, 2008b) en matrices alimentarias concretas sobre la reducción del colesterol en sangre, con la mención de que el descenso del colesterol en sangre puede reducir el riesgo de enfermedad coronaria. En el caso de los esteroides vegetales, el Panel científico ha concluido que una ingesta diaria de 2-2,4 g de fitosteroides en un alimento apropiado (por ejemplo, esteroides vegetales añadidos a los alimentos a base de grasa y alimentos bajos en grasa, como leche y yogur) puede producir un descenso clínicamente significativo del colesterol-LDL de alrededor del 9 % (EFSA, 2008a). También ha indicado que el efecto sobre la disminución del colesterol puede diferir en otras matrices de alimentos. Asimismo, recomienda que los productos a los que se añaden estos compuestos sean consumidos sólo por las personas que desean reducir su colesterol en la sangre.

Respecto del efecto de los esteroides vegetales en comparación con los estanoles vegetales, la opinión científica emitida por el Panel de Productos Dietéticos, Nutrición y Alergias (*Dietetic Products, Nutrition and Allergies-NDA Panel*) de EFSA es que ingestas de esteroides vegetales y ésteres de estanol en el rango de 1,5 a 3,0 g en matrices concretas (grasas amarillas para untar, productos lácteos, mayonesa y aderezos para ensaladas) tienen una eficacia similar en la reducción de colesterol-LDL en la sangre (EFSA, 2012). En dicha opinión también se concluye que una ingesta diaria de esteroides vegetales y ésteres de estanol de 3 g (rango de 2,6 a 3,4 g) en las matrices mencionadas reduce el colesterol-LDL en un 11,3 % (IC 95 %: 10,0-12,5).

El mecanismo exacto por el cual los fitosteroides disminuyen la concentración circulante de colesterol no está totalmente esclarecido, pero se han propuesto varias teorías. Se ha considerado que el principal mecanismo es el desplazamiento del colesterol de las micelas mixtas de sales biliares y fosfolípidos, que son necesarias para que el colesterol sea absorbido. Es decir, los esteroides vegetales, al ser más hidro-

fóbicos, presentan una mayor afinidad por las micelas que la que tiene el colesterol y, en consecuencia los desplazan de las micelas mixtas. La capacidad de las micelas mixtas para incorporar esteroides es limitada, por tanto la competencia entre los fitosteroides y el colesterol reduce el contenido de colesterol de las micelas y por lo tanto disminuye su transporte hacia la membrana del borde en cepillo intestinal (Mel'nikov et al., 2004). Fuera de la fase micelar, el colesterol ya no es soluble y puede formar cocristales con los fitosteroides y es entonces excretado junto con los fitosteroides no absorbidos. Esto se traduce en una disminución de la absorción intestinal de colesterol y una mayor excreción fecal de colesterol y sus metabolitos. Este mecanismo, si fuera el único responsable, implicaría que los esteroides vegetales se deben consumir en cada comida que contiene colesterol para lograr la máxima eficacia. El hecho de que los esteroides vegetales también disminuyen de manera efectiva el colesterol cuando se consume una vez al día sugiere que la menor incorporación de colesterol en micelas mixtas no es el único mecanismo implicado (Plat y Mensink, 2005). También se ha propuesto que los esteroides vegetales podrían reducir la tasa de esterificación del colesterol en el enterocito, al afectar a la actividad de la enzima responsable de la esterificación de los esteroides en el intestino y el hígado, la acil coenzima A: colesterol aciltransferasa (ACAT) (Child y Kuksis, 1983); consecuentemente se reduciría la cantidad de colesterol exportado a la sangre. Además, se ha demostrado que el sitosterol no es un sustrato adecuado para la ACAT (Field y Mathur, 1983). Esto puede explicar también por qué la absorción de esteroides vegetales es tan baja.

Más recientemente se ha centrado también la atención en los transportadores ABC como mecanismo responsable de la menor absorción intestinal de colesterol por los esteroides vegetales (Chen, 2001) (Kidambi y Patel, 2008). Parece ser que el colesterol y los fitosteroides comparten los mismos transportadores ABC (ABCG5 y ABCG8) (Plat y Mensink, 2005) (von Bergmann et al., 2005). Los transportadores ABCG5 y ABCG8 se expresan en las células de la mucosa intestinal y la membrana canalicular del hígado, y resecretan esteroides, especialmente los esteroides vegetales absorbidos, de nuevo al lumen intestinal y del hígado a la bilis. Esto también explica porque los esteroides vegetales se absorben menos que el colesterol y también porque se incorporan más a la bilis que el colesterol. Si los esteroides vegetales estimulan el flujo de colesterol a través de estos transportadores, este mecanismo podría explicar el efecto de los esteroides vegetales sobre la absorción del colesterol, y el hecho de que el consumo de esteroides vegetales una vez al día reduce las concentraciones séricas de colesterol-LDL en la misma medida que consumo de dichos compuestos tres veces al día (Plat y Mensink, 2005). Se ha descrito que defectos en estos transportadores conducen a la enfermedad hereditaria rara denominada fitoesterolemia o sitosterolemia, que se define clínicamente por una hiperabsorción y excreción biliar disminuida de esteroides vegetales (Belamarich et al., 1990). También se ha identificado otro transportador, el NPC1L1 (Niemann-Pick C1 like 1), que probablemente está más implicado en el transporte de colesterol y esteroides vegetales en la mucosa intestinal (von Bergmann et al., 2005).

Debe mencionarse que el efecto hipocolesteremiante de los esteroides o estanoles vegetales no es igual para todos los individuos, habiéndose descrito algunos individuos "no respondedores" (Rudkowska et al., 2008). Los factores genéticos se han propuesto como una de las principales causas de dichas diferencias (Quilez et al., 2003).

5.3.2 Efectos de los esteroides vegetales sobre la biodisponibilidad de carotenoides y vitaminas liposolubles

Los fitosteroides, al interferir con la absorción intestinal del colesterol, pueden resultar también en una reducción indeseada de la absorción de carotenoides y vitaminas liposolubles, ya que comparten la misma vía de absorción que el colesterol. De hecho, la mayor parte de estudios realizados en este sentido muestran un descenso de los niveles absolutos de alfa- y beta-caroteno, aunque los cambios no siempre alcanzan diferencias significativas (Plat y Mensink, 2001) (Richelle et al., 2004). Los niveles de carotenoides oxigenados (luteína/zeaxantina y β -criptoxantina) también se ven generalmente disminuidos, mientras que los de retinol no se afectan. Algunos estudios muestran también un descenso de las concentraciones absolutas de tocoferol (Mensink et al., 2002) (Richelle et al., 2004), aunque no se sabe si puede ser debido a la matriz del alimento. Debido a que los antioxidantes liposolubles son transportados en la sangre por las lipoproteínas, una disminución de los lípidos plasmáticos puede ser simplemente la causa de un descenso en las concentraciones de antioxidantes liposolubles. Por este motivo, las concentraciones de dichos antioxidantes son generalmente normalizadas por una fracción de lípidos en plasma, aunque no existe uniformidad en todos los estudios (Weststrate y Meijer, 1998) (Plat et al., 2000) (Plat y Mensink, 2001) (Mensink et al., 2002). En general, con la excepción del beta-caroteno, el descenso de las concentraciones de antioxidantes liposolubles es paralelo al descenso en el colesterol-total y LDL. Por ejemplo, en un estudio en el que se suplementó la dieta con ésteres de estanoles vegetales (3 g/día) durante 4 semanas se observó un descenso de las concentraciones plasmáticas de varios carotenoides, mientras que las concentraciones absolutas de diferentes isómeros de tocoferol y de retinol se mantuvieron sin cambios (Mensink et al., 2002). De hecho, las partículas de LDL resultaron enriquecidas en tocoferoles, mientras que los títulos de varios carotenoides no mostraron cambios y los de beta-caroteno disminuyeron. Esto sugiere que las variaciones en las concentraciones sanguíneas de antioxidantes, descritas en diversos trabajos, no se pueden explicar simplemente por una disminución en el número de partículas de LDL circulantes (Mensink et al., 2002).

En otro estudio en el que se analizó el efecto del consumo durante 1 año de margarina enriquecida con ésteres de sitostanol (Gylling et al., 1999) se observó una disminución de la concentración plasmática de beta-caroteno del 33,3 % respecto a la de los controles. Cuando la concentración de beta-caroteno se normalizó por la de colesterol, la diferencia fue menor, pero todavía estadísticamente significativa. En este estudio no se hallaron efectos significativos sobre la vitamina D o las concentraciones de retinol, ni tampoco para los cocientes de concentraciones de alfa-tocoferol/colesterol y alfa-caroteno/colesterol. Asimismo, se demostraba que las concentraciones séricas de alfa-tocoferoles y de carotenos (pero no las de retinol y de vitamina D) estaban estrechamente asociadas a los indicadores de la absorción del colesterol (Gylling et al., 1999). Otros estudios a largo plazo han mostrado resultados similares (Palou et al., 2005). Aparte de la disminución de las concentraciones plasmáticas de carotenoides y nutrientes liposolubles, no se han descrito otros cambios nutricionales relevantes. Analizando los datos disponibles en la literatura se ha calculado que la disminución de carotenoides plasmáticos llega a un plató cuando las dosis de esteroides vegetales alcanzan cerca de 2,2 g/día (Plat et al., 2000) (Palou et al., 2005).

Las alteraciones de las concentraciones de beta-caroteno asociadas a la sobreingesta de esteroides vegetales se han confirmado, en general, en numerosos estudios (Plat y Mensink, 2001) (Richelle et al.,

2004). El SCF estimó que la ingesta de 20 g/día durante 1 año de productos que contenían un 8 % de fitosteroles libres reducía un 20 % las concentraciones plasmáticas de beta-caroteno (SCF, 2000). Aunque la concentración de beta-caroteno todavía estaba dentro del amplio rango normal y de las variaciones estacionales normales, tal reducción en los títulos plasmáticos podría llegar a ser relevante en sujetos con un estado no óptimo de vitamina A (SCF, 2000).

Un estudio de Noakes et al. (2002) ha demostrado que cuando se consumen esteroides vegetales (2,3-25 g/día) en margarinas o grasas amarillas para untar, el consejo dietético de una porción diaria adicional de vegetales o fruta (con alto contenido en carotenoides) puede ser eficaz para el mantenimiento de las concentraciones plasmáticas de los carotenoides. Otros estudios han mostrado que los efectos de los esteroides vegetales sobre las concentraciones de carotenoides son leves o prácticamente indetectables si se mantiene una dieta equilibrada (Raeini-Sarjaz et al., 2002). En todo caso, durante el consumo excesivo a largo plazo de alimentos enriquecidos con esteroides vegetales, es conveniente recomendar una ingesta de beta-caroteno de fuentes naturales, es decir, vegetales y frutas ricas en carotenoides, para compensar la reducción prevista de los títulos de beta-caroteno y con otros nutrientes liposolubles (SCF, 2000).

5.4 Seguridad

5.4.1 Efectos colaterales adversos

Se han descrito pocos efectos adversos relacionados con la sobreingesta de esteroides o estanoles vegetales tanto a corto como a largo plazo. Tal como se ha descrito en el apartado anterior, la principal preocupación es que su sobreingesta se acompaña de una reducción de las concentraciones plasmáticas de alfa- y beta-caroteno, alfa-tocoferol, y/o licopeno (Plat y Mensink, 2001) (Richelle et al., 2004). En general, con la excepción de beta-caroteno, estas disminuciones son a menudo paralelas a las disminuciones en el colesterol-total y LDL. Por este motivo se ha recomendado acompañar la ingesta de esteroides vegetales con un mayor consumo de frutas y verduras, ricas en carotenoides (SCF, 2000).

Por otra parte, una sobreingesta de esteroides/estanoles vegetales se ha visto que no contribuye, o sólo mínimamente, a un incremento de las concentraciones plasmáticas de dichos compuestos (Lichtenstein y Deckelbaum, 2001). Sin embargo, puede haber algunos individuos en la población con una anormalmente alta absorción de esteroides vegetales. Tal es el caso de aquellas personas que padecen el desorden genético antes mencionado (fitosterolemia). Dichos individuos absorben cantidades importantes de sitosterol (y colesterol), y dichos niveles circulantes elevados conducen al desarrollo de xantomas (Belamarich et al., 1990).

5.4.2 Estudios toxicológicos

En relación con los potenciales efectos tóxicos de los esteroides vegetales, el SCF evaluó en 2000 una formulación específica de esteroides vegetales en margarinas y la consideró aceptable previendo un consumo promedio de 20-30 g/día del nuevo alimento margarinas/grasas amarillas de untar con un máximo del 8 % de fitosteroles (SCF, 2000). Dicho Comité concluyó que no existen riesgos de seguridad evidentes con el consumo de estos esteroides vegetales específicos (SCF, 2000). La información toxicológica disponible para dicha evaluación abarcó estudios sobre la absorción, distribución, metabolismo y excreción de estos esteroides (Sanders et al., 2000), estudios de toxicidad subcrónica (Hepburn et al., 1999), genotoxicidad

(Wolfreys y Hepburn, 2002), función reproductiva y toxicidad reproductiva (Waalkens-Berendsen et al., 1999), potencial actividad estrogénica (Baker et al., 1999), además de estudios en humanos sobre la microflora y composición fecal, y otros parámetros (Ayesh et al., 1999) (Weststrate et al., 1999).

En concreto, estudios subcrónicos en animales utilizando una composición específica de ésteres de fitosteroles conteniendo un 62 % de esteroides totales, principalmente beta-sitosterol (48,7 %), campesterol (25,8 %) y estigmasterol (21,6 %) y con sólo 1,1 % de brasicasterol, no encontraron efectos tóxicos relevantes con la dosis más alta ensayada de hasta 6,6 g/kg peso corporal/día (correspondiente a 4,1 g de fitosteroles/kg peso corporal/día) (Hepburn et al., 1999). En un estudio de toxicidad reproductiva en dos generaciones en ratas y utilizando la misma composición anterior tampoco se observaron efectos tóxicos. Se fijó un valor de NOAEL de un 8,1 %, equivalente a una dosis de 2,5-9,1 g/kg peso corporal/día (Waalkens-Berendsen et al., 1999).

El potencial mutagénico de los esteroides vegetales (47,9 % beta-sitosterol, 28,8 % campesterol, 23,3 % estigmasterol) y de los ésteres de fitoesterol (47,3 % beta-sitosterol, 28,1 % campesterol, 24,1 % estigmasterol) también se ha evaluado en un análisis de mutagenicidad en bacterias y en un análisis *in vitro* de aberraciones cromosómicas. Además, utilizando la mezcla conteniendo 0,3 % colesterol, 3,0 % brasicasterol, 28,1 % campesterol, 0,8 % campestanol, 18,7 % estigmasterol, 45,5 % beta-sitosterol, 2,6 % beta-sitostanol, 1,1 % D5-avenasterol y 1,9 % de otros compuestos, se realizó un análisis *in vitro* de mutación génica en células de mamífero y dos estudios *in vivo* de mutagenicidad (análisis de micronúcleos en la médula ósea de rata y análisis de la síntesis no programada de DNA en hígado), sólo con los ésteres de fitoesterol (Wolfreys y Hepburn, 2002). Los fitosteroides y los ésteres de fitoesterol no mostraron ninguna evidencia de actividad mutagénica en ninguno de estos análisis. En este mismo estudio se analizaron, en dos análisis toxicológicos *in vitro* (análisis de mutagenicidad en bacterias y análisis *in vitro* de aberraciones cromosómicas), un producto de descomposición del colesterol, el 4-colesten-3-ona, y un subproducto fecal importante, 5-beta-colestan-3-ona, y no mostraron evidencia alguna de actividad mutagénica en estos análisis (Wolfreys y Hepburn, 2002). En conclusión, el consumo de fitosteroides se considera seguro según lo deducido de los estudios en modelos animales, sin efectos toxicológicos relevantes.

Respecto de la capacidad estrogénica, varios estudios en animales indican que, cuando se usan a niveles altos o cuando se administran por vía subcutánea, los esteroides vegetales, especialmente el sitosterol, pueden tener actividad estrogénica. Se han descrito ciertos efectos estrogénicos claros en peces (MacLatchy y Van Der Kraak, 1995) (Mellanen et al., 1996). Hay también algunos datos controvertidos en la rata con beta-sitosterol administrado por vía oral (Rosenblum et al., 1993), que no fueron confirmados por otros estudios en la misma especie (Baker et al., 1999). El SCF, después de revisar los estudios disponibles sobre este aspecto, incluyó un estudio de reproducción de dos generaciones en ratas antes mencionado, consideró que proporcionaban suficientes evidencias en relación a la ausencia de efectos endocrinos cuando se administran por vía oral (SCF, 2002a).

En relación a los estanoles vegetales, hay diversos estudios similares disponibles que tampoco muestran resultados adversos (Palou et al., 2005): genotoxicidad en las dosis del límite de solubilidad, correspondientes a concentraciones dietéticas de 0,2 hasta 1 % (expresados como estanoles libres, equivalentes a alrededor de 0,5 g de estanoles/kg peso corporal/día) (Turnbull et al., 1999b); toxicidad

reproductiva en dos generaciones en ratas a concentraciones de hasta 4,4 % de ésteres de estanol vegetal (equivalentes a 2,5 % de estanoles totales en la dieta) (Whittaker et al., 1999); toxicidad oral subcrónica (Turnbull et al., 1999b) o toxicidad para el desarrollo (Slesinski et al., 1999) en ratas; si bien a concentraciones dietéticas del 5 %, la ingestión subcrónica de estas sustancias disminuyó las concentraciones plasmáticas de las vitaminas liposolubles E y K y, en un grado inferior, las de la vitamina D. Este efecto también se observó en los títulos hepáticos de las vitaminas liposolubles, excepto la vitamina K que no se analizó (Turnbull et al., 1999b).

En un estudio *in vitro* sobre la potencial actividad estrogénica de estanoles vegetales, distintas mezclas de estanoles derivados de aceites vegetales (58,3-67,1 % de sitostanol, 29,3-31,6 % de campestanol, 0,7-2,6 % de sitosterol, 0,2-1,1 % de campesterol, y 0,4-8,7 % de otros compuestos esteroides) no indujeron la proliferación de células de un adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) que responde a los estrógenos (Turnbull et al., 1999a). En un ensayo uterotrófico con ratas hembras inmaduras, ésteres de estanoles obtenidos de vegetales y de la madera, tampoco indujeron cambios significativos en los pesos del útero cuando se alimentaron con concentraciones de 8,3 % en la dieta durante 4 días.

La mayoría de estudios realizados en humanos se han dirigido a determinar la eficacia de los esteroides vegetales, en las dosis típicas, en cuanto a su capacidad de reducir las concentraciones sanguíneas de colesterol, particularmente colesterol-LDL, y sin afectar otros parámetros, como colesterol-HDL, triglicéridos, etc. No se han descrito efectos secundarios (con la excepción del descenso de la biodisponibilidad de beta-caroteno y otros compuestos liposolubles) o reacciones adversas, lo que complementa los resultados de los estudios toxicológicos en animales y otros estudios en diversos sistemas y en modelos *in vitro* (Palou et al., 2005).

El número de estudios desarrollados en niños con hipercolesterolemia es significativo (Amundsen et al., 2002, 2004) (Ketomaki et al., 2004) y muestra unos resultados de efectividad similares a los de los adultos en la reducción de las concentraciones de colesterol, sin que tampoco se hayan descrito efectos adversos, aunque deba considerarse la acción reductora de los esteroides vegetales sobre los títulos sanguíneos de provitamina A.

5.4.3 Opiniones del *Scientific Committee on Food* (SCF) y el Panel NDA de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) sobre la seguridad de los esteroides vegetales

El *Scientific Committee on Food* de la Comisión Europea (SCF) y más adelante el Panel NDA de EFSA, han emitido numerosas opiniones sobre la seguridad de inclusión de fitosteroides y/o fitostanoles en diversos alimentos (EFSA, 2003, 2006, 2007) (SCF, 2000, 2002a, 2002b, 2003a, 2003b, 2003c). En el informe del SCF sobre los efectos a largo plazo del consumo de elevadas cantidades de fitosteroides procedentes de diversas fuentes alimentarias, con especial atención a los efectos sobre el beta-caroteno (SCF, 2002a), se expresó que era prudente evitar ingestas de esteroides vegetales superiores a un rango de 1 a 3 g/día, ya que no había evidencias de obtención de beneficios adicionales a dosis más elevadas. En dictámenes posteriores relativos a distintos alimentos con fitosteroides, el SCF y el Panel NDA de EFSA llegaron a la conclusión de que la adición de fitosteroides era segura, siempre que se tomaran las medidas de gestión adecuadas para evitar la ingesta excesiva de fitosteroides. Por estas razones, en el Reglamento (CE) N° 608/2004 relativo al etiquetado de alimentos e ingredientes alimentarios con fitosteroides añadidos (UE,

2004), se estableció que los alimentos con fitosteroles añadidos debe ser presentados de tal manera que se puedan dividir fácilmente en porciones que contengan un máximo de 1 g (en el caso de 3 porciones/día) o 3 g (en el caso de 1 porción/día) de fitosteroles añadidos. También estableció que un envase de bebidas no deben contener más de 3 g de fitosteroles.

5.5 Conclusión

Los estudios disponibles hasta el momento no han permitido establecer con suficiente precisión una ingesta diaria máxima tolerable para los esteroides vegetales debido a que no existen suficientes datos en humanos a dosis superiores a 6 a 9 g diarios, tomados regularmente y por un tiempo prolongado. El Comité Científico de la AECOSAN comparte la opinión del SCF de que los datos disponibles no proporcionan las bases suficientes para fijar, numéricamente, unas concentraciones máximas de ingesta diaria de esteroides vegetales. Si bien, considerando que los máximos beneficios de reducción de las concentraciones de colesterol sanguíneo se alcanzan a dosis de 1,5 a 3 g por día, dependiendo del tipo de alimento, de la formulación de esteroides concreta, de los hábitos dietéticos y de otros factores, en ausencia de evidencias de beneficios adicionales a dosis más elevadas, el Comité Científico también considera que es prudente evitar ingestas de esteroides que excedan de dicho margen.

Por tanto, el Comité Científico concluye que, en función de la información disponible en la actualidad y teniendo en cuenta las consideraciones generales reflejadas en el presente informe, la propuesta de la AECOSAN de una cantidad máxima diaria de 3 g para los fitosteroles es aceptable desde el punto de vista de su seguridad en su uso como complemento alimenticio, siempre que se trate de fitosteroles autorizados.

Asimismo, debido a que los fitosteroles pueden reducir los niveles plasmáticos de beta-caroteno y otras vitaminas liposolubles, el Comité Científico comparte la opinión del SCF de que dichos efectos sobre las concentraciones plasmáticas de beta-caroteno deben comunicarse al consumidor, con los correspondientes consejos dietéticos de un consumo regular de frutas y verduras. El efecto reductor del beta-caroteno es especialmente importante en personas con niveles no óptimos de vitamina A, así como para personas con requerimientos específicos de vitamina A y que merecen especial cautela, por ejemplo durante el embarazo, lactancia, e infancia. También es importante indicar que la ingesta de complementos con esteroides vegetales es totalmente desaconsejable en personas afectadas por un error congénito del metabolismo poco frecuente (la fitosterolemia).

Referencias

- Amundsen, A.L., Ose, L., Nenseter, M.S. y Ntanios, F.Y. (2002). Plant sterol ester-enriched spread lowers plasma total and LDL cholesterol in children with familial hypercholesterolemia. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76, pp: 338-344.
- Amundsen, A.L., Ntanios, F., Put, N. y Ose, L. (2004). Long-term compliance and changes in plasma lipids, plant sterols and carotenoids in children and parents with FH consuming plant sterol ester-enriched spread. *European Journal of Clinical Nutrition*, 58, pp: 1612-1620.
- Ayesh, R., Weststrate, J.A., Drewitt, P.N. y Hepburn, P.A. (1999). Safety evaluation of phytosterol esters. Part 5. Faecal short-chain fatty acid and microflora content, faecal bacterial enzyme activity and serum female sex hormones in healthy normolipidaemic volunteers consuming a controlled diet either with or without a phytosterol ester-enriched margarine. *Food and Chemical Toxicology*, 37, pp: 1127-1138.

- Baker, V.A., Hepburn, P.A., Kennedy, S.J., Jones, P.A., Lea, L.J., Sumpter, J.P. y Ashby, J. (1999). Safety evaluation of phytosterol esters. Part 1. Assessment of oestrogenicity using a combination of *in vivo* and *in vitro* assays. *Food and Chemical Toxicology*, 37, pp: 13-22.
- Belamarich, P.F., Deckelbaum, R.J., Starc, T.J., Dobrin, B.E., Tint, G.S. y Salen, G. (1990). Response to diet and cholestyramine in a patient with sitosterolemia. *Pediatrics*, 86, pp: 977-981.
- Berge, K.E., Tian, H., Graf, G.A., Yu, L., Grishin, N.V., Schultz, J., Kwiterovich, P., Shan, B., Barnes, R. y Hobbs, H.H. (2000). Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science*, 290, pp: 1771-1775.
- Chen, H.C. (2001). Molecular mechanisms of sterol absorption. *Journal of Nutrition*, 131, pp: 2603-2605.
- Child, P. y Kuksis, A. (1983). Critical role of ring structure in the differential uptake of cholesterol and plant sterols by membrane preparations *in vitro*. *The Journal of Lipid Research*, 24, pp: 1196-1209.
- Demonty, I., Ras, R.T., van der Knaap, H.C., Duchateau, G.S., Meijer, L., Zock, P.L., Geleijnse, J.M. y Trautwein, E.A. (2009). Continuous dose-response relationship of the LDL-cholesterol-lowering effect of phytosterol intake. *Journal of Nutrition*, 139, pp: 271-284.
- EFSA (2003). European Food Safety Authority. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to a novel food application from Forbes Medi-Tech for approval of plant sterol-containing milk-based beverages. *The EFSA Journal*, 15, pp: 1-12.
- EFSA (2006). European Food Safety Authority. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Statement of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to a novel food application on rice drinks with added phytosterols; expressed on 15 February 2006.
- EFSA (2007). European Food Safety Authority. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Statement of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to a novel food application on fruit juices and nectars with added phytosterols. Expressed on 15 February 2007.
- EFSA (2008a). European Food Safety Authority. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific Opinion of the Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies on a request from Unilever PLC/NV on Plant Sterols and lower/reduced blood cholesterol, reduced the risk of (coronary) heart disease. *The EFSA Journal*, 781, pp: 1-12.
- EFSA (2008b). European Food Safety Authority. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific Opinion of the Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from McNeil Nutritionals Ltd. related to the scientific substantiation of a health claim on plant stanol esters and lower/reduced blood cholesterol and reduced risk of (coronary) heart disease. *The EFSA Journal*, 825, pp: 1-13.
- EFSA (2012). European Food Safety Authority. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to 3 g/day plant sterols/stanols and lowering blood LDL-cholesterol and reduced risk of (coronary) heart disease pursuant to Article 19 of Regulation (EC) No 1924/2006. *The EFSA Journal*, 10, pp: 2693.
- Field, F.J. y Mathur, S.N. (1983). Beta-sitosterol: esterification by intestinal acylcoenzyme A: cholesterol acyltransferase (ACAT) and its effect on cholesterol esterification. *The Journal of Lipid Research*, 24, pp: 409-417.
- Gylling, H., Puska, P., Vartiainen, E. y Miettinen, T.A. (1999). Retinol, vitamin D, carotenes and alpha-tocopherol in serum of a moderately hypercholesterolemic population consuming sitostanol ester margarine. *Atherosclerosis*, 145, pp: 279-285.
- Hepburn, P.A., Horner, S.A. y Smith, M. (1999). Safety evaluation of phytosterol esters. Part 2. Subchronic 90-day oral toxicity study on phytosterol esters-a novel functional food. *Food and Chemical Toxicology*, 37, pp: 521-532.
- Ikeda, I. y Sugano, M. (1978). Comparison of absorption and metabolism of beta-sitosterol and beta-sitostanol in rats. *Atherosclerosis*, 30, pp: 227-237.
- Italia (2013). Elenco sostanze ad effetto nutritivo o fisiologico impiegabili negli integratori alimentari. Disponibile en: http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pagineAree_1268_listaFile_itemName_4_file.pdf [accesso: 4-12-13].

- Katan, M.B., Grundy, S.M., Jones, P., Law, M., Miettinen, T. y Paoletti, R. (2003). Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels. *Mayo Clinic Proceedings*, 78, pp: 965-978.
- Kitomaki, A., Gylling, H. y Miettinen, T.A. (2004). Effects of plant stanol and sterol esters on serum phytosterols in a family with familial hypercholesterolemia including a homozygous subject. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 143, pp: 255-262.
- Kidambi, S. y Patel, S.B. (2008). Cholesterol and non-cholesterol sterol transporters: ABCG5, ABCG8 and NPC1L1: a review. *Xenobiotica*, 38, pp: 1119-1139.
- Law, M. (2000). Plant stanol and stanol margarines and health. *British Medical Journal*, 320, pp: 861-864.
- Lichtenstein, A.H. y Deckelbaum, R.J. (2001). AHA Science Advisory. Stanol/sterol ester-containing foods and blood cholesterol levels. A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism of the American Heart Association. *Circulation*, 103, pp: 1177-1179.
- Ling, W.H. y Jones, P.J. (1995). Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. *Life Sciences*, 57, pp: 195-206.
- MacLatchy, D.L. y Van Der Kraak, G.J. (1995). The phytoestrogen beta-sitosterol alters the reproductive endocrine status of goldfish. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 134, pp: 305-312.
- Mel'nikov, S.M., Seijen ten Hoorn, J.W. y Eijkelenboom, A.P. (2004). Effect of phytosterols and phytostanols on the solubilization of cholesterol by dietary mixed micelles: an *in vitro* study. *Chemistry and Physics of Lipids*, 127, pp: 121-141.
- Mellanen, P., Petanen, T., Lehtimaki, J., Makela, S., Bylund, G., Holmbom, B., Mannila, E., Oikari, A. y Santti, R. (1996). Wood-derived estrogens: studies in vitro with breast cancer cell lines and in vivo in trout. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 136, pp: 381-388.
- Mellies, M., Glueck, C.J., Sweeney, C., Fallat, R.W., Tsang, R.C. y Ishikawa, T.T. (1976). Plasma and dietary phytosterols in children. *Pediatrics*, 57, pp: 60-67.
- Mensink, R.P., Ebbing, S., Lindhout, M., Plat, J. y van Heugten, M.M. (2002). Effects of plant stanol esters supplied in low-fat yoghurt on serum lipids and lipoproteins, non-cholesterol sterols and fat soluble antioxidant concentrations. *Atherosclerosis*, 160, pp: 205-213.
- Moreau, R.A., Whitaker, B.D. y Hicks, K.B. (2002). Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Progress in Lipid Research*, 41, pp: 457-500.
- Noakes, M., Clifton, P., Ntanos, F., Shrapnel, W., Record, I. y McInerney, J. (2002). An increase in dietary carotenoids when consuming plant sterols or stanols is effective in maintaining plasma carotenoid concentrations. *American Journal Clinical Nutrition*, 75, pp: 79-86.
- Ostlund, R.E.Jr., McGill, J.B., Zeng, C.M., Covey, D.F., Stearns, J., Stenson, W.F. y Spilburg, C.A. (2002). Gastrointestinal absorption and plasma kinetics of soy Delta(5)-phytosterols and phytostanols in humans. *The American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 282, pp: E911-916.
- Palou, A., Picó, C., Bonet, M., Oliver, P., Serra, F., Rodríguez, A. y Ribot, J. (2005). *En libro: El libro blanco de los esteroides vegetales en alimentación*. Instituto Flora, Unilever Foods S.A., Barcelona, España.
- Piironen, V., Lindsay, D.G., Miettinen, T.A., Toivo, J. y Lampi, A.M. (2000). Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, pp: 939-966.
- Plat, J., Kerckhoffs, D.A. y Mensink, R.P. (2000). Therapeutic potential of plant sterols and stanols. *Current Opinion in Lipidology*, 11, pp: 571-576.
- Plat, J. y Mensink, R.P. (2001). Effects of diets enriched with two different plant stanol ester mixtures on plasma ubiquinol-10 and fat-soluble antioxidant concentrations. *Metabolism*, 50, pp: 520-529.
- Plat, J. y Mensink, R.P. (2005). Plant stanol and sterol esters in the control of blood cholesterol levels: mechanism and safety aspects. *The American Journal of Cardiology*, 96, pp: 15D-22D.
- Quilez, J., Garcia-Lorda, P. y Salas-Salvado, J. (2003). Potential uses and benefits of phytosterols in diet: present situation and future directions. *Clinical Nutrition*, 22, pp: 343-351.

- Raeini-Sarjaz, M., Ntanios, F.Y., Vanstone, C.A. y Jones, P.J. (2002). No changes in serum fat-soluble vitamin and carotenoid concentrations with the intake of plant sterol/stanol esters in the context of a controlled diet. *Metabolism*, 51, pp: 652-666.
- Richelle, M., Enslin, M., Hager, C., Groux, M., Tavazzi, I., Godin, J.P., Berger, A., Metairon, S., Quaile, S., Piquet-Welsch, C., Sagalowicz, L., Green, H. y Fay, L.B. (2004). Both free and esterified plant sterols reduce cholesterol absorption and the bioavailability of beta-carotene and alpha-tocopherol in normocholesterolemic humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80, pp: 171-177.
- Rosenblum, E.R., Stauber, R.E., Van Thiel, D.H., Campbell, I.M. y Gavaler, J.S. (1993). Assessment of the estrogenic activity of phytoestrogens isolated from bourbon and beer. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 17, pp: 1207-1209.
- Rudkowska, I., AbuMweis, S.S., Nicolle, C. y Jones, P.J. (2008). Association between non-responsiveness to plant sterol intervention and polymorphisms in cholesterol metabolism genes: a case-control study. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 33, pp: 728-734.
- Sanders, D.J., Minter, H.J., Howes, D. y Hepburn, P.A. (2000). The safety evaluation of phytosterol esters. Part 6. The comparative absorption and tissue distribution of phytosterols in the rat. *Food and Chemical Toxicology*, 38, pp: 485-491.
- SCF (2000). Scientific Committee on Food. Opinion of the SCF on a request for the safety assessment of the use of phytosterol esters in yellow fat spreads. SCF/CS/NF/DOS/1 Final 2000.
- SCF (2002a). Scientific Committee on Food. General view of the Scientific Committee on Food on the long-term effect of the intake of elevated levels of phytosterols from multiple dietary sources, with particular attention to the effects on β -carotene. Expressed on 26 September 2002.
- SCF (2002b). Scientific Committee on Food. Opinion of the Scientific Committee on a report on Post Launch Monitoring of "yellow fat spreads with added phytosterol esters". Expressed on 26 September 2002.
- SCF (2003a). Scientific Committee on Food. Opinion of the Scientific Committee on Food on an application from ADM for approval of plant sterol-enriched foods. Expressed on 4 April 2003.
- SCF (2003b). Scientific Committee on Food. Opinion of the Scientific Committee on Food on an application from Multi-Bene for approval of plant-sterol enriched foods. Expressed on 4 April 2003.
- SCF (2003c). Scientific Committee on Food. Opinion of the Scientific Committee on Food on applications for approval of a variety of plant sterol-enriched foods. Expressed on 5 March 2003.
- Slesinski, R.S., Turnbull, D., Frankos, V.H., Wolterbeek, A.P. y Waalkens-Berendsen, D.H. (1999). Developmental toxicity study of vegetable oil-derived stanol fatty acid esters. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 29, pp: 227-233.
- Tilvis, R.S. y Miettinen, T.A. (1986). Serum plant sterols and their relation to cholesterol absorption. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 43, pp: 92-97.
- Turnbull, D., Frankos, V.H., Leeman, W.R. y Jonker, D. (1999a). Short-term tests of estrogenic potential of plant stanols and plant stanol esters. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 29, pp: 211-215.
- Turnbull, D., Whittaker, M.H., Frankos, V.H. y Jonker, D. (1999b). 13-week oral toxicity study with stanol esters in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 29, pp: 216-226.
- UE (2004). Reglamento (UE) N° 608/2004 de la Comisión, de 31 de marzo de 2004, relativo al etiquetado de alimentos e ingredientes alimentarios con fitosteroles, ésteres de fitosterol, fitostanoles o ésteres de fitostanol añadidos. DO L 97 de 1 de abril de 2004, pp: 44-45.
- Von Bergmann, K., Sudhop, T. y Lutjohann, D. (2005). Cholesterol and plant sterol absorption: recent insights. *American Journal of Cardiology*, 96, pp: 10D-14D.
- Waalkens-Berendsen, D.H., Wolterbeek, A.P., Wijnands, M.V., Richold, M. y Hepburn, P.A. (1999). Safety evaluation of phytosterol esters. Part 3. Two-generation reproduction study in rats with phytosterol esters-a novel functional food. *Food and Chemical Toxicology*, 37, pp: 683-696.
- Weststrate, J.A. y Meijer, G.W. (1998). Plant sterol-enriched margarines and reduction of plasma total- and LDL-cho-

lesterol concentrations in normocholesterolaemic and mildly hypercholesterolaemic subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*, 52, pp: 334-343.

Weststrate, J.A., Ayesh, R., Bauer-Plank, C. y Drewitt, P.N. (1999). Safety evaluation of phytosterol esters. Part 4. Faecal concentrations of bile acids and neutral sterols in healthy normolipidaemic volunteers consuming a controlled diet either with or without a phytosterol ester-enriched margarine. *Food and Chemical Toxicology*, 37, pp: 1063-1071.

Whittaker, M.H., Frankos, V.H., Wolterbeek, A.P. y Waalkens-Berendsen, D.H. (1999). Two-generation reproductive toxicity study of plant stanol esters in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 29, pp: 196-204.

Wilkins, T.D. y Hackman, A.S. (1974). Two patterns of neutral steroid conversion in the feces of normal North Americans. *Cancer Research*, 34, pp: 2250-2254.

Wolfreys, A.M. y Hepburn, P.A. (2002). Safety evaluation of phytosterol esters. Part 7. Assessment of mutagenic activity of phytosterols, phytosterol esters and the cholesterol derivative, 4-cholesten-3-one. *Food and Chemical Toxicology*, 40, pp: 461-470.

6. Lactasa

6.1 Propuesta

La AECOSAN ha propuesto la inclusión de la lactasa en el Real Decreto 1487/2009 sin especificar una cantidad máxima diaria.

Esta propuesta se basa en la autorización de una declaración de propiedad saludable en relación a que la lactasa es una enzima que mejora la digestión de la lactosa en las personas con problemas para digerir la lactosa. Esta declaración solo puede utilizarse respecto a complementos alimenticios con una dosis mínima de 4 500 unidades del FCC (*Food Chemical Codex*), junto con instrucciones a la población destinataria de que la consuman con cada comida que contenga lactosa (UE, 2012).

En Italia la lactasa está autorizada en complementos alimenticios sin haberse establecido una cantidad máxima diaria (Italia, 2013).

6.2 Características y fuentes

La lactasa o enzima β -D-galactosidasa es secretada de forma natural en mamíferos de las microvellosidades intestinales. Las β -galactosidasas, principalmente derivadas de diversas cepas de *Kluyveromyces* y *Aspergillus*, han encontrado aplicación industrial durante muchos años. Predomina el uso de lactasas fúngicas debido, en gran parte, a su naturaleza extracelular, altos niveles de producción, estabilidad, y la consideración de sustancias GRAS (*Generally Recognized as Safe*). Las β -galactosidasas de diversas cepas de *Aspergillus niger* y *A. oryzae* se explotan comercialmente para la hidrólisis de la lactosa en suero de leche, para mejorar los síntomas de la intolerancia a la lactosa y para la producción de galacto-oligosacáridos. En algunos casos se ha ensayado la administración exógena con buenos resultados en humanos (O'Connell y Walsh, 2008).

6.3 Nutrición y metabolismo

La lactasa o β -D-galactosidasa hidroliza la lactosa en galactosa y glucosa.

6.4 Seguridad

Hay información desde hace décadas sobre que el uso de las lactasas en la industria alimentaria es seguro y, aunque los estudios con animales o humanos se han orientado hacia la eficacia, se pueden indicar algunos estudios de los que deducir la seguridad.

La toxicidad de la preparación de lactasa Neutralact® se evaluó en ratas (Coenen et al., 2000). La administración de la enzima en dosis de 500, 3 000 y 10 000 mg/kg peso corporal/día durante 28 días no induce un efecto de toxicidad significativa. El nivel sin efecto adverso observado (NOAEL) de la preparación enzimática era de 10 000 mg/kg peso corporal/día. Los autores llegaron a la conclusión de que no había riesgo de toxicidad con esta preparación de lactasa.

Flood y Kondo (2004) estudiaron la tilactasa, una preparación enzimática de β -galactosidasa que tiene actividad de lactasa producida a partir del hongo *Penicillium multicolor*. La seguridad de la tilactasa se investigó en ratas, perros y conejos. A las ratas adultas y jóvenes se les administró 0, 500, 1 000, o 4 000 mg/kg peso corporal/día de la preparación enzimática por sonda durante 35 días, y los perros recibieron 0, 200, 500 ó 1 000 mg/kg peso corporal/día en cápsulas durante 30 días, sin mostrar cambios significativos relacionados con la dosis en el peso corporal, consumo de alimento, peso de los órganos, análisis de orina, perfiles hematológicos, química clínica, o perfiles histopatológicos. Las ratas que recibieron la misma dosis durante 6 meses tampoco mostraron ninguna dosis relacionada con efectos adversos, a excepción de un pequeño aumento en el peso del intestino grueso, un efecto considerado como una reacción fisiológica al paso de una gran cantidad de una sustancia no absorbible. El NOAEL fue de 4 000 mg/kg peso corporal/día para ratas y 1 000 mg/kg peso corporal/día para perros. En ensayos de toxicidad reproductiva se fijó el NOAEL de 4 000 mg/kg peso corporal/día para ratas y en 1 000 para perros y conejos. La cepa de *P. multicolor* usada para preparar tilactasa no se considera patógena. De este estudio se deduce una IDA de 40 mg/kg/día es decir una IDE para un adulto de 60 kg de 2 400 mg/día es adecuada.

Los estudios de toxicidad sugieren que el uso de estas enzimas en la industria alimentaria es seguro (Flood y Kondo, 2004).

Se conoce que existe actividad lactásica en numerosos productos lácteos fermentados no tratados térmicamente (AFSSA, 2008).

6.5 Conclusión

La lactasa está considerada por el Panel NDA de EFSA como suficientemente caracterizada y recomienda una dosis de 4 500 FCC (*Food Chemical Codex*) con cada comida conteniendo lactosa aunque la dosis debería ajustarse a cada persona en función de las comidas realizadas con lactasa (EFSA, 2009).

Desde el punto de vista de la seguridad, se podría admitir esta consideración pues la evidencias científicas no ponen de manifiesto que se puedan producir efectos adversos observables.

Tal como indica el Reglamento (UE) Nº 432/2012, por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos, deberá informarse a la población destinataria de que la tolerancia a la lactosa es de grado variable y de la conveniencia de consultar sobre el papel que desempeña esta sustancia en su dieta (UE, 2012).

Referencias

- AFSSA (2008). Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments sur un Project d'arrêté relatif à l'emploi de substances à but nutritionnel ou physiologique et des plantes et préparations de plantes dans la fabrication de compléments alimentaires. Afssa. Saisine No 2007-SA-0231.
- Coenen, T.M., Bertens, A.M., de Hoog, S.C. y Verspeek-Rip, C.M. (2000). Safety evaluation of a lactase enzyme preparation derived from *Kluyveromyces lactis*, *Food and Chemical Toxicology*, 38, pp: 671-677.
- EFSA (2009). European Food Safety Authority. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to lactase enzyme and breaking down lactose (ID 1697, 1818) pursuant to Article 13(1) of regulations (EC) No 1924/2006. *The EFSA Journal*, 7 (9), pp: 1236.
- Flood, M.T. y Kondo, M. (2004). Toxicity evaluation of β -galactosidase preparation produced by *Penicillium multicolor*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 40, pp: 281-292.
- Italia (2013). Elenco sostanze ad effetto nutritivo o fisiologico impiegabili negli integratori alimentari. Disponible en: http://www.salute.gov.it/imgs/C17_pagineAree_1268_listaFile_itemName_4_file.pdf [acceso: 4-12-13].
- O'Connell, S. y Walsh, G. (2008). Application relevant studies of Fungal β -galactosidases with potential application in the alleviation of lactose intolerance. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 149, pp: 129-138.
- UE (2012). Reglamento (UE) N° 432/2012 de la Comisión, de 16 de mayo de 2012, por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños. DO L 136 de 25 de mayo de 2012, pp: 1-40.

7. Melatonina

7.1 Propuesta

La AECOSAN ha propuesto una cantidad máxima diaria para la melatonina de 1 mg. Esta propuesta se basa en la autorización de dos declaraciones de propiedades saludables, en relación a que la melatonina contribuye a aliviar la sensación subjetiva de desfase horario (*jet lag*) y que la melatonina contribuye a disminuir el tiempo necesario para conciliar el sueño. La primera declaración solo puede utilizarse con alimentos que contengan un mínimo de 0,5 mg de melatonina por porción cuantificada. Para que un producto pueda llevar esta declaración, se informará al consumidor de que el efecto beneficioso se obtiene con una ingesta mínima de 0,5 mg que debe tomarse poco antes de acostarse el primer día de viaje y unos cuantos días después de la llegada al lugar de destino (UE, 2012).

La segunda declaración solo puede utilizarse con alimentos que contengan 1 mg de melatonina por porción cuantificada. Para que un producto pueda llevar esta declaración, se informará al consumidor de que el efecto beneficioso se obtiene con una ingesta de 1 mg de melatonina poco antes de irse a dormir (UE, 2012).

En Italia la melatonina está autorizada en complementos alimenticios en una cantidad máxima diaria de 1 mg (Italia, 2013).

7.2 Características y fuentes

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es una neurohormona producida por la glándula pineal de mamíferos y otros órganos, especialmente las células enterocromafínicas del tracto gastrointestinal y la retina (Hardeland et al., 1993) (Huether, 1993), cuya principal función fisiológica es la regulación o control de los ritmos circadianos y estacionales (Armstrong et al., 1986). Fue descubierta en la década de los cincuenta (Lerner et al., 1958, 1959).

Durante los últimos años se ha demostrado que la melatonina posee también otras numerosas funciones adicionales, es producida y actúa en numerosos tejidos o células que expresan receptores de melatonina, en niveles mucho más bajos (Hardeland, 2009). Se han detectado receptores de melatonina MT_1 y MT_2 (receptores de membrana) en numerosos tejidos del SNC (Sistema Nervioso Central), en órganos periféricos tales como el tracto gastrointestinal, hígado, pulmón, piel, glándula adrenal, gónadas, órganos masculinos, tejido mamario, riñón, corazón, vasos sanguíneos, tejido adiposo, neutrófilos, linfocitos y tejido linfoide (Ishii et al., 2009). Ambos receptores implican señalización a través de inhibición de AMPc, actividad protein-quinasa A, efectos sobre fosfolipasa A_2 y C, y efectos sobre los canales de potasio y calcio (Mathes, 2010). Se ha descrito también un tercer receptor, MT_3 que es una enzima identificada como quinona reductasa 2.

Las deficiencias en la producción de melatonina o en la expresión de los receptores o los descensos en los niveles de melatonina (tales como aquellos que ocurren con la edad) originan numerosas disfunciones. En estos casos, con niveles de melatonina insuficientes o de pobre señalización melatoninérgica, pueden presentarse numerosas alteraciones patofisiológicas, lo que refleja la pleiotropía de la molécula. Así, por ejemplo, ha sido repetidamente observado un descenso de los niveles nocturnos de melatonina en pacientes con desórdenes neurodegenerativos y que presentan alteraciones del sueño (Uchida et al., 1996).

7.3 Nutrición y metabolismo

El triptófano y la serotonina son los precursores de la síntesis de melatonina, y las enzimas que catalizan la formación son la N-acetiltransferasa, que convierte serotonina a N-acetil-serotonina, y la enzima hidroxindol-O-metiltransferasa, que convierte la N-acetil-serotonina a melatonina (Carpentieri et al., 2012) (Figura 2). La melatonina presente en circulación sanguínea se metaboliza principalmente vía citocromo P450 a 6-hidroxi-melatonina, seguido de conjugación, excretándose en orina como 6-sulfatoxi-melatonina. En el SNC no se forma este metabolito sino que predomina la ruptura oxidativa del anillo pirrol. La semivida plasmática de la melatonina se encuentra en un rango de 30-50 min (Lane y Moss, 1985).

La regulación de la síntesis de melatonina está controlada por el ciclo luz-oscuridad que actúa a través de la activación neural del hipotálamo anterior, vía axones de las células ganglionares de la retina a través del nervio óptico. La capacidad de síntesis de melatonina es variable entre individuos. En el hombre existe evidencia de que los niveles de melatonina disminuyen conforme incrementa la edad. Los niveles séricos de melatonina son muy bajos en las primeras semanas de vida postnatal, sin variación diurna. A los 6 meses de vida, la síntesis sigue un ritmo circadiano, alcanzando el máximo entre los 3 y 6 años de edad. A los 40-50 años se observa un descenso en la síntesis de melatonina y después de los 70 años de edad el ritmo circadiano en la secreción de melatonina prácticamente desaparece en la mayoría de los individuos (Dziegiel et al., 2008). También parece existir una diferencia estacional en la síntesis de melatonina en el hombre, siendo los niveles más altos en invierno que en verano (Vijayalaxmi Reiter et al., 2004).

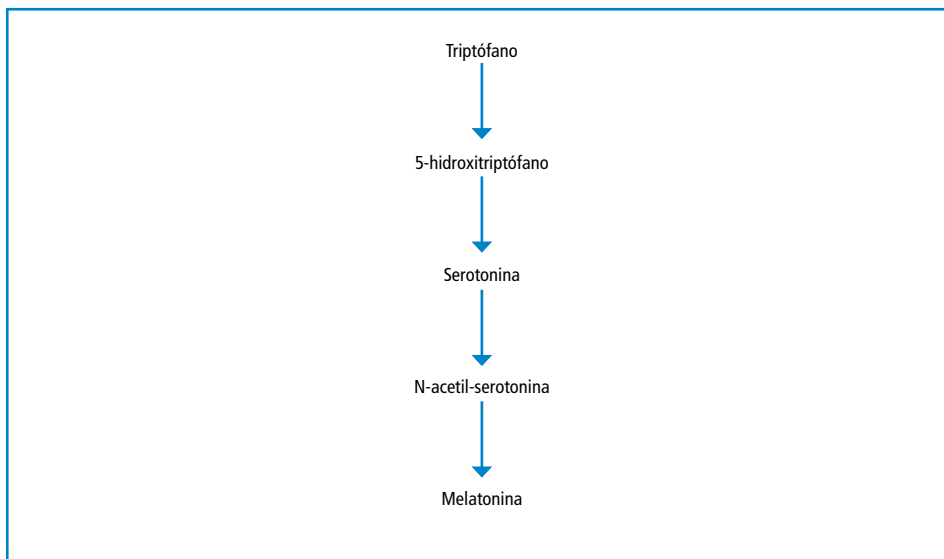


Figura 2. Fase metabólica de la síntesis de melatonina.

La producción endógena de melatonina en el hombre ha sido estimada en valores de 25-30 $\mu\text{g}/\text{día}$ (Peters, 1992) o aproximadamente 0,4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ en una persona de 70 kg de peso corporal. Los niveles circulantes de melatonina siguen una pauta diurna, con niveles plasmáticos más altos durante la noche que durante el día, incluso en especies de animales nocturnas tales como la rata (Reiter, 1991), niveles que pueden variar con el estado de gestación (Pang et al., 1987). La melatonina es una molécula hidrofóbica que atraviesa por difusión las membranas biológicas, estando presente en los tejidos o fluidos biológicos a concentraciones similares a las observadas en el plasma (Hardeland et al., 1993), (Menendez-Peláez y Reiter, 1993). La unión de melatonina a la albúmina plasmática es de un 70 %, lo que conlleva que el 30 % en forma libre se difunde a los tejidos (Hardeland et al., 2006).

La melatonina puede estar presente en plantas en cantidades superiores a las observadas en tejidos de vertebrados (excepto en la glándula pineal) y su función parece ser similar a la de vertebrados, "barredor de radicales libres" y posiblemente también interviene como coordinador de respuestas fotoperiódicas. La melatonina reduce el daño oxidativo de macromoléculas tales como lípidos, proteínas y ADN (Reiter, 1991). La melatonina, por su propiedad lipofílica, tiene capacidad de llegar hasta los compartimentos intracelulares y proteger del daño oxidativo a todas las partes de la planta, en especial al germen y tejidos reproductivos que residen en las semillas y en las flores. En 1995 se publican los primeros trabajos que identifican melatonina en plantas y frutas tales como tomate, arroz, repollo, naranjas, manzanas y plátano (Dubbels et al., 1995) (Hattori et al., 1995). Más recientemente, se han determinado las concentraciones de melatonina en semillas de 15 plantas comestibles, alcanzando un rango de 2 a 200 ng/g peso seco (Manchester et al., 2000), y en cerezas en un rango de 2-14 ng/g peso fresco (Burkhardt et al., 2001). Las concentraciones más altas se encontraron en mostaza blanca y negra (Tabla 2).

Tabla 2. Concentraciones de melatonina en semillas de 15 plantas comestibles

Nombre	Contenido de melatonina (ng/g semilla)
Cardo mariano (<i>Silybum marianum</i>)	2
Ópio (<i>Papaver somniferum</i>)	6
Anis (<i>Pimpinella anisum</i>)	7
Cilantro (<i>Coriandrum sativum</i>)	7
Apio (<i>Apium graveolens</i>)	7
Lino/linaza (<i>Linum usitatissimum</i>)	12
Cardamono (<i>Elettaria cardamomum</i>)	15
Alfalfa (<i>Medicago sativum</i>)	16
Hinojo (<i>Foeniculum vulgare</i>)	28
Girasol (<i>Helianthus annuus</i>)	29
Almendro (<i>Prunus amygdalus</i>)	39
Alhova/fenogreco (<i>Trigonella foenum-graecum</i>)	43
Goji (<i>Lycium barbarum</i>)	103
Mostaza negra (<i>Brassica nigra</i>)	129
Mostaza blanca (<i>Brassica hirta</i>)	189

7.4 Seguridad

Durante los últimos 20 años, numerosos ensayos clínicos han examinado la utilidad del aporte de melatonina exógena en diferentes campos de la medicina. Los efectos de la melatonina han sido evaluados en un amplio rango de dosis como medicación coadyuvante de otros fármacos terapéuticos en diversas enfermedades (Sánchez-Barceló et al., 2010).

En los diversos ensayos clínicos realizados en humanos, las dosis utilizadas de melatonina se encuentran en un amplio rango, desde 0,1 a 300 mg, lo que explica, por una parte, la baja toxicidad de la melatonina y, por otra parte, la falta de conocimiento de una dosis óptima para cada caso de desorden para el cual la melatonina pudiera ser eficaz. Lo que es evidente es que en todos los ensayos clínicos realizados la aparición de efectos adversos por melatonina es inexistente.

Las opiniones de EFSA en base a diversas publicaciones (metaanálisis de ensayos clínicos controlados en sujetos con desordenes del sueño) concluyen que la melatonina presenta efectos fisiológicos beneficiosos por contribuir a aliviar la sensación subjetiva de desfase horario (*jet lag*) y contribuir a la disminución del tiempo necesario para conciliar el sueño (EFSA, 2010, 2011).

A nivel experimental en animales de laboratorio (roedores) se cuestiona si la melatonina pudiera afectar el desarrollo reproductivo y la fertilidad. Sin embargo, Jahnke et al. (1999) no observan toxicidad embrio/fetal en ratas tratadas oralmente con melatonina (50, 100 y 200 mg/kg/día, desde los 6 a 19 días de gestación). Únicamente fue observada toxicidad maternal a la dosis de 200 mg/kg/día en el punto crítico "reducción transitoria de la ganancia de peso corporal". La melatonina no afectó a la supervivencia prenatal y el peso del feto y no originó efectos o incidencias de malformaciones fetales. Los NOAEL y LOAEL (*Lowest Observed Adverse Effect Level*) de toxicidad maternal fueron 100 y 200 mg/kg/

día, respectivamente. En el hombre existe evidencia de que la melatonina administrada oralmente está asociada a una inducción del sueño en un amplio rango de dosis desde 0,2 mg (Attenburrow et al., 1996) (Herxheimer y Petrie, 2002), por lo que el NOAEL calculado en los ensayos de toxicidad del desarrollo fue 500 veces las dosis que producen inducción del sueño.

La *benchmark dose* (BMD) se aplica para definir el umbral para la acción farmacológica de una sustancia. La BMD es el punto de la curva dosis-respuesta que caracteriza un efecto específico, la denominada *benchmark response*. Los valores se basan en los datos a partir de la curva dosis-respuesta y la variabilidad de los datos para el efecto crítico. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria sugiere que la BMD es aplicable a todas las sustancias presentes en los alimentos, independientemente de su categoría y origen, especialmente cuando la identificación de un NOAEL presenta incertidumbres (EFSA, 2009). Para el caso de la melatonina, Lachenmeier et al. (2012) calcularon la BMD a partir de los datos aportados por Attenburrow et al. (1996) quienes determinaron diversos parámetros relacionados con el tiempo y eficacia en el sueño por melatonina, a un rango bajo de dosis, donde la melatonina demostró un efecto altamente significativo ($p=0,001$). La BMD calculada fue 0,4 mg/día, que es consistente con la literatura que demuestra que la melatonina es eficaz a dosis bajas (Herxheimer y Petrie, 2002). Se calculó un umbral para la acción farmacológica (*threshold*) de 0,04 mg/día a partir de la BMD con un factor de incertidumbre de 10, considerando las diferencias entre individuos. Es extremadamente importante diferenciar claramente un producto medicinal de un complemento alimenticio, por ello, para el caso de la melatonina, dado que la acción de la melatonina sobre los receptores en cerebro humano está bien definida (Reppert et al., 1995), una ingesta de melatonina por encima de 1mg/día debería ser clasificada como un producto medicinal (Lachenmeier et al., 2012).

7.5 Conclusión

Con la información disponible actualmente, el Comité Científico considera que no hay evidencias científicas que relacionen el consumo de melatonina con el desarrollo de efectos adversos, por tanto establece que la melatonina puede ser contemplada como complemento alimenticio de forma segura para contribuir a aliviar la sensación subjetiva de desfase horario (*jet lag*) y contribuir a la disminución del tiempo necesario para conciliar el sueño, siempre que dicho consumo se realice dentro de unos límites razonables de ingesta.

El Comité Científico concluye que, en función de la información disponible en la actualidad y teniendo en cuenta las consideraciones reflejadas en el presente informe, la propuesta de la AECOSAN de una cantidad máxima diaria de 1 mg de melatonina es aceptable desde el punto de vista de la seguridad en su uso como complemento alimenticio.

Referencias

- Armstrong, S.M., Cassone, V.M., Chesworth, M.J., Redman, J.R. y Short, R.V. (1986). Synchronization of mammalian circadian rhythms by melatonin. *Journal of Neural Transmission*, 21, pp: 375-394.
- Attenburrow, M.E., Cowen, P.J. y Sharpley, A.L. (1996). Low dose melatonin improves sleep in healthy middle-aged subjects (Berl.). *Psychopharmacology*, 126, pp: 179-181.
- Burkhardt, S., Tan, D-X., Manchester, L.C., Hardeland, R. y Reiter, R.J. (2001). Detection and quantification of the anti-

- oxidant melatonin in Montmorency and Balaton tart cherries (*Prunus cerasus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, pp: 4898-4902.
- Carpentieri, A., Díaz de Barboza, G., Areco, V., Peralta Lopez, M. y Tolosa de Talami, N. (2012). New perspectives in melatonin uses. *Pharmacological Research*, 65 (4), pp: 437-444.
- Dubbels, R., Reiter, R.J., Klenke, E., Goebel, A., Schnakenberg, E., Ehlers, C., Schivara, H.W. y Schloot, W.J. (1995). Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pineal Research*, 18, pp: 28-31.
- Dziegiel, P., Podhorska-Okolow, M. y Zabel, M. (2008). Melatonin: adjuvant therapy of malignant tumors. *Medical Science Monitor*, 14, pp: 64-70.
- EFSA (2009). European Food Safety Authority. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Use of the benchmark dose approach in risk assessment. Guidance of the scientific committee. *The EFSA Journal*, 1150, pp: 1-72.
- EFSA (2010). European Food Safety Authority. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific opinion on the substantiation of health claims related to melatonin and alleviation of subjective feelings of jet lag (ID 1953), and reduction of sleep onset latency, and improvement of sleep quality (ID 1953) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *The EFSA Journal*, 8, pp: 1467.
- EFSA (2011). European Food Safety Authority. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific opinion on the substantiation of a health claim related to melatonin and reduction of sleep onset latency (ID 1698, 1780, 4080) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *The EFSA Journal*, 9, pp: 2241.
- Hardeland, R., Reiter, R.J., Poeggeler, B. y Tan, D-X. (1993). The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: Antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 17, pp: 347-357.
- Hardeland, R., Pandi-Perumal, S.R. y Cardinali, D.P. (2006). Melatonin. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 38, pp: 313-316.
- Hardeland, R. (2009). Melatonin: signaling mechanisms of a pleiotropic agent. *Biofactors*, 35, pp: 183-192.
- Hattori, A., Migitaka, H., Masayaki, I., Itoh, M., Yamamoto, K., Ohtani-Kaneko, R., Hara, M., Suzuki, I. y Reiter, R.J. (1995). Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 35, pp: 627-634.
- Herxheimer, A. y Petrie, K.J. (2002). Melatonin for the prevention and treatment of jet lag. *Cochrane Database of Systematic Reviews* CD001520.
- Huether, G. (1993). The contribution of extrapineal sites of melatonin synthesis to circulating melatonin levels in higher vertebrates. *Experientia*, 49, pp: 665-670.
- Italia (2013). Ministero de Ila Salute. Altri nutrienti e altre sostanze ad effetto nutritivo o fisiologico. Disponible en: http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pagineAree_1268_listaFile_itemName_4_file.pdf [acceso: 26-05-14].
- Ishii, H., Tanaka, N., Kobayashi, M., Kato, M. y Sakuma, Y. (2009). Gene structures, biochemical characterization and distribution of rat melatonin receptors. *Journal of Physiological Sciences*, 59, pp: 37-47.
- Jahnke, G., Marr, M., Myers, C., Wilson, R., Travlos, G. y Price, C. (1999). Maternal and Developmental toxicity evaluation of melatonin administered orally to pregnant Sprague-Dawley rats. *Toxicological Sciences*, 50, pp: 271-279.
- Lachenmeier, D.W., Steffen, C., El-Atma, O., Maixner, S., Lobell-Behrends, S. y Kohl-Himmelseher, M. (2012). *Regulatory Toxicology Pharmacology*, 64, pp: 286-295.
- Lane, E.A. y Moss, H.B. (1985). Pharmacokinetics of melatonin in man: first pass hepatic metabolism. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 61, pp: 1214-1216.
- Lerner, A.B., Case, J.D., Takahashi, Y., Lee, T.H. y Mori, N. (1958). Isolation of melatonin, a pineal factor that lightens melanocytes. *Journal of the American Chemical Society*, 80, pp: 2587.
- Lerner, A.B., Case, J.D. y Heinzelmann, R.V. (1959). Structure of melatonin. *Journal of the American Chemical Society*, 81, pp: 6085.

- Manchester, L.C., Tan, D-X., Reiter, R.J., Park, W., Monis, K. y Qi, W. (2000). High levels of melatonin in the seeds of edible plant. Possible function in germ tissue protection. *Life Sciences*, 67, pp: 3023-3029.
- Mathes, A.M. (2010). Hepatoprotective actions of melatonin: possible mediation by melatonin receptors. *World Journal of Gastroenterology*, 16, pp: 6087-6097.
- Menendez-Peláez, A. y Reiter, R.J. (1993). Distribution of melatonin in mammalian tissues: The relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *Journal of Pineal Research*, 15, pp: 59-69.
- Pang, S.F., Tang, P.L., Tang, G.W.K., Yam, A.W.C. y Ng, K.W. (1987). Plasma levels of immunoreactive melatonin, estradiol, progesterone, follicle stimulating hormone, and beta-human chorionic gonadotropin during pregnancy and shortly after parturition in humans. *Journal of Pineal Research*, 4, pp: 21-31.
- Peters, A.R. (1992). Endocrine manipulation-toxicological frontiers. *Journal of Reproduction and fertility*, 45 (Suppl), pp: 193-201.
- Reiter, R.J. (1991). Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrine Reviews*, 12, pp: 151-180.
- Reppert, S.M., Godson, C., Mahle, C.D., Weaver, D.R., Slaugenhaupt, S.A. y Gusella, J.F. (1995). Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, pp: 8734-8738.
- Sánchez-Barceló, E.J., Mediavilla, M.D., Tan, D.X. y Reiter, R.J. (2010). Clinical uses of melatonin: evaluation of human trials. *Current Medicinal Chemistry*, 17 (1), pp: 1-25.
- Uchida, K., Okamoto, N., Ohara, K. y Morita, Y. (1996). Daily rhythm of serum melatonin in patients with dementia of the degenerate type. *Brain Research*, 717, pp: 154-159.
- UE (2012). Reglamento (UE) N° 432/2012 de la Comisión, de 16 de mayo de 2012, por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños. DO L 136 de 25 de mayo de 2012, pp: 1-40.
- Vijayalaxmi Reiter, R.J., Tan, D., Herman, T.S. y Thomas Jr., C.R. (2004). Melatonin as a radioprotective agent: a review. *International Journal of Radiation Oncology, Biology and Physics*, 59, pp: 639-653.

8. Metilsulfonilmetano

8.1 Propuesta

La AECOSAN ha propuesto una cantidad máxima diaria para el metilsulfonilmetano de 1 g.

Se han presentado a EFSA distintas declaraciones de propiedades saludables de cantidades entre 0,5 y 1,5 g/día de metilsulfonilmetano, para toda la población en general, que incluyen: (1) contribución a la síntesis de colágeno en cartilago y al mantenimiento normal de las estructuras hueso, articulaciones, dientes, pelo y uñas; (2) regeneración del cartilago; (3) mantenimiento del balance ácido-base en el organismo; (4) fortalecimiento de la función del sistema inmune; (5) fortalecimiento de la función del sistema gastrointestinal; (6) contribución a la síntesis de cisteína; y (7) producción de vitaminas (C, H, B5, B13) que contribuye a una correcta función del metabolismo, aunque ninguna de estas propuestas demostró una relación causa-efecto entre el efecto alegado y la dosis propuesta (EFSA, 2010).

En Italia el metilsulfonilmetano está autorizado en complementos alimenticios sin haberse establecido una cantidad máxima diaria (Italia, 2013). En Bélgica el metilsulfonilmetano está autorizado en complementos alimenticios (Bélgica, 2013).

8.2 Características y fuentes

El metilsulfonilmetano (MSM) (Figura 3), también conocido como dimetil sulfona (DMSO₂) y metil sulfona, es un compuesto orgánico que contiene azufre (34 %), altamente estable incluso a altas temperaturas (275 °C), presente en pequeñas cantidades en una gran variedad de frutas, vegetales, granos de cereales, carne, huevos y pescado (Pearson et al., 1981).

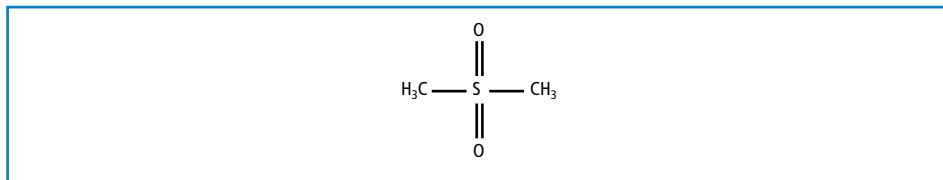


Figura 3. Estructura química del metilsulfonilmetano.

La leche de vaca es la principal fuente de MSM conteniendo 6-8 µg/g (Williams et al., 1966) (Imanaka et al., 1985). Otros alimentos que contienen MSM incluyen café (1,6 µg/g), tomate (0,86 µg/g), té (0,3 µg/g), maíz (0,11 µg/g) y alfalfa (0,07 µg/g), entre otros.

En el hombre se han detectado concentraciones de MSM en rango de 0-25 µmol/l en el plasma y fluido cerebrospinal de individuos sanos (Engelke et al., 2005). El MSM se ha detectado por espectroscopia de resonancia magnética en el tejido cerebral de individuos que consumen MSM como complemento, pero no en aquellos que no lo consumen, por lo que se sugiere que el MSM puede atravesar la barrera hematoencefálica (Rose et al., 2000) (Lin et al., 2001) (Cecil et al., 2002). En el hombre se excretan, aproximadamente, 5-10 mg/día de MSM en la orina.

Se ha estudiado el comportamiento cinético del MSM en ratas, demostrándose que el MSM, tras una dosis única oral de 500 mg/kg peso corporal, se absorbe rápidamente, se distribuye por todo el organismo y se elimina principalmente por excreción renal. Entre los parámetros cinéticos descritos se destaca una semivida de eliminación plasmática de 12 horas; aproximadamente el 85,8 % de la dosis se excreta por orina en 120 horas tras la administración (Magnuson et al., 2007a).

El papel biológico del MSM no está del todo elucidado, se considera como un compuesto bioactivo y una fuente de azufre para la producción de aminoácidos que contienen azufre tales como cisteína y metionina (Parcell, 2002).

8.3 Nutrición y metabolismo

El MSM es un metabolito del dimetilsulfoxido (DMSO). En la troposfera, DMSO es un producto de biotransformación formado a partir del fitoplancton y de las algas. En la producción comercial, el MSM se sintetiza a partir de la reacción del DMSO con peróxido de hidrógeno, lo que conduce a MSM y agua. En el hombre, aproximadamente un 15 % de la dosis ingerida de DMSO se metaboliza en MSM (Hucker et al., 1967). Ambos compuestos pueden actuar a través de su capacidad como estabilizantes de membranas y como barreos de radicales hidroxilo libres; se ha sugerido que el azufre que forma parte de su molécula podría intervenir en la formación de cartilago (Parcell, 2002).

8.4 Seguridad

Existen en la literatura diversos ensayos clínicos (doble-ciego y placebo controlado, multicentros) para evaluar la eficacia y seguridad del MSM en pacientes con osteoartritis (desorden caracterizado por ruptura progresiva del cartilago articular). En el caso de osteoartritis, media-moderada, de rodilla, Usha y Naidu (2004) evaluaron el efecto del MSM sobre el alivio del dolor por movimiento en 118 pacientes a dosis de 1,5 g/día durante 12 semanas. El único efecto adverso detectado, diarrea, solo se presentó en un 5 % de los pacientes tratados. Kim et al. (2006) evaluaron también en 29 pacientes con osteoartritis media-moderada de rodilla, el efecto del MSM (dosis oral de 2 a 5 g/día, durante 12 semanas) sobre el dolor al movimiento, observándose un efecto paliativo estadísticamente significativo. Los efectos adversos fueron menores y principalmente relacionados con el tracto gastrointestinal. Posteriormente, Brien et al. (2008) evaluaron seis estudios con 681 pacientes con osteoartritis de rodilla (tratados con DMSO) y 168 tratados con MSM, donde observaron de forma significativa menor dolor al movimiento, pero en estos ensayos clínicos no se concluye la dosis óptima y el periodo de dosificación. En todos los ensayos clínicos realizados la aparición de efectos adversos por MSM es inexistente o mínima y están relacionados con el tracto gastrointestinal.

Con respecto a la seguridad del MSM a nivel experimental, se han realizado en ratas ensayos de toxicidad aguda, dosis límite, vía oral de 2,0 g/kg peso corporal, y dosis vía oral de 1,5 g/kg peso corporal en ensayos de toxicidad subcrónica de 90 días (dosis 15 veces la dosis máxima recomendada en humanos de 6 g/día equivalente a 0,1 g/kg peso corporal (60 kg) como terapéutico (Horvath et al., 2002) y dosis de 60 veces la dosis máxima recomendada en humanos de 1,5 g/día equivalente a 0,025 g/kg peso corporal (60 kg) como suplemento). En ambos ensayos no se observó ningún efecto adverso o mortalidad, efectos clínicos de toxicidad, efectos sobre la ganancia de peso corporal, alteraciones en los parámetros hematológicos y bioquímicos, la necropsia no reveló lesiones patológicas, ni se observaron alteraciones en los pesos de los órganos, ni en la histopatología de los órganos. Se estableció un NOAEL subcrónico para el MSM de 1,5 g/kg/día (Horvath et al., 2002). En base a este estudio, extrapolando este NOAEL al hombre (60 kg de peso corporal) y tomado un factor de seguridad de 100, tendríamos una cantidad máxima diaria de 0,9 g \approx 1 g para el MSM como complemento. Otro estudio a nivel experimental es el desarrollado por Magnuson et al. (2007b) donde se determina la toxicidad potencial en el desarrollo del MSM en ratas hembras gestantes tratadas durante el periodo de organogénesis e histogénesis. El MSM fue administrado oralmente por gavage; dosis orales de 50, 250, 500 y 1 000 mg/kg/día, durante los días 6 al 20 de gestación, no originándose toxicidad maternal, no se observó ninguna anomalía en la formación fetal, ni malformaciones en tejidos esqueléticos. El NOAEL para la toxicidad maternal y del desarrollo para el MSM fue 1g/kg/día (Magnuson et al., 2007b). En base a este estudio, extrapolando este NOAEL al hombre (60 kg de peso corporal) y tomado un factor de seguridad de 100, tendríamos una cantidad máxima diaria de 0,6 g para el MSM como complemento.

La genotoxicidad del MSM también ha sido evaluada en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Lee et al., 2006). El MSM no indujo reversión en *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535 or TA1538 a concentraciones de 10 000 µg/placa con y sin fracciones de S9. No se observó ninguna capacidad del MSM (hasta concentraciones de 5 000 µg/ml) para inducir daño cromosómico en los ensayos *in vitro* de aberración cromosómica en células CHL con y sin fracciones S9. Similarmente, no se observó genotoxicidad en médula ósea de ratones tratados con 5 000 mg MSM/kg.

Todos estos estudios a nivel experimental y los realizados en ensayos clínicos en humanos, soportan la evidencia de seguridad del uso del MSM a las dosis recomendadas.

8.5 Conclusión

Con la información disponible actualmente, el Comité Científico considera que no hay evidencias científicas que relacionen el consumo de metilsulfonilmetano con el desarrollo de efectos adversos.

Por ello, el Comité Científico concluye que, en función de la información disponible en la actualidad y teniendo en cuenta las consideraciones generales reflejadas en el presente informe, la propuesta de la AECOSAN de una cantidad máxima diaria de 1 g de metilsulfonilmetano es aceptable desde el punto de vista de la seguridad en su uso como complemento alimenticio.

Referencias

- Bélgica (2013). Novel foods. Indicative list of plants/plant parts/ substances and their novel food status (non-exhaustive list). Substances not novel food supplements. Federal Public Service (FPS) Health, Food Chain Safety and Environment. Disponible en: <http://www.health.belgium.be/eportal/foodsafety/foodstuffs/novelfoods/index.htm> [acceso: 4-12-13].
- Brien, S., Prescott, P., Bashir, N., Lewith, H. y Lewith, G. (2008). Review. Systematic review of the nutritional supplements dimethyl sulfoxide (DMSO) and methylsulfonylmethane (MSM) in the treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 16, pp: 1277-1288.
- Cecil, K.M., Lin, A., Ross, B.D. y Egelhoff, J.C. (2002). Methylsulfonylmethane observed by in vivo proton magnetic resonance spectroscopy in a 5-year-old child with developmental disorder: effects of dietary supplementation. *Journal of Computer Assisted Tomography*, 26, pp: 818-820.
- EFSA (2010). European Food Safety Authority. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to methylsulfonylmethane (MSM) and contribution to normal collagen formation (ID 353, 388, 389, 394, 1695, 1741, 1874), maintenance of normal hair (ID 353, 1741, 1874), maintenance of normal nails (ID 1695, 1741, 1874), maintenance of normal acid-base balance (ID 387), "strengthens the immune system function" (ID 390), maintenance of normal bowel function (ID 391), contribution to the normal cysteine synthesis (ID 392) and "vitamin production needed for correct function of metabolism" (ID 393) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *The EFSA Journal*, 8 (10): 1746, pp: 1-22.
- Engelke, U.F.H., Tangerman, A., Willemsen, M.A.A.P., Moskau, D., Loss, S., Mudd, H. y Wevers, R.A. (2005). Dimethyl sulfone in human cerebrospinal fluid and blood plasma confirmed by one-dimensional ¹H and two dimensional ¹H-¹³C NMR. *NMR in Biomedicine*, 18, pp: 331-336.
- Horvath, K., Noker, P.E., Somfai-Relle, S., Glavits, R., Financsek, I. y Schauss, A.G. (2002). Toxicity of methylsulfonylmethane in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 40, pp: 1459-1462.
- Hucker, H.B., Miller, J.K., Hochberg, A., Brobyn, R.D., Riordan, F.H. y Calesnick, B. (1967). Studies on the absorption, excretion and metabolism of dimethylsulfoxide (DMSO) in man. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 155, pp: 309-317.
- Imanaka, M., Matsunaga, K. e Ishida, T. (1985). Gas chromatography-mass spectroscopy identification of dimethyl sulfone in cow's milk and other livestock products. *Journal of Pesticide Science*, 10, pp: 549-554.
- Italia (2013). Elenco sostanze ad effetto nutritivo o fisiologico impiegabili negli integratori alimentari. Disponible en: http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pagineAree_1268_listaFile_itemName_4_file.pdf [acceso: 4-12-13].
- Kim, L.S., Axelrod, L.J., Howard, P., Buratovich, N. y Waters, R.F. (2006). Efficacy of methylsulfonylmethane (MSM) in osteoarthritis pain of the knee: a pilot clinical trial. *Osteoarthritis and Cartilage*, 14, pp: 286-294.

- Lee, Y., Lee, Y., Park, J., Lee, K.B. y You, K. (2006). Evaluation of genotoxicity on plant-derived dietary sulfur. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, pp: 817-820.
- Lin, A., Nguy, C.H., Shic, F. y Ross, B.D. (2001). Accumulation of methylsulfonylmethane in the human brain: identification by multinuclear magnetic resonance spectroscopy. *Toxicology Letters*, 123, pp: 169-177.
- Magnuson, B.A., Appleton, J. y Ames, G.B. (2007a). Pharmacokinetics and distribution of [³⁵S] methylsulfonylmethane following oral administration to rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (3), pp: 1033-1038.
- Magnuson, B.A., Appleton, J., Ryan, B. y Matulka, R.A. (2007b). Oral developmental toxicity study of methylsulfonylmethane in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 45, pp: 977-984.
- Parcell, S. (2002). Sulfur in human nutrition and applications in medicine. *Alternative Medicine Review*, 7 (1), pp: 22-44.
- Pearson, T.W., Dawson, H.J. y Lackey, H.B. (1981). Natural occurring levels of dimethyl sulfoxide in selected fruits, vegetables, grains, and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29, pp: 1089-1091.
- Rose, S.E., Chalk, J.B., Galloway, G.J. y Doddrell, D.M. (2000). Detection of dimethyl sulfone in the human brain by in vivo proton magnetic resonance spectroscopy. *Magnetic Resonance Imaging*, 18, pp: 95-98.
- Usha, P. y Naidu, M. (2004). Randomised, double-blind, parallel, placebo-controlled study of oral glucosamine, methylsulfonylmethane and their combination in osteoarthritis. *Clinical Drug Investigation*, 24, pp: 353-363.
- Williams, K.I.H., Burstein, S.H. y Layne, D.S. (1966). Dimethyl sulfone: isolation from cows' milk. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 122, pp: 865-866.

9. Polifenoles del aceite de oliva y de las hojas y frutos del olivo

9.1 Propuesta

La AECOSAN ha propuesto una cantidad máxima diaria para los polifenoles de aceite de oliva y de las hojas y frutos del olivo (en adelante, polifenoles del olivo) de 5 mg.

Esta propuesta se ha basado en la dosis efectiva sobre la salud de los polifenoles del olivo (fruto, agua residual de la molienda de la aceituna o "alperujo"¹, aceite de oliva, extractos de hoja de *Olea europea* L.). Concretamente esta dosis es la que se recomienda para su acción protectora de la LDL frente al daño oxidativo (EFSA, 2011).

9.2 Características y fuentes

Los compuestos fenólicos del olivo son compuestos del metabolismo secundario de la planta que se sintetizan en respuesta a distintas situaciones de estrés, ataques de patógenos y daños producidos por insectos. La denominación de compuestos fenólicos es más apropiada, puesto que no todos los compuestos a considerar son polifenólicos y será la utilizada en este informe.

Los compuestos fenólicos mayoritarios del olivo son la oleuropeína glicósido, el hidroxitirozol y el tirozol. La oleuropeína está formada por hidroxitirozol y ácido elenóico. Hay otros fenoles minoritarios como el ligstrosido, taninos, etc. (Tuck y Hayball, 2002) (Bendini et al., 2007).

La oleuropeína pertenece a un grupo de compuestos fenólicos, los secoiridoides, que solo se encuentran, de forma abundante, en la familia Oleaceae, que incluye la especie *Olea europea* L., el olivo. Se originan a

¹Alperujo: también conocido como alpeorujo, es un subproducto obtenido mediante el sistema continuo de extracción de dos fases del aceite de oliva virgen. Es la mezcla de: aguas de vegetación o alpechines; partes sólidas de la aceituna, como el hueso, el mesocarpio y la piel; y restos grasos.

partir de los terpenos en el metabolismo secundario de la planta y normalmente están glicosilados. En general están formados por un fenil-etil alcohol (hidroxitirosol y tirosol), ácido elenólico y, eventualmente, un residuo glicosídico. La oleuropeína en concreto es un éster del hidroxitirosol y el glucósido del ácido elenólico (Bendini et al., 2007) (Taamalli et al., 2012).

Las fuentes de compuestos fenólicos del olivo son los extractos de hojas, el "alperujo" que es la fracción acuosa obtenida en el proceso de obtención del aceite de oliva virgen y el propio aceite de oliva virgen (Biagi et al., 2014). Existen ligeras diferencias en el perfil aunque los mayoritarios en todos ellos son los secoiridoides y en concreto la oleuropeína con sus dos fenil-etil alcoholes el hidroxitirosol y el tirosol en menor proporción.

Los secoiridoides (la oleuropeína) en la forma aglicona presentes en el aceite de oliva virgen provienen de los glicósidos presentes en el fruto por hidrólisis realizada por β -galactosidasas endógenas durante el proceso de obtención del aceite (molienda y batido). Son anfifílicos y se reparten entre la capa oleosa y el agua de vegetación, estando más concentrados en esta última por el carácter polar de sus grupos funcionales. Durante el almacenamiento del aceite de oliva virgen se produce una hidrólisis de la oleuropeína aumentando el contenido en fenoles simples como el hidroxitirosol (mayoritario) y del ligstrosido aglicona, que contiene tirosol y ácido elenólico (Taamalli et al., 2012) (Biagi et al., 2014).

Sin embargo, existen claras diferencias en el aspecto cuantitativo ya que la oleuropeína supone entre el 0,005 y 0,12 % en el aceite de oliva virgen, el 0,87 % en el "alperujo" y entre el 1 y 4 % en las hojas. De mayor a menor contenido en compuestos fenólicos tendríamos las hojas, el alperujo y el aceite de oliva virgen (El y Karakaya, 2009) (Biagi et al., 2014).

El contenido total de compuestos fenólicos en las tres fuentes obtenidas del olivo es muy variable y depende de numerosos factores como la variedad de olivo, las condiciones climáticas y la humedad, entre otras. En las hojas, el contenido total de compuestos fenólicos es de 2 058 mg GAE (Equivalentes de Ácido Gálico)/kg. En el aceite virgen de oliva el contenido en fenólicos varía entre 100 y 800 mg/kg dependiendo de numerosos factores intrínsecos a la aceituna o externos. En los extractos del fruto, tras el proceso de extracción de la fase oleosa, la concentración oscila entre 2 000 y 8 000 mg de GAE/kg de extracto acuoso (Taamalli et al., 2012) (Biagi et al., 2014).

Se debe aclarar que la mayoría de los datos obtenidos sobre compuestos fenólicos, especialmente los obtenidos en humanos, se refieren a estudios en los que la fuente dietética fue el aceite de oliva virgen, siendo los datos de fenólicos del "alperujo" y otros extractos de pulpa de aceituna y hojas de olivo minoritarios ya que no se incluyen en una dieta habitual de la población y solo se utilizan en complementos alimenticios o en enriquecimiento de otros alimentos. En cualquier caso las moléculas mayoritarias, desde el punto de vista cualitativo, contenidas en las tres fuentes citadas son semejantes con variaciones en la cantidad y proporción debidas a los procesos tecnológicos utilizados (Tuck y Hayball, 2002) (El y Karakaya, 2009) (Taamalli et al., 2012) (Biagi et al., 2014).

Los compuestos fenólicos del olivo, y especialmente los del aceite de oliva virgen tienen un papel relevante en la estabilidad y atributos sensoriales (amargor y picor, principalmente). Sin embargo, las propiedades más demandadas y actualmente en estudio son su papel como moléculas antioxidantes naturales actuando sobre el estrés oxidativo del organismo originado por la generación de radicales libres del oxígeno, también poseen la capacidad de inhibir la proliferación de muchos microorganismos

patógenos. Así por ejemplo, se ha probado su papel positivo en la prevención de las enfermedades cardiovasculares por su acción evitando la oxidación de las LDL, también inhiben la agregación plaquetaria, tienen una acción antineoplásica por sus propiedades apoptóticas y ejercen una acción sobre el crecimiento de microorganismos patógenos respiratorios y gastrointestinales (Cicerale et al., 2010) (Sabatini, 2010) (Hu et al., 2014).

9.3 Nutrición y metabolismo

La ingesta alimentaria de compuestos fenólicos del olivo tiene como principales fuentes el aceite de oliva virgen y las aceitunas de mesa. Precisamente por el alto consumo de aceite de oliva virgen, las poblaciones mediterráneas de Grecia, Italia y España son las que tienen una mayor ingesta, con 18, 13 y 11 kg de aceite de oliva virgen/año/persona. Si consideramos una ingesta media de aceite de oliva virgen entre 30 y 50 g/día (aderezo y cocinado) y un contenido medio de unos 180 mg/kg, la ingesta de estos componentes alimentarios sería de 9; 7,5 y 5,5 mg/día. En la cohorte PREDIMED la ingesta de fenoles totales en la población española fue de 820 ± 323 mg/día de los que 22 ± 11 mg/día proceden del aceite de oliva y $68,5 \pm 104,0$ mg/día de aceitunas. En total, los fenoles procedentes del olivo supondrían el 11,0 % de los fenoles totales ingeridos (Tuck y Hayball, 2002) (Vissiers et al., 2004) (Tresserra et al., 2013).

Los estudios en animales y humanos muestran que los compuestos fenólicos del olivo (del aceite de oliva virgen, de los extractos acuosos de pulpa y extractos de hoja), son bien absorbidos en el intestino delgado tanto en animales de experimentación como en humanos ya que aparecen en plasma y orina después de su ingesta. Los datos de que disponemos acerca de su absorción y metabolismo se refieren a los fenoles mayoritarios en el olivo, oleuropeína, ligustrósido (secoiridoides) glicosilados o agliconas, hidroxitirosol y tirosol.

Su contenido y las proporciones en los distintos productos del olivo difieren como consecuencia de los procesos a los que están sometidos y a los que antes se ha hecho referencia en el apartado de características y fuentes.

Los datos de concentraciones plasmáticas tras la ingesta de aceite de oliva virgen son muy variables entre individuos y entre estudios debido al producto ingerido (aceite de oliva virgen, extractos de hoja, etc.), al tratamiento de las muestras y a las técnicas analíticas utilizadas. Así, Rubió et al. (2012) observan, en humanos, que tras la ingesta de 30 ml de distintos aceite de oliva virgen con diferente contenido en fenoles (250, 500 y 750 mg de fenoles totales/kg), lo que se corresponde con una ingesta de 6,9; 13,8 y 20,7 g, se detectan en plasma entre 0 y 6 horas tras la ingesta distintos metabolitos entre los que están: el sulfato de hidroxitirosol (HyTy), acetato sulfato de HyTy, ácido homovanílico y sulfato de ácido homovanílico. Presentan un T_{max} entre 1 y 2 horas (entre 45 y 120 minutos para todos los metabolitos) por lo que su absorción es rápida. Las formas conjugadas con glucurónico no se detectan. Tanto para el área bajo la curva (AUC) como para la C_{max} existe una relación dosis-respuesta lineal entre los aceites, aunque entre las concentraciones medias y altas no existen diferencias significativas en estas dos variables lo que atribuyen a la alta variabilidad interindividual y a la modulación de las enzimas de Fase II (SNPs, epigenética o genética) (Rubió et al., 2012). En estudios previos, siempre con aceite de oliva virgen, se observó que al incrementar la cantidad de fenoles del aceite de oliva ingeridos, la concentración de HyTy conjugado con glucurónido aumentaba de manera dosis dependiente (Vissiers et al., 2004).

La fracción de metabolitos de HyTy en plasma respecto a la ingerida es similar en los aceites de bajo, medio y alto contenido en fenólicos y varía entre el 17 y el 23 % (Rubió et al., 2012). Otros autores indican una cifra de recuperación en orina de los fenoles ingeridos que oscila entre el 5 y el 72 %, la mayoría en forma de glucuronido-conjugados (Vissiers et al., 2004). Los estudios de Visioli et al. (2003) administrando HyTy presentan datos de recuperación en orina de este fenol simple y de su metabolito, el ácido homovanílico, del 44 % del HyTy total administrado y del 234 % del HyTy libre administrado. En humanos la elevada excreción de HyTy libre (más del 100 %) sugiere la hidrólisis de la OE. También concluyen que la excreción de HyTy en humanos es mayor cuando se administra como componente natural del aceite de oliva virgen (44 % del HyTy) que tras administración adicionado al aceite de oliva refinado (23 % del HyTy) o añadido a yogur (5,8 % de la dosis). Esta gran variabilidad pudiera relacionarse, también, con las diferentes aproximaciones en la determinación de la excreción urinaria y las diferentes técnicas analíticas utilizadas, como antes se mencionó.

La presencia en plasma y orina de ácido homovanílico y sus conjugados con sulfato indica la actuación de la Catecol-O-metil transferasa (COMT), enzima que también interviene en el metabolismo de las catecolaminas.

En el estudio de García-Villalba et al. (2013), en humanos se administró 250 mg de un extracto de hojas de olivo rico en oleuropeína. Estos autores afirman que durante la absorción de la oleuropeína, esta es, casi totalmente, hidrolizada en el tracto gastrointestinal apareciendo su principal producto de hidrólisis el HyTy en sangre como glucurónido conjugado en los primeros 30 minutos tras la ingesta del extracto. Estos autores detectan en plasma 15 metabolitos la mayoría conjugados con glucurónido lo que contrasta con otros estudios que no detectan estos compuestos y si los conjugados con sulfato (Rubió et al., 2012).

El patrón de absorción de los diferentes compuestos fenólicos en plasma fue muy similar. El mecanismo de absorción no está claro y hay diferentes hipótesis para diferentes clases de compuestos fenólicos. Se han propuesto mecanismos de difusión pasiva bidireccional según algunos autores en ensayos *in vitro* con células Caco-2 (Manna et al., 2000) y transcelular, paracelular o vía transportadores de glucosa para el HyTy y OE, respectivamente. Basándose en los resultados de Manna et al. (2000) puede pensarse que, en humanos, el HyTy se absorbe completamente (100 %). Bonanome et al. (2000), administrando 100 g de aceite de oliva virgen, concluyen que su absorción no se realiza a través de la formación de quilomicrones pudiendo ejercer *in vivo* un efecto antioxidante probablemente en el periodo postprandial.

Tras la administración de HyTy marcado, el 90 % de la radioactividad administrada se detectó en orina dentro de las 5 horas siguientes y solo el 5 % en heces. Los sulfo-conjugados representaron una importante fracción de la radioactividad total y además son los principales productos de excreción urinaria. Basados en estos resultados los autores proponen que en el metabolismo del HyTy exógeno intervienen la COMT, alcohol deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa y fenol-sulfo-transferasa (D'Angelo et al., 2001).

La cinética de excreción urinaria fue, igualmente, similar para la mayoría de los compuestos. La máxima tasa de excreción urinaria se alcanzaba en las primeras 4 horas, y después se observa un descenso rápido a valores basales con excepción de los metabolitos sulfatados cuya excreción no se completó a las 24 horas de la ingesta de un extracto de hoja de olivo (García-Villalba et al., 2013). Miró-Casas et al. (2003a)

y Miró-Casas et al. (2003b), en estudios con una sola dosis y en consumo a corto plazo de aceite de oliva virgen, obtienen las máximas concentraciones plasmáticas de HyTy y 3-o-metil HyTy a los 32 y 53 minutos tras su ingestión y una vida media de eliminación de 2,43 horas con una concentración máxima de 26 µg/l. Debido a que el HyTy aparece en plasma y orina en un 98 % en formas conjugadas, se sugiere un primer paso que incluye metabolismo intestinal y hepático del HyTy ingerido.

Algunos autores han descrito diferencias en la absorción y metabolismo de los fenólicos de los extractos de hojas entre géneros y estado hormonal, estas últimas en un estudio en mujeres pre y postmenopáusicas (De Bock et al., 2013).

9.4 Seguridad

En una reciente publicación (Martin y Apple, 2010) se alerta del potencial efecto nocivo de un exceso en la ingesta de antioxidantes tras su ingesta como productos concentrados, purificados o enriquecidos con diferentes moléculas antioxidantes formando parte de complementos alimenticios. En ciertas condiciones como altas concentraciones de compuestos fenólicos, pH elevado o la presencia de hierro, estos compuestos pueden entrar en un proceso de autooxidación y comportarse como prooxidantes. Existen pruebas de este comportamiento, por ejemplo, en compuestos fenólicos del té verde como la epigallocatequina galato. En ciertas condiciones este fenólico genera peróxido de hidrógeno (H_2O_2) e induce procesos de oxidación, observándose una cierta toxicidad hepática.

En este marco, se han realizado diferentes estudios sobre la toxicidad de distintos fenoles obtenidos y purificados de diferentes partes del olivo (especialmente HyTy) así como de extractos de la pulpa de la aceituna (extractos acuosos) y de la hoja del olivo.

La evaluación más completa de aspectos de seguridad se ha llevado a cabo con un extracto acuoso de pulpa de aceituna (Soni et al., 2006). En toxicidad aguda no se observan efectos deletéreos para dosis entre 1 000 y 2 000 mg/kg del extracto, siendo la DL50 > 2 000. Con dosis superiores de 5 000 mg/kg administradas durante 29 días los test de micronúcleos no presentan resultados negativos siendo la DL50 > 5 g/kg. Tampoco se observan cambios patológicos en órganos a estas dosis administradas durante 14 días. Los estudios de toxicidad subcrónica han establecido una NOAEL de 2 000 mg/kg del extracto que se corresponde con 120 mg/kg/día de fenólicos totales ingeridos. En ellos se observan algunas incidencias pero no atribuibles al extracto o banales. Respecto a la toxicidad reproductiva y del desarrollo tampoco encuentran daños hasta dosis de 2 000 mg/kg del extracto estableciendo un NOAEL > 2 000 mg/kg (Soni et al., 2006).

Por último, los ensayos de genotoxicidad *in vitro* utilizando varias cepas de *S. tiphymurium* y *E. coli* y con dosis de hasta 5 000 µg/placa encuentran algunos casos que ofrecen evidencias equívocas de actividad mutagénica en dos cepas de *S. tiphymurium*. En otro estudio de aberraciones cromosómicas con hamsters chinos y dosis de hasta 1 000 µg/ml los extractos mostraron positivos en la inducción de aberraciones cromosómicas a la dosis máxima. Los ensayos *in vivo* mediante ensayos de micronúcleos en ratas CrI: CD® Sprague Dawley no muestran efectos reseñables con dosis entre 1 000 y 500 mg/kg/día durante 28 días y entre 1 000 y 2 000 mg/kg en dosis únicas (Soni et al., 2006).

En un estudio realizado en 2003 acerca de la citotoxicidad *in vitro* en células normales y cancerosas de la boca y glándulas salivales de algunos compuestos fenólicos del aceite de oliva (Babich y Visioli, 2003),

los autores concluyen que a las concentraciones en las que se encuentran los fenólicos ensayados en el aceite de oliva no existen evidencias de efectos citotóxicos e incluso en concentraciones muy superiores.

En una reciente publicación se ha evaluado la toxicidad del HyTy a dosis de 5, 50 y 500 mg/kg/día, uno de los compuestos fenólicos mayoritario en los productos del olivo (aceite virgen, aceitunas, hoja, alperujo) (Auñón et al., 2013). Tras el análisis de los efectos funcionales, histopatológicos, hematológicos, clínicos, los autores proponen un NOAEL de 500 mg/kg/día. Los estudios de genotoxicidad *in vitro* muestran que el HyTy no es genotóxico a las dosis fisiológicas habituales. No tenemos datos de la genotoxicidad *in vivo*. Un estudio realizado con *Drosophila* descarta la genotoxicidad de los fenólicos del aceite de oliva virgen (Anter et al., 2010). Los estudios de seguridad para extractos de hojas son escasos. Aunque no se han descrito efectos adversos serios, si se han observado algunos trastornos leves (tos, vértigo, dolor de cabeza y tos) y reacciones alérgicas. Un informe de la Agencia Europea del Medicamento desaconseja su uso en individuos con litiasis biliar debido a que pueden precipitar la aparición de cólicos biliares. También informa de que no existen estudios para su administración a niños y mujeres gestantes y en lactación por la falta de datos en estas poblaciones (European Medicines Agency, 2011).

Un estudio realizado con alpechín y los compuestos fenólicos que contiene (El Hajjouji et al., 2007) muestra efectos genotóxico del alpechín, la oleuropeína y el ácido gálico en ensayos sobre aberraciones cromosómicas de *Vicia faba* (micronúcleos).

9.5 Conclusión

En conjunto los estudios muestran una baja toxicidad y por tanto una alta seguridad de los compuestos fenólicos procedentes del olivo aunque algunos estudios alertan de su posible papel prooxidante a altas concentraciones y determinadas condiciones ambientales (alto pH y presencia de hierro). Además, la ingesta de compuestos antioxidantes en la dieta habitual puede ser alta, en especial en un patrón de dieta mediterránea con alto consumo de alimentos ricos en antioxidantes (frutas, verduras y hortalizas, etc.). Creemos que la dosis propuesta de 5 mg/día, que coincide con la recogida en el informe de EFSA sobre los biofenoles del aceite de oliva virgen y su papel evitando la oxidación de las partículas de LDL y, por tanto, previniendo el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, es adecuada para su ingesta como complemento alimenticio.

Por ello, el Comité Científico concluye que, en función de la información disponible en la actualidad y teniendo en cuenta las consideraciones generales reflejadas en el presente informe, la propuesta de la AECOSAN de una cantidad máxima diaria de 5 mg de compuestos fenólicos de aceite de oliva y de las hojas y frutos del olivo es aceptable desde el punto de vista de la seguridad en su uso como complemento alimenticio.

Referencias

- Anter, J., Campos-Sánchez, J., Hamss, R.E., Rojas-Molina, M., Muñoz-Serrano, A., Analla, M. y Alonso-Moraga, A. (2010). Modulation of genotoxicity by extra-virgin olive oil and some of its distinctive components assessed by use of the *Drosophila* wing-spot test. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 703 (2), pp: 137-142.
- Auñón-Calles, D., Canut, L. y Visioli, F. (2013). Toxicological evaluation of pure hydroxytyrosol. *Food and Chemical Toxicology*, 55, pp: 498-504.

- Babich, H. y Visioli, F. (2003) In vitro cytotoxicity to human cells in culture of some phenolics from olive oil. *Il Farmaco*, 58 (5), pp: 403-407.
- Bendini, A., Cerretani, L., Carrasco-Pancorbo, A., Gómez-Caravaca, A.M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. y Lercker, G. (2007). Phenolic Molecules in Virgin Olive Oils: a Survey of Their Sensory Properties, Health Effects, Antioxidant Activity and Analytical Methods. An Overview of the Last Decade. *Molecules*, 12, pp: 1679-1719.
- Biagi, A., Zullo, M., Di Stefano, G., Cioccia, G. y Ciafardin, G. (2014). Evaluation of polyphenol decay in the oily fraction of olive fruit during storage using a mild sample handling method. *European Journal of Lipid Science Technology*, 116, pp: 160-168.
- Bonanome, A., Pagnan, A., Caruso, D., Toia, A., Xamin, A., Fedeli, E., Berra, B., Zamburlini, A., Ursini, F. y Galli, G. (2000). Evidence of postprandial absorption of olive oil phenols in humans. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases*, 10, pp: 111-120.
- Cicerale, S., Lucas, L. y Keast, R. (2010). Biological Activities of Phenolic Compounds Present in Virgin Olive. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, pp: 458-479.
- D'Angelo, S., Manna, C., Migliardi, V., Mazzoni, O., Morrica, P., Capasso, G., Pontoni G., Galletti, P. y Zappia, V. (2001). Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 29, pp: 1492-1498.
- De Bock, M., Thorstensen, E.B., Derraik, J.G.B., Henderson, H.V., Hofman, P.L. y Cutfield, W.S. (2013). Human absorption and metabolism of oleuropein and hydroxytyrosol ingested as olive (*Olea europaea* L.) leaf extract. *Molecular Nutrition and Food Research*, 57, pp: 2079-2085.
- EFSA (2011). European Food Safety Authority. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865), maintenance of normal blood HDL-cholesterol concentrations (ID 1639), maintenance of normal blood pressure (ID 3781), "anti-inflammatory properties" (ID 1882), "contributes to the upper respiratory tract health" (ID 3468), "can help to maintain a normal function of gastrointestinal tract" (3779), and "contributes to body defenses against external agents" (ID 3467) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *The EFSA Journal*, 9 (4), pp: 2033.
- El Hajjouji, H., Pinelli, E., Guisresse, M., Merlina, G., Revel, J.C. y Hafidi, M. (2007). Assessment of the genotoxicity of olive mill waste water (OMWW) with the *Vicia faba* micronucleus test. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 634 (1-2), pp: 25-31.
- El, S.N. y Karakaya, S. (2009) Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. *Nutrition Reviews*, 67 (11), pp: 632-638.
- European Medicines Agency (2011). Committee on Herbal Medicinal Products. Assessment report on *Olea europaea L. folium*, 44, pp: 1-33.
- García-Villalba, R., Larrosa, M., Possemiers, S., Tomás-Barberán, F. y Espín, J.C. (2013). Bioavailability of phenolics from an oleuropein-rich olive (*Olea europaea*) leaf extract and its acute effect on plasma antioxidant status: comparison between pre- and postmenopausal women. *European Journal of Nutrition*, 53 (4), pp: 1015-1027.
- Hu, T., He, X.W., Jiang, J.G. y Xu, X.L. (2014). Hydroxytyrosol and Its Potential Therapeutic Effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 (7), pp: 1449-1455.
- Manna, C., Galletti, P., Maisto, G., Cucciolla, V., Dangelo, S. y Zappia, V. (2000). Transport mechanism and metabolism of olive oil hydroxy- tyrosol in Caco-2 cells. *FEBS Letters*, 470, pp: 341-344.
- Martin, K.R. y Appel, C.L. (2010). Polyphenols as dietary supplements: A double-edged sword. *Nutrition and Dietary Supplements*, 2, pp: 1-12.
- Miró-Casas, E., Covas M.I., Farré-Albadalejo, M., Fitó, M., Ortuno, J., Weinbrenner, T., Roset, P. y de la Torre, R. (2003a). Hydroxytyrosol disposition in humans. *Clinical Chemistry*, 49, pp: 945-952.
- Miró-Casas, E., Covas, M.I., Fitó, M., Farré-Albadalejo, M., Marrugat, J. y de la Torre, R. (2003b). Tyrosol and hydroxy-

- tyrosol are absorbed from moderate and sustained doses of virgin olive oil in humans. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57, pp: 186-190.
- Rubió, L., Valls, R.M., Macià, A., Pedret, A., Giral, M., Romero, M.P. y Motilva, M.J. (2012). Impact of olive oil phenolic concentration on human plasmatic phenolic metabolites. *Food Chemistry*, 135 (4), pp: 2922-2929.
- Sabatini, N. (2010). Recent Patents in Olive Oil Industry: New Technologies for the Recovery of Phenols Compounds from Olive Oil, Olive Oil Industrial by-Products and Waste Waters. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 2, pp: 154-159.
- Soni, M.G., Burdock, G.A., Christian, M.S., Bitler, C.M. y Crea, R. (2006). Safety assessment of aqueous olive pulp extract as an antioxidant or antimicrobial agent in foods. *Food and Chemical Toxicology*, 44 (7), pp: 903-915.
- Taamalli, A., Arraéz-Roman, D., Zarrouk, M., Valverde, J., Segura-Carretero, A. y Fernandez-Gutierrez, A. (2012). The Occurrence and Bioactivity of Polyphenols in Tunisian Olive Products and by-Products: A Review. *Journal of Food Science*, 77 (4), pp: 83-92.
- Tresserra-Rimbau, A., Medina-Remón, A., Pérez-Jiménez, J., Martínez-González, M.A., Covas, M.I., Corella, D., Salas-Salvadó, J., Gómez-Gracia, E., Lapetra, J., Arós F., Fiol, M., Ros, E., Serra-Majem, L., Pintó, X., Muñoz, M.A., Saez, G.T., Ruiz-Gutiérrez, V., Warnberg, J.R., Estruch, R. y Lamuela-Raventós, R.M. (2013). Dietary intake and major food sources of polyphenols in a Spanish population at high cardiovascular risk: the PREDIMED study. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*, 23 (10), pp: 953-959.
- Tuck, K.L. y Hayball, P.J. (2002). Major phenolic compounds in olive oil: Metabolism and health effects. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13 (11), pp: 636-644.
- Vissers, M.N., Zock, P.L. y Katan, M.B. (2004). Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 58 (6), pp: 955-965.
- Visioli, F., Galli, C., Grande, S., Colonnelli, K., Patelli, C., Galli, G. y Caruso, D. (2003). Hydroxytyrosol excretion differs between rats and humans and depends on the vehicle of administration. *Journal of Nutrition*, 133, pp: 2612-2615.