

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos



TESIS DOCTORAL

Viabilidad tecnológica y bioaccesibilidad del ácido fólico incorporado a productos cárnicos convencionales y listos para consumo (RTE) elaborados mediante la aplicación de radiaciones ionizantes

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Irene Galán Trigo

Directoras

M^a Dolores Selgas Cortecero

M^a Luisa García Sanz

Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



VIABILIDAD TECNOLÓGICA Y BIOACCESIBILIDAD DEL ÁCIDO
FÓLICO INCORPORADO A PRODUCTOS CÁRNICOS
CONVENCIONALES Y LISTOS PARA CONSUMO (RTE)
ELABORADOS MEDIANTE LA APLICACIÓN DE RADIACIONES
IONIZANTES

TECHNOLOGICAL VIABILITY AND BIOACCESSIBILITY OF FOLIC ACID
ADDED TO CONVENTIONAL AND READY TO EAT MEAT PRODUCTS
MANUFACTURED USING E-BEAM IRRADIATION TREATMENT

Memoria que, para optar al grado de Doctor, con mención honorífica de
“Doctorado Europeo”, presenta la Licenciada Irene Galán Trigo



Departamento de Nutrición, Bromatología
y Tecnología de los Alimentos
Facultad de Veterinaria

Ciudad Universitaria , s/n. 28040 Madrid
Teléfono: 91 394 3749. Fax: 91 394 37 43

M^a DOLORES SELGAS CORTECERO, Catedrática del Tecnología de los Alimentos y
M^a LUISA GARCÍA SANZ, Profesora titular de Tecnología de los Alimentos, ambas
profesoras de este Departamento

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “**Viabilidad tecnológica y bioaccesibilidad del ácido fólico incorporado a productos cárnicos convencionales y listos para consumo (RTE) elaborados mediante la aplicación de radiaciones ionizantes**”, presentada por Irene Galán Trigo, Licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, para optar al grado de Doctor con mención honorífica de “Doctorado Europeo”, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección conjunta de los que suscriben y autorizan su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal que se nombre a tal fin.

Madrid, 2 de Diciembre de 2011.

Las Directoras de la Tesis Doctoral,

M^a Dolores Selgas Cortecero

M^a Luisa García Sanz



Departamento de Nutrición, Bromatología
y Tecnología de los Alimentos
Facultad de Veterinaria

Ciudad Universitaria , s/n. 28040 Madrid
Teléfono: 91 394 3749. Fax: 91 394 37 43

El trabajo experimental que ha dado lugar a esta memoria ha sido realizado en el Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid financiado mediante los proyectos de investigación:

- Programa **CONSOLIDER-Ingenio 2010**, Ref. CSD 2007-00016: “Productos cárnicos para el siglo XXI: seguros, nutritivos y saludables” .
Acción 4: Diseño de productos cárnicos funcionales saludables y nutritivos con especial mención a embutidos y otros productos curados (Acrónimo FUNCIOCA).
- Programa de Creación y Consolidación de Grupos de Investigación Banco Santander Central Hispano-Universidad Complutense (BSCH-UCM). Ref. GR58/10A. Grupo de Investigación “Tecnologías de alimentos de origen animal”.
- Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT). Ref. AGL2007-6366/A4: “Ingredientes funcionales en matrices cárnicas: viabilidad tecnológica, disponibilidad y efecto de la aplicación de tecnologías emergentes”.
- Programa de Actividades de I+D entre grupos de investigación de la Comunidad de Madrid. Ref CAM.S-0505/AGR-0314: “Tecnologías emergentes y procesado mínimo: aplicación a la seguridad química y microbiológica de alimentos listos para el consumo (RTE)”. (Acrónimo TEMINYSA).

To my husband and my daughter

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my gratitude to the people who has contributed to the development of this dissertation.

To my supervisors Prof. M^a Dolores Selgas and Prof. M^a Luisa García for their help and advices. This work could not have been developed without them. Thank you for helping me in a personal way, every time I have needed and for your friendship.

To the Professors of the Department for accepting me and giving me the opportunity to be part of this great team, specially to Prof. Lorenzo de la Hoz for always having good words and comments for me.

To Prof. Rob Havenaar for accepting me to work at TNO center, for his help, good advices, comments and critics, and for sharing with me comments and chat about mutual hobbies. To all the colleagues of TNO, who shared their time helping me to learn new things. Specially, thank you to Hans and Marjorie.

To my best friend and colleague Carmen for her unconditional help, working everyday together in the lab, sharing good moments and jokes. Thank you for sharing unforgettable good and bad moments, which have made possible this big friendship. Thanks “Zia Carmen”.

To my colleagues, for doing everyday easier and funny in the department.

To all the students who helped me to perform the experiments for the development of this thesis and the good moments that we shared.

To my very good friends, Silvia, Mercedes, Gema, Baldo and Rufi, for supporting me, even when we cannot be together as much as desired.

To my family, for being always by my side and encouraging me to continue forward, even when you don't want. Specially to my father, who perfectly knows how hard is the development of a Ph.D. dissertation.

To my husband Victor, for supporting me patiently, in good and bad moments, for sharing his life with me, and making me feel all his love. Thanks for being special.

Finally, to the most special little person, my baby Lucía. For being my life.

I would also like to thank to IONISOS IBERICA S.A., where the irradiation treatment was performed. To Olga Melero, the manager, and the technicians for their technical and economical support, and the kindness always given to our team.

ÍNDICE

SUMMARY	15
1. Introducción	
1.1. Alimentos funcionales	
1.1.1. Historia.	21
1.1.2. Evolución de los alimentos funcionales.	25
1.1.3. Declaraciones de salud.	30
1.1.4. Actitud de los consumidores frente a los alimentos funcionales.	37
1.1.5. Diseño y desarrollo de alimentos funcionales.	39
1.1.6. Las vitaminas como ingrediente funcional.	42
1.2. Ácido fólico	
1.2.1. Antecedentes.	43
1.2.2. Estructura, bioquímica y metabolismo.	44
1.2.3. Importancia del ácido fólico: prevención de enfermedades.	52
1.2.4. Estabilidad.	56
1.2.5. Métodos de análisis.	59
1.2.6. Biodisponibilidad del ácido fólico.	61
1.2.7. Fortificación de alimentos con ácido fólico.	69
1.3. Productos cárnicos funcionales	72
1.4. Productos listos para el consumo (<i>Ready-To-Eat</i> , RTE)	77
1.4.1. Métodos no térmicos de descontaminación.	80
1.4.2. Irradiación ionizante.	82
1.4.3. Efecto sobre los microorganismos.	84
1.4.4. Efectos sobre los alimentos.	86
1.4.5. Irradiación de productos cárnicos.	88
1.5. Legislación relativa al tratamiento de irradiación	90

2. Justificación y objetivos	99
3. Material y Métodos	
3.1. Material de laboratorio y Planta Piloto	109
3.2. Reactivos y disolventes	110
3.3. Fabricación de productos cárnicos	111
3.3.1. Proceso de elaboración de productos cárnicos crudos.	111
3.3.2. Proceso de elaboración de productos cárnicos cocidos.	111
3.3.3. Proceso de elaboración de productos cárnicos madurados.	113
3.4. Irradiación	114
3.5. Material y métodos generales	
3.5.1. Determinación de la actividad de agua (aw).	114
3.5.2. Medida del pH.	114
3.5.3. Recuentos microbiológicos.	115
3.5.4. Estimación del color.	115
3.5.5. Análisis de textura.	117
3.5.5.1. Ensayo de doble compresión (TPA).	117
3.5.5.2. Ensayo de corte.	119
3.5.6. Análisis sensorial	120
3.5.6.1. Panel de catadores.	121
3.5.6.2. Preparación de las muestras.	121
3.5.6.3. Prueba hedónica.	122
3.5.6.4. Prueba preferencial.	123
3.5.7. Análisis estadístico	123
3.5.8. Cuantificación del ácido fólico	126

3.6. Bioaccesibilidad	127
4. Resumen de artículos sobre el estudio de la viabilidad tecnológica de la fabricación de productos cárnicos RTE, enriquecidos con ácido fólico	133
5. Publicaciones sobre el estudio de la viabilidad tecnológica de la fabricación de productos cárnicos RTE, enriquecidos con ácido fólico	139
5.1. Effects of irradiation on hamburgers enriched with folic acid. <i>Meat Science</i> 84, (2010), 437–443.	143
5.2. Effects of ionising irradiation on quality and sensory attributes of ready-to-eat dry fermented sausages enriched with folic acid. <i>International Journal Food Science and Technology</i> 46, (2011), 469–477.	153
5.3. Irradiation is useful for manufacturing ready-to-eat cooked meat products enriched with folic acid. <i>Meat Science</i> 87, (2011), 330–335.	165
5.4. Effects of the storage time on the folic acid content of enriched ready-to-eat meat products. <i>Radiation, Physics and Chemistry</i> . Under review.	173
6. Resumen de artículos sobre el estudio de la bioaccesibilidad del ácido fólico en productos cárnicos RTE	183
7. Publicaciones sobre el estudio de la bioaccesibilidad del ácido fólico en productos cárnicos RTE	191
7.1. Bioaccessibility of folic acid added to ready-to-eat meat products. <i>Fleiswirstchaft</i> . Accepted, 2012.	195
7.2. Effect of e-beam treatment on the bioaccessibility of the folic acid incorporated to ready to eat meat products.	205

LWT- Food Science and Technology. Under review.

8. Discusión general	219
8.1. Viabilidad tecnológica del ácido fólico como ingrediente funcional de productos cárnicos convencionales y RTE	221
8.1.1. Contenido de ácido fólico.	221
8.1.2. Textura.	224
8.1.3. Color.	226
8.1.4. Análisis sensorial.	230
8.1.5. Estabilidad del ácido fólico durante el almacenamiento de los productos cárnicos diseñados.	232
8.2. Bioaccesibilidad del ácido fólico en productos cárnicos	234
8.2.1. Bioaccesibilidad por el método estático.	234
8.2.2. Bioaccesibilidad por el método dinámico.	236
9. Conclusiones	245
10. Bibliografía	249
11. Otros artículos relacionados con esta tesis	277

SUMMARY

Meat and meat products are one of the most important foods in the diet but, during the last years, they have been related with diseases like cardiovascular, obesity, diabetes or certain types of cancer. This fact contributes to a decrease in consumption. Therefore, scientists and meat industry have made efforts to innovate and bring to market new meat products, according to nutritional guides. A good option could be the development of functional meat products. In this way, one of the strategies used is the incorporation of bioactive compounds (fiber, proteins, antioxidants, minerals, etc.). Sometimes it is necessary to modify the manufacturing processes in order to obtain final products with the required nutritive value and sensory properties. There are other interesting ingredients, which have not been studied yet despite their importance in human health. One of them is folic acid, an essential vitamin associated with the prevention of certain diseases and which intake has been recommended by different regulatory authorities, such as the FDA (Food and Drugs Administration) and the WHO (World Health Organization).

On the other hand, in our society, the type of life has changed the eating habits, making more frequent fast, prepared or semi-prepared foods, nutritive and safe, which could be consumed with scarce or without culinary treatment. They are the Ready To Eat products (RTE). Their manufacture implies a manipulation that is associated with the presence of pathogen and spoilage microorganisms, which could grow in refrigeration conditions and limit the shelf-life of the foods. For that reason, it is necessary to apply an additional treatment to guarantee the microbiological quality. One of the best options is the use of non-thermal technologies, such as the irradiation treatment.

Functional meat products cannot remain indifferent to this trend and it seems that, in a next future, they will be prepared as conventional RTE products. Thus, it is important to know if this technology affects not only the general quality of the product but also the bioaccessibility of the added bioactive compound, the folic acid in this case. Few works have been performed in this area.

The objectives of this work have been the following: a) to determine the technological viability of folic acid as functional ingredient in conventional and RTE meat products manufactured using E-beam irradiation; b) to evaluate the physico-

chemical and sensory properties of the final product, and its shelf-life; c) to study the bioaccessibility of folic acid from the designed meat products. The novelty of this work is to be the first time that folic acid has been studied as potential functional ingredient in meat products and also to be the first time that the irradiation treatment (E-beam) has been used as non-thermal technology to manufacture functional RTE meat products. There are not published papers about this aim preceding this work.

To achieve the objectives, three types of meat products were manufactured (fresh, cooked and dry fermented sausages) and they were enriched with different amounts of folic acid (0.6, 1.2 and 2.4 mg/100 g final products) looking for a final amount enough to give the 100% of the RDA (Recommended Dietary Allowances). The irradiation treatment was performed in the IONISOS Ibérica S.A. plant using an E-beam source operating at 10 MeV. The doses applied were 2, 3 and 4 kGy, described as sufficient to guarantee the objective security of food. The folic acid concentration was determined by a Ridascreen Fast-Folsäure kit (R-Biopharm, Germany). The textural properties were evaluated with a Texture Profile Analysis using a Texturometer Stable Micro System TA-TX 2i/25. The colour parameters were analyzed with a Chroma Meter Colorimeter CR-400 (Minolta, Japan) using the CIEL*a*b* System and the sensory analysis, using hedonic and preferential analysis. Statistical analysis were performed using the SPSS package at level of $P < 0.05$. The bioaccessibility of folic acid was studied from conventional and RTE meat products by means of two *in vitro* models, static and dynamic, both simulating the gastrointestinal digestion. The dynamic assay was performed using in the TNO's Intestinal Model (TIM-1) (TNO, The Netherlands).

The obtained results demonstrated that the folic acid has a very good technological viability and it is a potential functional ingredient in meat products. In general terms, folic acid was stable in conventional products, independently of the manufacturing process or the added amount; it was stable after cooking the hamburgers, after the thermal treatment of cooked meat products and after the ripening of dry fermented sausages. The final amount was, in general, sufficient to achieve the percentage of the RDA stated in the objective of this work. Scarce influence was observed in technological and sensory properties. All of the final products obtained an overall acceptability enough to consider them as new meat products adequate for the market.

The main changes were detected after the irradiation treatment. Folic acid decreased according to the irradiation doses; so, at 4 kGy, losses close to 30% were obtained. In any case, the RDA objective can be achieved with the higher amount assayed. The textural and sensory properties were modified; changes in hardness, odour and taste were described in the samples treated with the higher doses of irradiation. These changes have been described in the literature related to this topic as the result of structural changes and the development of volatile compounds resulting from lipids oxidation and protein degradation, yielding responsible for off-flavors. However, these changes were masked after cooking the hamburgers (Maillard reaction) and with the mixture of spices added to the cooked meat products. Changes were more evident in dry fermented sausages. So, in order to avoid the higher losses of folic acid and assure the sensory quality, doses of 3 kGy were considered as the more adequate because they are enough to assure the hygienic quality.

The bioaccessibility values obtained were higher using the TIM-1 dynamic model than with the *in vitro* static model. In hamburgers and dry fermented sausages, the bioaccessibility was greater than 80%. Dry fermented sausages showed lower values, close to 61%. When the irradiation treatment was applied, the bioaccessibility of folic acid from hamburgers and cooked meat products increased between 20-30%. In dry fermented sausages, the increase was approximately 6%. This fact has been related to the changes in the structure of the meat matrices produced by the irradiation treatment, which modifies and favors the extraction of folic acid.

It is possible to manufacture fresh, cooked and dry fermented meat products enriched with folic acid, both conventional and RTE product obtained using E-beam treatment. In all cases, the final folic acid content is enough to give the 100% of the RDA with one service of cooked or dry fermented sausages (approximately 50 g) or one hamburger (approximately 100 g). Due to the high bioaccessibility determined, these meat products could be considered as *source of* folic acid according to the Normative 1924/2006 of the European Union, and to be placed in the market as new and healthier meat products.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Alimentos funcionales

1.1.1. Historia

La enorme capacidad de adaptación del ser humano al medio y a las circunstancias ha hecho que el hombre haya ido cambiando su alimentación a través de los tiempos. Así, en un principio, buscaba los alimentos (hierbas, frutos silvestres y raíces) a campo abierto, con la única finalidad de cumplir el más elemental instinto de conservación. Sus primeras armas fueron ramas de árbol, piedras y palos que usaban no sólo para defenderse de los grandes animales sino para matar a los más pequeños y utilizar su carne, despedazar la carroña, partir los huesos y comer la médula o para abrir los frutos de cáscara dura. Más tarde, el hombre primitivo observó que la carne de los animales que cazaba se mantenía en buenas condiciones para su consumo durante más tiempo si se mantenían en cuevas y si se secaba la superficie de la misma.

La conquista del fuego, hace unos 500.000 años, es uno de los grandes logros humanos sobre la Naturaleza; fue adorado como un dios y forma parte integrante de todas las mitologías. El hombre se percató del temor instintivo de las fieras a las hogueras y de su inmenso poder destructivo pero observó también que el fuego mejoraba su alimentación, hacía a los alimentos más apetecibles, se digerían mejor y, sobre todo, se conservaban mejor. El fuego (calor), la evaporación del agua (secado) y el ahumado, se habían convertido, en perfectos aliados que le permitían conservar los alimentos durante más tiempo en mejores condiciones. Así, al abrigo de las peñas o en cuevas más o menos profundas, empezó a almacenar alimentos a pequeña escala para consumirlos en las épocas de frío o escasez.

El establecimiento de grupos familiares permitió su asentamiento en áreas donde el hombre empezó a seleccionar y cultivar plantas y a domesticar animales. Las evidencias más antiguas de la domesticación de ganado vacuno datan de 6.000 años a.C., cuando la leche fue considerada como el alimento por excelencia, siendo *fuerza de fortaleza y vida*.

En climas fríos, los alimentos se conservaban simplemente, manteniéndolos a bajas temperaturas. En climas cálidos, era una prioridad buscar técnicas que

mantuvieran los alimentos en buen estado. Así, en la Biblia se mencionan las uvas e higos secos o el "maíz tostado" lo que sugiere un procedimiento de desecación al sol y con el fuego. El hombre descubrió que se podían conservar los alimentos mediante la adición de sal; en las carnes, si se combinaba con la desecación al sol, se evitaba el crecimiento microbiano causante de la alteración. Además, el hombre primitivo descubrió que dicha carne presentaba un color más agradable; evidentemente, nada sabían acerca de la presencia de nitrito ni su papel como agente conservante (Labuza, 1976). El secado y salazonado del pescado quedaron recogidos en los jeroglíficos egipcio. Las carnes saladas y ahumadas ya existían 1.000 años a C. Las fermentaciones (principalmente de leche) y las acidificaciones, también se utilizaban para conservar los alimentos.

Para los egipcios la alimentación era un reflejo de su cultura caracterizándose por ser conservadora, estable, de lenta evolución y siempre pendiente de la crecida del Nilo, introduciendo poco a poco nuevas tecnologías y nuevos alimentos. La alimentación egipcia estaba muy influida por la religión, que aconsejaba templanza y moderación en cuanto a los placeres gastronómicos y establecía prohibiciones como comer en presencia de extranjeros. La variedad de alimentos era alta, desde legumbres, como los garbanzos, cereales, hasta carne, pescado y productos lácteos (quesos y mantequilla). La preparación de alimentos ha quedado recogida en papiros médicos a modo de recetas, donde se detallan las cantidades exactas de los ingredientes. Un ejemplo de esto es el papiro de Ebers, donde se prescriben un tipo de galletas denominadas *shayt* así como otro tipo de preparaciones dulces utilizadas para curar la tos. Para los egipcios los alimentos eran el vehículo óptimo de nutrientes y la base de la farmacopea. En las prescripciones médicas aparecen la mayoría de las plantas, colorantes y aceites que se utilizaban en alimentación con fines curativos. La miel o la cerveza eran los alimentos que más se empleaban con dicho objetivo.

“Deja que los alimentos sean tu medicina y que la medicina sean los alimentos”. Quizás, esta frase que pronunció Hipócrates 2500 años a.C, se haya convertido, sin ser consciente de ello, en una de las realidades más contundente en nuestros días. Hipócrates considerado por muchos autores como “el padre de la Medicina”, clasificaba los alimentos en función de su correspondencia con uno u otro de los cuatro elementos: el agua, la tierra, el aire y el fuego. Cada alimento era clasificado según sus cualidades,

que se distribuían en cuatro ejes, dos principales (caliente-frío y seco-húmedo) y dos secundarios (dulce-amargo y crudo-cocido). Según la escuela hipocrática, el calor de la digestión transformaba los alimentos en linfa que, a su vez, se transformaba en humores o actuaba sobre la calidad y el equilibrio de los humores presentes. Por lo tanto, para conservar la buena salud a lo largo del tiempo, habría que tener una dieta equilibrada. Para corregir el desequilibrio de los humores, los médicos que se basaban en la tradición hipocrática recomendaban a sus pacientes consumir alimentos que se correspondieran con el inverso de su temperamento. Así, el vino tinto (caliente y seco) y la carne (caliente y seca) eran recomendados para ancianos, flemáticos y melancólicos, de *naturaleza fría*. En cambio, el pescado fresco (frío y húmedo) y las frutas o legumbres (frías y húmedas) eran más convenientes para coléricos y optimistas, así como a los jóvenes, de *temperamento caliente*.

Según Hipócrates, la alimentación también tenía que variar según el clima y las estaciones, que creía que influían en los humores. En invierno, un periodo en que domina el frío y la humedad, sería preferible consumir carnes con salsa, cocinadas con especias calientes; en primavera, cuando domina el calor y la humedad, se aconsejaba pasar poco a poco de los pucheros a los asados y empezar a comer más legumbres verdes; en verano, cuando domina el calor, sería el momento de consumir carnes y pescados a la plancha, más ligeros y preferir alimentos fríos y húmedos como frutas; en otoño, un periodo en que empieza el frío, haría falta comer alimentos apetitosos y ligeramente ácidos para expulsar la melancolía, así como reducir el consumo de vino y frutas.

Estas ideas pasarán a lo largo de los siglos por diferentes culturas, sirviendo de guía y de base para la medicina y la alimentación de los pueblos.

En Roma conocían mejor la relación entre el consumo de determinados alimentos y la prevención o tratamiento de enfermedades y así, Plinio recomendaba consumir productos lácteos fermentados para tratar problemas intestinales. Desde el siglo V hasta el siglo XIV hay muy pocas avances desde el punto de vista alimenticio excepto la utilización de la pasta, como resultado de los viajes de Marco Polo a China. Hacia el año 1100 surgen en Italia las primeras destilaciones.

El imperio bizantino desarrolló nuevas técnicas culinarias y utensilios como el tenedor o la cuchara. Cabe destacar la capacidad de los bizantinos para elaborar nuevos productos como el huevo hilado u hojaldres y fueron los maestros en el uso de rellenos y salsas aderezadas con distintas hierbas.

Durante la Edad Media, la alimentación humana no tuvo grandes avances, pero sí se escribieron textos sobre las propiedades curativas de los alimentos. Todos estos conocimientos nos han llegado a través de textos conservados en monasterios a manos de la sociedad árabe de Al-Andalus. La frase: “si el paciente puede ser tratado con la dieta, deben evitarse los medicamentos simples y especialmente las asociaciones de medicamentos” resume y caracteriza el pensamiento Rhazes, considerado el padre de la medicina experimental. Otro destacado autor de esta época fue Ibn Wafid, quien escribió varios tratados y obras de medicina entre los que destacamos el “Libro de Medicamentos Simples” en el que se describen las propiedades de los alimentos de origen vegetal y animal y su utilidad en la prevención y tratamiento de enfermedades. Sin embargo, no son los únicos que en su tiempo describieron y estudiaron las propiedades curativas o preventivas de los alimentos y como anécdota podemos comentar que todos los médicos de esta época aconsejaban comer poca cantidad de alimentos y esperar a hacerlo hasta tener verdadera hambre (Salas-Salvadó, García-Lorda, & Sánchez Ripollés, 2005).

En las culturas orientales encontramos también esta tendencia bien definida, transmitiendo de generación en generación la creencia en las propiedades medicinales de los alimentos. En países como China o Japón, siempre se ha creído que los alimentos y las medicinas tienen el mismo origen (Verschuren, 2002; Weststrate, Van Poppel, & Verschuren, 2002) y así se muestra en el libro antiguo de Medicina China “Shinongbonchokyung”, donde clasifican numerosas plantas, animales y minerales como medicinas. La dieta se consideraba como una parte importante para el tratamiento y prevención de determinadas enfermedades, existiendo una larga tradición (1000 años a.C.) de atribuir propiedades curativas o terapéuticas a los alimentos y hierbas (Kwak & Jukes, 2001).

1.1.2. Evolución de los alimentos funcionales

Desde Hipócrates o los citados autores árabes a nuestros días el concepto de alimentación ha evolucionado sobremanera, pero siempre ha estado implícito el hecho de que una alimentación correcta y sana repercute favorablemente en la salud. En nuestra sociedad actual, el concepto de alimento “saludable”, es decir, la relación positiva entre alimento y salud, se ha convertido en una auténtica filosofía de vida con un éxito sin precedentes.

En la primera mitad del siglo XX, se desarrolló una fuerte corriente de elaboración de alimentos que contribuyesen al estado del bienestar.

La calidad nutricional de los alimentos fue objeto de numerosas investigaciones durante la segunda guerra mundial ya que los problemas de hambre sufridos por la población en esta época aumentaron la preocupación por las deficiencias nutricionales. En las décadas de los 60-70 hubo un movimiento de “vuelta a lo natural” que preconizaba el consumo de alimentos naturales. En los siguientes años se introdujo el concepto de que los alimentos son “buenos” para la salud; se potencia enormemente el consumo de lo que se denominaron *alimentos de primera generación*: zumos, yogur... y aquellos enriquecidos con vitaminas o minerales reconocidos por sus beneficios sobre la salud humana. El objetivo de la ciencia de la nutrición, pasó de estar centrada en las deficiencias nutricionales de la dieta a potenciar las propiedades nutritivas de los alimentos. Los nutricionistas evidenciaron que el consumo excesivo de algunos nutrientes podían influir en algunas enfermedades crónicas tales como obesidad, cardiopatías, diabetes tipo 2 o hipertensión. Surge en este momento, la década de los 80, el movimiento “light” que supuso la eliminación en los alimentos de componentes “perjudiciales” para la salud y la incorporación a la dieta de lo que se denominaron *alimentos de segunda generación*: hipocalóricos, hiposódicos. Éste sí que fue un auténtico cambio. Se desarrollaron numerosos estudios e investigaciones relacionados con el diseño y elaboración de alimentos con cantidades reducidas de ciertos nutrientes, sobre todo grasa, sal y azúcar. Surgieron nuevos ingredientes y cambios en el procesado de alimentos para cubrir las necesidades de los consumidores más exigentes. Durante la década de los 90 surgió el etiquetado nutricional y se introdujo la idea de que los

alimentos pueden reducir el riesgo de enfermedades. Es en este punto cuando empieza el desarrollo de los *alimentos de tercera generación* o alimentos funcionales.

Es, a mediados de los años 80, cuando surge por primera vez el término alimento funcional. En esta época, el envejecimiento de la sociedad japonesa hizo que el gobierno se plantease nuevas estrategias para controlar los gastos sanitarios asociados. Una de ellas era mejorar de la calidad de vida para reducir la incidencia de determinadas enfermedades como diabetes, osteoporosis o enfermedades cardiovasculares (Arai, 2002). Entre 1984 y 1988, el Ministerio Japonés de Salud y Bienestar desarrolló dos proyectos (Systematic Analysis and Development of Food Function y Analysis of Body-Modulating Functions of Foods) en los que se recogía por primera vez el concepto de “alimento funcional”. Se definió a los alimentos funcionales como *aquellos que eran diseñados y procesados para expresar las funciones relacionadas con la prevención y tratamiento de enfermedades y mecanismos de defensa del organismo*. Además se indicaba que estos alimentos deberían consumirse como parte de una dieta básica, que los ingredientes utilizados debían ser convencionales y que en el etiquetado debería figurar la función concreta con la que se relacionaba el alimento (Kwak & Jukes, 2001).

Durante estos mismos años se registró un aumento de reacciones alérgicas (dermatitis), asociadas con el consumo de arroz. Se puso en marcha un proyecto para diseñar y producir un arroz hipoalergénico mediante la hidrólisis enzimática de las proteínas responsables. Es así como aparece el primer producto aprobado como “FOSHU” (Food for Specified Health Use), el denominado “Fine Rice”. Esto hizo que en 1991 Japón estableciera el primer sistema de concesión de licencias para alimentos FOSHU según el cual, para que estos alimentos se consideren como tal, debían cumplir una serie de requisitos, entre los que se consideraba prioritario el hecho de que se demostrara científicamente su efecto positivo en la salud, que fueran seguros, que no supusieran una pérdida de los nutrientes habituales de ese alimento y sobre todo, que no se considerasen una medicina, dejando claro que no podían entenderse como alimentos funcionales ni cápsulas ni píldoras, solamente alimentos (Kwak & Jukes, 2001). Para aprobar un alimento FOSHU, se debía utilizar un ingrediente previamente aprobado por el Ministerio de Salud y Bienestar y posteriormente, solicitar su utilización demostrando científicamente que el producto final poseía un efecto beneficioso sobre la salud. Así se

estableció por primera vez una regulación para la comercialización de alimentos funcionales (Arai, 2002; Verschuren, 2002).

Los ingredientes funcionales para productos FOSHU se agruparon en 11 categorías: Fibra dietética – Oligosacáridos - Azúcares alcoholes - Ácidos grasos poliinsaturados - Péptidos y proteínas - Glucósidos, isoprenoides y vitaminas - Alcoholes y fenoles - Ésteres de la colina - Bacterias ácido-lácticas - Minerales – Otros (Toshihiko, 1998) y se agruparon en función de su efecto fisiológico: Modulación de condiciones gastrointestinales (fibra, oligosacáridos, probióticos), nivel sérico de colesterol (fitosteroles), tensión arterial (péptidos bioactivos), absorción de minerales y salud ósea (soja, caseinatos, fructooligosacáridos), niveles de glucemia (fibra) o triglicéridos (catequinas) (Nakai, Yasuoka, Kato, & Abe, 2010).

Al mismo tiempo que en Japón se definían los alimentos FOSHU, en EE. UU. aparecieron los denominados “alimentos nutraceúticos” definidos como *aquellos suplementos dietéticos que proporcionan una forma concentrada de un agente presumiblemente bioactivo de un alimento, presentados en una matriz no alimenticia y utilizados para incrementar la salud en dosis que exceden aquellas que pudieran ser obtenidas del alimento normal* (Zeisel, 1999) o “alimentos diseñados”, definidos como *aquellos suplementados con ingredientes naturales ricos en sustancias capaces de prevenir enfermedades*. Este término se utiliza frecuentemente como sinónimo de alimento funcional (Alvídrez-Morales, González-Martínez, & Jiménez-Salas, 2002).

En 1989 surgieron en la Unión Europea varios intentos por definir a un alimento funcional. Así aparece el término “Foods for Particular Nutritional Uses” (PARNUTS) que se refiere a *productos alimenticios que, debido a su especial composición o proceso de fabricación se distinguen claramente de los productos alimenticios de consumo corriente, que son adecuados para el objetivo nutritivo indicado y que se comercializan de tal modo que se hace especial mención a esta adecuación*. Dentro de él, se establecieron cinco categorías: fórmulas infantiles y de continuación (Directiva 91/321/EEC), alimentos basados en cereales, alimentos para recién nacidos (Directiva 96/5/EC), alimentos hipocalóricos (Directiva 96/8/EC) y alimentos con fines médicos (Directiva 1999/21/EC) (Coppens, da Silva, & Pettman, 2006).

En 1995, el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación del Reino Unido, definió los alimentos funcionales como *alimentos que tienen un ingrediente adicionado que proporcione algún beneficio físico o médico específico además del puramente nutricional* (Kwak & Jukes, 2001). Otras son más sencillas como la de la Fundación IFIC (International Food Information Council) en 1995 (Roberfroid, 2002), *“alimentos que pueden dar beneficios para la salud más allá de una nutrición básica”*, o más complejas como *“alimentos en apariencia similares a los convencionales que se pretende que se consuman como parte de una dieta normal, pero que han sido modificados para servir a las funciones fisiológicas, más allá de la provisión de los requerimientos nutricionales”* (Bech-Larsen & Grunert, 2003).

Ante tal variedad de definiciones y con el fin de aunar conceptos, en 1996, un equipo formado por expertos en nutrición y otras ciencias relacionadas, desarrolló la Acción Europea “Functional Food Science in Europe” (FUFOSE), coordinada por el International Life Sciences Institute (ILSI). En ella se alcanzó el primer consenso científico para Alimentos Funcionales (Diplock, Ashwell, Bornet, Fern, & Roberfroid, 1999).

“Un alimento puede ser denominado como alimento funcional si se demuestra satisfactoriamente que afecta de forma beneficiosa a una o más funciones del organismo, más allá de los efectos nutricionales propios, de manera que sea relevante para ellos mejorar el estado de salud y/o disminuir el riesgo de enfermedad. Un alimento funcional debe seguir siendo un alimento y debe demostrar sus efectos en cantidades que de forma normal se espera sea consumido en la dieta: no es una pastilla o una cápsula sino parte de un patrón normal de alimentación”.

Así mismo se establecieron por consenso las características que deberían tener los alimentos para poderse considerar como funcionales:

- Ser un alimento convencional o que se consume como parte de una dieta normal/habitual.
- El ingrediente puede estar presente en concentraciones no habituales o en alimentos que de forma natural carecen de ellos.

- Tener un efecto positivo sobre determinadas funciones además de su valor nutritivo.
- Estar autorizado y poseer proclamas alimentarias con base científica.
- Mejorar el bienestar y la salud y/o reducir el riesgo de padecer enfermedades, mejorando la calidad de vida y afectando positivamente en la forma física, psicológica y en la conducta.

Posteriormente, se ha propuesto añadir una más, la de que se pueda mantener en almacenamiento como un alimento convencional (Kwak & Jukes, 2001).

Poco después, en 1999, la Asociación Americana de Dietética consideró también como alimentos funcionales los *enteros*, siempre que fueran consumidos como parte de una dieta variada y en las cantidades habituales (Katan & De Roos, 2004). Dentro de estos alimentos *enteros* son citados como ejemplos frutas y vegetales. Esta definición no deja clara una demarcación entre funcionales y otro tipo de alimentos, ya que desde este punto de vista, todos los alimentos tienen o pueden tener efecto beneficioso sobre la salud; por ejemplo, el agua podría ser un alimento funcional, ya que su ingesta en cantidades elevadas ayuda a prevenir enfermedades como la cistitis (Katan & De Roos, 2004).

A pesar de este consenso, han seguido apareciendo nuevas definiciones como la de Doyon y Labrecque (2008): *un alimento funcional es, o se parece a un alimento convencional, forma parte de una dieta normal y es consumido regularmente en cantidades normales pero, además de cumplir sus funciones nutricionales básicas, tiene que proporcionar beneficios para la salud así como reducir el riesgo de enfermedades.* ¿Será ésta la definitiva?

1.1.3. Declaraciones de salud

Tampoco ha existido un acuerdo unánime sobre lo que se puede considerar una declaración de salud y esto sí que es importante, ya que la diferencia de criterios existente entre los diferentes países conduce al consumidor a equívocos. La definición más aceptada ha sido la establecida por el Codex Alimentarius en 1991, que considera las declaraciones de salud como *cualquier representación que afirme, sugiera o implique que un alimento tiene ciertas características relacionadas con su origen, propiedades nutricionales, naturaleza, producción, procesado, composición o cualquier otra cualidad* (Diplock, Ashwell, Bornet, Fern, & Roberfroid, 1999).

Es en el etiquetado donde se encuentran las mayores dificultades a la hora de alegar si el producto es un alimento funcional o, por ejemplo, un producto dietético. De hecho, durante la década de los 90 se produjeron en Estados Unidos tres importantes cambios legislativos en este sentido. El primero de ellos fue el Nutrition Labeling and Education Act (NLEA) (Public Law 101-535, 1990) donde se establecieron regulaciones aprobadas por la FDA, por las que los alimentos debían presentar un etiquetado nutricional cuando estuviera probado científicamente el efecto que declara (Milner, 2000). Posteriormente, el Dietary Supplement Health and Education Act (DSHEA) de 1994, estableció una definición formal de suplementos dietéticos (Kaushik & Kaushik, 2010) que les separa por completo de los aditivos alimentarios, de tal forma que sus declaraciones de salud no tenían por qué ser aprobadas por la FDA (Milner, 2000). Aún así, su etiqueta debía llevar escrito que la declaración usada no ha sido aprobada por la FDA. El tercero fue el FDA Modernization Act (FDAMA) (1997) por el que se autoriza a los fabricantes un proceso acelerado para usar declaraciones de salud si éstas están basadas en declaraciones reales, publicadas y autorizadas por los cuerpos científicos federales preestablecidos. En este ámbito, en 1999 apareció la primera declaración autorizada por la FDAMA que relacionaba los granos de cereales y la disminución del riesgo de enfermedades coronarias y cáncer (ADA Reports, 2004).

En la Unión Europea el primer y más importante paso fue, sin duda, la creación de la Acción Concertada FUFOSÉ (European Commission Community Research, 2000). Su objetivo fundamental era establecer un enfoque científico sobre las pruebas que se necesitan para respaldar el desarrollo de productos funcionales. La posición que

defendió el informe es que “los alimentos funcionales deben presentarse en forma de alimentos normales y que se deben demostrar sus efectos en las cantidades que normalmente se consumirían en la dieta. Un alimento funcional puede ser un alimento natural, un alimento al que se ha añadido un componente, o un alimento al que se le ha quitado un componente mediante medios tecnológicos o biológicos. También puede tratarse de un alimento en el que se ha modificado la naturaleza de uno o más de sus componentes, o en el que se ha modificado su biodisponibilidad o cualquier combinación de estas posibilidades. Un alimento funcional puede estar destinado a toda la población o a grupos determinados que se pueden definir, por ejemplo, según su edad o su constitución genética. Así mismo, el proyecto FUFOSSE se centró en seis áreas de salud: crecimiento, desarrollo y diferenciación, metabolismo, defensa contra especies oxidativas reactivas, alimentos funcionales y el sistema cardiovascular, fisiología y función gastrointestinal, y los efectos de los alimentos en el comportamiento.

En el informe FUFOSSE, y basándose en la clasificación que en 1997 estableció el Codex Alimentarius, se describieron cuatro categorías diferentes de declaraciones (Diplock, Ashwell, Borneo, Fern, & Roberfroid, 1999):

1. Relacionadas con las guías dietéticas. Éstas no pueden contener información que relacionen alimentos con enfermedades o condiciones de salud. Estas declaraciones se centran en patrones generales de ingestas de alimentos de forma sana y equilibrada, tales como dietas bajas en grasas saturadas o elevadas en fibra. Frecuentemente hacen referencia a alimentos como frutas y verduras.
2. Relacionadas con el contenido en nutrientes: hacen referencia al contenido de algún nutriente usando expresiones como “fuente de”.
3. Declaraciones que comparan el contenido en nutrientes entre dos o más alimentos: un ejemplo sería que un alimento tiene bajo contenido en grasa y alto en ácido fólico.
4. Aquellas que describen las funciones de un nutriente, por ejemplo que un alimento que tuviese un alto contenido en ácido fólico consumido por

mujeres gestantes, disminuiría el riesgo de defectos del tubo neural en los fetos.

La Acción Concertada de la UE apoyaba además dos tipos básicos de declaraciones de salud que deberían ser siempre válidas en el contexto de una dieta global:

TIPO A: Declaraciones de "funciones de mejora" asociadas a determinadas funciones fisiológicas y psicológicas y a actividades biológicas que van más allá de su papel establecido en el crecimiento, el desarrollo y otras funciones normales del cuerpo. Por ejemplo “algunos oligosacáridos no digeribles mejoran el crecimiento de la flora bacteriana intestinal; la cafeína puede mejorar el rendimiento cognitivo”.

TIPO B: Declaraciones de "reducción de riesgo de enfermedades", que se asocian al consumo de un alimento o de sus componentes para ayudar a reducir el riesgo de padecer una determinada enfermedad o afección, gracias a los nutrientes específicos que contenga o no contenga dicho alimento. Algún ejemplo sería “el folato puede reducir el riesgo de que una mujer tenga un hijo con defectos del tubo neural” y “una ingesta adecuada de calcio puede ayudar a reducir el riesgo posterior de osteoporosis”.

Para poner en práctica las conclusiones y principios del programa FUFOSÉ se desarrolló una nueva Acción Concertada de la Comisión Europea, (Process for the Assessment of Scientific Support for Claims on Foods, PASSCLAIM QLK1-2000-B6) contemplada dentro del 5º Programa Marco (2000-2005) (ILSI Europe, 2010). PASSCLAIM tuvo como objetivo resolver los temas relativos a validación y verificación científica de declaraciones generando en el consumidor una mayor confianza sobre estos alimentos.

El PASSCLAIM estableció criterios comunes para evaluar la confirmación científica de las declaraciones de salud y proporcionar la base para la preparación de informes científicos que respalden dichas declaraciones. Partió del principio de que las declaraciones "funciones de mejora" y las de "reducción de riesgo de enfermedades" deberían basarse en estudios bien planificados, mediante el uso de biomarcadores adecuadamente identificados, caracterizados y validados. Sin embargo, los resultados de esta acción no llegaron a implementarse de forma consistente y así, en el año 2003 este

mismo organismo publicó una propuesta (Propuesta COM/2003/0424) para una nueva regulación referente a las declaraciones nutricionales y de salud en alimentos y suplementos dietéticos.

En el año 2002, la FDA clasificó las declaraciones de salud en 4 categorías. En la primera de ellas (categoría A) figura el nivel más alto de evidencias científicas. En la segunda entrarían aquellas cuyo nivel científico sea moderado, como por ejemplo: “...aunque hay evidencias científicas soportando esta declaración, no son concluyentes.” El nivel C y D corresponderían a niveles bajos o muy bajos de evidencia científica (ADA Reports, 2004).

En las mismas fechas, China dio un paso adelante en este tema ya que el Ministerio de Salud Pública otorgó un sello a aquellos alimentos funcionales aprobados legalmente. En este país estos alimentos están clasificados según las funciones metabólicas con las que se relacionan (Arai, 2002).

Con el fin de establecer directrices comunes hacia el uso de declaraciones de salud en el etiquetado y comercio de dichos alimentos, en 2006 el Parlamento Europeo emitió el Reglamento (CE) nº 1924/2006. En él, se armonizan *las disposiciones legales, reglamentarias o administrativas de los Estados miembros relativas a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables, con el fin de garantizar un funcionamiento eficaz del mercado interior a la vez que se proporciona un elevado nivel de protección de los consumidores. Dicho Reglamento se aplicará a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables efectuadas en las comunicaciones comerciales, ya sea en el etiquetado, la presentación o la publicidad de los alimentos que se suministren como tales al consumidor final.*

En este Reglamento, se define “Declaración” como *cualquier mensaje o representación que no sea obligatorio con arreglo a la legislación comunitaria o nacional, incluida cualquier forma de representación pictórica, gráfica o simbólica, que afirme, sugiera o dé a entender que un alimento posee unas características específicas.* Así mismo, se contemplan las siguientes definiciones:

- “Declaración nutricional”: cualquier declaración que afirme, sugiera o dé a entender que un alimento posee propiedades nutricionales beneficiosas específicas.
- “Declaración de propiedades saludables”: se entenderá por tal, cualquier declaración que afirme, sugiera o dé a entender que existe una relación entre una categoría de alimentos, un alimento o uno de sus constituyentes y la salud.
- “Declaración de reducción del riesgo de enfermedad”: cualquier declaración que afirme, sugiera o dé a entender que el consumo de una categoría de alimentos, un alimento o uno de sus constituyentes reduce significativamente un factor de riesgo de aparición de una enfermedad humana.

En su artículo 13, el Reglamento establece las bases para la autorización de declaraciones de salud; así, se indica que para establecer una declaración de salud *será necesario demostrar, con fundamento científico, en qué medida el efecto declarado es beneficioso para la salud humana al haberse establecido una relación causa-efecto entre el consumo del alimento y el efecto declarado*. También será necesario indicar *qué cantidad de alimento y cual es el patrón de consumo requerido para alcanzar el efecto saludable y que pueda alcanzarse razonablemente, como parte de una dieta equilibrada, haciéndose constar, por último, el grupo específico en el que se realizó el estudio*.

Según este Reglamento, las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables *no deberán ser falsas, ambiguas o engañosas, ni dar lugar a tener dudas sobre la seguridad y/o adecuación nutricional de otros alimentos. Tampoco pueden fomentar el consumo excesivo de un alimento*. Por otra parte, deja claro que una dieta equilibrada puede proporcionar cantidades adecuadas de un nutriente, con lo que una declaración no puede afirmar o ni si quiera sugerir lo contrario. De la misma manera, no pueden referirse a cambios en las funciones corporales. En el Anexo de dicho Reglamento se recogen las declaraciones nutricionales aprobadas, así como las condiciones que se les aplica.

El apoyo científico para las demandas potenciales para la salud está siendo evaluada por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), pero la

consideración de otros aspectos y la decisión final de aceptar o rechazar una reclamación corresponde a la Comisión Europea. La lista definitiva de declaraciones de propiedades saludables debía haberse publicado a principios de 2010, pero el trabajo se ha retrasado, publicándose declaraciones por lotes. El primer lote de declaraciones referentes Artículo 13 del citado Reglamento (Declaraciones de propiedades saludables distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños) se publicó en Octubre del 2009 (Bech-Larsen & Scholderer, 2007; Buttriss & Benelam, 2010).

En 2007, la FDA/CFSAN (Food and Drugs Administration's Center for Food Safety and Applied Nutrition) agrupa las declaraciones de salud en cuatro categorías siendo las tres primeras muy similares a las establecidas en el informe FUFUSE.

1. Declaraciones relacionadas con las guías dietéticas.
2. Declaraciones relacionadas con el contenido en nutrientes
3. Declaraciones sobre la estructura o la función en el organismo
4. Declaraciones de salud relacionadas con la disminución del riesgo de padecer enfermedades.

Así mismo, se establece que las declaraciones de salud no pueden hacer referencia al tratamiento o cura de enfermedades. Si las declaraciones se refieren a tratamientos de enfermedades, los productos dónde se encuentran estas declaraciones se consideran medicamentos y no alimentos (Lupton, 2009).

A pesar del esfuerzo llevado a cabo tanto por administraciones como por científicos de todos los países, el debate sobre las declaraciones de salud sigue abierto y se deberá seguir tratando hasta llegar a un punto en el que todos estén de acuerdo, de forma que la información y los beneficios de estos alimentos puedan llegar a todos los consumidores.

La Tabla 1 recoge los principales organismos encargados de la legislación sobre alimentos funcionales (Kaushik & Kaushik, 2010).

COUNTRIES	FUNCTIONAL FOODS/ NUTRACEUTICALS STATUS	LEGISLATIVE BODIES
UNITED STATES	Functional Foods/Dietary supplements	FDA regulates under the authority of two laws: · FD&C Act 1938 for food additives. · DSHEA 1994 for dietary supplements.
EUROPEAN UNION	Food supplements	EFSA (European Food standard Authority)
JAPAN	FOSHU products	MHLW (Ministry of Health Labor and Welfare)
CHINA	Health foods	SFDA (State Food and Drug Administration)
CANADA	Functional Foods /Natural Health Products	Health Food Directorate/Natural Health Product Directorate
AUTRALIA & NEW ZEALAND	Functional foods/Nutraceuticals	FSANZ (joint food std. Australia and New Zealand)
BRAZIL	Functional foods/Nutraceuticals	ANVISA (National Sanitary Surveillance Agency)
INDIA	Functional foods/Nutraceuticals	Two Act regulates this category: · Drugs and Cosmetics Act.(1940) · Food Safety and Standard Act. (2006)

Table 1. Legislative bodies related to functional foods globally. (Kaushik & Kaushik, 2010).

Son muchas las industrias de alimentos que, aprovechando el vacío legal existente, juegan con la ambigüedad de los reclamos publicitarios para anunciar sus productos con supuestas propiedades beneficiosas sin tener un aval científico que las garantice. Por ello, y para frenar esta situación, se ha puesto en marcha el programa Bioclaims, dirigido a establecer un sistema de control que garantice la veracidad de los mensajes publicitarios en el campo de los productos alimentarios. Este programa,

financiado por la Comisión Europea con seis millones de euros está orientado a la búsqueda de nuevos biomarcadores en los alimentos que certifiquen sus propiedades saludables y tendrá entre sus principales objetivos atajar la publicidad engañosa de los productos con supuestas propiedades beneficiosas para la salud. Bioclaims ha comenzado a actuar este mismo año y servirá de base para remodelar la Legislación Europea sobre declaraciones de salud en los alimentos, prevista para el 2014, coincidiendo con la finalización del proyecto. De este modo, los anuncios de alimentos saludables sólo podrán volver a ser emitidos si sus afirmaciones están sustentadas en una evidencia científica rigurosa, acreditada por el Panel de Nutrición de la Autoridad Europea en Seguridad Alimentaria.

1.1.4. Actitud de los consumidores frente a alimentos funcionales

Actualmente, tanto expertos como consumidores aceptan ya abiertamente una conexión tan cerrada entre nutrición y salud que ha hecho aparecer cambios en los hábitos alimenticios. De hecho, los consumidores muestran una conciencia cada vez más saludable, han asimilado de una forma rápida que es mejor “prevenir antes que curar” y hay un creciente conocimiento de que nuestra perspectiva de salud, bienestar y longevidad está relacionada con la composición de los alimentos que comemos.

Como respuesta a esta demanda, la industria alimentaria ha centrado sus investigaciones en el desarrollo de nuevos alimentos (Kwak & Jukes, 2001). En los últimos años, se ha desarrollado un mercado de alimentos funcionales, que ya en 2003 se estimó alrededor de 33 billones de dólares, correspondiendo 2 de ellos a alimentos producidos en Europa y el resto en países como Estados Unidos y Japón, todos ellos contribuyen a más del 90% de las ventas globales (Benkouider, 2004). Dentro del mercado europeo Alemania, Francia, Reino Unido y Holanda se encuentran a la cabeza (Mäkinen-Aakula, 2006). En 2006, los alimentos funcionales representaba en España el 17% del total del sector alimentario, pudiendo aumentar, según las previsiones hasta el 40% en 2020 (Mónar, 2007).

La actitud de los consumidores frente los alimentos funcionales está condicionada por distintos factores, como los demográficos o los cognitivos (Verbeke, 2005). Así, algunos estudios (Beardsworth, Bryman, Keil, Goode, Haslam, &

Lancashire, 2002; Verbeke & Vackier, 2004) muestran que las mujeres son más receptivas a todo aquello relacionado con la salud y la alimentación. Así mismo, se ha observado que las mujeres con un nivel de estudios medio-alto y con edades comprendidas entre 45-75, no tienen problemas para introducir en su dieta alimentos funcionales. Sin embargo, los hombres poseen un punto de vista de la alimentación más tradicional (IFIC 1999). Esta tendencia no se produce de la misma forma en todos los países, siendo este hecho el que marca su incidencia o su mayor o menor presencia en el mercado.

En 2007, Urala y Lähteenmäki realizaron un estudio sobre la actitud de los consumidores frente a los alimentos funcionales y para ello, utilizaron tres parámetros diferentes: beneficios asociados al consumo de alimentos funcionales, necesidad de alimentos funcionales y la confianza en los alimentos funcionales. Los resultados mostraron que tanto hombres como mujeres presentaban las mismas actitudes frente a los alimentos funcionales y que prácticamente no existían diferencias entre los grupos de edad y educación. Existen también estudios orientados a conocer la opinión del consumidor sobre sí mismo cuando incluye alimentos funcionales en su dieta. Se ha podido comprobar que aquellas personas que incluyen en sus compras este tipo de alimentos se ven como innovadoras y más disciplinadas que los consumidores de alimentos convencionales (Saher, Arvola, Lindeman, & Lähteenmäki, 2004; Urala & Lähteenmäki, 2007). Sin embargo, hay que tener en cuenta que los consumidores no desean productos nuevos que aunque les aporten algún beneficio para la salud, tengan sabores o texturas diferentes o poco apetecibles (Arbolea, Lasa, Olabarrieta, & Martínez de Marañón, 2010).

Todos estos estudios muestran que la elección de alimentos funcionales por parte de los consumidores no es incondicional y que su opinión debe tenerse muy en cuenta a la hora de su diseño y desarrollo a nivel industrial. Actualmente, numerosas empresas prestan especial atención a esta opinión y conjuntamente con equipos de investigación realizan el diseño y desarrollo de nuevos productos (Siró, Kápolnab, Kápolnac, & Lugasi, 2008).

1.1.5. Diseño y desarrollo de alimentos funcionales

Cuando se plantea el diseño de un alimento funcional es imprescindible tener en cuenta tres aspectos fundamentales (Palou & Serra, 2000):

1. Es importante conocer perfectamente el componente con el que vamos a trabajar (adicionar, eliminar o modificar), tanto desde el punto de vista químico como biológico (estructura, reactividad, estabilidad) y establecer exactamente qué papel juega en el organismo.
2. Diseño y producción del alimento funcional. Se han desarrollado diferentes estrategias (Palou & Serra, 2000; Ashwell, 2002):
 - a) Eliminación de algún componente que se encuentre de forma natural en el alimento pero que puede causar algún perjuicio al consumidor, por ejemplo grasa, proteínas del gluten o colesterol.
 - b) Adición o modificación de la cantidad de un componente presente en el alimento. Un ejemplo claro de este caso sería la adición de calcio a la leche o de ácido fólico a los cereales de desayuno.
 - c) Sustitución de un componente por otro. Hablaríamos de los sustitutos de grasa o azúcar en los alimentos hipocalóricos o de sal común en los hiposódicos.
 - d) Alteración de la biodisponibilidad. Un ejemplo muy claro de este grupo son los fitosteroles cuya similitud estructural hace que se absorban en lugar del colesterol y disminuya, en consecuencia, su biodisponibilidad.
3. Caracterización de biomarcadores: Será necesario encontrar biomarcadores específicos que sean válidos, específicos, reproducibles y sensibles que permitan seguir o comprobar el efecto del componente funcional, teniendo en cuenta que debe ser fisiológica y estadísticamente significativo.

Son muchos los investigadores que centran en la actualidad sus estudios en la identificación, caracterización y posterior validación de estos marcadores ya que de su efectividad dependerán posteriormente las declaraciones de la salud (Roberfroid, 2002).

El primer paso es encontrar un biomarcador que pueda ser usado *in vitro* para simular la situación que se produciría *in vivo*. Para ello, es imprescindible cuantificar una molécula en particular como marcador, lo cual no es tarea fácil y, después, habría que cuantificar su actividad mediante estudios a nivel celular.

En la actualidad, las técnicas “ómicas” (transcriptómica, proteómica y metabolómica) se han convertido en herramientas muy importantes para entender más claramente los mecanismos bioquímicos que determinan cómo funcionan las rutas metabólicas a nivel celular con la presencia de los compuestos estudiados (Arola, 2010).

Para que un marcador pueda considerarse efectivo, debe tener una respuesta correcta en las pruebas clínicas y dietéticas que se realicen; debe ser coherente con la epidemiología; tener una correcta respuesta en estados de enfermedades hereditarias y plausibilidad del mecanismo. Por ello, sólo algunos de los marcadores propuestos, llegan a ser aceptados como tales.

Algunos ejemplos clásicos de marcadores serían la presión sanguínea y los niveles de colesterol sanguíneo en enfermedades cardiovasculares; la frecuencia de fractura y el contenido mineral para enfermedades relacionadas con el sistema óseo (osteoporosis); el índice de masa corporal se usa como biomarcador de la obesidad y las pruebas de tolerancia a la glucosa para la diabetes (Verschuren, 2002).

En la Tabla 2 se muestran algunos ejemplos de alimentos funcionales que se comercializan.

COMERCIAL NAME/BRAND	DESCRIPTION	MANUFACTURER	COUNTRY
Actimel	Probiotic yogurt drink with <i>L. casei</i> <i>Imunitas</i> [®]	Danone	France
Activia	Creamy yogurt with <i>Bifidus ActiRegularis</i> [®]	Danone	France
Hellus	Daily product with <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>ME-3</i>	Tallinna Piimatööstuse AS	Estonia
Pro Viva	Refreshing drink of fresh fruit and yogurt containing <i>Lactobacillus plantarum</i>	Skåne mejerier	Sweden
Snack Fibra	Snacks with natural fiber, minerals and vitamins	Celigüeta	Spain
Vitality	Pre and probiotics and <i>n-3</i> enriched yogurt	Müller	Germany
Becel-proactive	Margarine enriched with sterols	Unilever	Spain
Vifit	Liquid yogurt enriched with probiotics	Südmilch	Germany
Yakult	Liquid yogurt enriched with <i>L. casei</i>	Yakult	The Netherlands
La Viva	Vitamins enriched cookies	Bahlsen	Germany and Austria
Jeunesse	Chocolate with antioxidant poliphenols	New Tree	Belgium
Couscous bienetre	Couscous enriched with iron, fiber and magnesium	Tipiak	France
Greenwood wine jam	Poliphenols enriched jam	Kato Sangyo	Japan
Digestao fácil	Vitamin D and <i>n-3</i> enriched milk	Lactogal	Portugal
Optivita	Cereals enriched with vitamins and betaglucan	Kellogg's	EE.UU.
Chocolate Weetabix	Vitamins enriched cereals bars	Weetabix Food Cº.	United Kingdom
Adobados bienstar	Marinated loin "low in salt"	El Pozo	Spain

Table 2. Comercial functional foods.

1.1.6. Las vitaminas como ingrediente funcional

Las vitaminas son sustancias orgánicas imprescindibles en los procesos metabólicos que tienen lugar en los seres vivos. Cada vitamina posee su propia función en el organismo y no puede sustituirse por ninguna otra sustancia. Como el organismo no es capaz de sintetizarlas, se deben adquirir a través de la alimentación.

Desde la antigüedad las vitaminas han estado ligadas a la salud ayudando, sin saberlo, a la prevención o mejora de enfermedades. Un ejemplo de ello es el consumo de hígado que se recomendaba a personas que tenían ceguera nocturna o el zumo de lima utilizado ya en el siglo XVII por la Armada Británica para combatir el escorbuto. Sin embargo, no es hasta 1912 cuando se establece la necesidad de su ingesta: fue Casimir Funk quien aisló por primera vez a partir de cascarilla de arroz, una amina que prevenía o disminuía los síntomas del beriberi. A esta amina, por su función determinante en esta enfermedad se la denominó vitamina (esencial para la vida) y fue en concreto, la vitamina B₁. A partir de entonces se aislaron y determinaron las estructuras del resto de vitaminas que conocemos actualmente y que se fueron nombrando por orden alfabético (Nelson & Cox, 2005).

La malnutrición debida a la carencia de vitaminas fue ya reconocida en 1992 en una conferencia internacional de la FAO/WHO. A partir de este momento se desarrollaron programas en muchos países para enriquecer alimentos. Un ejemplo podría ser el programa de fortificación mejicano LICONSA: En 1999, la Mexican National Nutrition Survey declaró que alrededor del 50% de los niños entre 1 y 2 años presentaban anemia debida a la deficiencia de hierro en la dieta. Como respuesta a esto, se desarrolló este programa con el fin de fortificar la leche con hierro, cinc, ácido fólico y vitamina C el cual ayudó a producir un descenso del 25% en la incidencia de esta enfermedad en tan sólo 6 meses (Shamah & Villalpando, 2006).

Las cantidades diarias recomendadas varían dependiendo del tipo de vitamina y grupos de población y será mayor para aquellos grupos considerados de riesgo, como mujeres embarazadas, ancianos o niños.

La pérdida de vitaminas es inherente al procesado de alimentos. En términos generales, se puede decir que a mayor intensidad del tratamiento de conservación

aplicado o mayores manipulaciones previas (recolección, pelado o recorte, procesado, preparación culinaria), la pérdida de vitaminas es mayor. Así, por ejemplo, durante la cocción, las pérdidas de vitaminas hidrosolubles se producen principalmente por lixiviación; hay otro porcentaje de pérdidas asociadas a separaciones físicas (el pelado) o durante la extrusión debido a la gran presión utilizada y a las condiciones de temperatura y humedad. Además, hay otros muchos factores que afectan a la estabilidad de las vitaminas, entre otros, la forma química en la que se encuentren.

Por todo ello y teniendo en cuenta que uno de los objetivos de la Tecnología de los Alimentos es ofrecer alimentos nutritivos, es muy importante el desarrollo y diseño de alimentos ricos en vitaminas, cuyas concentraciones sean suficientes para cubrir las necesidades diarias del organismo.

1.2. Ácido fólico

1.2.1. Antecedentes

Fue en 1931 cuando por primera vez se extrajo de la levadura de cerveza un compuesto capaz de curar la enfermedad que conocemos hoy en día como anemia megaloblástica. Fue la primera enfermedad que respondía de forma positiva a un tratamiento con ácido fólico. Sin embargo, no fue hasta doce años después cuando Stokstad y colaboradores identificaron el ácido fólico como tal (Hoffpauer & Bonnette, 1998) y en 1947 se sintetizó por primera vez en los laboratorios Lederle. A partir de entonces, se iniciaron numerosos estudios encaminados a conocer la importancia del ácido fólico en el organismo y la repercusión de su ingesta en la dieta (Rosenberg, 2005).

De forma natural, el ácido fólico se encuentra en pequeñas cantidades mientras que sus derivados, los folatos, se encuentran en concentraciones mucho mayores, llegando a ser los que mayoritariamente se ingieren en el organismo a través de la dieta; su principal fuente son los vegetales de hoja verde, de los que adquiere su nombre (del latín, *folium*). Así, el mayor aporte lo encontramos en verduras, como el brócoli, las espinacas o las acelgas (aportan alrededor de 140 $\mu\text{g}/100\text{gr}$ de producto). También se encuentra en los frutos secos, donde destacamos los cacahuets (110 $\mu\text{g}/100\text{gr}$) o las

almendras (96 µg/100gr) y en cantidades menores, en naranjas, limones, espárragos y fresas. Un alimento con cantidades altas de ácido fólico es el hígado (192 µg/100gr) (Andújar, Moreiras-Varela, & Gil, 1994).

El ácido fólico es la forma sintética, la más activa y se encuentra en estado oxidado. Su estabilidad es mayor que la de los folatos por lo que es la forma que habitualmente se utiliza para la fortificación de alimentos. Es muy importante diferenciar entre uno y otros ya que la biodisponibilidad del ácido fólico duplica prácticamente la de los folatos.

Para encontrar dosis de ácido fólico similares a las de los folatos hay que recurrir a los alimentos fortificados como los cereales de desayuno, los cuales pueden alcanzar hasta el 100% de la cantidad diaria recomendada (CDR). En el caso de personas adultas, se recomienda un aporte diario de unos 400 µg de ácido fólico, 600µg/día para mujeres gestantes y unos 500 µg/día para mujeres en periodo de lactación (OMS, 2006).

1.2.2. Estructura, Bioquímica y Metabolismo

El ácido fólico (ácido pteroilmonoglutámico) es una vitamina hidrosoluble esencial perteneciente al grupo B cuyo peso molecular es 441,4.

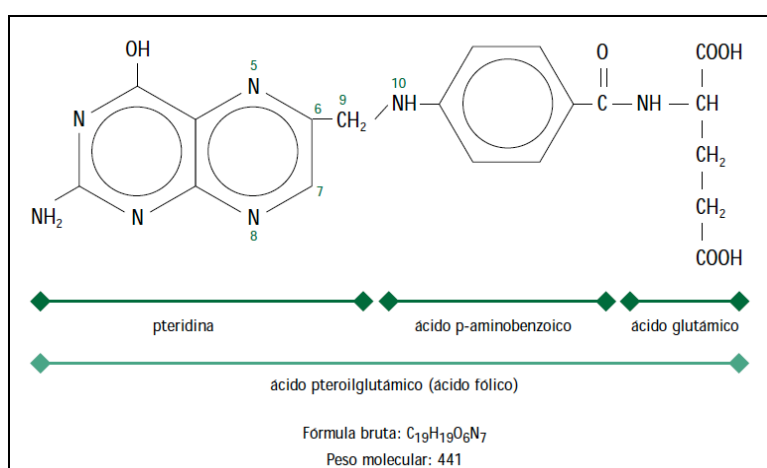


Figure 1. Folic acid structure. (Varela-Moreiras, Aperte, & Prieto, 2000).

Estructuralmente está constituido por el anillo bicíclico de la pteridina conjugada al ácido p-aminobenzóico por un enlace metileno (C9-N10) el cual, a su vez, está unido a una molécula de ácido glutámico (monoglutamato) mediante un enlace peptídico.

Folato es el término que se utiliza de forma genérica para referirse a una familia de vitaminas hidrosolubles del grupo B que tienen estructura y propiedades nutricionales similares a las del ácido fólico. Estructuralmente, los folatos se diferencian del ácido fólico en que el anillo de pteridina está en forma reducida y hay más de una molécula de glutámico, es decir, son poliglutamatos en los que las moléculas de glutámico están unidas unas a otras directamente mediante enlaces γ -glutamilo. Los más frecuentes en el organismo son los mono, penta y hexaglutamatos. Unos de otros se diferencian en el número de moléculas de ácido glutámico y en el estado de oxidación. Si el anillo de pteridina se encuentra reducido en las posiciones N7 y N8, se forman los dihidrofolatos (DHF) y si lo está en las posiciones N5, N7, N8 y N10, se forman los tetrahydrofolatos (THF). Estos THF, a su vez, son capaces de aceptar unidades metilo (un solo carbono) que se fijan en las posiciones 5 y 10 o en ambas, dependiendo del estado de oxidación.

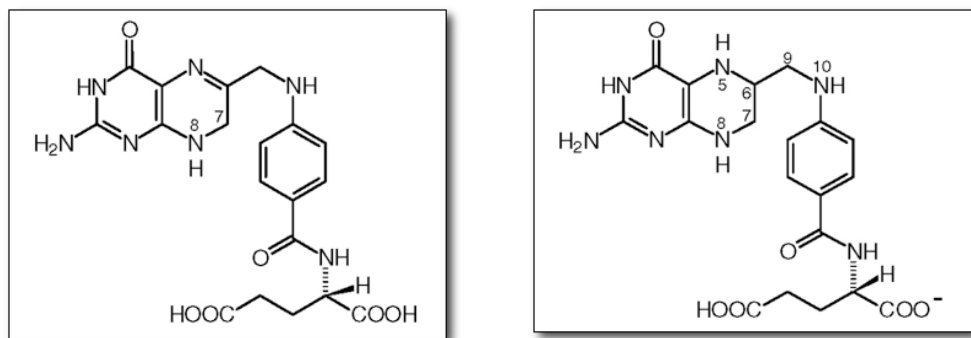


Figure 2. DHF and THF structure.

Su principal función es la de ser aceptores y donantes de unidades monocarbonadas, fundamentalmente de grupos metilo. En este sentido, y como se verá más adelante, los THF portadores de un grupo metilo son esenciales para la síntesis de algunos aminoácidos (metionina), de nucleótidos, de ADN y ARN.

Los folatos existen principalmente en dos formas: como 5-metiltetrahidrofolatos (5-Me-THF), que es el mayoritario, y como formiltetrahidrofolatos (formil-THF). El 5-Me-THF por oxidación se transforma en 5-metil-5,6-dihidrofolato (5-Me-5,6-DHF) siendo esta forma la que más comúnmente se encuentra. Durante el proceso de digestión, el 5-Me-5,6-DHF se degrada rápidamente por ser más inestable; el ácido ascórbico, secretado de forma activa en el estómago desempeña un papel importante, ya que salva la labilidad del 5-Me-5,6-DHF al reducirlo de nuevo a la forma estable 5-Me-THF. Este mecanismo es crucial para optimizar la biodisponibilidad de los folatos (Lucock, 2000).

El mecanismo de absorción de los folatos es complejo. Los folatos se encuentran en los alimentos, en su gran mayoría (90%), en forma de poliglutamatos y asociados a proteínas; es así como se encuentran a nivel intracelular. El resto se encuentran como monoglutamatos que son las formas extracelulares y en los que se transforman los poliglutamatos por acción de las enzimas digestivas. La absorción se realiza principalmente en el yeyuno, aunque parte se absorbe también en el colon; ambas absorciones han de tenerse en cuenta a la hora de calcular la biodisponibilidad total. Para poder ser absorbidos, los poliglutamatos han de ser hidrolizados a monoglutamatos a nivel intestinal. La pteroilpoliglutamato hidrolasa (γ -glutamihidrolasa o folato conjugasa) presente en la membrana del “borde en cepillo” de las células intestinales es la exopeptidasa que cataliza dicha reacción (Wright, Dainty, & Finglas, 2007). Los monoglutamatos formados son transportados al interior del enterocito por un proceso de transporte activo que implica un intercambio iónico a través de la membrana por un gradiente de pH. El pH óptimo para dicho transporte es 5.8 (Fowler, 1998). Los folatos son aniónicos al pH intraluminal y son intercambiados en la membrana por iones hidroxilo (Lucock, 2000). Se han detectado en las membranas las denominadas “proteínas ligantes de folatos” (FBP, folate binding proteins) que están implicadas en este transporte activo. Las FPB permiten la entrada en la célula a través de una vacuola de la membrana; introduce los folatos en forma de monoglutamatos, se rompe posteriormente la unión entre ambos, se libera el monoglutamato y vuelven a su posición original en la membrana (Lee, Shoda, Krall, Foster, Selhub, & Rosenberry, 1992). Sin embargo, a altas dosis, el mecanismo de absorción es el transporte pasivo (Fowler, 1998).

En general, los monoglutamatos son transferidos del interior del enterocito al plasma sin sufrir modificaciones, excepto una parte que son reducidos y metilados a 5-Me-THF, que es la forma en la que habitualmente se encuentra en el plasma. Difunden por el torrente sanguíneo hasta alcanzar diversos órganos, principalmente el hígado (Figura 3) donde los monoglutamatos se metabolizan siendo reducidos por la dihidrofolato reductasa a DHF y THF y metilados posteriormente, formándose 5-Me-THF que, cedido a la circulación, alcanza los distintos tejidos, en especial aquellos que muestran una gran división celular como la médula ósea, la mucosa gastrointestinal y el sistema inmune. Se estima que entre un 10 y un 20% de los folatos absorbidos son retenidos ahí (Gregory, 1995).

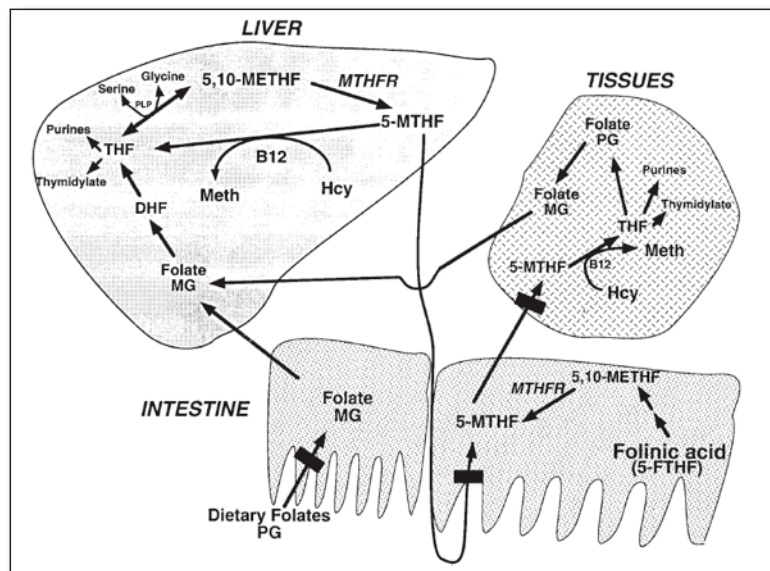


Figure 3. Schematic representation of folic acid metabolism. (Massy, 1999).

El 5-Me-THF sólo puede perder su grupo metilo cediéndolo a la homocisteína para la síntesis de metionina, reacción catalizada por la metionina sintetasa que requiere de la vitamina B₁₂ para su actividad. El THF formado debe transformarse posteriormente en un poliglutamato que es la forma más activa del ácido fólico. Para ello, tanto en el hígado como en los tejidos extrahepáticos, existe una folilpoliglutamato sintetasa que cataliza la transformación hasta alcanzar entre 5 y 6 unidades de glutámico. Así, en los tejidos se encuentran fundamentalmente los poliglutamatos mientras que en sangre y orina, mayoritariamente los monoglutamatos.

En cuanto al catabolismo y excreción de los poliglutamatos, a nivel intracelular la molécula sufre una rotura a nivel del enlace C9-N10 dando p-aminobenzoilpoliglutamato, que es hidrolizado a monoglutamato y finalmente N-acetilado antes de excretarse por vía renal. El folato excretado como tal, se reabsorbe en su totalidad en el túbulo proximal. También puede excretarse vía biliar o por las heces, siendo muy difícil cuantificar las pérdidas del folato correspondientes a la microflora intestinal (Mataix Verdú & Ochoa Herrera, 2002).

El 30-40% de los folatos se encuentran en el plasma sanguíneo parcialmente unidos a proteínas ligantes de baja afinidad, como la albúmina, a través de las cuales son transportados. También aparecen ligados a la transferrina y la α 2-macroglobulina. Existen también proteínas ligantes de alta afinidad, las cuales aumentan en los estadios de deficiencia de fólico asociados al embarazo, leucemia, uremia o enfermedades hepáticas; estas proteínas son similares a las ligantes de folato asociadas a las membranas celulares (Lucock, 2000).

La afinidad de los transportadores varía dependiendo de la forma en la que se encuentren los folatos. Así, la PCFT (protein-coupled folate transporter), tiene mayor afinidad por los folatos reducidos, mientras que las α y β -RF (reduce folate) tienen mayor afinidad por el ácido fólico (Nygren-Babool, Sternesjö, Jägerstad, & Björck, 2005; Assaraf, 2006; Zhao, Matherly, & Goldman, 2009). Los niveles bajos o la ausencia de PCFT provocan un déficit en el transporte de los folatos causando una enfermedad, “malabsorción hereditaria de folatos”, que puede ser grave (Qui, *et al.*, 2006).

Una de las funciones más importantes del ácido fólico, en su forma reducida (THF), y concretamente el 5-Me-THF, es actuar como coenzima en las reacciones de transferencia de unidades de un carbono, de restos metilo (Wagner, 1995), haciendo posibles reacciones como las siguientes (Figura 4):

1. Interconversión de serina y glicina. El THF es capaz de captar el grupo metilo de la serina en reacción reversible, dando lugar al 5,10-metilen-THF. Éste es un compuesto inestable que se degrada rápidamente a formaldehído y THF pero, no obstante, participa en una serie de reacciones de gran relevancia como son las que a continuación se relacionan (Figura 4, sombreado en amarillo).

2. Síntesis de pirimidinas. El 5,10-metilen-THF cede el grupo metileno y dos electrones del anillo de la pteridina al deoxiuridilato (dUMP) para la síntesis de deoxitimidina monofosfato, lo que permite la síntesis de timidilato y de ADN. En esta reacción se genera DHF que debe reducirse posteriormente para producir THF. La enzima que cataliza la reacción es la dihidrofolato reductasa (DHFR) la cual, en consecuencia, es un factor limitante de la síntesis de ADN (Figura 4, sombreado en morado).
3. Síntesis de purinas. El 5,10-metilen-THF se transforma en el 10-formil-THF que participa directamente en la síntesis de purinas. Éste es quizás el papel más importante del ácido fólico y sus derivados. El aminoimidazol-4-carboxamida (AICAR) y el glicinamida ribonucleótido reciben una unidad formilo del 10-formil-THF y se desencadena una cascada de reacciones que conducen a la formación de ácido inosínico, precursor de los nucleóticos púricos (Rosenblatt, 1995) (Figura 4, sombreado en rojo).
4. Síntesis de metionina y S-adenosil-metionina. La metilación de la homocisteína es un proceso indispensable para la síntesis de metionina, uno de los aminoácidos esenciales. El proceso se desencadena a partir del 5,10-metilen-THF, el cual puede reducirse a través de una reacción reversible dando lugar a 5-Me-THF. Este compuesto cede el grupo Me a la homocisteína para la síntesis de metionina, reacción catalizada por la metionina sintetasa (MS), enzima que requiere de la vitamina B₁₂ para su actividad (Figura 4, sombreado en azul). Cuando se produce una deficiencia de cobalamina, incluso habiendo suficientes folatos y 5-Me-THF, se produce lo que se denomina “Folate-trap” ya que el 5-Me-THF queda “atrapado” y no puede ni ser convertido a THF ni volver a la forma 5,10-metilen-THF (Stranger, 2002). Cuando esto ocurre, el ciclo de metilación se reduce, con las consiguientes implicaciones metabólicas (Bailey & Gregory, 1999) (Figura 5). La metionina puede volver a su vez a homocisteína, generando THF; esta vía es metabólicamente muy importante ya que se genera S-adenosil metionina (SAM) que actúa como donante de grupos metilo en gran número de transmetilaciones catalizadas por las ADN metil transferasas (DNMTs) implicadas en la síntesis de ADN, principalmente en la metilación del nucleósido citosina-guanina (CpG) (Figura 6).

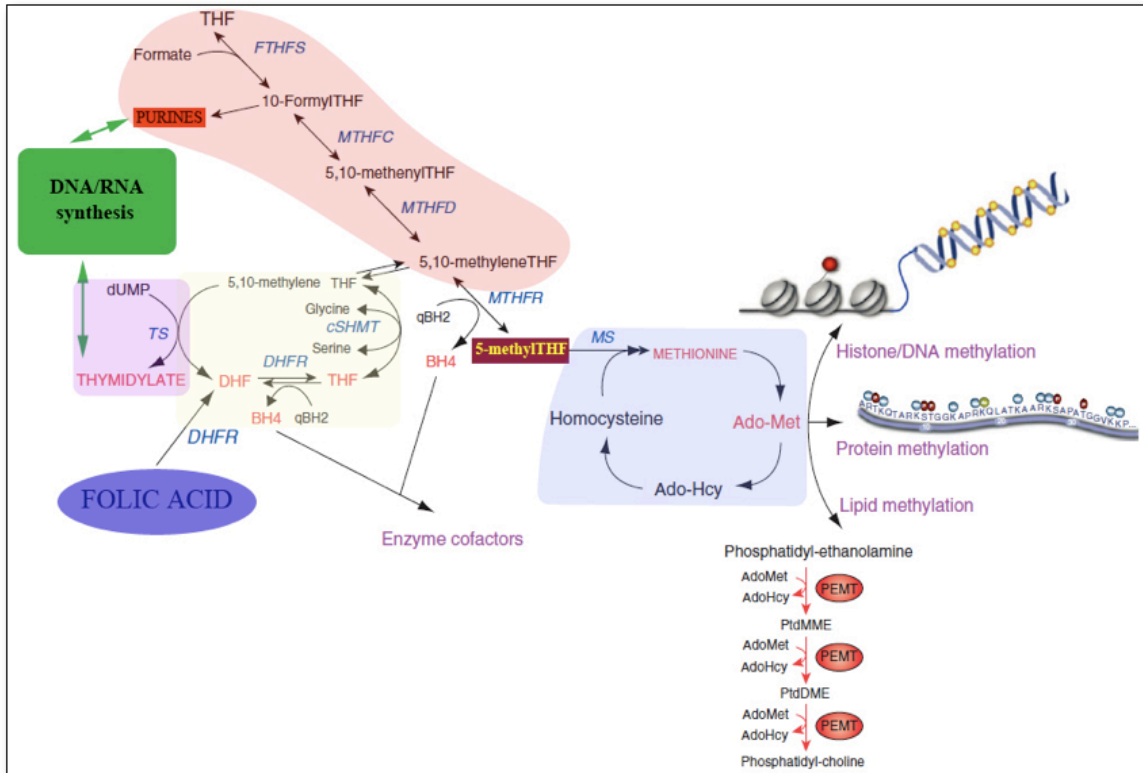


Figure 4. Folate/folic acid metabolism and its contribution to physiological processes. In blue, catalytic enzymes of folic acid metabolic processes; In red, mainly products in the metabolic pathway. Shading in yellow, glycine-serine interconversion; shading in purple, pyrimidine synthesis; shading in red, purine synthesis; shading in blue, methionine synthesis and S-adenosyl-methionine. Adapted from Ross (2010).

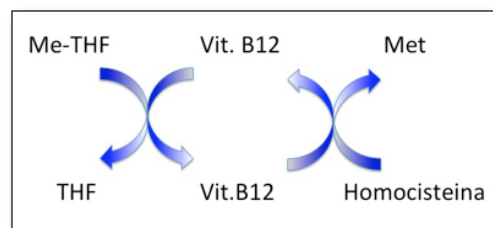


Figure 5. Interaction of vitamin B₁₂ in the methylation cycle

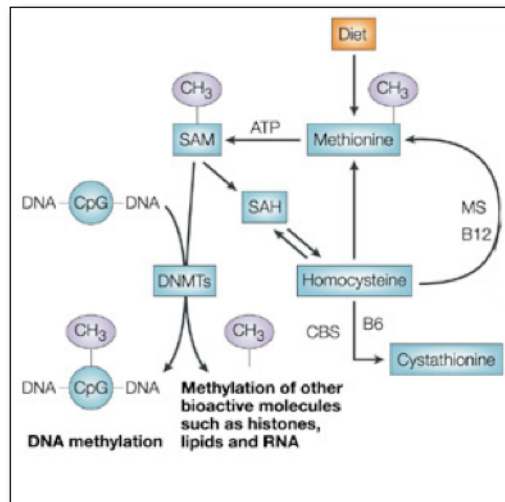


Figure 6. Importance of S-adenosylmethionine in the methylation cycle and DNA synthesis. Adapted from Lamprecht & Lipkin (2003).

5. Participación indirecta en los procesos de oxidación permitiendo la generación de compuestos reactivos al oxígeno (Figura 7). Esto se debe a que el 5-Me-THF posee una estructura similar a la de la tetrahidrobiopterina (BH₄), cofactor esencial de la oxido-nítrico sintetasa endotelial (eNOS). Esta enzima tiene dos maneras de actuar, bien uniéndose al 5-Me-THF o bien acoplándose a la BH₄. Cuando este cofactor se acopla a la sintetasa se produce óxido nítrico (NO). Sin embargo, debido al estrés oxidativo, este cofactor puede oxidarse formándose BH₂, compuesto inactivo, de forma que disminuye la formación de NO y aumenta la generación de especies reactivas al oxígeno, produciendo radicales libres que pueden favorecer la aterogénesis.

En las últimas décadas, el interés por la repercusión del ácido fólico y folatos en la salud ha aumentado notablemente. En un principio, se centraba en su papel en la prevención de defectos del tubo neural como la espina bífida, pero en la actualidad, tras el conocimiento de su implicación metabólica (ver apartado anterior) se ha relacionado con otras muchas enfermedades relacionadas, la mayoría de ellas, con la transferencia de grupos metilo y las reacciones que implican a la metionina y a la biosíntesis de las purinas y pirimidinas (Lucock, 2000; Van der Put, Van Straaten, Blom, & Trijbels, 2001; Caudill, 2004; Gregory, 2004; Wald, Wald, Morris, & Law, 2006).

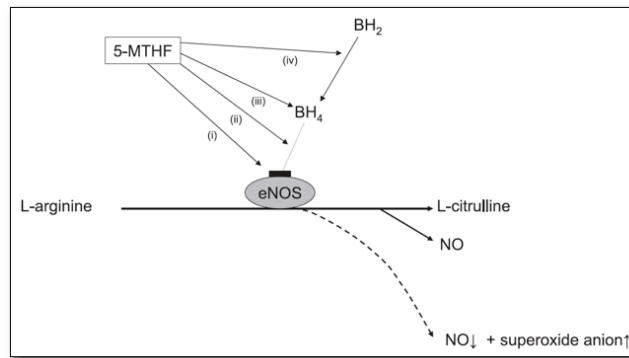


Figure 7. Folic acid and eNOS interaction. Adapted from Moens, Vrints, Claeys, Timmermans, Champion, & Kass (2008).

1.2.3. Importancia del ácido fólico: prevención de enfermedades.

1) Ácido fólico y anemia megaloblástica:

La anemia megaloblástica es una enfermedad hematológica caracterizada por la aparición de glóbulos rojos más grandes de lo habitual, deformados o fragmentados. Es una consecuencia de la ausencia de la vitamina B₁₂ y de ácido fólico/folatos en la dieta y su influencia en la síntesis de ADN (Lucock, 2000; Stanger, 2002). Al coexistir la síntesis defectuosa del ADN y la normal del ARN, células plasmáticas crecen de forma anómala; en los eritrocitos se observa un aumento del tamaño de la célula, del citoplasma, en relación con el tamaño nuclear, por lo que adoptan formas anómalas, normalmente ovaladas. La formación anómala de estas células (dispoiesis) provoca su destrucción intramedular, originándose hiperbilirrubinemia e hiperuricemia. Como están afectadas todas las líneas celulares, además de la anemia, el déficit de ácido fólico/folatos puede desarrollar leucopenia y trombocitopenia, aunque suelen tardar más tiempo en aparecer.

Debido a la implicación de los dos compuestos, a nivel clínico es difícil distinguir entre una deficiencia en folatos o en cobalamina. Sin embargo, un tratamiento con cobalamina hace que la situación vuelva rápidamente a la normalidad, ya que terminará con la inhibición, mientras que si se suministran folatos, éstos sólo serán convertidos a DHF y THF, los cuales serán utilizados para la división celular.

Tratamientos con dosis altas de folatos, durante un tiempo prolongado sólo enmascaran la causa real de una anemia perniciosa debida a la falta de vitamina B₁₂ (Stranger, 2002).

El tratamiento para la anemia megaloblástica causada por una deficiencia de folatos se basa en administrar una cantidad de 200 a 500 µg/d de ácido fólico. La respuesta verifica el diagnóstico, ya que una anemia producida por falta de cobalamina no responde a dosis tan bajas de ácido fólico (Watkins, Whitehead, & Rosenblatt, 2009).

2) Ácido fólico y cáncer:

Un estado deficiente de folatos puede reducir la disponibilidad de la S-adenosilmetionina (SAM), necesaria para la metilación de ADN y por lo tanto, podría influir en la expresión genética. Este estado también puede dar lugar a una síntesis de ADN anormal, basada en la no incorporación de grupos uracilo, lo cual lleva a la ruptura del cromosoma y a la interrupción en la reparación del ADN (Zhang, *et al.*, 1999). Estos ADN anómalos están asociados a la carcinogénesis (Maruti, Ulrich, & White, 2009). Numerosos estudios apoyan este hecho. Por un lado, se ha visto que una ingesta baja de folatos está asociada a un riesgo alto de cáncer de mama y de colon en estudios epidemiológicos, más concretamente, en casos en los que se consumió alcohol, ya que éste es un antagonista del ácido fólico (Zhang, *et al.*, 1999; Slattery, Potter, Samowitz, Schaffer, & Leppert, 1999). Pelucchi, *et al.*, (2005) observaron que combinando una ingesta alta de folatos en la dieta y un consumo de alcohol bajo, se reducía el riesgo de padecer cáncer de próstata hasta un 54%. En 2009, Maruti, Ulrich y White observaron que las mujeres que habían consumido 1200 DFE/día (Dietary folate equivalents) tenía un 22% menos de riesgo de padecer cáncer de mama que aquellas que consumían menos folatos. Por otro lado, existen otros estudios con resultados contrarios como el realizado por Hultdin, Van Guelpen, Bergh, Hallmans y Stattin (2005) quienes no encontraron una relación directa entre la ingesta de folatos y el cáncer de próstata. En 2008, Slatore, Littman, Au, Satia y White, realizaron un estudio de cohortes con hombres y mujeres de edades comprendidas entre 50 y 76 años para determinar la influencia de la ingesta de varias vitaminas en la prevención del cáncer de pulmón. No

encontraron evidencias de que el uso de multivitaminas, suplementos de vitamina C, vitamina E o folatos estuvieran asociados con una baja incidencia de este tipo de cáncer.

La utilización de agentes inhibidores de la hidrofolato reductasa (metotrexato o el 5-fluorouracilo) ha recibido especial atención en el tratamiento de cáncer al bloquear el paso de DHF a THF. La afinidad del metotrexato por la enzima es 10^5 veces mayor que por el DHF. Como consecuencia, disminuye la biosíntesis de purinas y pirimidinas y por último, de ADN, deteniendo la proliferación de células neoplásicas (Stranger, 2002).

Sin embargo, existen evidencias de que la ingesta elevada de folatos puede causar una paradójica aceleración de la carcinogénesis en individuos que presentan metástasis. Se debe a que las células neoplásicas, en su rápido crecimiento, requieren altas cantidades de ácido fólico para mantener la síntesis de timidina a un ritmo necesario para satisfacer las mayores necesidades de ADN (Mason, 2009). Así, en aquellos individuos que presenten lesiones neoplásicas, la ingesta de ácido fólico supone un riesgo adicional a la formación de tumores.

3) Ácido fólico y enfermedades cardiovasculares:

El efecto que presenta el ácido fólico sobre los niveles de homocisteína es bien conocido (Kim, 2004; Wen, *et al.*, 2008). La hiperhomocisteinemia, encontrada en más de un 40% de individuos con enfermedades cerebro-cardiovasculares, coronarias o periféricas puede considerarse como un factor de riesgo cardiovascular. Los niveles elevados de homocisteína en sangre superiores a 100 $\mu\text{moles/L}$ se consideran un factor severo de riesgo cardiovascular, moderado si son entre 30-100 $\mu\text{moles/L}$ y bajos entre 16-30 $\mu\text{moles/L}$ (Murthy, Matta, Mondal, & McNamara, 2003). Estudios desarrollados en este sentido han demostrado que la administración oral de 0.5–5 mg diarios de ácido fólico da como resultado una reducción del 25-30% en la concentración de homocisteína (Bellamy, McDowell, Ramsey, Brownlee, Newcombe, & Lewis, 1999; Chambers, Ueland, Obeid, Wrigley, Refsum, & Kooner, 2000; Carnicer, *et al.*, 2007; Moens, Vrints, Claeys, Timmermans, Champion, & Kass, 2008).

Sin embargo, la administración de ácido fólico junto con vitaminas B₆ y B₁₂ no parece ser suficiente para reducir el riesgo de eventos cardiovasculares (Lonn, *et al.*,

2006). En 2008, Albert, *et al.*, observaron que en mujeres con historial de enfermedades cardiovasculares o con 3 o más factores de riesgo, la administración de ácido fólico, vitaminas B₆ y B₁₂ no redujo los posibles factores de riesgo, aunque disminuyan los niveles de homocisteína. También se ha relacionado un bajo consumo de ácido fólico, con el riesgo de preeclampsia (Bodnar, Tang, Ness, Harger, & Roberts, 2006; Wen, *et al.*, 2008).

4) Ácido fólico y defectos del tubo neural (DTN):

La espina bífida y la anencefalia son las dos enfermedades más comunes en el feto asociadas a fallos en el cierre del tubo neural. Cuando se producen malformaciones en la columna, “espina bífida”, la médula espinal queda al descubierto en la parte inferior de la columna pudiendo producir parálisis parcial o total. Esta enfermedad comienza a desarrollarse durante los días 24-27 de embarazo, cuando la mujer, muchas veces, desconoce su estado. Aunque la etiología de estas enfermedades es muy compleja, el papel del ácido fólico en la reducción de los DTN está bien establecido ya que se han asociado a niveles altos de homocisteína, a factores genéticos que condicionan la síntesis de enzimas implicadas en el ciclo de la metionina, a la síntesis defectuosa del ADN y finalmente, a bajos niveles de vitamina B₁₂.

Uno de los estudios más representativos y que indujeron a recomendar el consumo de ácido fólico en mujeres que planificaban su embarazo, fue el llevado a cabo en 1991 por 33 centros de investigación bajo los auspicios del Consejo Británico de Investigaciones Médicas. En ese estudio se suministró ácido fólico a mujeres que habían tenido anteriormente un embarazo con DTN. Los resultados obtenidos mostraron que con la ingesta pautada de ácido fólico antes y durante el embarazo, la recurrencia de DTN disminuyó el 72% frente al grupo que no lo había consumido (Hoffpauer & Bonnette, 1998).

En la actualidad, distintas organizaciones internacionales recomiendan aumentar su presencia en la dieta, bien con el aporte de los alimentos que son ricos en folatos o con alimentos enriquecidos. Así, en Chile, es obligatoria la fortificación de harinas con ácido fólico en cantidades de 220 µg/100gr de harina. Desde 1998, en Estados Unidos es obligatorio el enriquecimiento con ácido fólico en cereales y derivados. En 2001, en E.E. U.U. se llevó a cabo un estudio sobre la incidencia de DTN después del consumo

de alimentos fortificados observándose una disminución del un 19% (Morales, 2002). En la actualidad se recomienda una ingesta de ácido fólico, a modo de suplementos, de 400 µg diarios a las mujeres que están planificando su embarazo (Rosenberg, 2005).

1.2.4. Estabilidad

El ácido fólico es un compuesto cristalino que en solución desarrolla colores entre naranja y amarillo según la concentración. Tiene una solubilidad limitada en agua, es insoluble en disolventes orgánicos y soluble en soluciones ligeramente ácidas ó alcalinas (Lund, 1994).

Aunque es un compuesto estable, su estabilidad puede modificarse por factores como la temperatura, el pH, la radiación ultravioleta (luz) o la presencia de agentes prooxidantes.

La temperatura es uno de los parámetros más importantes a tener en cuenta. Su efecto depende del tiempo de exposición al calor. A pesar de que el ácido fólico es más estable que sus derivados, los folatos, esta estabilidad se pierde a partir de los 148°C. Vora, Riga, Dollimore y Alexander (2004) estudiaron la descomposición térmica del ácido fólico utilizando técnicas fluorimétricas, polarográficas y espectrofotométricas y observaron que el ácido fólico se descompone en el rango 148-262°C y lo hace siguiendo una secuencia de tres etapas, todas ellas endotérmicas. La primera de ellas, supone la pérdida del 40% y está relacionada con la pérdida total del agua, apareciendo formas totalmente anhidras. La segunda etapa se alcanza a los 195°C y supone una pérdida adicional del 8% observándose la separación del ácido glutámico y en consecuencia, la pérdida de funcionalidad. El 52% restante del ácido fólico se pierde a partir de 200°C y supone la pirólisis del compuesto.

Ottaway y Ottaway (2002) revisaron la estabilidad de vitaminas, entre ellas el ácido fólico, durante el procesado de alimentos y describieron que en la leche pasteurizada, las pérdidas eran del 5%, del 20% durante los tratamientos UHT y del 30% después de una esterilización hidrostática. La leche UHT almacenada durante 3 meses, puede llegar a registrar pérdidas de hasta el 50%. En el caso del huevo, se puede perder hasta el 10% si se somete a una cocción, aumentando esta pérdida hasta el 30-35% tras

la fritura. Así mismo describen cómo en las espinacas, se pierde un 42% del ácido fólico tras el blanqueado por vapor y hasta el 80% cuando se hace con agua. Sin embargo, en congelación, describen pérdidas del 30% después de 3 meses de almacenamiento.

Estudios realizados en legumbres ricas en ácido fólico (*Vigna catjang L.*) (“judías de carilla”), han mostrado que las pérdidas comienzan a producirse a temperaturas superiores a 80°C y, tras una hora a 120°C, la degradación del ácido fólico se encontraba en torno a un 40%. Cuando compararon el comportamiento del ácido fólico presente en estas legumbres con el que tenía en solución acuosa, observaron que la matriz influía de forma significativa; la degradación fue más rápida en la solución acuosa que en el alimento. De alguna forma, la matriz protege al ácido fólico frente a la degradación térmica (Nisha, Rekha, & Pandit, 2005). En este sentido, Nguyun, Indrawati y Hendickx, (2003) estudiaron el efecto del tratamiento térmico en combinación con altas presiones en la estabilidad de ácido fólico y 5-Me-THF y observaron que durante procesos como la pasteurización o la esterilización, no producían pérdidas de ácido fólico, y sin embargo, para el 5-metiltetrahidrofólico se situaban en torno a un 15%. Los tratamientos de altas presiones a temperatura ambiente o superiores (mayores de 60°C) no tenían efecto significativo sobre el ácido fólico.

El pH del medio es determinante para su estabilidad. El pH óptimo es de 7,6 cuando está en solución acuosa, mientras que a pH ácido (2-4), el ácido fólico se degrada por fotólisis. Este proceso de fotólisis y los compuestos generados han sido caracterizados por Akhtar, Khan y Ahmad (2003) (Figura 8). En este estudio, los autores describieron cómo en presencia de luz ultravioleta se produce la oxidación del C9 y N10 a través de un mecanismo de radicales libres dando lugar a una enamina estable. Cuando esta enamina se encuentra en medio ácido, es más susceptible a la hidrólisis que en medio básico y se protona en el N10. Finalmente se produce la escisión de la molécula obteniendo un ácido y un aldehído que por una oxidación posterior dan lugar al ácido pterin-6-carboxílico (Akhtar, Khan, & Ahmad, 2003).

Así mismo, se ha descrito cómo el cobre, el oxígeno y la luz, en presencia de riboflavina, aceleran la destrucción del ácido fólico, mientras que el ácido ascórbico parece estabilizarlo (Arcot, Shrestha, & Gusanov, 2002).

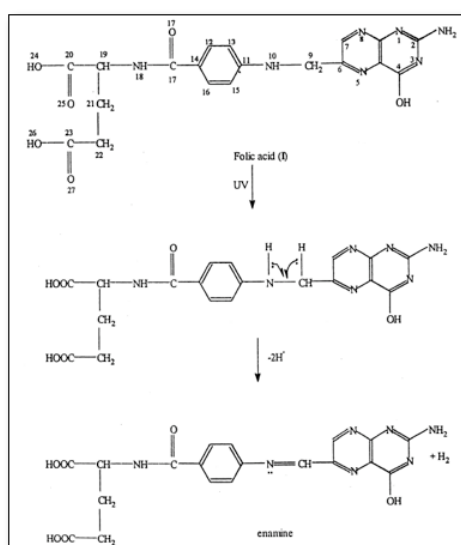


Figure 8. Folic acid photolysis. (Akhtar, Khan, & Ahmad, 2003)

También influyen algunas de las operaciones aplicadas durante el procesado de los alimentos. Un ejemplo de esto es el pelado de las frutas: durante este proceso se pierde alrededor de un 10% de ácido fólico, porcentaje que, de forma general, coincide con el que sería el correspondiente a las pérdidas de vitaminas durante la preparación del alimento. Los tratamientos alcalinos aplicados para incrementar la eficacia del pelado, pueden incrementar las pérdidas de vitaminas lábiles en la superficie del producto como folatos, ácido ascórbico y tiamina (Fennema, 2000).

Por otro lado, el ácido fólico es sustrato del pardeamiento no enzimático ya que, al ser un derivado de la pteridina, presenta grupos amino que pueden reaccionar con los hidratos de carbono dando lugar a la reacción de Maillard. El resultado de esta reacción es la degradación del ácido fólico y su pérdida durante el asado de los alimentos. Es importante tener este hecho en cuenta en productos ricos en lactosa, como la leche y sus derivados o fórmulas infantiles, así como en zumos de frutas o cereales enriquecidos ya que el tratamiento térmico hace descender el contenido de ácido fólico (Schneider, Klotzsche, Werzinger, Waibel, & Pischetsrieder, 2002).

1.2.5. Métodos de análisis

El interés creciente del ácido fólico en la dieta hace necesario desarrollar y optimizar métodos de análisis que permitan determinar de una forma precisa su contenido en los alimentos, no sólo para conocer su viabilidad después del procesado, sobre todo en los alimentos fortificados.

Uno de los primeros métodos desarrollados, y de eficacia comprobada, es el *microbiológico*. Su fundamento es sencillo: el crecimiento del microorganismo control es proporcional a la cantidad de folato en el medio; este crecimiento es estimado mediante turbidimetría. Este método fue el pionero de los utilizados para la determinación de folatos en los alimentos e incluso es reconocido oficialmente por la AOAC (Método 992.05) (AOAC, 2006) y la AACC (Método 86-47) (Arcot & Shretha, 2005). *Lactobacillus casei var. rhamnosus* ATCC 7469 es el microorganismo más utilizado para estos ensayos ya que responde perfectamente al ácido fólico y a una amplia variedad de folatos, incluyendo el 5-Me-THF; también se han utilizado *Streptococcus faecalis* ATCC 8043, *Pediococcus cerevisiae* ATCC 8081 y *Bacillus coagulans*.

La espectrofotometría es otro de los métodos utilizados para la determinación de folatos, sin embargo cobran mayor importancia los *métodos cromatográficos*. Estos últimos son capaces de diferenciar entre las distintas formas de las vitaminas y no son destructivos. Actualmente, el más utilizado es la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) que ha sido utilizada durante muchos años y en numerosos estudios para la detección de ácido fólico y folatos. Ya en 1996, Swan-Choo y E-Siong emplearon esta técnica para determinar de forma simultánea vitaminas del grupo B junto con ácido ascórbico. Observaron que eran capaces de separar las vitaminas B₁, B₂, B₆, niacina, B₁₂, vitamina C y ácido fólico en tan sólo 14 minutos. Akhtar, Khan y Ahmad, (1997) utilizaron esta técnica para estudiar la degradación del ácido fólico por la acción de la luz en soluciones acuosas. Unos años más tarde se mejoró la técnica (Osseyi, Wehling, & Albrecht, 1998) realizando previamente una extracción trienzimática y purificando las muestras a través de columnas de intercambio aniónico. También se ha empleado HPLC para su detección en zumos de cítricos (Thomas, Flanagan, & Pawlosky, 2003) observando que la forma mayoritaria no era el ácido

fólico sino los folatos. En el año 2002, Freisleben, Schieberle y Rychlik determinaron distintas formas activas del ácido fólico mediante HPLC acoplada a espectrometría de masas. Esta combinación de técnicas se ha convertido en un método muy utilizado en la actualidad para la determinación de ácido fólico y folatos incluso en sangre (Berry, Bailey, Mulinare, Bower, & Dary, 2010).

Una muy buena alternativa a estos métodos son los *bioensayos* ya que son rápidos, de alta sensibilidad y específicos. Hay dos grupos de bioensayos; el primero utiliza proteínas ligantes de folato marcadas con compuestos radiactivos (ensayos RPBA) o con enzimas (ensayos EPBA). En este caso, el ácido fólico está adsorbido en el fondo de los pocillos de una placa de microtitulación; la muestra con el ácido fólico a determinar se incorpora al pocillo con las proteínas marcadas. Durante la incubación de la muestra el ácido fólico de la muestra y el del pocillo compiten con la proteína marcada. Si el contenido en la muestra es alto, se unirá a la proteína marcada formando un complejo que se eliminará con los posteriores lavados de la placa; la poca proteína que haya quedado ligada en el pocillo, al revelar la placa con un compuesto coloreado, dará un color poco intenso que se estimará colorimétricamente y evidenciará el alto contenido de ácido fólico en la muestra. Por el contrario, si la muestra tiene poco ácido fólico, la proteína queda mayoritariamente unida al pocillo, por lo que el color que se desarrollará será más intenso.

El segundo grupo abarca los métodos de inmunoensayo (ELISA y RIA) que son más rápidos, reproducibles, fáciles de realizar y con un alto rendimiento (Arcot, Shrestha, & Gusanov, 2002); son altamente específicos y sensibles debido a la interacción de un anticuerpo con su antígeno. Esta interacción tiene una alta afinidad incluso en matrices tan complejas como los alimentos. El principio de esta técnica es prácticamente el mismo que en el primer grupo, excepto el hecho de que se emplean anticuerpos en lugar de las proteínas ligantes de folatos (Arcot & Shretha, 2005). Modificaciones del método ELISA, por ejemplo realizando un ensayo competitivo indirecto también ha obtenido buenos resultados, haciéndolo más rápido y altamente reproducible (Hoegger, Morier, Vollet, Heini, Reymond, & Rossier, 2007).

Además de estos métodos, se han desarrollado biosensores como el utilizado por Wan y Yang (2002), quienes diseñaron un electrodo de oro modificado en su superficie con una capa de 2-S-benzotiazol. Debido a que esta vitamina es un componente muy

electro-activo este método puede ser utilizado para la determinación de ácido fólico en muestras farmacéuticas, clínicas y alimentos.

Dentro de los métodos empleados para la extracción y purificación de ácido fólico cabe destacar la cromatografía de intercambio iónico y/o tratamientos enzimáticos. En el caso de los tratamientos enzimáticos, se suele realizar una extracción trienzimática, empleando proteasa, α -amilasa y folato-conjugasa. Este método ha sido utilizado desde hace años para la extracción del ácido fólico. Un ejemplo serían los trabajos realizados por Doherty y Beecher (2003), Hyun y Tamura (2005) o Johnston, Lofgren y Tamura, (2002) en el que utilizaban esta técnica para analizar folatos y ácido fólico naturales y sintéticos en alimentos (Arcot & Shrestha, 2005). En los últimos años, se han realizado diferentes variantes dirigidas a la optimización de la técnica de extracción (Chen & Eitenmiller, 2007; Cho, Choi, Lee, & Eitenmiller, 2010) como puede ser, cambiar el orden del tratamiento con las distintas enzimas, o realizar una centrifugación previa a la extracción.

1.2.6. Biodisponibilidad del ácido fólico

El término *biodisponibilidad* es un concepto multifactorial, complejo, en el que participan muchos factores como la disponibilidad del nutriente a partir del alimento, sus cambios metabólicos, la absorción, la distribución por los tejidos y la bioactividad final (Gregory, Quinlivan, & Davis, 2005).

Desde un punto de vista nutricional, la biodisponibilidad se define como *la fracción de un nutriente o compuesto bioactivo ingerido que está disponible para su uso en funciones fisiológicas normales o para su almacenamiento* (Jackson, 1997; McNulty & Pentieva, 2004; Verwei, 2004; Fernández-García, Carvajal-Lérída, & Pérez-Gálvez, 2009). También se ha definido como *la fracción de una dosis oral de un metabolito activo administrado de una forma determinada y que alcanza la circulación sistémica* (Weber, Flühmann, & Eggersdorfer, 2006).

Otro concepto importante, diferente al de biodisponibilidad pero englobado en ella es el de *bioaccesibilidad*. Se refiere a *la forma en la que un nutriente sale de la matriz del alimento durante la digestión gastrointestinal y queda disponible para su*

absorción en el intestino Estos estudios son los que habitualmente se llevan a cabo para valorar las alegaciones de salud.

Un tercer concepto a tener en cuenta es el de *bioactividad*, que se refiere a una etapa más avanzada en el proceso de digestión e incluye *el transporte y asimilación del compuesto por parte del tejido diana, cómo reacciona con bio-moléculas y su metabolismo o biotransformación*. Aquí es importante disponer de un biomarcador que permita establecer la respuesta fisiológica (Fernández-García, Carvajal-Lérida, & Pérez-Gálvez, 2009).

También se han acuñado otros términos como *bioconversión*, que sería la *fracción del nutriente biodisponible que es convertido a la forma activa* (de Groot, West, & van Staveren, 2001), o *bioeficacia* o *bioeficacia funcional*, definido como *fracción que posee un efecto positivo en un parámetro funcional* (Brouwer, van Dusseldorp, West, & Steegers-Theunissen, 2001) en un afán de intentar diferenciar mejor entre la eficiencia de absorción y el término de utilización metabólica, respectivamente, pero son bastante menos utilizadas.

La biodisponibilidad del ácido fólico depende de múltiples factores (Brouwer., van Dusseldorp, West, & Steegers-Theunissen, 2001; Öhrvik, 2009) tales como la complejidad de la dieta (Sauberlich, Kretsch, Skala, Johnson, & Taylor, 1987), la cantidad de ácido fólico ingerida (Malinow, *et al.*, 1998), la presencia de antagonistas como el consumo de alcohol (Bhandari & Gregory, 1990; Halsted, 1995), factores genéticos como la influencia del gen *RFC-1* en el metabolismo de folatos, que regula su absorción pH-dependiente o el gen que codifica para la metilen-TFH reductasa (Chiao, Roy, Tolner yang, & Sirotnak, 1997), la actividad de las proteínas ligantes de folato (Arkbåge, Verwei, Havenaar, & Witthöft, 2003) o el denominado “efecto étnico” referente a las diferencias encontradas, en estudios controlados, entre los niveles de folato en sangre en función del área geográfica en la que vivan los sujetos sometidos al estudio; el motivo no está claro, pero parece evidente el efecto de la variación genética en los niveles de las enzimas necesarios para metabolizar el folato. En el año 2003 se publicó un informe de un Workshop de la Food Standard Agency del Reino Unido (Sanderson, *et al.*, 2003) sobre la biodisponibilidad de folatos; sus conclusiones no se diferenciaron apenas de lo anteriormente mencionado, pero apuntaron un factor más a

tener en cuenta: el comportamiento del ácido fólico, su bioaccesibilidad, a partir de una comida completa en la que se ingieren varios alimentos a la vez.

Otro factor muy importante es la matriz del alimento (Keagy, Shane, & Oace, 1988; Pfeiffer, Rogers, Bailey, & Gregory, 1997; Brouwer, *et al.*, 1999; Appel, *et al.*, 2000). Este último, sin duda es uno de los más interesantes ya que cuanto más compleja sea la matriz, más atrapado puede quedar el ácido fólico y por lo tanto, más difícil será extraerlo y menor su biodisponibilidad. En el caso de los folatos, la baja bioaccesibilidad puede deberse a que se encuentren encapsulados en el interior de las células o en componentes subcelulares, lo que les hace estar libres en una pequeña proporción. Así, se ha comprobado que es mayor cuando los vegetales están troceados que cuando están enteros (Castenmiller, van de Poll, West, Brouwer, Thomas, & van Dusseldorp, 2000). Puede ser también que los folatos se encuentren unidos mediante enlaces covalentes a las macromoléculas del alimento, quedando ligados a ellas lo suficiente como para que su liberación sea complicada y su bioaccesibilidad baja (McNulty & Pentieva, 2004). Todos estos factores han sido revisados exhaustivamente por Brouwer, van Dusseldorp, West y Steegers-Theunissen, (2001) y más recientemente, por Caudill (2010).

La desconjugación intestinal de los folatos realizada de forma incorrecta también puede modificar su biodisponibilidad: si estos no se encuentran en forma de monoglutamatos no podrán ser absorbidos. De la misma forma, si el transportador se ve modificado, la biodisponibilidad también variará: un ejemplo sería la modificación del transportador más conocido, las proteínas ligantes de folatos o FBP. Factores que pueden afectar a la presencia y actividad de esta enzima, afectarán a la biodisponibilidad de los folatos, como por ejemplo, la presencia de iones de ácidos orgánicos presentes en cítricos produce un efecto inhibitorio en la actividad de la FBP (Wei & Gregory, 1998). Si no se encuentran presentes en cantidad suficiente o no están disponibles, no podrán unirse al ácido fólico, con lo que no se producirá su entrada en la célula.

Sin embargo, a la hora de establecer la ingesta diaria recomendada, es necesario tener en cuenta la diferencia que hay entre la biodisponibilidad de los folatos y la del ácido fólico, siendo menor la de los primeros. La disparidad de datos es tan grande que se han descrito diferencias tan distintas como del 10, el 30, el 50 o el 98% (McNulty &

Pentieva, 2004; Gregory, Quinlivan, & Davis, 2005; Winkels, Brouwer, Siebelink, Katan, & Verhoef, 2007). Es difícil saber cuál es la cantidad real. Por ello, para poder establecer la ingesta diaria recomendada, adaptando estas recomendaciones a la biodisponibilidad real, Sauberlich, Kretsch, Skala, Johnson y Taylor, (1987) realizaron un estudio en E.E. U.U. analizando el metabolismo de los folatos en mujeres no embarazadas; los resultados indicaban que la biodisponibilidad de los folatos de los alimentos no alcanzaba el 50% de la biodisponibilidad del ácido fólico. Este estudio sirvió de base para otros estudios de intervención en humanos en los que se llegó a estimar que la biodisponibilidad de los folatos era hasta el 80% de la del ácido fólico. De estos trabajos se puede concluir que, aunque la biodisponibilidad del ácido fólico es mayor, el consumo de folatos también es importante y no solo en estados de necesidad sino en dietas diarias normales siempre que sean variadas y que incluyan frutas y verduras ya que pueden llegar a aportar hasta 370 µg de folatos (Brouwer, *et al.*, 1999; Hannon-Fletcher, Armstrong, Scott, & *et al.*, 2004; Winkels, Brouwer, Siebelink, Katan, & Verhoef, 2007).

La biodisponibilidad de un nutriente puede estudiarse a través de métodos *in vivo* y métodos *in vitro*. Cuando los métodos *in vivo* se basan en modelos animales, el principal problema es equiparar los resultados obtenidos con lo que podría ocurrir en humanos y cuando se realizan en humanos, aparecen inconvenientes como el elevado coste y las consideraciones éticas, así como el efecto de múltiples factores asociados a la propia variabilidad metabólica del individuo, factores genéticos y sobre todo, la posible influencia de componentes de los alimentos que se ingieren junto con el nutriente (Gregory, 2001). Sin embargo, presentan la ventaja de ser muy adecuados para ver la bioactividad, es decir, la cantidad del compuesto bioactivo que llega a los órganos diana; en el caso del fólico/folatos, tejidos como hígado o riñones (Witthoft, Forsskn, Johannesson, & Jagerstad, 1999).

Los estudios sobre la biodisponibilidad *in vivo* de los folatos comenzaron, aunque de forma tímida, en 1988 cuando Keagy, Shane y Oace realizaron un estudio sobre la biodisponibilidad de folatos a partir de salvado de trigo y judías en un grupo reducido de individuos. Observaron que a los que se les suministró salvado de trigo en la dieta aumentaba la absorción del ácido fólico monoglutamil (PteGlu) respecto al

heptaglutamil (PteGlu7), mientras que en las dietas en las que se incluían las judías, se minimizaban las diferencias en la absorción de ambos compuestos.

Otro de los trabajos pioneros realizados con animales de experimentación (ratas) fue el de Clifford, Heid, Peerson y Bills (1991) quienes observaron una biodisponibilidad de los folatos mayor del 70%. En un estudio controlado llevado a cabo por Appel, *et al.*, (2000), se compararon dietas convencionales con otras reducidas en grasa en la que se incrementaba el consumo de frutas y verduras. Este estudio mostró cómo el mayor contenido de homocisteína se correspondía a las dietas ricas en vegetales. Estos autores determinaron que aunque existe esta relación directa, resulta difícil predecir la cantidad de folatos que se absorbe por las posibles interferencias que puedan surgir entre los componentes de los diferentes alimentos. En cualquier caso, los autores de estos dos trabajos están de acuerdo en establecer un orden de preferencias en estudios de esta naturaleza, dando la prioridad al conocimiento de la bioaccesibilidad de nutrientes en los alimentos de forma individual y después, pasar a conocer su absorción a partir de una dieta mixta. Más recientemente, en 2007, Winkels, Brouwer, Siebelink, Katan y Verhoef, observaron que la biodisponibilidad de los folatos era un 80% de la del ácido fólico. En la actualidad hoy en día está bien establecido que en el caso de los folatos, los estudios de intervención en humanos más fiables son los que se realizan a largo plazo (15-16 semanas), si bien los realizados a corto plazo (4 semanas) pueden servir de índice ya que se puede estimar la relación entre la ingesta y su excreción urinaria (Öhrvik, 2009).

La influencia de la matriz del alimento se ha demostrado en diferentes trabajos. Aunque en algunos casos podría producirse su encapsulación, generalmente el ácido fólico, cuando se añade a los alimentos procesados, está en estado más libre que los folatos naturales. Así, estudios realizados por Riddell, Chisholm, Williams y Mann, (2000) demostraron que la ingesta de ácido fólico a partir de cereales fortificados provocaba un descenso significativo en los niveles plasmáticos de homocisteína y mejoraban notablemente la concentración de folato en sangre, un claro índice de que el compuesto está libre y activo. Así, Finglas, *et al.*, (2002) desarrollaron en un grupo de 15 mujeres, un protocolo oral/intravenoso, utilizando cereales fortificados con ácido fólico marcado con isótopos. En este trabajo se observó que ciertos cereales pueden inhibir la absorción de dicha vitamina, aunque eran necesarios más estudios. También

podemos destacar el trabajo realizado por de Jong, et al., (2005) en el cual se estudiaba la biodisponibilidad del ácido fólico en leches pasterizadas y UHT enriquecidas con dicha vitamina utilizando para ello una población con edades comprendidas entre 18 y 49 años. Sus resultados mostraron la buena capacidad de la leche como matriz para la fortificación con ácido fólico. En 2006, Witthöft, *et al.*, usando un modelo humano, observaron que la biodisponibilidad del ácido fólico es mayor cuando se consume como suplemento que a partir de alimentos, en ese caso concreto, panes fortificados. Carter, Monsivais y Drewnowski (2010) estudiaron mediante quimioluminiscencia, la biodisponibilidad del ácido fólico y el ácido ascórbico en un grupo de 12 adultos, en diferentes alimentos: zumo de naranja, leche desnatada y bebidas hipocalóricas fortificadas con estos ingredientes. Los resultados obtenidos mostraron una biodisponibilidad alta y similar de ambas vitaminas en todas las bebidas.

Se han publicado muchos estudios en este sentido con resultados similares; pueden consultarse los trabajos de Gregory, Quinlivan y Davis, (2005), Winkels, Brouwer, Siebelink, Katan y Verhoef, (2007) y las revisiones de Brouwer, van Dusseldorp, West y Steegers-Theunissen, (2001), Sanderson, *et al.*, (2003), McNulty y Pentieva, (2004) o Caudill (2010).

Los métodos *in vitro* se han constituido como una herramienta alternativa y muy útil para establecer de una forma objetiva la importancia de diferentes factores y permiten además, hacer un análisis en profundidad de la composición de la matriz del alimento en los procesos digestivos. En el caso de los alimentos funcionales, los métodos *in vitro* proporcionan una primera idea del comportamiento del ingrediente bioactivo, de su transporte, absorción y bioaccesibilidad pudiendo realizarse con métodos automatizados y validarlos al poder utilizar el mismo componente bioactivo de forma individualizada a modo de referencia (Fernández-García, Carvajal-Lérida, & Pérez-Gálvez, 2009).

En la Tabla 3 se muestra estudios de biodisponibilidad del ácido fólico utilizando ambos tipos de métodos y teniendo en cuenta los factores que pueden influir:

METHODS OF BIOAVAILABILITY STUDIES	REFERENCES	TYPE OF FOOD/SAMPLES
<i>In vitro</i>	(Ristow, Gregory, & Damron, 1982)	Folic acid solution
	(Arkbåge, Verwei, Havenaar, & Witthöft, 2003)	Yogurt
	(Verwei, Arkbåge, Havenaar, van den Berg, Witthöft, & Schaafsma, 2003)	UHT Milk
	(Verwei, Arkbåge, Mocking, Havenaar, & Groten, 2004)	Daily products
<i>In vivo</i>	(Öhrvik, 2009)	Breads
	(Keagy, Shane, & Oace, 1988)	Cereals and beans
	(Gregory, Bhandari, Bailey, Toth, Baumgartner, & Cerda, 1992)	Enriched apple juice
	(Pfeiffer, Rogers, Bailey, & Gregory, 1997)	Fortified cereals
	(Brouwer, <i>et al.</i> , 1999)	Vegetables and citrus
	(Finglas, <i>et al.</i> , 2002)	Cereals
	(Konings, Troost, Castenmiller, Roomans, van den Brandt, & Saris, 2002)	Spinach and folic acid as supplement
	(Wright, <i>et al.</i> , 2003)	Supplements of folic acid
	(de Jong, <i>et al.</i> , 2005)	Milk
	(Witthöft, <i>et al.</i> , 2006)	Enriched daily products, breads and dessert
(Carter, Monsivais, & Drewnowski, 2010)	Beverages	

Table 3. *In vitro* and *in vivo* bioavailability studies.

Los estudios *in vitro* se basan en simular el proceso de digestión gastrointestinal utilizando secuencialmente soluciones salinas (saliva), enzimas digestivas, cofactores, coenzimas, sales biliares, etc., en proporciones muy próximas a las que se encuentran en

el tracto gastrointestinal y a pH, temperatura y condiciones de agitación controladas que simulen a su vez, la motilidad intestinal. Los modelos más tradicionales son los estáticos que conllevan varias etapas: la primera es la fase gástrica en la que, básicamente, el alimento previamente triturado con una solución salina (saliva), se incuba en un medio con pepsina y un pH de 2,5. Posteriormente, este digerido gástrico se somete en condiciones de agitación, a la acción de enzimas pancreáticas a pH 7,5 durante un tiempo variable que, por término medio, se sitúa entre 1,5-2 horas. Posteriormente, la tercera fase (absorción intestinal) se realiza mediante el uso de membranas de diálisis que permite separar el compuesto que se quiere analizar, el cual puede ser determinado posteriormente por técnicas analíticas específicas. Estos métodos son indicativos, fácilmente reproducibles y útiles para tener una primera impresión sobre el proceso digestivo y la absorción del nutriente. Sin embargo, presentan algunos problemas basados, fundamentalmente, en la dificultad de alcanzar la composición adecuada del quimo, cuya complejidad fisiológica es bien conocida y la motilidad intestinal, ya que el tiempo de estancia en cada una de las partes del intestino es fundamental para la absorción de nutrientes la cual, además, se lleva a cabo mediante transporte activo en el que están implicadas proteínas transportadoras (Venema, Havenaar & Minekus, 2009).

Estos modelos estáticos han sido mejorados por los sistemas dinámicos patentados por el TNO (Zeist, Holanda), donde se han realizado parte de los trabajos de esta Tesis: TIM-1 (fases gástrica y absorción en intestino delgado) y TIM-2 (fase colónica) El sistema (TIM-1) consta de cuatro compartimentos sucesivos que simulan estómago, duodeno, yeyuno e íleon. Cada uno consta de una camisa de cristal en cuyo interior hay una doble pared flexible por la que circula agua termostaticada impulsada por una bomba externa. Los cambios de presión hacen que el agua mueva la pared flexible simulándose así los movimientos peristálticos. A medida que la muestra va pasando de unos compartimentos a otros se van introduciendo los correspondientes jugos enzimáticos y los ácidos/bases que ayudan a alcanzar el pH necesario en cada momento (Minekus, Marteau, Havenaar, & Huis in 't Veld, 1995). Con este equipo se han realizado numerosos estudios *in vitro* de bioaccesibilidad de ácido fólico; dentro de los trabajos más recientes, cabe destacar los realizados en relación a la influencia de la concentración de las FBP en la bioaccesibilidad del ácido fólico en leche UHT (Verwei, Arkbåge, Havenaar, van den Berg, Witthöft, & Schaafsma, 2003) o en yogures

(Arkbåge, Verwei, Havenaar, & Witthöft, 2003). Posteriormente, este mismo grupo (Verwei, Arkbåge, Mocking, Havenaar, & Groten, 2004) comprobó que la unión del ácido fólico y el 5-Me-THF a las FBP es totalmente reversible y dependiente del pH, ya que a valores próximos a 3 se rompía la unión pero al instaurarse de nuevo la neutralidad volvían a unirse. Esta unión es diferente dependiendo del folato que se trate.

1.2.7. Fortificación de alimentos con ácido fólico

Tanto la suplementación como el enriquecimiento en ácido fólico se realizan para contribuir al mantenimiento de los niveles adecuados en el organismo. En 2009, Vaesken, Alonso-Apperte y Varela-Moreiras, realizaron un estudio sobre los alimentos fortificados con ácido fólico comercializados en nuestro país (Tabla 4). En este estudio se observó que la cantidad utilizada para fortalecer alimentos suelen ser superior al 15% de la cantidad diaria recomendada (CDR) por 100 g/ml o ración y se identificaron seis grupos de alimentos enriquecidos: cereales y derivados (52%), leches y derivados (17%), alimentos para lactantes y niños de corta edad (12%), productos dietéticos y de régimen (11%), bebidas no alcohólicas (6%) y grasas comestibles (2%). Por grupos, los alimentos mayoritarios fueron los cereales para desayuno, leche, batidos y preparados lácteos, dentro de los productos lácteos y dentro de los alimentos para lactantes, las papillas. Igualmente se establecieron cuatro grupos diana a los que van dirigidos estos alimentos tomando como referencia la alegación directa mediante marketing del envase: lactantes, infantil, madres y sobrepeso. La mayoría de los productos carecían de población diana (37%), mientras que un 28% de los alimentos utilizados para el estudio iba dirigido a población con sobrepeso, siendo los productos mayoritarios los cereales y sus derivados.

Las cantidades de ácido fólico recomendadas diariamente varían dependiendo del país y del grupo de población al que van dirigidas.

FOODS GROUPS	SUBGROUP	n ₁	Folic acid µg/100 g or ml	% CDR ^a / 100 g or ml
CEREALS	Breakfast cereals	74	202,5±62,85	101.2
	cookies	35	91,82±37,31	45.9
	cereals bars	16	139.7±41.1	69.5
	bakery	7	104.3±70.7	52.1
	Subtotal	132		
DAILY PRODUCTS	Milks, milk preparations	26	45.1±55.1	22.5
	Yogourht, fermented milks	13	30	15
	Dairy desserts	4	59±33.52	29.5
	Fresh cheeses	1	30	15
	Subtotal	44		
INFANT FOODS	Baby foods	26	24.7±14.5	24.7
	Formula milk	4	15.7±7.1	15.7
	Subtotal	30		
DIETETIC PRODUCTS	Foods substitutes	20	105,4±46,7	52.7
	Several foods	7	1598.7±1451.4	800
	Dairy desserts	2	387.5±379.7	193
	Subtotal	29		
NON ALCOHOLIC BEVERAGES	Packaged juices	12	37±23.29	18.5
	Coffee, cocoa and tea	4	550.5±437.2	275.2
	Subtotal	16		
FATS	Spreadable fats	5	860±313	430
TOTAL FOODS		256		

Table 4. Marketed folic acid enriched food in Spain. Adapted from Vaesken, Alonso-Aperte, & Varela-Moreiras, 2009.

En Estados Unidos y Canadá, la cantidad diaria recomendada (RDA) ya en 1990 fue de 200 µg ácido fólico y en 2002, la FAO/OMS estableció una Ingesta de Nutriente Recomendada (RNI) para el ácido fólico de 400 µg (Gabarra, 2006). Durante el periodo de 1995-2007 los RDA/RNI fueron sustituidas y ampliadas por las DRI (Dietary Reference Intakes) que incluyen, además conceptos como Ingesta Adecuada (AI), usada cuando no se puede utilizar la RDA, Requerimiento Medio Estimado (EAR) o nivel de ingesta diaria de un nutriente estimado para cubrir el requerimiento de la mitad (mediana) de los individuos sanos, o el Nivel Máximo de Ingesta Tolerable (UL) que es el umbral a partir del cual empiezan a observarse efectos adversos y/o el nivel máximo

de ingesta que no produce tales efectos. En el caso de los folatos, la UL se sitúa en 1000 μg para adultos (Gabarra, 2006).

En 2006, la Organización Mundial de la Salud (OMS), estableció como DRI para adultos 400 equivalentes dietéticos de folatos (DFE), 600 para mujeres embarazadas y 500 para mujeres en periodo de lactancia.

Para establecer una relación entre la absorción de folatos y del ácido fólico, se establecieron unas nuevas unidades, los equivalentes dietéticos de folatos (DFE). Estas unidades tienen en cuenta que la biodisponibilidad del ácido fólico presente como fortificante en los alimentos se estima en un 85% y la de los folatos un 50%, la relación sería (85/50) igual a 1,7. Por ello, 1 μg ácido fólico como fortificante = 1,7 μg DFE. Estas estimaciones deben ser revisadas con los nuevos avances científicos con el fin de adecuarlas a las nuevas necesidades. En cualquier caso, los EDF pueden expresarse de diferentes maneras (Suitor & Bailey, 2000):

- 1 μg DFE = 1 μg folatos en alimentos = 0,6 μg ácido fólico añadido a alimentos = 0,5 μg ácido fólico ingerido sin alimentos.
- 1 μg ácido fólico como suplemento = 2 μg DFE.

En España, las ingestas recomendadas (IR), tienen en cuenta distintos grupos de población y así, son de 400 μg de ácido fólico para adultos, 600 μg para mujeres gestantes y de 100 a 200 μg para la población infantil. A efectos legales, a la hora de establecer una cantidad en el etiquetado, la referencia aplicable es la de la CDR de 200 μg (Vaesken, Alonso-Aperte, & Varela-Moreiras, 2009) (Real Decreto 1669/2009).

1.3. Productos cárnicos funcionales

La carne es uno de los alimentos básicos en la alimentación humana y una de las piezas claves en la dieta de los países desarrollados, aunque su consumo está ligado estrechamente a factores sociales, económicos, políticos, creencias religiosas y culturales, así como a aspectos geográficos que, en algunas ocasiones, limitan su consumo aún siendo un alimento de reconocido valor nutritivo, fundamentalmente por el balance de aminoácidos esenciales. Sin embargo, para la mayoría de las poblaciones, la carne es un alimento de prestigio muy apreciado y hasta hace relativamente poco tiempo asociado con una buena salud y prosperidad (Carbajal, 2004).

El consumo en España ha ido variando con el paso de los años con una tendencia a disminuir ligeramente; según los balances publicados por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), el consumo alcanzó su punto máximo en 1992, siendo la carne de cerdo la que experimentó un mayor aumento (MAPA, 1996). Según el Boletín Mensual de Estadísticas (MAPA, 2011), durante el mes de febrero de 2011, el consumo de carne *per cápita* fue de 51,8 Kg experimentando un descenso del consumo de carne fresca de vacuno y de cerdo en torno a un 11% en relación al año 2010. La carne de pollo es la única que ha mantenido el nivel de consumo durante ese tiempo, siendo bastante superior con respecto a los otros tipos de carne (MAPA, 2011).

Este descenso en el consumo parece asociado a una imagen un tanto denostada en los últimos años, ya que su ingesta se ha asociado a la de componentes no saludables como ácidos grasos saturados, colesterol, sal o a enfermedades cardiovasculares, obesidad, hipertensión y diversos tipos de cáncer (Jiménez-Colmenero, Carballo, & Cofrades, 2001; Biesalski, 2005).

Han sido muchos los esfuerzos y las inversiones realizadas en el ámbito de la ciencia y tecnología de la carne para contribuir a mejorar esta imagen y adaptarse a las nuevas tendencias. Entre ellos, cabe destacar la modificación de la composición de la carne y la elaboración de nuevos productos cárnicos, con un potencial nutritivo mejorado mediante la incorporación de nutrientes que redunden positivamente en la salud. Este hecho, junto con la necesidad de adaptación a los nuevos hábitos alimentarios y al ritmo actual de nuestra sociedad, ha provocado una mayor demanda de

alimentos que, además de un valor nutritivo mejorado, ayuden a estar mejor. Es así como han surgido los productos cárnicos funcionales.

Desde el punto de vista del consumidor, es muy importante que los nuevos productos cárnicos funcionales sean apropiados, y tengan las mismas o muy similares características de su homólogo convencional, tanto tecnológica como sensorialmente. Deben ser percibidos como algo natural, nutritivo y saludable. Por ello, el proceso de elaboración debe cuidarse sobremanera con el fin de evitar cambios que hagan poco atractivo al producto final.

Las estrategias que se han de llevar a cabo para su elaboración son las mismas que para cualquier otro alimento funcional (Holm, 2003; Fernández-Ginés, Fernández-López, Sayas-Barberá, & Pérez- Alvarez, 2005; Jiménez-Colmenero, Reig, & Toldrá, 2006) y que han sido mencionadas anteriormente (apartado 1.1.6).

Los principales ingredientes que se pueden incorporar o modificar en los productos cárnicos son los siguientes:

- Grasas

Puesto que la grasa es uno de los componentes de la carne que más preocupa al consumidor por su relación con diferentes enfermedades, su reducción, modificación o sustitución han sido procesos muy estudiados.

Son muchas los trabajos publicados en este sentido, pero como una pequeña muestra, podemos citar algunos relacionados con cambios de su composición mediante la incorporación de los ingredientes saludables en los piensos (de la Hoz, D'Arrigo, Cambero, & Ordóñez, 2004), o la sustitución de grasa animal por otras más saludables como el aceite de oliva o de girasol (Muguerza, Fista, Ansorena, Astiasarán, & Bloukas, 2002) o ácidos grasos poliinsaturados *n*-3 procedentes de aceites de pescado (Cáceres, García, & Selgas, 2008), de algas (López-López, Cofrades, & Jiménez-Colmenero, 2009; Cofrades, *et al.*, 2010; Cofrades, López-López, Ruiz-Capillas, Triki, & Jiménez-Colmenero, 2011) o nuez (Ayo, Carballo, Serrano, Olmedilla-Alonso, Ruiz-Capillas, & Jiménez-Colmenero, 2007). Así se ha conseguido reducir el colesterol hasta valores

próximos al 60%. También se ha utilizado mezclas de aceites interesterificados (aceite de palma y de algodón entre otros) o harina de semilla de uvas para mejorar el perfil nutricional y reducir la oxidación lipídica (Özvural & Vural, 2008, 2011).

- Proteínas

Son muchos los productos cárnicos que han incorporado en su composición proteínas de origen vegetal, sobre todo de proteína de soja (Paneras, Bloukas, & Filis, 1998) por su papel preventivo en enfermedades cardiovasculares, cáncer y osteoporosis.

También se han utilizado derivados proteicos del huevo o la leche (caseinatos), que aportan una buena funcionalidad a los productos cárnicos pero poseen ciertas proteínas que dan lugar a intolerancias alimentarias o reacciones alérgicas.

Por ello, en los últimos años se han desarrollado los productos denominados “Apilight”, cuya formulación elimina estos componentes alérgicos. Estos productos (“allergen-free”) han sido categorizados como FOSHU por las autoridades japonesas (Arihara, 2006). Muchas proteínas contienen además secuencias bioactivas, péptidos, que se encuentran inactivas dentro de las mismas, pero cuando son liberados por un proceso proteolítico, pueden actuar como sustancias reguladoras. Se han descrito algunas funciones de tanta relevancia (antioxidativas, antimicrobiana, hipocolesterolémicas, antihipertensivas, inmunomoduladores, prebióticos o antidiabética) que los péptidos bioactivos son candidatos prometedores como ingredientes de productos cárnicos funcionales. En el caso de los productos cárnicos madurados, pueden llegar a formarse como consecuencia de los procesos hidrolíticos que tienen lugar durante la maduración (Arihara, 2006; Zhang, Xiao, Samaraweera, Lee, & Ahn, 2010).

- Prebióticos y probióticos

En los productos cárnicos, el prebiótico por excelencia es la fibra. Se han conseguido productos cárnicos frescos, cocidos y madurados enriquecidos con diferentes tipos de fibras solubles e insolubles (fruta, cereales, hortalizas, inulina,

fructooligosacáridos) en cantidades significativas por ración para que se puedan considerar como *fuentes de fibra* sin que se observe impacto negativo en la calidad sensorial. En algunos casos las cantidades incorporadas han sustituido parcialmente la grasa. Valga como muestra los siguientes trabajos: Mendoza, García, Casas y Selgas, (2001); Cáceres, García, Toro y Selgas, (2004); Rodríguez, Jiménez, Fernández-Bolaños, Guillén y Heredia, (2006); Fernández-López, Sendra, Sayas-Barberá, Navarro y Pérez-Alvarez, (2008); Calvo, García y Selgas, (2008); Choi, *et al.*, (2008); Sayago-Ayerdi, Brenes y Goni, (2009); Salazar, García y Selgas, (2009); Viuda-Martos, Ruiz-Navajas, Fernández-López y Pérez-Álvarez, (2010).

El uso de probióticos en el diseño de productos cárnicos funcionales, es otra línea interesante. Algunas de las ventajas que aportan las bacterias probióticas utilizadas son: modulación de la flora intestinal, prevención de diarreas, disminución del nivel de colesterol en plasma, prevención y tratamiento de alergias alimentarias o modulación de la respuesta inmune. Su incorporación a productos, fundamentalmente madurados, puede introducir beneficios potenciales en la salud del consumidor (Arihara, 2006). Las bacterias más comúnmente utilizadas para este fin son *Lactobacillus* o *Bifidobacterium* (De Vuyst, Falony, & Leroy, 2008) habiéndose observado que su incorporación apenas inducen cambios físico-químicos, tecnológicos o sensoriales (Pérez-Alvarez, 2008).

- Antioxidantes, vitaminas, minerales y sales

El interés en el uso de antioxidantes y/o vitaminas (C, E, carotenoides o polifenoles) para la elaboración de alimentos funcionales ha aumentado considerablemente. Así, se han utilizado extractos de semillas de uva y de gayuba en carne de cerdo cruda y cocinada y en la elaboración de productos cárnicos (Mielnik, Olsen, Vogt, Adeline, & Skrede, 2006; Carpenter, O'Grady, O'Callaghan, O'Brien, & Kerry, 2007), subproductos de cítricos en la elaboración de productos cárnicos (Fernández-López, Fernández-Ginés, Aleson-Carbonell, Sendra, Sayas-Barberá, & Pérez-Alvarez, 2004) o fibra dietética de las uvas en hamburguesas de pollo (Sáyago-Ayerdi, Brenes, & Goñi, 2009); también se han ensayado subproductos y excedentes del tomate como fuente de licopeno en productos cárnicos frescos y madurados con excelentes resultados tecnológicos y sensoriales (Calvo, García, & Selgas, 2008; Selgas, García, & Calvo,

2009; García, Calvo, & Selgas, 2009). Otro ejemplo son las salchichas enriquecidas con luteína (Granado-Lorencio, *et al.*, 2010), resultando un buen vehículo para aumentar la ingesta de dicho compuesto en la dieta. Más recientemente se ha estudiado (Özvural & Vural, 2011) la viabilidad de harina de semillas de uva en salchichas, mejorando el perfil nutricional y reduciendo la oxidación lipídica.

También se han realizado estudios con resultados favorables en la incorporación de minerales, como el calcio, selenio y zinc en productos cárnicos. Es innegable el papel que juega el calcio en el organismo (la denominada *salud ósea*), garantizando la integridad de los tejidos y manteniendo la función celular. Bien es cierto que la principal fuente de calcio es la leche y sus derivados, pero se han incorporado diferentes sales cálcicas (citrato, lactato, gluconato cálcicos) de alta biodisponibilidad, en productos cárnicos, también con buenos resultados tecnológicos y sensoriales (Cáceres, García, & Selgas, 2006; Selgas & García, 2008; Selgas, Salazar, & García, 2009).

El papel del selenio como parte del sitio activo de la enzima glutatión-peroxidasa es bien conocido. La función metabólica de esta enzima es vital para las células ya que forma parte del mecanismo responsable del metabolismo y detoxificación del oxígeno. En EE. UU el selenio se aporta principalmente a través de cereales, pan, carne y productos cárnicos. Modificando los piensos para porcino, se ha conseguido carne con diez veces más de selenio que en una carne de cerdo tradicional (Zhang, Xiao, Samaraweera, Lee, & Ahn, 2010; García-Íñiguez de Ciriano, *et al.*, 2010).

El zinc es componente de algunas metaloenzimas y es importante tanto para el crecimiento como para la replicación celular, osteogénesis y para el sistema inmunitario. Por lo tanto el desarrollo de nuevos productos cárnicos enriquecidos con zinc sería una buena forma de aumentar su consumo en la dieta (Türkmen, Türkmen, Tepe, Ateç, & Gökkuç, 2008).

De las sales, la más importante es el cloruro sódico por su relación con problemas de hipertensión. Su reducción en la industria cárnica ha tenido una alta repercusión, encontrándose actualmente en el mercado multitud de productos hiposódicos que ayudan a mantener la salud del consumidor: jamón cocido, salchichas... (Gimeno, Astiasarán, & Bello, 1999; Gimeno, Astiasarán, & Bello, 2001; Vandendriessche, 2008).

Sin embargo, en algunos productos cárnicos, la reducción excesiva de cloruro sódico presenta efectos negativos sobre la calidad final. Por ejemplo, Gou, Guerrero, Gelabert y Arnau, (1996) y Gelabert, Gou, Guerrero y Arnau, (2003) utilizaron como sustitutos del NaCl sales como cloruro potásico, lactato potásico y glicina, en mezcla o de forma individual, obteniendo deficiencias importantes en el aroma del producto, cuando las sustituciones que se realizaban estaban en torno a un 40%. Sin embargo, si el porcentaje de sustitución es menor, los resultados son mejores (Ibáñez, Quintanilla, Astiasarán, & Bello, 1997; Ansorena & Astiasarán, 2007).

En la tabla que se muestra a continuación (Tabla 5), se resumen algunos de los productos cárnicos funcionales desarrollados durante los últimos años.

1.4. Productos listos para el consumo (*Ready-To-Eat*, RTE)

La transformación de los hábitos alimentarios en el momento actual es muy evidente sobre todo en las grandes ciudades en las que las distancias y la ajetreada forma de vida dificultan e incluso impiden tener una alimentación reposada o tradicional. Cada vez es más frecuente el consumo de comidas rápidas, preparadas en envases unidos o familiares, tanto de alimentos crudos como procesados. Esta situación ha provocado que la industria alimentaria surta a los minoristas envases domésticos de uso fácil y rápido, que se consumen directamente, con un procesado mínimo y que apenas exija una preparación culinaria. Otras veces, son las grandes superficies las que preparan raciones individuales (lonchas, filetes, piezas pequeñas, etc.) y las envasan para su exposición y venta en vitrinas refrigeradas. En la mayor parte de los casos, estos productos se envasan a vacío o en atmósferas modificadas y han de mantenerse en refrigeración hasta su venta con el fin de alargar su vida útil. Estamos hablando de los denominados *alimentos listos para el consumo* (ready to eat, RTE). La importancia que han adquirido estos productos en la actualidad se pone en evidencia simplemente al echar un vistazo a cualquier supermercado y observar la gran variedad de productos de origen vegetal y animal que se expone para la venta. Entre estos alimentos alcanzan una notoria relevancia los productos cárnicos cocidos y madurados y/o curados (jamón cocido, mortadelas, chorizo, salchichón, fiambres) y diversos productos formulados a base de carne (rotí, carne guisada, etc.).

FUNCTIONAL INGREDIENT	MEAT PRODUCT	REFERENCE
Olive oil	Dry fermented sausages	(Muguerza, Gimeno, Ansorena, Bloukas, & Astiasarán, 2001; Muguerza, Fista, Ansorena, Astiasarán, & Bloukas, 2002; Muguerza, Ansorena, & Astiasarán, 2003; Ansorena & Astiasarán, 2004)
	Cooked meat products	(Pappa, Bloukas, & Arvanitoyannis, 2000)
Polyunsaturated fatty acids	Dry fermentes sausages	(de la Hoz, D'Arrigo, Cambero, & Ordóñez, 2004)
	Fresh meat products	(Betti, Schneider, Wismer, Carney, Zuidhof, & Renema, 2009)
Conjugated linoleic acid	Fresh meat products	(Hur, Ye, Lee, Ha, Park, & Joo, 2004)
Green tea	Fresh meat products	(Jo, Ho Son, Bae Son, & Woo Byun, 2003)
Dietary fiber	Chicken nuggets	(Verma, Sharma, & Banerjee, 2009)
Dietary fiber from grapes	Fres meat products (chicken hamburgers)	(Sayago-Ayerdi, Brenes, & Goni, 2009)
Dietary fiber from carrots	Dry fermented sausages	(Eim, Simal, Rosselló, & Femenia, 2008)
Interesterified oils	Cooked sausages	(Özvural & Vural, 2008)
Olive oil and <i>n</i> -3 from algae	Cooked sausages	(López-López, Cofrades, & Jiménez-Colmenero, 2009)
Fatty acids <i>n</i> -3	Meat products (bologna)	(Berasategi, <i>et al.</i> , 2011)
Inulin	Fresh meat products	(Yilmaz & Gegel, 2009)
	Dry fermented sausages	(Mendoza, García, Casas, & Selgas, 2001)
	Cooked meat products	(García, Cáceres, & Selgas, 2006)
Fructooligosaccharides	Dry fermented sausages	(Salazar, García, & Selgas, 2009)
Melon seed oil	Fresh meat products	(Maryam, Varidi, Shahidi, & Marashi, 2009)
Lycopene	Fresh meat products	(Selgas, García, & Calvo, 2009)
Calcium salts	Dry fermented sausages	(Selgas, Salazar, & García, 2009)
Selenium, iodine, <i>n</i> -3, and naturals antioxidants	Dry fermented sausages	(García-Íñiguez de Ciriano, <i>et al.</i> , 2010)
Lutein	Cooked meat products	(Granado-Lorencio, <i>et al.</i> , 2010)
Canola oil, rice bran	Cooked meat products	(Álvarez, Delles, Xiong, Castillo, Payne, & Laencina, 2011)
Grape seed flour	Cooked meat products	(Özvural & Vural, 2011)

Table 5. Review of the studies about functional meat product developed in the last years.

La FDA (2009) indica que la categoría de RTE se refiere a alimentos que: *son de origen vegetal o animal, crudos o parcialmente cocinado... que han recibido el tratamiento adecuado para asegurar la letalidad de microorganismos patógenos de acuerdo con una variación de las condiciones de procesamiento concedidas por una autoridad reguladora ... elaborados de tal forma que no necesitan preparación adicional para conseguir su seguridad alimentaria...se encuentran preparados de tal forma que facilitan su consumo directo o bien son comestibles tras una preparación adicional que mejore su palatabilidad o estética por razones gastronómicas o culinarias...* ” (FDA, 2009).

Hay que tener en cuenta que su preparación conlleva una manipulación y cualquier operación de troceado, loncheado, dosificación o envasado, por ejemplo, presenta un riesgo de contaminación con microorganismos alterantes o patógenos, procedentes del entorno, del utillaje empleado en las operaciones, manipuladores, etc., que pueden alcanzar el alimento y desarrollarse durante su almacenamiento en refrigeración. Es el caso de diversos serovares de *Escherichia coli*, incluido el O157:H7, *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* y *Yersinia enterocolitica* (Samelis, Kakouri, Savvaidis, Riganakos, & Kontominas, 2005). En condiciones de refrigeración (sin sobrepasar 3-4°C), su crecimiento queda condicionado a un aumento incontrolado de la temperatura de almacenamiento, algo que, desgraciadamente, ocurre con más frecuencia de lo deseable (International Commission on Microbiological Specification fo Foods (ICMSF) 1996; Zhu, Du, Cordray, & Ahn, 2005).

En este contexto resulta muy interesante el estudio y la aplicación de las nuevas tecnologías emergentes, tratamientos no térmicos, cuyo efecto bactericida hace que se configuren como muy buenas opciones para asegurar la calidad microbiológica (Samelis, Kakouri, Savvaidis, Riganakos, & Kontominas, 2005). La aplicación de estas nuevas tecnologías debe intentar mantener las características organolépticas propias del alimento y su valor nutritivo natural, haciendo que todos sus nutrientes estén en la mejor disposición para poder ser utilizados por el organismo y evitando el uso de aditivos y tratamientos químicos (Coutrelis, 2008).

1.4.1. Métodos no térmicos de descontaminación

Dentro de los métodos no térmicos que se pueden utilizar con estos fines podemos citar los campos de pulsos eléctricos (PEF), pulsos de luz con luz blanca o UV, ultrasonidos, altas presiones hidrostáticas (HP) o la irradiación (Barbosa-Cánovas, 2008).

Los PEF consisten en la aplicación de pequeños pulsos eléctricos con una intensidad entre 10-80 kV/cm. Su efectividad se basa en el hecho de cuando se aplica una energía superior a 1 V, se produce la expansión de los poros de la membrana celular y/o la formación de otros nuevos con el consiguiente aumento de la permeabilidad. Además, con los PEF se forman radicales libres altamente reactivos, reacciones de oxidación-reducción inducida y calor (Ohlsson, Gothenburg, & Bengtsson, 2002; Lado & Yousef, 2002). La efectividad de este tratamiento se ha demostrado en distintos alimentos como leche desnatada, huevos líquidos o zumos de fruta, pero son necesarios más estudios para determinar las intensidades adecuadas para no modificar las características sensoriales y nutricionales de los alimentos, a la vez que cumplen con el correspondiente objetivo de seguridad alimentaria (Wouters & Smelt, 1997; Ohlsson, Gothenburg, & Bengtsson, 2002; Álvarez & Jil, 2003; Toepfl, Heinz & Knorr, 2007; Gómez-López, Ragaerta, Debeverea & Devlieghere, 2007; Barbosa-Cánovas, 2008).

El tratamiento con pulsos lumínicos consiste en aplicaciones sucesivas de pulsos o destellos de luz con una duración muy corta lo que provoca que la energía transmitida sea muy intensa. El tratamiento dura muy poco tiempo y su rendimiento es muy alto. Los pulsos de luz empleados durante el procesado de alimentos emiten de 1 a 20 flashes por segundo con una densidad de energía comprendida entre 0,01 y 50 J/cm² en la superficie (Oms-Oliu, Martín-Belloso, & Soliva-Fortuny, 2010). Pueden alcanzarse temperaturas momentáneas de 50-100°C pero sin ningún aumento de la temperatura global del alimento, por lo que este método es especialmente efectivo en la superficie del alimento (Öhlsson, Gothenburg, & Bengtsson, 2002). Una variante es el tratamiento con luz UV continua, no pulsada que se puede utilizar no sólo para la inhibición de microorganismos en superficies, sino en el aire y para esterilización de líquidos; de hecho se ha aplicado en vinos, zumos, bebidas y cervezas (Bintsis, Litopoulou-Tzanetaki & Robinson, 2000).

La aplicación de ultrasonidos para la eliminación de microorganismos en alimentos, es una técnica que por sí sola no es totalmente efectiva debido a que requiere su aplicación durante largos periodos de tiempo. Su efecto letal se debe al fenómeno de cavitación, el cual libera grandes cantidades de energía, generando altas temperaturas instantáneas (aproximadamente 4700°C) y ondas de choque con presiones de varias atmósferas (Char, Mitilinaki, Guerrero, & Alzamora, 2010). Se ha estudiado el efecto combinado de ultrasonidos y calor aplicado de forma simultánea (termoultrasonicación) tanto en alimentos líquidos como leche (Ordóñez, Aguilera, García, & Sanz, 1987; García, Burgos, Sanz, & Ordóñez, 1989) como para la eliminación de *Salmonella* de la cáscara de huevo (Cabeza, Ordóñez, Cambero, de la Hoz, & García, 2004). Igualmente, se ha estudiado el efecto combinado de ultrasonidos y presión (Manosonicación) (Pagán, Mañas, Palop, & Sala, 1999). Por otra parte, en combinación con otras técnicas, como aplicación de calor moderado, se ha demostrado que aumenta su efecto inhibitor sobre *Listeria monocytógenes*, *Escherichia coli* O157:H7 y *Mycobacterium spp.* (D'Amico, Silk, Wu, & Guo, 2006; Al Bsoul, Magnin, Commenges-Bernole, Gondrexon, Willison, & Petrier, 2010).

En el caso de las altas presiones hidrostáticas, los alimentos son sometidos a presiones comprendidas entre 300-800 MPa, valores capaces de inactivar microorganismos y enzimas con pérdidas mínimas de aromas o nutrientes. Su efecto se basa en la combinación de presiones y temperaturas, consiguiendo tanto la inactivación de células vegetativas como de las esporas bacterianas sin que se modifiquen las características sensoriales del alimento (Barbosa-Cánovas, 2008). Se han desarrollado diferentes hipótesis sobre la inactivación microbiana producida; así, la ruptura de la pared celular debido al aumento de la presión interna (Nakamura, Enomoto, Fukushima, Nagai, & Hakoda, 1994) o la extracción de los lípidos de la pared celular (Enomoto, Nakamura, & Hakoda, 1997), pueden ser alguna de las causas de la muerte celular (Spilimbergo, Elvassore, & Bertucco, 2002). En los alimentos, las altas presiones producen la desnaturalización de las proteínas (gelificación), inactivación de enzimas, cambios en las interacciones entre sustrato y enzima, así como cambios en hidratos de carbono y lípidos (Aymerich, Picouet & Monfort, 2008). Su efectividad ha hecho que las altas presiones se hayan utilizado en una amplia gama de alimentos como zumos y bebidas, productos cárnicos, derivados de la pesca, quesos, gazpacho, mermeladas,

guacamole y salsas (Smelt, 1999; Andrés, Adamsen, Møller, Ruiz & Skibsted, 2006; Rubio, Martínez, García-Cachán, Rovira & Jaime, 2007; Medina, *et al.*, 2009).

El último de los procesos citados es la irradiación, en la actualidad uno de los procesos no térmicos más estudiados y a la vez más polémicos. Por ser el que centra la atención en nuestro trabajo, será considerado más en extenso a continuación.

1.4.2. Irradiación ionizante

La ionización ocurre cuando una partícula cargada, normalmente un electrón, recibe una energía suficiente para salir de su orbital atómico dejando al átomo con deficiencia electrónica y dando lugar a otro átomo, el que lo recibe, con un mayor número de electrones; en ambos casos se rompe el equilibrio existente entre protones y electrones. Los electrones liberados pueden ionizar otros átomos dando lugar a una cascada de colisiones que origina un conjunto de partículas iónicas altamente inestables. Cada ionización produce aproximadamente una energía de 33 eV. Si la radiación es insuficiente para producir cambios químicos en las moléculas se denomina *radiación no ionizante*; cuando se producen estos cambios químicos, se denomina *ionizante* (Brewer, 2004).

Básicamente hay tres tipos de radiaciones ionizantes: los rayos gamma procedentes de los radionucleótidos ^{60}Co o ^{137}Cs , los electrones acelerados generados en equipos con una energía igual o inferior a 10 MeV y los rayos X, generados en equipos con una energía igual o inferior a 5 MeV. Estas fuentes de irradiación presentan características diferentes (Cleland, 2006; Aymerich, Picouet & Monfort, 2008):

- 1) ^{60}Co : Se obtiene por activación neutrónica del ^{59}Co . Se caracteriza por su alto poder de penetración y la uniformidad de la dosis empleada. Hay una alta disponibilidad de este tipo de fuentes, su riesgo medioambiental es bajo, su coste es aceptable y ha dado resultados satisfactorios por lo que ha sido bastante utilizado en la industria alimentaria (Aliste, Vieira, & Del Mastro, 2000). Sin embargo, la vida útil del ^{60}Co es corta (5,3 años) y obliga a reemplazar la fuente con frecuencia. El ^{137}Cs se produce como resultado de la fisión de uranio. No da lugar a desechos radioactivos, ya que al desactivarse forma bario. Su uso no está

muy extendido por el momento debido a que su disponibilidad es limitada y a que su extracción es costosa (Cleland, 2006).

- 2) Haces de electrones acelerados: La radiación en este caso se produce mediante la incidencia sobre el alimento de un haz de electrones acelerados generados eléctricamente. Este sistema implica un consumo de energía elevado pero una gran ventaja es que no utiliza ningún material nuclear y que la radiación se emite sólo cuando el acelerador de electrones está encendido. Su poder de penetración es relativamente bajo 5-10 cm, por lo que es necesario distribuir el alimento en capas delgadas (no más de 8 cm) o aplicar un tratamiento bilateral (Satin, 2002; Brewer, 2004). El poder de penetración varía en función a la energía del electrón, así resulta más ventajoso usar energías de hasta 10 MeV para alimentos envasados, los cuales pueden tener una densidad media de $0,8 \text{ g/cm}^3$ y para la irradiación de granos o fluidos se pueden usar niveles menores (5 MeV) ya que se puede controlar el espesor de la capa para optimizar la penetración de la radiación (Cleland, 2006).
- 3) Rayos X: Se generan a partir de equipos que operan por debajo de 5 MeV. Esta radiación también se genera cuando un haz de electrones choca con cualquier material. En este caso, el poder de penetración aumenta con el número atómico del material sobre el que incide el haz inicial y de la energía que lleven los electrones. A mayor energía, mayor es el poder de penetración. Sin embargo, su poder de penetración a veces no es suficiente para el tratamiento de algunos alimentos como los de mayor espesor. Al igual que en el caso de los electrones acelerados, el consumo eléctrico es elevado.

Independientemente del sistema utilizado, todos tienen el mismo impacto en los alimentos, pero los consumidores reaccionan mucho mejor frente a los dos últimos que frente a los isótopos a los que asocian con la energía nuclear (Rahman, 1999).

Tradicionalmente y según la dosis utilizada, el proceso de radiación se clasifica en radapertización (10-50 kGy), radacidación (0,1-8 kGy) y radurización (0,4-10 kGy) (Ohlsson, Gothenburg, & Bengtsson, 2002; Ehlermann, 2009). En la actualidad, y

siguiendo los criterios de la Agencia Internacional de Energía Atómica (IAEA) (2002), los tratamientos se clasifican, según la dosis, en baja (hasta 1 kGy), media (de 1 a 10 kGy) y alta (de 10 a 50 kGy). Con esta clasificación se agrupan más exactamente los efectos y objetivos conseguidos.

La utilización de radiaciones ionizantes en alimentos presenta varias ventajas frente a otros tratamientos: a) el proceso es totalmente controlable, ya que en los alimentos puede disponerse un dosímetro que permite conocer la intensidad de la radiación absorbida; b) es un tratamiento que no conlleva un aumento de la temperatura por lo que el producto, a las dosis utilizadas, se mantiene igual de “fresco” antes y después del tratamiento; en este sentido, la energía absorbida por el alimento a 10 kGy es equivalente a la energía necesaria para aumentar la temperatura del agua 2,4°C (Rahman, 1999); c) se puede aplicar con el alimento envasado en distintos tipos de plástico (poliestireno, polietileno, PVC, etc.) e incluso papel o cartón porque atraviesan sin dificultad estas barreras sin verse afectadas; d) los cambios en el valor nutritivo de los alimentos son comparables a los que se producen utilizando otros métodos de conservación y e) la radiación puede penetrar hasta 8 cm por lo que alcanza lugares (“sombras”) donde no llegarían otros tratamientos superficiales como las radiaciones ultravioleta o los lavados con ácidos orgánicos (Ohlsson, Gothenburg, & Bengtsson, 2002).

1.4.3. Efectos sobre los microorganismos

La efectividad de la irradiación de alimentos para eliminar o reducir la presencia de microorganismos patógenos y alterantes, parásitos y en menor grado, virus ha sido ampliamente demostrada. Valgan como muestra los siguientes trabajos: Patterson y Stevenson, (1995); Diehl, (2001); Dickson, (2001); Zhu, Du, Cordray y Ahn, (2005); Cabeza, Cambero, de la Hoz y Ordóñez, (2007); Neal, Cabrera-Díaz, Márquez-González, Maxim y Castillo, (2008); Hyun-Joo, Jun-Sang, Ju-Woon, Keehyuk, Sang-Do y Cheorun, (2010); Beguiristain, Fuentes, Pintó y Bosch, (2011).

Los mecanismos de inactivación de microorganismos se deben fundamentalmente a lesiones en el material genético (ácidos nucleicos) y en los lípidos de la membrana celular. En los ácidos nucleicos, el choque de un electrón provoca la

ruptura de una cadena de ADN o si, la orientación de la molécula de ADN es la apropiada, la ruptura de las dos; este tipo de lesiones es mucho menos frecuente ya que es necesaria una determinada orientación del ADN en relación con la fuente de irradiación (Dickson, 2001).

En el primer caso, las lesiones producidas no dan lugar a la muerte celular pero sí a mutaciones; sin embargo, cuando varias de estas lesiones se acumulan, la bacteria pierde su capacidad para repararlo provocando finalmente su muerte. Cuando choca contra ambas cadenas se produce su ruptura causando la muerte celular de forma más inmediata. Esta tecnología se ha demostrado eficaz frente a bacterias esporuladas y vegetativas pero la dosis que hay que aplicar es muy diferente (Agencia Española de Seguridad Alimentaria (AESAs), 2005); así, debido a su bajo contenido en agua, las esporas bacterianas, como las de *Clostridium botulinum*, son mucho más resistentes a la radiación, necesitando dosis elevadas (radapertización) (Aymerich, Picouet & Monfort, 2008). Sin embargo, para la eliminación de *Listeria monocytogenes*, se necesitan dosis mucho menores (2 y 4 kGy) (Samelis, Kakouri, Savvaidis, Riganakos & Kontominas, 2005; Zhu, Du, Cordray & Ahn, 2005). En este sentido, la FDA autoriza dosis de irradiación de 3 y 4,5 kGy en carne de ave y mamíferos con el fin de disminuir la presencia de *Listeria*. Si la carne está congelada, la dosis permitida aplicada es de hasta 7 kGy (AESAs, 2005).

Dentro de los microorganismos patógenos asociados a los productos RTE, hay que mencionar que *Salmonella* spp. y *Listeria* presentan una radiorresistencia similar. Los experimentos realizados al efecto han mostrado que, a veces, se han calculado valores D más elevados para *Salmonella* y en otras ocasiones para *Listeria*, dependiendo de las condiciones experimentales (Grant & Patterson, 1992; 1995; Thayer & Boyd, 1993; Doyle, 1999). *E. coli* es más sensible a las radiaciones ionizantes que *Listeria* y *Salmonella* (Doyle, 1999) y *Campylobacter* más aún, habiéndose observado que los niveles de esta última bacteria se reducen en 3 unidades logarítmicas con dosis de 3 kGy (Roberts, 1998). La radiorresistencia de *E. coli* O157:H7 es similar a la calculada para otros serotipos de esta especie (Roberts, 1998). Se han descrito valores D a 4°C de 0,39 (Thayer & Boyd, 2001). Un tratamiento de 6 D parece ser suficiente para eliminar este serotipo a los niveles que habitualmente se encuentran en la carne (Clavero, Monk, Beuchat, Doyle, & Brackett, 1994; Thayer & Boyd, 1993).

A pesar de estos datos, es necesario optimizar al máximo los tratamientos con radiaciones ionizantes buscando siempre un equilibrio entre la dosis adecuada para reducir los patógenos y evitar que se produzcan efectos secundarios adversos, como la modificación de las propiedades sensoriales, la pérdida de nutrientes o la generación de los fenómenos oxidativos que veremos a continuación.

1.4.4. Efectos sobre los alimentos

Los resultados de las investigaciones realizadas hasta el momento indican de forma categórica que el consumo de alimentos irradiados es totalmente seguro siempre que este tratamiento se realice, entre otras condiciones, con dosis inferiores a 10 kGy (AESA, 2005). Si las dosis empleadas son más altas se pueden producir pérdidas de nutrientes (siempre menores que las producidas durante el cocinado) (Grolichová, Dvorák, & Musilová, 2004) y además, podría aparecer radiactividad inducida lo que quiere decir que algunos componentes de los alimentos se podrían transformar en radioactivos.

Las reacciones químicas que se producen en un alimento cuando se irradia son complejas y es necesario tenerlas en cuenta para valorar su calidad final. En términos generales, cuando un compuesto se irradia, los átomos y/o las moléculas se ionizan (*efecto primario*), dando lugar a radicales libres que podrán reaccionar posteriormente consigo mismo o con otros compuestos dando lugar a reacciones secundarias de dimerización, recombinación o captura de electrones generándose compuestos que no estaban presentes en la composición inicial (*efecto secundario*) y cuya formación y desaparición continúa en el alimento hasta la formación de compuestos estables. Al conjunto de estos dos procesos se le denomina *radiólisis* y su intensidad depende de la dosis de irradiación absorbida, de la composición del alimento y de las condiciones del procesado (Ordóñez, *et al.*, 1998).

Uno de los procesos más significativos es la radiólisis del agua ya que es el componente mayoritario de casi todos los alimentos; cuando se irradia el agua, se producen compuestos altamente reactivos como radicales hidroxilo, peróxido de hidrógeno, hidrógeno atómico y molecular. Un factor muy importante a tener en cuenta es la temperatura del producto durante la irradiación ya que en un alimento congelado,

los compuestos reactivos mencionados quedan atrapados y en consecuencia, no interaccionan unos con otros o con otros compuestos (Obana, Furuta & Tanaka, 2007). Sin embargo, estos compuestos quedan ahí, y cuando el alimento se descongela, comienzan a actuar pudiendo provocar cambios en el alimento (Stewart, 2001).

En las proteínas, los cambios químicos surgen como resultado de la alteración de los aminoácidos que las constituyen y están relacionados con los compuestos formados por la radiólisis del agua. Los aminoácidos más sensibles son los que contienen azufre ya que dan lugar a cantidades considerables de sulfuros como el de hidrógeno (Lacroix & Ouattara, 2000) que causan los malos olores característicos y definidos como “a irradiado”. Otras reacciones que se pueden producir son la desaminación de aminoácidos, como la histidina, rindiendo ácidos pirúvico y propiónico, decarboxilación, con producción de etilamina y acetaldehído y la oxidación de grupos sulfhidrilo con rotura de enlaces peptídicos (Diehl, 1990; Giroux & Lacroix, 1998). En el caso de los aminoácidos aromáticos, pueden aparecer nuevos compuestos que pueden ser utilizados como marcadores en alimentos irradiados; es el caso de la o-, m- y p-tirosina (Marchioni, 2006).

Cuando se irradian los carbohidratos, se reduce su rotación óptica y se puede observar un pardeamiento que da lugar a la formación de carbonilos y furanos y una mezcla de gases, básicamente H₂ y CO₂ con trazas de metano y CO (Fan & Sokorai, 2008). Así mismo, se observa un descenso del pH cuando se solubilizan en agua. En el caso de los polisacáridos, como pectinas y almidones pueden degradarse y provocar un excesivo ablandamiento en frutas y verduras; estos carbohidratos pueden perder su funcionalidad, básicamente su capacidad espesante y gelificante (Marchioni, 2006) lo que contribuiría a la pérdida de la textura del alimento. La descomposición posterior da lugar, entre otros, a ácido fórmico, acetaldehído, etanol y formiato de metilo que podrían considerarse, igualmente, indicadores de irradiación (Stewart, 2001).

La radiólisis de la grasa ha sido ampliamente estudiada ya que este proceso induce el desarrollo de reacciones hidrolíticas y si está presente el oxígeno, se acelera la auto-oxidación con la generación de compuestos volátiles responsables en gran parte de los olores y sabores desagradables asociados a la irradiación (Giroux & Lacroix, 1998) y que a su vez pueden afectar negativamente a otros componentes como las vitaminas E y K (Kwakwa & Prakash, 2006). Por todo ello, es importante que los alimentos con un

alto contenido en lípidos sean irradiados y almacenados en ausencia de oxígeno (Ohlsson, Gothenburg, & Bengtsson, 2002). Así mismo, durante la radiólisis de la grasa se generan alcanos y alquenos, ésteres, peróxidos y óxidos de colesterol, compuestos que también han sido utilizados como indicadores de irradiación (Barba, Santa-María, Flores, Herraiz, & Calvo, 2010).

La sensibilidad de las vitaminas frente a la irradiación es variable: dentro de las vitaminas hidrosolubles, las más sensibles son la tiamina, seguida del ácido ascórbico, piridoxina, riboflavina, ácido fólico, cobalamina y ácido nicotínico. En el caso particular del ácido fólico, su estabilidad frente a la irradiación es menor cuando se encuentra en solución que en los alimentos (Müller & Diehl, 1996; Araújo, *et al.*, 2011). Hay que mencionar que los folatos, por ejemplo, resultan ser más estables a la irradiación que a los tratamientos culinarios con los que se llega a destruir hasta el 50% (Müller, 1995). En el caso de las vitaminas liposolubles son más sensibles las vitaminas E y A, mientras que la vitamina K o la vitamina D son más resistentes. Como en los casos anteriores, la estabilidad y/o sensibilidad va a depender de la dosis recibida, del efecto protector que puede ejercer la matriz o los componentes del alimento y de las condiciones del tratamiento como la temperatura, lo que hace que se pueda minimizar mediante el tratamiento en congelación y en atmósfera inerte (Grolichová, Dvorák, & Musilová, 2004; Ahn & Lee, 2006).

1.4.5. Irradiación de productos cárnicos

Se conoce bien la eficacia de las radiaciones ionizantes para prevenir o retrasar la alteración de la carne. En 1999 se observó que dosis de 0,25-1 kGy, en condiciones aeróbicas, consiguió aumentar la vida útil de la carne, utilizando dosis de 2,5 kGy para controlar *Salmonella*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, o *E. coli* (Rahman, 1999).

Se ha demostrado que la irradiación es plenamente eficaz para la eliminación de patógenos: *L. monocytogenes*, *Salmonella*, *Y. enterocolitica*, *E. coli* O157:H7 (Monk, Beuchat, & Doyle, 1995; Zhu, Du, Cordray, & Ahn, 2005). En 2009, Cabeza, de la Hoz, Velasco, Cambero y Ordóñez realizaron un estudio sobre la calidad y seguridad de salchichones RTE tratados con radiaciones ionizantes. Las muestras tratadas con dosis menores de 2 kGy cumplían con el objetivo de seguridad alimentaria (FSO) y no sufrían

modificaciones sensoriales apreciables, sin embargo, otros autores (Ahn, Jo, & Olson, 2000; Lee & Ahn, 2005) indican que el uso de estos tratamientos en carne es limitado por los cambios en el aroma, color y sabor que afectan a la aceptación del producto por parte de consumidor. En consecuencia, es primordial elegir cuidadosamente la que nos permita alcanzar la seguridad microbiológica y que a la vez no produzca cambios importantes en la características sensoriales de estos productos cárnicos que llevan a rechazar el alimento irradiado por parte del consumidor.

Se ha observado que no todos los microorganismos se destruyen a dosis bajas de radiación, siendo las bacterias gram-positivas las que prevalecen tras la irradiación en una microbiota mixta. En el caso particular de *L. monocytogenes*, dosis de 2-2,5 kGy garantizan su destrucción en diversos alimentos (Huhtanen, Jenkins, & Thayer, 1989). En sandwiches de jamón congelados se ha observado que el valor D es de 0,71-0,81 kGy, necesitándose por tanto 3,5-4,0 kGy para conseguir una reducción de 5D (Clardy, Foley, Caporaso, Calicchia, & Prakash, 2002). También se sabe que *L. monocytogenes* es más resistente en carne que en medios de cultivo (Andrews, Marshall, & Grodner, 1995; Kamat & Nair, 1995; Gursel & Gurakan, 1997).

A continuación se citan algunos de los numerosos trabajos existentes sobre la irradiación de productos cárnicos: Giroux y Lacroix, (1998); Jo, Lee y Ahn, (1999); Nanke, Sebranek y Olson, (1999); Al-Bachir y Mehio, (2000); Kim, Ahn, Kim, Jo, Yook, Park y Byun, (2003); Cabeza, Cambero, de la Hoz y Ordóñez, (2007); Kwon, Kwon, Nam, Lee y Ahn, (2008); Lim, Seol, Jeon, Jo y Lee, (2008); Johnson y Resurreccion, (2009); Cabeza, de la Hoz, Velasco, Cambero y Ordóñez, (2009); Stefanova, Toshkov, Vasilev, Vassilev y Marekov, (2011).

Jo, Lee y Ahn (1999) observaron el efecto de la irradiación en la oxidación lipídica y en el desarrollo de aromas extraños en productos cocidos de cerdo. Jo, Lee, Cho, Yook y Byun, (2002) llegaron a la conclusión de que el envasado a vacío solo o combinado con el uso de antioxidantes era muy eficaz para inhibir la posible oxidación de los lípidos debida a la irradiación. Ahn, Jo y Olson, (2000); Yoon, (2003) observó un efecto negativo de la irradiación sobre las características organolépticas y propiedades físicas como la textura cuando las dosis empleadas son de 5 kGy. Kim, Ahn, Lee, Park, Ryu, Kang y Byun (2005) observaron el descenso de las aminas presentes en un producto cárnico (*pepperoni*) tras el tratamiento con 5, 10 y 20 kGy. Jo, Ahn y Byun

(2006) establecieron que la irradiación de las materias primas (carne de cerdo y cordero) utilizadas para la elaboración de salchichas tenía un efecto positivo sobre las características sensoriales de dicho producto. Johnson y Resurrección (2009) no observaron cambios en el aroma global o en la apariencia de salchichas *frankfurt* preparadas como RTE (1, 2 y 3 kGy). Stefanova, Toshkov, Vasilev, Vassilev y Marekov (2011) realizaron un estudio sobre la influencia de la irradiación en el perfil de ácidos grasos en carne de vaca empleando dosis de hasta 15 kGy y observaron un aumento de ácidos grasos saturados y una disminución de los poliinsaturados.

1.5. Legislación relativa al tratamiento de irradiación

La efectividad de la irradiación en la conservación de los alimentos ya fue observada en 1943 cuando el Instituto de Tecnología de Massachusetts, bajo un contrato con la Armada de los Estados Unidos, demostró la utilidad de la irradiación de carne picada de vaca con rayos X como método de conservación. Estos estudios continuaron después de la Segunda Guerra Mundial y en 1947 Brasch y Huber, propusieron utilizar un acelerador de electrones para irradiar, entre otros alimentos, carne y leche. Fue en EE. UU. donde se concedió la primera patente para el uso de radiaciones ionizantes para la conservación de cereales (Molins, 2001).

En la década de los 50 ya se irradiaron en Alemania especias con fines comerciales, para mejorar su calidad higiénica y Reino Unido comenzó a desarrollar su programa para irradiar alimentos. En la de los 60, la conservación de alimentos por irradiación alcanzó el umbral de industrialización en varios países desarrollados, entre ellos España (Molins, 2001).

En Europa, el uso de irradiación para la conservación de alimentos fue aprobada en 1981 por un Comité mixto de Expertos de FAO/IAEA/WHO, quienes establecieron que la irradiación (<10 kGy) de alimentos no presentaba ningún riesgo toxicológico, o nutricional, mejorando los producidos por técnicas convencionales de procesado de alimentos, siempre que se lleven a cabo buenas prácticas de fabricación e irradiación.

Pauli y Tarantino (1995) indicaron que la información que la FDA requería para regular una autorización para irradiar un alimento determinado era la fuente de

irradiación empleada y las condiciones de uso, es decir, tipo de alimento, dosis de irradiación a emplear y otras condiciones como si el alimento era fresco o congelado. En la petición para la autorización debía constar que se pretende lograr con la irradiación y la dosis. También se debían proponer métodos para controlar la dosis exacta que recibe el alimento. Igualmente, debería hacerse una evaluación sobre el impacto medioambiental.

En fecha 6 de octubre de 1966 se dictó el Decreto 2725/1966 por el que se regulaba la conservación por irradiación de alimentos destinados al consumo humano. En el mismo año se creaba además la Comisión Asesora de Conservación de Alimentos por Irradiación (Decreto 2728/1966). En 1999 se llevó a cabo una petición a la FDA para la aprobación del uso de irradiación para alimentos “listos para el consumo” (Ready-To-Eat; RTE) (Farkas, 2006) siendo este tipo de alimentos uno de los más estudiados (Zhu, Mendoca, Min, Lee, Nam, Park, Du, Ismail & Ahn, 2004; Farkas, Andrassy & Polyak-Feher, 2005; Sommers & Boyd, 2006) con el objetivo de garantizar la calidad microbiológica de dichos productos.

La Unión Europea ha tratado de armonizar la legislación relativa a este tema, estableciendo dos líneas de actuación. La primera de ellas es la Directiva 1999/2/CE relativa a la elaboración, comercialización e importación de productos alimenticios y de ingredientes alimentarios tratados con radiaciones ionizantes. En el Anexo I se establecen las condiciones para la autorización de la irradiación de productos alimenticios buscando siempre como fin la seguridad alimentaria. En el Anexo II, se establecen las fuentes de radiaciones ionizantes permitidas que son las mencionadas en el apartado 1.4.2. Con la segunda línea de actuación se regulan los productos alimenticios que pueden tratarse con radiaciones ionizantes y las dosis máximas que se pueden emplear (Directiva 1999/3/CE). Los alimentos permitidos son “Hierbas aromáticas secas, especias y condimentos vegetales” con un valor máximo de la dosis absorbida de 10 kGy.

A pesar de que en esta lista sólo figuran las especias, algunos países de la Unión Europea han autorizado la irradiación de otros alimentos (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 2001), aunque en la realidad sólo unos pocos son irradiados. Entre los países que permiten irradiar otros tipos de alimentos podemos encontrar:

- ✓ Francia: autoriza alimentos como aves de corral, menudillos de pollo, ancas de rana gambas congeladas con dosis máximas de 5 kGy, hortalizas y frutos secos (1 kGy) o clara de huevo (3 kGy), por poner algunos ejemplos.
- ✓ Holanda: autoriza la irradiación de carne de pollo (7 kGy), gambas o clara de huevo (3 kGy) o copos de cereales (1 kGy).
- ✓ Reino Unido: está autorizada la irradiación de frutas (2 kGy), hortalizas y cereales (1 kGy), aves de corral como gansos o codornices (7 kGy) o pescados y mariscos (3 kGy).

Estas normativas europeas quedan recogidas en el Real Decreto 348/2001, y se han incorporado al ordenamiento jurídico español. En él se determinan los principios generales para la elaboración, comercialización e importación de productos alimenticios e ingredientes alimentarios tratados con radiaciones ionizantes, así como los métodos para su control. Incluye también una lista de los productos que pueden ser irradiados y las dosis máximas a emplear: “Hierbas aromáticas secas, especias y condimentos vegetales” (10 kGy). Esta lista no es cerrada ya que la norma prevé la solicitud para incluir nuevos productos alimenticios.

Hay discrepancia legal en cuanto a la clasificación de irradiación de alimentos, ya que en EE. UU. lo consideran como un aditivo mientras que el resto del mundo se considera como un proceso (Lagunas-Solar,1995).

Su uso está autorizado en carne de pollo en Francia, en productos de pescado en Holanda, Bélgica y Francia, en gramíneas en Rusia o para controlar la germinación de las patatas en Japón. La irradiación de especias, hierbas o productos vegetales es una de las aplicaciones más usada hoy en día (Farkas, 2006) ya que permite sustituir al óxido de etileno o de propileno que son utilizados habitualmente para esterilización de especias.

En 2010, la GAO (United State Government Accountability Office, 2010) publicó una lista con los alimentos que la FDA autorizó para ser irradiados (Tabla 6):

FOOD PRODUCTS	AGENCY AND APPROVAL DATE	PURPOSE OF IRRADIATION	MAXIMUM PERMITTED DOSAGE (kGy)
DRY OR DEHIDRATED ENZIME PREPARATIONS	Food and Drugs Administration (FDA), June 10, 1985	Control of insects and micro-organism	10.0
PORK CARCASSES OR FRESH NONHEATED PROCESSED CUTS	FDA, July 22, 1985 United State Department of Agriculture (USDA), January 15, 1986	Control of <i>Trichinella spiralis</i>	0.30 to 1.00
FRESH FOODS	FDA, April 18, 1986	Delay maturation	1.0
FOODS	FDA, April 18, 1986	Arthropod disinfection	1.0
DRY OR DEHIDRATED AROMATIC VEGETABLES SUBSTANCES	FDA, April 18, 1986	Microbial disinfection	30.0
FRESH, FROZEN UNCOOKED POULTRY	FDA, May 2, 1990 USDA, September 21, 1992	Control foodborne pathogens	3.0
REFRIGERATED AND FROZEN UNCOOKED SHEEP, CATTLE, SWINE AND GOAT	FDA, December 3, 1997 USDA, December 23, 1999	Control foodborne pathogens and extend shelf-life	4.5 (refrigerated) 7.0 (frozen)
FRESH SHELL EGGS	FDA, July 21, 2000	Reduction of <i>Salmonella</i>	3.0
SEEDS FOR SPROUTING	FDA, October 30, 2000	Control microbial pathogens	8.0
FRESH OR FROZEN MOLLUSCAN SHELLFIS	FDA, August 16, 2005	Control <i>Vibrio</i> bacteria and other foodborne pathogens	5.5
FRESH ICEBERG LETTUCE AND FRESH SPINACH	FDA, August 22, 2008	Control foodborne pathogens and extend shelf-life	4.0

Table 6. Food products approved for irradiation in the EE.UU. (United State Government Accountability Office, 2010)

Se puede afirmar sin lugar a equívocos que la irradiación de alimentos es cada vez más común; se ha estimado que a nivel mundial el volumen de alimentos irradiados supera las 400.000 toneladas anuales y el mayor incremento se encuentra en los países asiáticos (Kume, Furuta, Todoriki, Uenoyama, & Kobayashi, 2009). Este incremento se debe básicamente a que su seguridad está ampliamente demostrada (WHO, 1997;

Morehouse & Komolprasert, 2004; Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2010).

Sin embargo, el consumo no se ha extendido, en parte por el desconocimiento que hay frente a estas nuevas tecnologías y en parte a que las palabras “radiación” o “irradiación” tienen connotaciones negativas para el consumidor. Podría decirse que los argumentos que se han utilizado frente a la irradiación son similares a los que se esgrimieron en su momento frente a la pasteurización de la leche, cuando fue introducida en el mercado hace más de 100 años.

Estudios de aptitud y test de mercados demuestran que cuando se les da la información adecuada, los consumidores aceptan los alimentos irradiados (Morehouse & Komolprasert, 2004). Generalmente, los consumidores rechazan este tipo de alimentos por la confusión que tienen respecto a lo que realmente son los alimentos irradiados: tienen un conocimiento limitado sobre cómo es el proceso de irradiación, el fundamento de este tratamiento, sobre los beneficios y la seguridad de este tipo de alimentos ya que tienen dudas tales como si los alimentos irradiados son radioactivos o no. Tienen que ser informados además sobre aspectos económicos, éticos e impacto medioambiental de esta tecnología. Una manera de hacerlo puede ser utilizando la comparación con otros métodos ya conocidos por el mismo, por ejemplo: “la irradiación es como la pasteurización, excepto que la pasteurización utiliza como energía el calor mientras que la irradiación usa otra fuente de energía” (Bruhn, 1995) e incluso se han sugerido términos como el de alimento “pasteurizado electrónicamente”. La prueba palpable del éxito de este proceso de información y educación es el rápido aumento que se ha producido en EE. UU. y Canadá en la aceptación de este tipo de productos (Morehouse & Komolprasert, 2004).

Según el Eurobarómetro del 2006 (Eurobarometer, 2006), las fuentes de información en las que más confía el consumidor son los profesionales de la salud, científicos universitarios y organizaciones de consumidores, seguidos de los científicos que trabajan en la industria alimentaria (Rollin, Kennedy, & Wills, 2011). Nuestra responsabilidad y, en consecuencia la finalidad última de trabajos como el que aquí se ha desarrollado, es abundar en esta línea y contribuir en la desaparición de los tópicos que limitan sobremanera la utilización de las radiaciones ionizantes como método de conservación de los alimentos.

Consideraciones finales

Por lo anteriormente expuesto, y teniendo en cuenta que:

1. Los productos cárnicos funcionales constituyen una parte muy importante dentro del sector cárnico y su finalidad es, entre otras, ofrecer una mayor gama de alimentos más saludables, por ejemplo mediante la incorporación de compuestos bioactivos.
2. Dentro de los ingredientes funcionales o bioactivos que se incorporan a los productos cárnicos, el ácido fólico, una de las vitaminas hidrosolubles de mayor repercusión en la salud, no ha sido ensayada nunca en productos cárnicos.
3. Los productos cárnicos funcionales no pueden ni deben ser ajenos a la demanda actual de productos de rápido y fácil consumo (alimentos listos para el consumo *RTE*). Su proyección natural en el comercio pasa, por ofrecerlos en las mismas condiciones que el producto homólogo convencional.
4. Su preparación como alimentos *RTE* conlleva la aplicación de nuevas tecnologías que aseguren el mantenimiento de la calidad higiénica y su valor nutritivo, es decir, estableciendo la bioaccesibilidad del ingrediente bioactivo para ser utilizado por el organismo.

Planteamos el presente trabajo cuya justificación se expone seguidamente.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La carne y los productos cárnicos son componentes habituales de la dieta de los países desarrollados aunque su consumo se ve afectado por diferentes factores entre los que se incluyen las propias características sensoriales y nutritivas o los relacionados con el tipo de consumidor y su entorno (estado de salud, aspectos familiares, religiosos, económicos). A pesar de que la carne se considera uno de los pilares básicos de nuestra alimentación por su interés nutritivo (no hay que olvidar el valor biológico de sus proteínas), en los últimos años parece tener una imagen “negativa” para la salud al asociarse su consumo con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares fundamentalmente, así como de obesidad, hipertensión e incluso algunos tipos de cáncer. Esta imagen negativa ha provocado un descenso de la demanda.

Por ello, se hace imprescindible innovar el sector cárnico y lanzar al mercado nuevos productos en los que la composición de la carne y en consecuencia, de los productos cárnicos se haya modificado de alguna manera con el fin de que el producto resultante se ciña cada vez más a las nuevas orientaciones nutricionales. Ésta es la puerta de entrada a los *productos cárnicos funcionales*.

Muchos han sido los ingredientes funcionales o bioactivos incorporados a productos cárnicos: aceites de origen vegetal o de pescado como fuente de ácidos grasos poliinsaturados *n-3*, proteínas de soja, antioxidantes, fibras dietéticas soluble e insoluble, minerales, pro- y prebióticos, etc. (Fernández-Ginés, Fernández-López, Sayas-Barberá, & Pérez- Alvarez, 2005; Jiménez-Colmenero, Reig, & Toldrá, 2006) y en los que se ha podido establecer el proceso tecnológico de elaboración más adecuado para obtener productos finales con el valor nutritivo buscado y unas características sensoriales lo más próximas posible al homólogo convencional al cual enriquecen. Sin embargo, hay otros ingredientes muy interesantes que no han sido objeto de un estudio de esta naturaleza a pesar de que su relevancia en la salud humana aconseje una mayor ingesta al menos en una parte de la población. Es el caso del *ácido fólico*.

Por otra parte, hay que tener en cuenta que el ritmo de vida de la sociedad actual ha transformado los hábitos alimentarios y ha hecho que cada vez sea más frecuente la cocina rápida, que lleva consigo la aparición de productos preparados o semipreparados que puedan ser consumidos en poco tiempo, prácticamente sin tratamiento culinario, pero que a la vez sean nutritivos e higiénicamente seguros. Por esta razón, la industria

alimentaria, se tiene que adaptar a estas nuevas tendencias, aumentando la producción de alimentos envasados en raciones “unidosis” o raciones domésticas, productos loncheados o troceados que no requieren tratamiento culinario y que facilitan el consumo. Estos alimentos son los conocidos como *Listos para el Consumo* o *Ready-To-Eat* (RTE). Su preparación conlleva operaciones de reducción de tamaño, es decir, troceado, loncheado, y/o otras manipulaciones como su posterior envasado, que favorecen el riesgo potencial de una contaminación. Suelen presentarse envasados a vacío o en atmósferas protectoras y mantenidos en refrigeración con el fin de alargar la vida útil. Normalmente, este tipo de productos una vez preparados, no llevan un tratamiento posterior, o si lo llevan es muy suave, de manera que si este alimento es contaminado durante su manipulación, los consumidores estarían expuestos a los posibles patógenos presentes. Por este motivo, se hace necesario higienizar el producto RTE antes de que llegue al consumidor. Esto se puede llevar a cabo mediante el uso de tratamientos no térmicos, como es la aplicación de *radiaciones ionizantes*.

Los productos cárnicos funcionales no pueden ni deben ser ajenos a estas nuevas tendencias ya que su proyección natural en el comercio pasa por ofrecerlos en las mismas condiciones que el producto homólogo convencional. Si el consumidor actual está acostumbrado cada vez más a disponer de productos cárnicos RTE, le resultan cómodos y muy útiles para su ritmo de vida; entonces, ¿por qué no pueden prepararse y consumirse los productos cárnicos funcionales como alimentos RTE si están elaborados de la misma forma?. Cuando se intenta abordar esta cuestión, surge de forma inmediata otra quizás más interesante: ¿qué es lo que le ocurre a un ingrediente funcional cuando se somete a estos tratamientos adicionales?. Este es el aspecto más importante que se pretende abordar y uno de los objetivos a cubrir.

Sin embargo, y teniendo en cuenta que en la actualidad está bien establecido que el diseño y desarrollo de un alimento funcional debe ir acompañado de estudios de bioaccesibilidad, la segunda parte de este trabajo ha consistido en establecer, mediante diferentes pruebas *in vitro*, qué cantidad del ácido fólico incorporado estaría disponible para realizar la función para la que ha sido incorporado. Hay que tener en cuenta además, que en nuestro caso, nos enfrentamos a unas matrices tan complejas como los productos cárnicos. Se tratan de sistemas en los que coexisten gran cantidad de nutrientes de distinta naturaleza, entre los que se establecen múltiples interacciones que influyen de forma definitiva en las características que le son propias. Dichas

interacciones o la misma inactivación del ingrediente funcional durante el procesado pueden hacer que no esté disponible para su absorción en cantidad suficiente para poder tener el efecto beneficioso por el que se ha añadido. Por ello, hemos considerado imprescindible estudiar si los componentes de los productos cárnicos interfieren con la disponibilidad del ácido fólico, en consecuencia, en su *bioaccesibilidad*.

Por lo anteriormente expuesto, los **objetivos** de este trabajo son:

- Estudiar la viabilidad tecnológica del ácido fólico como ingrediente funcional en productos cárnicos (frescos, cocidos y madurados) tanto convencionales como RTE.
- Evaluar las características sensoriales y los posibles cambios en los parámetros físico-químicos del producto final, producidos bien por la adición del ingrediente funcional, bien por el tratamiento de irradiación o por la combinación de ambos.
- Conocer la vida útil de los productos cárnicos diseñados estudiando la estabilidad del ácido fólico a lo largo del tiempo de almacenamiento.
- Estudiar la bioaccesibilidad del ácido fólico a partir de los productos cárnicos diseñados, tanto convencionales como RTE, utilizando para ellos dos métodos *in vitro*, uno estático y otro dinámico, que simulen el proceso de la digestión gastrointestinal.

MOTIVATION AND OBJECTIVES

Meat and meat products are usual components of the diet in the developed countries, although their consumption is affected by several factors as their own sensory and nutritional characteristics or the consumer and its environment ones (health, family, religious and economic aspects). Although the meat and meat products are considered as one of the most important groups of food in the diet, during the last years, they have acquired a “negative image” due to their relation with several disease as cardiovascular ones, obesity, diabetes or certain types of cancer. This “negative image” carries on a decrease on their consumption. This is one of the reasons why it is necessary to innovate the meat industry and place in the market new meat products, in which the meat composition would be modified in order to obtain a new product, which follows the nutritional guides. That is one option to develop functional meat products.

There are multiple functional ingredients or bioactive compounds incorporated to meat products: vegetable oils and fish as source of polyunsaturated fatty acids n-3, soy proteins, antioxidants, soluble and insoluble dietary fibers, minerals, and pro-and prebiotics (Fernández-Ginés, Fernández-López, Sayas-Barberá, & Pérez- Alvarez, 2005; Jiménez-Colmenero, Reig, & Toldrá, 2006). In those ones, the most adequate technological processes had been established in order to obtain final products with the required nutritive value and sensory characteristics. However, there are other interesting ingredients which have not been studied yet despite their importance in the human health. One of them is folic acid.

On the other hand, it is important consider that the lifestyle of consumers has led to changes on their eating habits, making more frequent the fast food, appearing prepared or semi-prepared foods, which could be consume quickly, practically without culinary treatment but being nutritive and safe. In this way, the industry has to be adapted to manufacture new products packaged in individual packaging or slice products without culinary treatment. These foods are known as Ready To Eat products. They are normally vacuum packaged or in modified atmospheres and maintained in refrigeration conditions to increase their self-life. Due to the absence of treatment after the manipulation, it is necessary to use some treatment to guarantee the microbiological

quality. One of the best options is the use of non-thermal technologies, such as irradiation treatment.

Functional meat products shouldn't be oblivious to these new trends due to its natural projection on trade is to offer the same conditions as the conventional ones. If today's consumer is increasingly used to dispose of RTE meat products, because they are convenient and useful for the consumer's lifestyle, then why functional meat product can not be prepared and consumed as RTE products? When attempting to address this issue immediately appears another question, perhaps more interesting: what happens to a functional ingredient when subjected to that treatment? This is the most important aspect that we would like to tackle and one of the objectives to be covered.

However, considering that today is well established that the design and development of a functional food must be accompanied by bioavailability studies, the second part of this work was to establish, through various *in vitro* tests, how much folic acid would be available to perform the function for which it was incorporated. Keep in mind also that in our case, complexity of matrices such as meat products. They are systems in which coexist different kinds of nutrients, where multiple interactions are established, which influence on their own characteristics. These interactions or inactivation of the functional ingredient during processing can make it unavailable for absorption in enough quantity to have the beneficial effect for which has been added. Therefore, we considered essential to study whether the components of meat products interfere with the availability of folic acid, therefore, in its bioaccessibility.

- To study the technological viability of folic acid as functional ingredient in conventional and RTE meat products (fresh, cooked and dry fermented sausages).
- To evaluate the sensory characteristics and the possible changes in the physicochemical parameters on the final product, due to the addition of the functional ingredient or due to the irradiation treatment.
- To determine the self-life of these functional meat product studying the folic acid stability during the time storage.
- To study the folic acid bioaccessibility from conventional and RTE functional meat products using a static and dynamic *in vitro* models, simulating the gastrointestinal digestion.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material de laboratorio y Planta Piloto

El material de vidrio empleado en las experiencias fue de tipo “Pyrex”.

El agua destilada utilizada para la preparación de los medios de cultivo y para las disoluciones acuosas se obtuvo en un destilador Millipore Elix 3, que proporciona una calidad del agua con una resistividad del orden de 15 M Ω . El agua necesaria para preparar las disoluciones, muestras y patrones utilizados en la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) fue agua MiliQ, agua de calidad superior a 18M Ω obtenida en un aparato acoplado al anterior.

Las pesadas ordinarias se realizaron en balanzas monoplano And mod. EK-1200^a, mod. FX-320 y mod. GF-2000; las pesadas de precisión en balanza analítica Sartorius mod. 2443.

La conservación de las muestras y sus extractos en congelación (-25°C) se realizó en arcones Liebherr y las mantenidas en refrigeración en frigoríficos Philco, Fagor, Electrolux y Kelvinator.

La homogenización de las muestras para análisis químico se realizó en un homogenizador Polytron mod. PT 10-35.

El hielo utilizado se obtuvo en una máquina Scotsman mod. AF-100.

Las disoluciones y medios de cultivo se prepararon en agitadores magnéticos Selecta mod. Agimatic N y Thermolyne mod. Nuova II, (Barcelona, España) dotadas ambas de calefacción.

Para las centrifugaciones se utilizaron centrífugas Sorvall mod. RC-5B equipadas con motores mod. GSA, GS3 y S600 .

Las pipetas automáticas utilizadas fueron Pipetman® P de Gilson, S.A.S. (mod. 20, 200, 1000 y 5000C) que dispensan volúmenes de 2-20 μ l, 20-200 μ l, 200-1000 μ l y de 5 ml, respectivamente.

Las estufas de incubación fueron Heraeus (mod. B-6200, Hanau, Alemania).

La esterilización de los medios de cultivo se hizo en autoclaves Selecta (mod. Autotester G y 43-G, Barcelona, España).

La carne se picó en una picadora Fals Co. (mod.10 Grinder, Barcelona, España).

La carne y el resto de los ingredientes se mezclaron en una amasadora Mainca (mod. RX, Barcelona, España).

El tratamiento térmico de los productos cárnicos cocidos se hizo en un horno de vapor Coven (Mod. Tec6MX, Milán, Italia).

La maduración de los embutidos se hizo en una cámara de maduración Binder (Mod. KBF 115-720, Tuttlingen, Alemania).

Los embutidos se lonchearon con una loncheadora Beckers Italy (mod. DOM, Italia).

El envasado a vacío se realizó en una envasadora Vapta, S.L. (mod. Euvac, Humanes de Madrid, España).

Las bolsas utilizadas para el envasado a vacío fueron bolsas laminadas de baja permeabilidad ($35 \text{ cm}^3 / 24 \text{ h m}^2$ bares para el oxígeno y $150 \text{ cm}^3 / 24 \text{ h m}^2$ bares para el dióxido de carbono) (Plastiñi, La Rioja, España).

En los estudios de bioaccesibilidad, las incubaciones se realizaron en un incubador orbital Infors (mod. AG CH-4103, Bottmingen, Suiza).

3.2. Reactivos y disolventes

Todos los productos químicos utilizados en este trabajo fueron de calidad “reactivo”, suministrados por las firmas Merck, Oxoid y Sigma.

El ácido fólico utilizado fue del laboratorio Inter-Pharma (Barcelona, España).

Las enzimas digestivas, reactivos del estudio de bioaccesibilidad y las bolsas de diálisis fueron de Sigma-Aldrich, (St.Louis, MO, USA).

3.3. Fabricación de productos cárnicos

Todos los productos cárnicos fueron fabricados en la planta piloto del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

3.3.1. Proceso de elaboración de productos cárnicos crudos

Como producto cárnico crudo, se eligieron hamburguesas, elaboradas con carne de vacuno. La carne fue picada con una picadora usando un plato de 3 mm.

El ácido fólico fue añadido a la carne picada disuelto en una pequeña cantidad de agua (10 ml) para facilitar su distribución de forma homogénea. Se fabricaron 3 lotes con cantidades de ácido fólico de 0,6 mg/100 g, 1,2 mg/100 g y 2,4 mg/100 g y otro lote sin ácido fólico utilizado como control.

Una vez homogeneizado, se prepararon hamburguesas de 60 g aproximadamente y se conformaron en placas de Petri, de manera que tuvieran 1 cm de altura y alrededor de 10 cm de diámetro. Las muestras fueron envasadas a vacío y se mantuvieron en refrigeración (< 4°C) hasta el momento del tratamiento de irradiación.

3.3.2. Proceso de elaboración de productos cárnicos cocidos

Se elaboraron productos cocidos (mortadelas) de acuerdo con la formulación que se muestra a continuación:

- ✓ Carne magra de cerdo 55%
- ✓ Tocino 30%
- ✓ Agua 10%
- ✓ Mezcla comercial de especias 5%

La mezcla de especias estaba formada por sal, dextrosa, proteínas de soja, especias, ácido glutámico, agentes emulsionantes y gelificantes, antioxidantes, nitrito potásico, citrato trisódico y ácido carmínico como colorante (Curavi®, Anvisa, Arganda del Rey, España).

Tanto la carne magra como el tocino (sin corteza) se mantuvieron en congelación hasta su utilización.

El agua utilizada fue en forma de hielo, para evitar que durante el picado la temperatura del producto aumentase por encima de 2°C, provocando un descenso en la capacidad emulsionante de la masa.

El ácido fólico en polvo fue mezclado con las especias con el fin de conseguir una mejor homogeneización.

Antes de comenzar, se eliminan en la carne los restos de tejido conjuntivo adheridos. A continuación se trocea junto con el tocino y se incorporan en una cutter Robot-Coupé mod. 20v. donde se pican a 1500 rpm durante un minuto. Posteriormente se añade la mitad del agua en forma de hielo junto con la mitad de las especias (que llevan incorporado el ácido fólico), y se vuelve a triturar durante un par de minutos. Pasado este tiempo se incorporan el resto del agua (hielo) y de la mezcla comercial de especias, triturándose hasta formar una pasta fina (emulsión).

La pasta fina se embute en las tripas artificiales (Multibar 80mm, Oskuda GMBH, Georgsmarienhütte, Alemania), mediante una embutidora neumática Vivar mod. 7321 (Barcelona, España). Previamente, las tripas se sumergieron en agua para humedecerlas y facilitar su llenado. Éstas se cierran mediante el uso de una grapadora manual Hemgrap (Lorenzo Barroso^R, S.A, Argenton, España).

Se fabricaron 3 lotes diferentes, dependiendo de la concentración de ácido fólico empleada: 0,6 mg/100 g, 1,2 mg/100 g y 2,4 mg/100 g, y otro sin ácido fólico utilizado como control.

Los embutidos se introdujeron en un horno y se sometieron a un tratamiento térmico de 78°C durante 35 minutos de forma que se alcance en el interior del producto

una temperatura de 72°C. La temperatura fue medida con un termómetro Interface EBI-AE 2000 (Ebro Electronic GMBH & Co., Ingolstadt, Alemania).

Finalizado el tratamiento térmico, los productos fueron enfriados en un baño de agua/hielo, loncheados, envasados a vacío y mantenidos en refrigeración hasta el tratamiento de irradiación.

3.3.3. Proceso de elaboración de productos cárnicos madurados

Se elaboraron productos madurados (salchichón) de acuerdo con la formulación que se muestra a continuación:

- ✓ Papada 15%
- ✓ Magro 85%
- ✓ Mezcla de especias ... 5%

La mezcla de especias contiene sal, dextrosa, dextrina, especias, proteína de leche, potenciador de aromas, emulsionantes, antioxidantes, nitritos y ácido ascórbico (Salavi®, Anvisa, Arganda del Rey, España).

Tanto la papada como la carne magra de cerdo se picaron y se mezclaron con las especias.

El ácido fólico fue adicionado, al igual que en el caso de los embutidos cocidos, junto con las especias con el fin de facilitar su homogeneización.

La mezcla obtenida se embutió en tripas artificiales de 55 mm. de diámetro, previamente humedecidas (Betex-Pack S.A., San Sebastián de los Reyes, España).

Los embutidos se maduraron en una cámara programada con las siguientes condiciones: 22-24°C, 85-90% de humedad relativa, durante las primeras 48 h; 13-16°C, y 88-85% de humedad relativa hasta el final de la maduración (20 días).

Después de la maduración, los embutidos fueron lonchados, envasados a vacío y mantenidos en refrigeración hasta el tratamiento de irradiación.

3.4. Irradiación

El proceso de irradiación fue llevado a cabo en la planta de irradiación de IONISOS IBÉRICA S.A., situada en Tarancón (Cuenca, España). La fuente de irradiación fueron haces de electrones acelerados en un acelerador Rhodotron que operaba a una intensidad de $10 \text{ MeV} \pm 250 \text{ keV}$.

Las dosis aplicadas fueron 2, 3 y 4 kGy. La dosis real absorbida por las muestras se determinó mediante dosímetros de triacetato de celulosa que se pegaron en las bolsas que contenían los productos.

Una vez irradiadas, las muestras fueron transportadas al laboratorio en condiciones de refrigeración y mantenidas de igual forma hasta su utilización para los análisis.

3.5. Material y métodos generales

3.5.1. Determinación de la actividad de agua (a_w)

La determinación de la a_w se llevó a cabo en un higrómetro de punto de rocío Decagon CX-1 a una temperatura de $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Las medidas se realizaron introduciendo en la cubeta del higrómetro cápsulas de plástico que contenían unos 2 g de muestra fresca picada en pequeños trozos ($<5 \text{ mm}$). Al cabo de 1-2 min, éste proporcionaba la lectura de la a_w de cada muestra.

3.5.2. Medida del pH

Se realizó a temperatura ambiente en un pH-metro Crisol mod. 2001 equipado con un electrodo de vidrio que se introdujo en un homogeneizado preparado con 1 g de muestra y 9 ml de agua destilada. Previamente el pHmetro había sido calibrado con dos tampones de calibración (pH 7,0 y pH 4,0) de Crisol.

3.5.3. Recuentos microbiológicos

Se tomó 10 g de muestra y se llevó a una bolsa de plástico estéril con filtro Sterilin que contenía 90 ml de agua de peptona también estéril (1% de bacto-peptona con 0,85% de NaCl). Se homogeneizó durante 5 minutos en un Stomacher 400 (Colworth, Reino Unido). De este homogeneizado se hicieron las diluciones decimales adecuadas.

A continuación se procedió a la siembra en placas de Petri de agar general para recuentos (Plate Count Agar, PCA) para la detección de microorganismos aerobios mesófilos, MRS ágar a pH 5,6 para la flora láctica y Manitol Sal Agar para micrococáceas. Para ello se tomó 1 ml de las diluciones deseadas y se depositaron en las placas estériles añadiendo a continuación una capa de 15-20 ml de agar fundido. Las placas se agitaron suavemente para favorecer una distribución homogénea y una vez solidificados los medios se incubaron a 32°C durante 48 horas. Los medios de cultivo y el agua de peptona fueron esterilizados a 121 °C durante 15 min.

3.5.4. Estimación del color

El espacio de color definido como CIE $L^*a^*b^*$ (CIE, 1971) representado en la Imagen 1 ha sido adoptado a nivel nacional e internacional como la definición estandarizada del color.

Se trata de un sistema cartesiano en el que existen tres ejes:

- L^* : es el eje vertical y representa la medida de la luminosidad de un color, variando desde cero para un negro hasta 100 para un blanco.

- a^* : es uno de los ejes horizontales y representa una medida del contenido de rojo o de verde de un color. Si un color tiene rojo, a^* será positivo (+60), mientras que si a^* es negativa entonces el color tendrá cierta cantidad de verde (-60).

- b^* : es el otro eje horizontal, perpendicular al anterior eje. Valores positivos de b^* (+60) indican contenido amarillo y negativos (-60) indican contenido de azul.

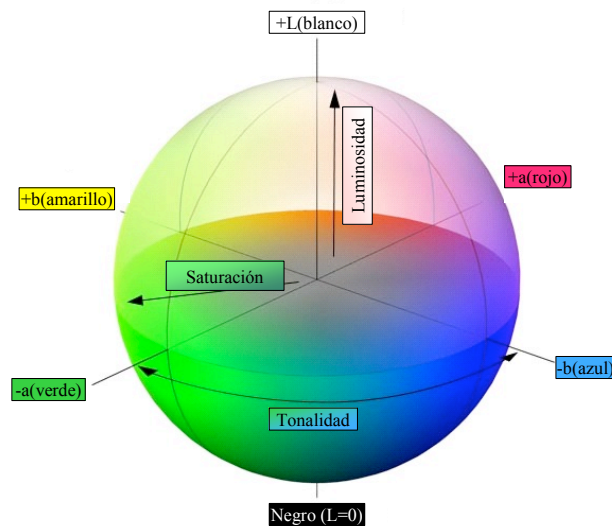


Image 1. Graphical representation of the CIELab system

El espacio de color CIE $L^*a^*b^*$ nos permite realizar una transformación particular de forma de cambios en la que la saturación y/o en la tonalidad de un color pueden interpretarse de forma más directamente. Si en lugar de emplear las coordenadas cartesianas a^* y b^* , empleamos coordenadas polares, llegamos al variante de espacio de color CIE $L^*a^*b^*$ llamado CIE $L^*C^*h^*$ donde:

- C^* : es la medida de saturación o croma de un color (Índice de Saturación) y se calcula como $(a^{*2} + b^{*2})^{0,5}$. De esta forma, un valor de 0 indica un color acromático, sin ninguna orientación hacia rojo, verde, azul o amarillo; y un valor alto de C^* es un color altamente saturado.

- h^* : es el ángulo que mide la tonalidad (Ángulo Hue) y se calcula como $\arctan(b^*/a^*)$. Indica la orientación relativa del color respecto al origen 0° . Si el círculo a^*b^* entero se divide en 360 grados como toda circunferencia y se define el origen 0° en la posición a^* positiva y $b^*=0$, es decir, donde se situaría un color estrictamente rojo, podemos desplazarnos en sentido contrario a las agujas del reloj de tal forma que un

color estrictamente amarillo se encontraría en el ángulo 90°, un verde estricto en el 180° y un azul estricto en el 270°.

El color fue medido con colorímetro triestímulo Chroma Meter CR-200 (Minolta Co. Osaka, Japón) usando una placa rosa para calibrar (L^* 44,88, a^* 25,99, b^* 6,67) y una fuente de iluminación D-65.

3.5.5. Análisis de textura

El análisis de textura se realizó en un texturómetro Stable Micro Systems mod. TA.XT 2i/25 controlado mediante el software Texture Expert versión 1.11 (Aname, Barcelona, España). Se realizaron dos tipos de ensayo: doble compresión (TPA) y corte. Las muestras analizadas consistieron en cilindros de 1cm de grosor y 25 mm de diámetro para ambos ensayos.

3.5.5.1. Ensayo de doble compresión (TPA)

Este ensayo consiste en comprimir una muestra colocada sobre una plataforma de aluminio mod HDP/90 mediante una sonda cilíndrica de aluminio de superficie plana de 25 mm de diámetro mod. P/25 hasta un 50% de su altura inicial (compresión del 50%) dos veces sucesivas con el fin de simular la labor que efectuaría la mandíbula humana. Se obtiene de esta manera una gráfica en la que se representa la fuerza aplicada (ordenadas) en función del tiempo (abscisas) (Gráfica 1).

De esta gráfica se obtienen los siguientes parámetros:

- Dureza: definida como la altura máxima obtenida en el primer ciclo de compresión; representa la fuerza máxima necesaria para producir una cierta deformación. Se mide en newtons.

- Adhesividad: es el área negativa producida tras el primer ciclo de compresión; representa la fuerza necesaria para separar la superficie compresora (sonda) de la muestra después de haberla comprimido por primera vez. Se mide también en newtons.

- Elasticidad: es la altura recuperada por la muestra entre el final de la primera compresión y el principio de la segunda. Se expresa en centímetros y corresponde a la diferencia entre las alturas registradas en la muestra tras la primera compresión (d_1) y al iniciar la segunda (d_2).

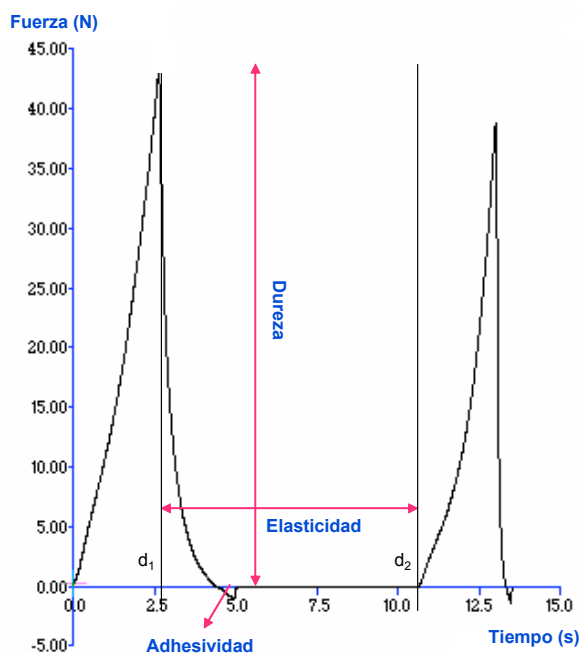
- Cohesión: es la relación entre el área positiva obtenida durante la segunda compresión y el área positiva obtenida durante la primera. Representa el grado en el que una muestra puede deformarse sin llegar a su ruptura. Es adimensional.

- Gomosidad: se define como el producto entre la dureza y la cohesión. Representa la fuerza necesaria para desintegrar una muestra antes de tragarla. Su unidad es el newton.

- Masticabilidad: se define como el producto de la gomosidad y la elasticidad (o el producto de dureza por cohesión por elasticidad). Representa el trabajo necesario para masticar una muestra dejándola lista para la deglución. Se mide en Ncm.

En este ensayo, primero se calibró la fuerza con una pesa de 5 Kg y la sonda utilizada para este tipo de análisis, estableciéndose las siguientes condiciones:

- velocidad de la sonda en compresión: 2,0 mm/s;
- velocidad de la sonda al subir: 10,0 mm/s;
- grado de compresión de la muestra: 50%.



Graph 1. Graphical representation of a compression test (TPA)

3.5.5.2. Ensayo de corte

Este ensayo consistió en hacer descender una sonda de corte Warner-Bratzler reversible de aluminio mod. HDP/BS, atravesando la muestra, hasta la placa perforada. Se obtuvo una gráfica (Gráfica 2) en la que se representó la fuerza aplicada (ordenadas) frente al tiempo (abscisas).

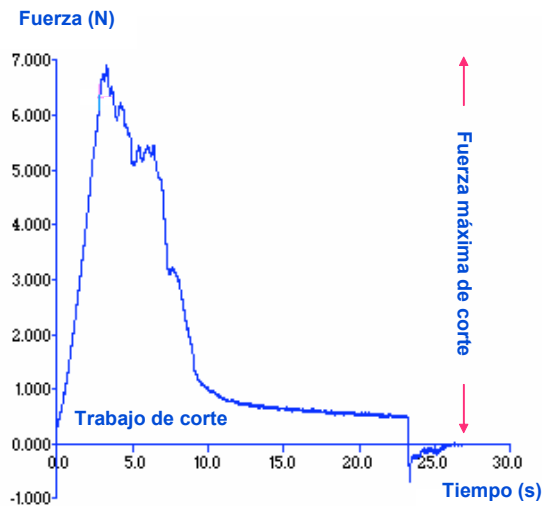
Los parámetros analizados fueron:

- Fuerza máxima de corte: se define como la altura máxima que produce la sonda al cortar la muestra. Representa la fuerza máxima necesaria para cortar la muestra. Se expresa en newtons.
- Trabajo total de corte: es el área comprendida por la fuerza de corte. Se mide en Ns.

Al igual que en el ensayo anterior, se calibró la fuerza con una pesa de 5 Kg y la sonda específica para este tipo de ensayos. Las condiciones de análisis fueron:

- velocidad de corte: 2 mm/s;
- velocidad de la sonda al subir: 10,0 mm/s;
- distancia recorrida por la sonda tras entrar en contacto con la muestra: 3,5 cm.

Al igual que en el ensayo anterior, las muestras se analizaron por quintuplicado.



Graph 2. Graphical representation of a shear test

3.5.6. Análisis sensorial

El análisis sensorial se realizó en la sala de catas del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, construida según la Norma ISO 6658 (ISO, 1985). Esta sala consta de un área de preparación de muestras y dispone de 6 cabinas independientes entre sí y comunicadas con la zona de preparación mediante ventanillas giratorias. Cada cabina está dotada de una mesa de trabajo, una pila con agua corriente e iluminación blanca y/o roja.

3.5.6.1. Panel de catadores

Entre los miembros del departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos se seleccionó un jurado formado, como mínimo, por 15 catadores (mujeres y hombres con edades comprendidas entre 25 y 60 años) no entrenados, consumidores habituales de productos cárnicos que no mostraban aversión hacia este tipo de producto.

Durante las pruebas se entregaron a cada catador las correspondientes hojas de respuesta en las que se explicaban las instrucciones para realizar los análisis y para expresar sus resultados. En ningún caso un mismo catador realizó más de 3 análisis consecutivos. Los análisis se realizaron uno por día o con un intervalo de como mínimo una hora entre uno y otro para evitar su saturación.

Los catadores realizaron los análisis bajo luz blanca fluorescente y dispusieron de agua y de pan para intentar eliminar el sabor dejado por la muestra anterior.

3.5.6.2. Preparación de las muestras

A la hora de llevar a cabo el análisis sensorial, las muestras se prepararon como se cita a continuación.

Para la prueba sensorial realizada en hamburguesas crudas, las muestras fueron colocadas y tapadas en placas Petri para que el catador evaluase el olor, el color y la aceptabilidad general. En el caso de las hamburguesas cocinadas, las muestras fueron preparadas a la plancha con una temperatura de 150°C durante 2 minutos por cada lado de la misma. De esta manera, la temperatura en el interior de la hamburguesa alcanza aproximadamente los 60°C. La temperatura fue medida con un termómetro digital Testo (mod. 735, Alemania).

Para el análisis sensorial de embutidos cocidos y madurados, la tripa se quitó con la ayuda de un cuchillo y con una loncheadora se cortaron muestras de 2 mm de espesor. Se mantuvieron a temperatura ambiente tapadas con papel aluminio para evitar la pérdida de humedad y cambios en el color. En el momento del análisis se colocaron

varias lonchas de cada muestra en placas Petri que se rotularon con números de 3 dígitos aleatorios seleccionados a partir de las Tablas de Dígitos al Azar para su identificación.

3.5.6.3. Prueba hedónica

El objetivo de la prueba de nivel de agrado o prueba hedónica es localizar el nivel de agrado o desagrado que provoca una muestra específica. Se utilizaron escalas no estructuradas (escalas hedónicas), sin mayores descriptores que los extremos de la escala, en las cuales se puntualiza la característica de agrado. Para este tipo de pruebas los catadores deben responder a los consumidores potenciales o habituales del producto en estudio y no deben conocer la problemática del estudio, solamente entender el procedimiento de la prueba y responder a ella.

Cada catador recibió una hoja (Hoja 1) con las instrucciones en las que se le pedía que calificara olor, color, textura, sabor y aceptabilidad general del producto sobre una línea horizontal de 10 cm y en la que tenía que marcar una línea vertical según su valoración.

En el caso del análisis sensorial de hamburguesas crudas, se solicitó a los catadores que calificaran, solamente el olor, el color y la aceptabilidad general del producto (Hoja 2).

Para interpretar los resultados, la escala hedónica se convirtió en numérica transformando a centímetros la distancia entre los dos extremos del continuo (10 cm) y se midió el punto de respuesta indicado por el catador para cada uno de los parámetros sensoriales.

3.5.6.4. Prueba preferencial

Esta prueba consiste en ordenar por preferencia las muestras ofrecidas al catador en función del agrado que le produzca. A la muestra mejor valorada se le dio la máxima puntuación: 4 puntos en el caso de analizar 4 muestras o 3 si se valoraron 3 muestras; a la peor muestra se le dio la puntuación de 1 en cualquier caso. Se empleó un panel de 20 catadores como mínimo.

3.5.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó con el programa informático SPSS versión 16.0 para MacOs (SPSS, Chicago, USA). Todos los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA). También fue utilizado el test Games-Howell para determinar diferencias entre los lotes.

Hoja 1

EVALUACION SENSORIAL

Nombre

Numero de muestra:

Fecha:

Instrucciones: Enjuáguese la boca con agua y coma un poco de pan antes de cada muestra, incluso antes de la primera. Fíjese en el atributo organoléptico que se le indica e intente, en la medida de lo posible, aislarlo de los demás y marque en función de su valoración, una línea vertical sobre la línea horizontal que determina cada atributo de calidad organoléptica. No olvide indicar el número de muestra. MUCHAS GRACIAS

Olor:

Muy desagradable

Muy agradable

Color:

Muy desagradable

Muy agradable

Textura:

Muy desagradable

Muy agradable

Sabor:

Muy desagradable

Muy agradable

Aceptabilidad general del producto:

Muy desagradable

Muy agradable

Una vez acabado el primer análisis, ordene las muestras presentadas, por orden de preferencia, según el nivel de agrado:

----- > ----- > ----- > -----

Mejor

Peor

Hoja 2

EVALUACION SENSORIAL

Nombre

Numero de muestra:

Fecha:

Instrucciones: Fijese en el atributo organoléptico que se le indica e intente, en la medida de lo posible, aislarlo de los demás y marque en función de su valoración, una línea vertical sobre la línea horizontal que determina cada atributo de calidad organoléptica. No olvide indicar el número de muestra. MUCHAS GRACIAS

Olor:

Muy desagradable

Muy agradable

Color:

Muy desagradable

Muy agradable

Aceptabilidad general del producto:

Muy desagradable

Muy agradable

3.5.8. Cuantificación del ácido fólico

Para la cuantificación de ácido fólico en todos los experimentos, excepto cuando se determinó la bioaccesibilidad de esta vitamina utilizando el método dinámico TIM-1, se empleó el kit comercial de Ridascreen® Fast-Folsäure consistente en un enzimo-inmunoensayo competitivo directo en microplaca (R-Biopharm, Darmstad, Alemania) A la superficie de cada pocillo se halla fijado un anticuerpo específico para el ácido fólico. Se añaden al pocillo la muestra (o estándar) y un conjugado ácido fólico-peroxidasa. El ácido fólico de la muestra y el conjugado compiten por unirse al anticuerpo de la microplaca. Se añade también al pocillo un sustrato cromógeno que da a la solución un color rojizo, que al unirse el conjugado y la enzima cambia a azul. Para parar la reacción se adiciona una solución que provoca el cambio de color azul a amarillo, cuya intensidad se mide a 450 nm. Los resultados se interpolan en una curva de calibrado preparada con patrones con concentraciones de ácido fólico comprendidas entre 0 y 25 ppb.

1. Extracción del ácido fólico

Para extraer el ácido fólico de la muestra se homogeneizaron 5 g de producto en 95 ml de agua destilada. A continuación se llevó el homogeneizado a ebullición durante 3 min en un baño termostatado, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se filtró el sobrenadante a través de papel de filtro. Se diluyó 100 µl del filtrado con 400 µl de tampón si el contenido esperado de ácido fólico era superior a 5 ppm, de lo contrario se diluyó con 900 µl del tampón.

2. Realización del ELISA

El kit incluye 6 estándares calibrados para construir la curva patrón, el estándar S1 se utiliza como control negativo, S2, S3, S4, S5 y S6 poseen concentraciones de ácido fólico de 1, 3, 9, 27 y 81 ppb respectivamente.

Tanto la curva patrón como las muestras se realizaron por duplicado.

Se añadió a cada pocillo 50 µl de extracto o de estándar más 50 µl de conjugado de ácido fólico-peroxidasa y se mezcló correctamente incubándolo durante 15 min en oscuridad a temperatura ambiente.

A continuación se lavó con agua destilada tres veces consecutivas y se añadió 100 µl de sustrato cromógeno. Se mezcló correctamente y se incubó durante 10 min en oscuridad a temperatura ambiente.

Seguidamente se añadió 100 µl de una solución H₂SO₄ 1 M para parar la reacción y se procedió a su lectura antes de 10 min.

3. Lectura de la placa e interpretación de resultados

La placa se leyó en un lector de placas Labsystems iEMS Reader MF a 450 nm empleándose el programa informático Genesis versión 3.

El valor del test para una muestra (B/B₀) se dio como el porcentaje de la absorbancia máxima (la del control negativo S1) y se calculó como:

$$B/B_0 = (\text{Absorbancia muestra} / \text{Absorbancia S1}) * 100\%$$

Este resultado se interpoló en la curva de calibración para obtener el valor de concentración de ácido fólico en el pocillo (C_p) en ng/ml (ppb). La concentración original en la muestra (C₀) se calculó a partir de este resultado, multiplicando por el factor de dilución.

3.6. Bioaccesibilidad

La bioaccesibilidad del ácido fólico fue estudiada utilizando dos métodos *in vitro*, uno estático y otro dinámico.

a) Método estático

El método estático está basado en el descrito por Hazell y Johnson (1987) y Wolfor, Drago, Rodríguez, Pellegrino, y Valencia (2002). Para la realización del mismo, se emplearon 30 g de muestra, de cada producto cárnico desarrollado, y en el caso de las hamburguesas, fueron previamente cocinadas.

Este método tiene dos etapas: una donde se realiza la simulación de la digestión gástrica y otra donde se simula la digestión intestinal.

1. Digestión gástrica:

Se tomaron 30 g de muestra y se homogeneizaron con 170 ml de tampón fosfato 0,2 M, a pH 6,8. Una vez homogeneizada la muestra, se ajustó el pH a valores comprendidos entre 1,5 y 2,0 utilizando para ello HCl 5 N. Este pH es similar al valor medio del pH que se alcanza en el estómago durante la digestión. A continuación se añade 1 ml de una solución de pepsina de mucosa gástrica de cerdo (EC 232-629-3), la cual contiene 0,16 g de pepsina por ml de HCl 0,1 N. La mezcla fue incubada durante 2 horas a 37°C, con constante agitación, simulando las condiciones fisiológicas de la digestión gástrica. Una vez finalizada la digestión, se tomaron dos alícuotas de 20 g en vasos Erlenmeyer para la realización de la digestión intestinal.

2. Digestión intestinal:

Una de las alícuotas de 20 g que se toman al finalizar la primera parte de la digestión se utiliza para determinar la acidez titulable. A esta alícuota se le añaden 5 ml de una solución de pancreatina-bilis, preparada a partir de 1 g de pancreatina de cerdo (EC 232-468-9) y 6,25 g de extracto de bilis de cerdo (EC 232-369-0) disueltos en un volumen de 250 ml de bicarbonato 0,1 M. Una vez añadida la solución de enzimas, se ajusta el pH a valores próximos a 7 con bicarbonato 1 M. El volumen total de bicarbonato empleado para esta titulación será el que se emplee posteriormente en la digestión intestinal.

Con la alícuota de la digestión gástrica de 20 g restante, se realiza la digestión intestinal. Con el volumen de bicarbonato determinado en la valoración de la otra alícuota, se rellena una bolsa de diálisis cuyo tamaño de poro es de 12000-14000 Da y cuyo diámetro es de 25 mm. El contenido de la bolsa de diálisis se completa con agua destilada hasta alcanzar un volumen de 25 ml. Una vez preparada la bolsa de diálisis donde se producirá el intercambio de compuestos, se introduce en el vaso Erlenmeyer que contiene la segunda alícuota obtenida en la digestión gástrica y se procede a su incubación, midiendo el pH hasta que se alcance un valor próximo a 5, pH que se considera como el valor medio del quimo. Es entonces cuando se adicionan 5 ml de la solución enzimática de

pancreatina-bilis. Los vasos Erlenmeyer son cerrados con Parafilm e incubados en agitación a 37°C durante 2 horas.

Finalizada la incubación, los vasos con las muestras son enfriados en un baño de hielo con el objetivo de parar la reacción enzimática. La bolsa de diálisis es retirada del vaso, lavada con agua destilada y se recoge el contenido en un vial para proceder a medir su volumen y pH como control de calidad del proceso.

La bioaccesibilidad del ácido fólico se expresó de la siguiente manera:

$$\text{Bioaccesibilidad (\%)} = [\text{AF}_{\text{bolsa de diálisis}}(\text{mg})/\text{AF}_{\text{muestra}}(\text{mg})]*100$$

b) Método dinámico

Para llevar a cabo el estudio de la bioaccesibilidad del ácido fólico con un método dinámico, se utilizó el modelo descrito por Minekus, Marteau y Havenaar en 1995: el TIM-1. La descripción de este modelo se recoge en el Anexo I (Pag. 185).

Para la realización de los ensayos en el TIM-1 se utilizaron 25 g de producto cárnico cocido (mortadela), 25 g de producto cárnico fresco (hamburguesa) y 17 g de producto cárnico madurado (salchichón). La diferencia en el peso de las muestras se hizo con el fin de estandarizar la cantidad de ácido fólico (600 µg, cantidad recomendada en estados de mayor necesidad). Estas muestras fueron homogeneizadas (Blender X620, CAT, M.Zipperer CMBH, Breigau, Alemania) con 100 ml de saliva artificial, la cual contiene electrolitos, α-amilasa tipo II-A de *Bacillus* (A 6380-1G) y agua para simular el proceso de masticación.

Se realizó un control del proceso empleando como muestra leche UHT enriquecida con ácido fólico. En este caso, la cantidad de leche empleada para el ensayo fue de 100 ml que contenía 600 µg de ácido fólico.

Una vez que la muestra era homogénea, se pasó al compartimento gástrico donde se adicionaba una solución con enzimas gástricas y agua destilada en cantidad suficiente para que el volumen final fuera de 300 ml, el cual se consideraba como ingesta gástrica. Las enzimas utilizadas fueron lipasa (150.000 U/g *Rhizopus lipase* FAP 15, Amano Pharmaceutical, Nagoya, Japón)

y pepsina (2.200 U/mg; P7012 Sigma San Luis, MO, USA) y fueron gradualmente bombeadas al compartimento gástrico. Al llegar al compartimento duodenal se bombearon también de forma gradual, extracto de bilis porcina (P8631, Sigma San Luis, MO, USA), jugo pancreático (Pancrex Powder, Paynes & Byne, Greenford, Reino Unido) y diferentes electrolitos (fosfatos, bicarbonatos y cloruros).

Durante la digestión, los dializados del yeyuno y del íleon fueron recogidos cada hora durante 5 horas. Estas muestras contenían la fracción bioaccesible de nutrientes a partir de las muestras introducidas.

La fracción del íleon que no era absorbida era recogida también cada hora.

Al final del experimento, los residuos del estómago, duodeno, yeyuno e íleon fueron recogidos y analizado el contenido de ácido fólico.

La cuantificación del ácido fólico se hizo por HPLC. Previamente al análisis, las muestras fueron digeridas enzimáticamente usando proteasa (2h, 37°C), seguido de un tratamiento con calor para desactivarla (15 min, 119°C) y una digestión con α -amilasa. Posteriormente, las muestras se filtraron y se ajustó el pH a 4,5 con ácido fosfórico. Las muestras fueron diluidas en las concentraciones adecuadas y analizadas con el equipo Waters Acquity UPLC con una columna BEH-C18 (1,7 mm, 2,1x100 mm) y un espectrómetro de masas (Micromass Quattro Ultima Triple Quadrupole Mass Spectrometer; MRM mode, PGA 442>295, 15C-PGA 447>295). Como estándar interno se utilizó 13C5-PGA (Merk Eprova, Schaffhausen, Suiza). Para calcular la concentración de ácido fólico se utilizó una curva patrón con cinco puntos. Los productos fueron analizados por duplicado siguiendo el mismo protocolo, independientemente del tipo de producto empleado.

Todos los pasos fueron realizados en el mismo día para evitar la degradación del ácido fólico.

La bioaccesibilidad del ácido fólico se expresó de la siguiente manera:

$$\text{Bioaccesibilidad (\%)} = [\text{AF}_{\text{dializado}}/\text{AF}_{\text{muestra}}]*100$$

***RESUMEN SOBRE EL ESTUDIO DE LA
VIABILIDAD TECNOLÓGICA***

4. RESUMEN DE ARTÍCULOS SOBRE EL ESTUDIO DE LA VIABILIDAD TECNOLÓGICA DE LA FABRICACIÓN DE PRODUCTOS CÁRNICOS RTE, ENRIQUECIDOS CON ÁCIDO FÓLICO

- Introducción y objetivos:

En los últimos años diversos organismos internacionales han recomendado aumentar el consumo de ácido fólico debido a su relación directa con la prevención de algunas enfermedades tales como anemia megaloblástica, las de tipo cardiovascular, defectos en el desarrollo del tubo neural y diferentes tipos de cáncer entre los que se encuentra el de colon, mama o próstata. La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2006) ha establecido una ingesta diaria de 400 equivalentes diarios de folato (EDF) para adultos, 600 EDF para mujeres embarazadas o en estado previo a la concepción y de 500 EDF para mujeres en periodo de lactancia.

Es innegable la preocupación por la salud que existe en la sociedad actual. Se reconoce que una alimentación adecuada es un instrumento de protección de la salud y prevención de enfermedades por lo que cada vez tienen una mayor demanda estrategias tales como el enriquecimiento de alimentos con compuestos bioactivos que potencien su valor nutritivo. Ya en 1996, la FDA recomendó enriquecer con esta vitamina cereales y derivados (panes, cereales de desayuno, harina, pastas alimenticias), arroz y otros productos en grano, comenzando así el enriquecimiento en ácido fólico de un considerable número de alimentos (por ejemplo, leche y productos lácteos y zumos) entre los que no se encuentran ni la carne ni los productos cárnicos.

Esta demanda entronca además con un cambio en las costumbres de la alimentación; el actual ritmo de vida ha provocado que el consumidor busque alimentos rápidos y fáciles de preparar, que puedan ser consumidos en cualquier situación y además, que sean nutritivos, sanos y seguros. Son los que se conocen como alimentos “listos para el consumo” (“Ready-To-Eat”, RTE). El riesgo de contaminación que conlleva la manipulación posterior al procesado (por ejemplo, loncheado, envasado unidosis, en pequeños porciones) hace que sea necesario aplicar un tratamiento posterior que contribuya a conservar la calidad microbiológica de dichos alimentos y aumentar su vida útil sin modificar las características organolépticas que le son propias. La mayoría

de estas tecnologías son procesos no térmicos tales como las altas presiones hidrostáticas, los pulsos de luz o incluso las radiaciones ionizantes; son muchos los trabajos que se están realizando en este sentido.

La industria de los alimentos funcionales no puede ser ajena a esta tendencia y es evidente que antes o después, serán preparados como RTE al igual que sus homólogos convencionales. Por esta razón, es muy importante conocer de qué modo estas tecnologías afectan no sólo a la calidad general del producto sino al contenido del compuesto bioactivo incorporado y sobre todo a su disponibilidad a nivel fisiológico.

Por lo anteriormente expuesto, en esta tesis se han contemplado dos objetivos principales: el desarrollo tecnológico de productos cárnicos enriquecidos con ácido fólico, tanto convencionales como RTE, y conocer, en ambos casos, su bioaccesibilidad. El procesado no térmico elegido para la elaboración de los productos RTE ha sido las radiaciones ionizantes, concretamente, haces de electrones acelerados. Su efectividad en la reducción de microorganismos patógenos justifica la aplicación en unos alimentos donde prima el valor nutritivo añadido que supone la presencia de un compuesto bioactivo. Este aspecto no ha sido estudiado hasta el momento y constituye uno de los más novedosos.

El trabajo se ha realizado con tres tipos de productos cárnicos: frescos (hamburguesas), cocidos (mortadela) y madurados (salchichón), estudiando la viabilidad tecnológica del ácido fólico como ingrediente funcional en los tres tipos de productos cárnicos, el efecto de la irradiación en su estabilidad tanto después del procesado como durante el almacenamiento y su posible influencia en las propiedades físico-químicas y sensoriales.

La metodología utilizada para la realización del estudio aparece descrita en los artículos que se muestran a continuación.

- Resultados:

A continuación se presenta un resumen de los trabajos realizados y que se han recogido en las siguientes publicaciones:

“Effects of irradiation on hamburgers enriched with folic acid”.

Meat Science 84, (2010), 437–443.

Es en este producto cárnico con el que se han obtenido los mejores resultados ya que la presencia de ácido fólico apenas influyó en sus características tecnológicas y sensoriales, tanto en estado fresco como tras el cocinado, e independientemente de la cantidad añadida. El proceso de irradiación produjo un descenso en el contenido final de ácido fólico (20-30%) cuando se aplicaron dosis de 2 kGy, pero no se detectaron pérdidas adicionales a dosis superiores. Incluso con estas pérdidas, una hamburguesa de 100 g podría aportar hasta el 100% de la cantidad diaria recomendada. La calidad sensorial disminuyó significativamente con 4 kGy observándose olores extraños que desaconsejaban su consumo si bien se enmascaraban totalmente tras el cocinado haciendo el producto aceptable. No obstante, se consideró que 3 kGy sería la dosis máxima adecuada para asegurar la calidad sensorial.

“Effects of ionizing irradiation on quality and sensory attributes of ready-to-eat dry fermented sausages enriched with folic acid”.

International Journal Food Science and Technology 46, (2011), 469–477.

Al final de la maduración, los productos cárnicos presentaban unos niveles de ácido fólico superiores a los añadidos a la masa como consecuencia de la concentración de solutos que tiene lugar por la pérdida de agua. Al igual que en caso anterior, los niveles de ácido fólico descendieron con el tratamiento de irradiación (4 kGy) y en unos porcentajes similares. Pero, de nuevo, los valores finales fueron suficientes para que una ración de 50 g pueda aportar el 100% de la cantidad de ácido fólico recomendada al día. Dosis de 4 kGy produjeron características sensoriales anómalas y de nuevo, el tratamiento con 3 kGy se perfiló como el más adecuado, asegurando igualmente la calidad higiénica de los productos.

“Irradiation is useful for manufacturing ready-to-eat cooked meat products enriched with folic acid”.

Meat Science 87, (2011), 330–335.

En los productos cárnicos cocidos los resultados fueron también muy parecidos a los obtenidos con los frescos y los madurados, tanto en las pérdidas de ácido fólico como en el efecto de la dosis de irradiación y la calidad sensorial final incluso a 4 kGy. Quizás se deba a que los cambios que hubieran podido aparecer quedan amortiguadas por la mezcla de especias que se incorporan a este tipo de productos.

“Effects of the storage time on the folic acid content of enriched ready-to-eat meat products”.

Radiation Physics and Chemistry, enviado

Los productos cárnicos se almacenaron durante tres meses en refrigeración, en el caso de mortadelas y salchichones, y en congelación, en el caso de las hamburguesas. El ácido fólico permaneció estable siempre durante el almacenamiento en hamburguesas y mortadelas. Sin embargo, en los embutidos madurados se observaron pérdidas de un 20% en los no irradiados y de un 15 y 8% en los irradiados a 2 y 3 kGy, respectivamente. Estas pérdidas pueden estar relacionadas con el consumo de ácido fólico por las bacterias ácido-lácticas. A pesar de estas pérdidas, la cantidad de ácido fólico presente en los productos desarrollados es suficiente para cubrir la cantidad diaria recomendada. Durante los tres meses de almacenamiento los productos conservaron sus características organolépticas obteniendo una buena aceptabilidad general en todos los casos.

En consecuencia, se ha demostrado que es posible enriquecer productos cárnicos con ácido fólico y elaborarlos además como *listos para el consumo* (RTE) aplicando haces de electrones acelerados a dosis máximas de 3 kGy, sin comprometer sus propiedades físico-químicas y sensoriales. A pesar de las pérdidas de ácido fólico producidas por el tratamiento de irradiación (hasta un 30%), los productos obtenidos aportarían una cantidad de esta vitamina suficiente para cubrir la CDR.

***PUBLICACIONES SOBRE EL ESTUDIO
DE LA VIABILIDAD TECNOLÓGICA***

5. PUBLICACIONES SOBRE EL ESTUDIO DE LA VIABILIDAD TECNOLÓGICA DE LA FABRICACIÓN DE PRODUCTOS CÁRNICOS RTE, ENRIQUECIDOS CON ÁCIDO FÓLICO

- 5.1. Effects of irradiation on hamburgers enriched with folic acid. *Meat Science* 84, (2010), 437–443.
- 5.2. Effects of ionising irradiation on quality and sensory attributes of ready-to-eat dry fermented sausages enriched with folic acid. *International Journal Food Science and Technology* 46, (2011), 469–477.
- 5.3. Irradiation is useful for manufacturing ready-to-eat cooked meat products enriched with folic acid. *Meat Science* 87, (2011), 330–335.
- 5.4. Effects of the storage time on the folic acid content of enriched ready-to-eat meat products. *Radiation, Physics and Chemistry*. Under review.

ARTÍCULO 1



Effects of irradiation on hamburgers enriched with folic acid

I. Galán, M.L. García, M.D. Selgas*

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 July 2009

Received in revised form 11 September 2009

Accepted 21 September 2009

Keywords:

Folic acid

Hamburgers

Irradiation treatment

ABSTRACT

Hamburgers enriched with different amounts of folic acid (0.6, 1.2 and 2.4 mg/100 g) were manufactured. They were then treated with doses of 2–4 kGy of ionizing radiation in order to increase their safety. The effects of these treatments on the colour, texture parameters, and sensory quality of the meat, as well as on the stability of folic acid, were studied in both raw and cooked hamburgers. The presence of folic acid negligibly influenced the quality of these meat products, with irradiation treatments causing most of the loss of sensory quality and so, the treatment with 4 kGy was not adequate. Folic acid levels decreased 20–30% following irradiation with 2 kGy, and no additional decrease was observed at higher doses of radiation. This new functional meat product may help consumers achieve the RDA for this vitamin in a normal diet.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Meat and meat products are one of the most consumed foods in Western diets. Meat has a high nutritional value due to its high content of macronutrients, such as highly nutritious proteins, and micronutrients, such as iron, which makes meat a good product for everyone.

However, some essential micronutrients for human health are not present naturally in meat or meat products. One example is folic acid (FA), a water-soluble vitamin that is almost absent from meat products and that plays an important role in human metabolism. Folic acid is important mainly for the biosynthesis of purines and pyrimidines, methionine and serine; it is also implicated in the metabolism of histidine and homocysteine.

Folic acid is found in green vegetables, certain beans and other foods such as orange juice (Stranger, 2002). It helps to prevent certain diseases such as macrocytic and megaloblastic anemia, cardiovascular diseases and several types of cancer (breast, colon and pancreatic) (Caudill, 2004; Kim, 2004; Wen et al., 2008). The vitamin has also been shown to prevent neural tube birth defects (Caudill, 2004; Gregory, 2004; Hoffpauer & Bonnette, 1998; Lucock, 2000; Van der Put, Van Straaten, Trijbels, & Blom, 2001; Wald, Wald, Morris, & Law, 2006). For these reasons, the World Health Organization (2006) established recommended daily amounts (RDA) of 400 dietary folate equivalents (DFE) for adults, 600 DFE for pregnant mothers and 500 DFE for nursing mothers. In order to achieve this RDA, different regulatory authorities such as the US Food and Drug Administration (FDA, 1996) have recommended

folic acid enrichment of basic foods such as breads, cereals, rice and other grain products.

Except for liver and liver-derived products (e.g., paté), meat and meat products cannot be considered a source of folic acid. Given that such high levels of meat products are consumed worldwide, enriching them with folic acid can be considered an important health initiative. So far, only a few studies have examined the addition of this vitamin to meat products. For example, Cáceres, García, and Selgas (2008) carried out a study showing good stability of folic acid in cooked sausage. However, the stability of folic acid in other derivative products, such as fresh meat products, has not been studied.

One of the most important fresh meat products is the hamburger because it is consumed in large quantities. Its manufacturing process carries considerable risk of contamination, mainly due to the grinding and moulding processes. The hygienic quality of this product can be threatened by the growth of food-borne pathogens, some of which can grow at refrigeration temperatures, such as *Listeria monocytogenes* (Farkas & Andrassy, 1998).

The current demand for innovative and safe meat products with high sensory quality and extended shelf-life has led the industry to treat food products, after packaging, with alternative technologies that guarantee their safety. These are called “non-thermal technologies,” and one is irradiation, which has proven effective at eliminating pathogens (Cabeza, Cambero, Hoz de la, & Ordóñez, 2007; Diehl, 2001; Patterson & Stevenson, 1995; Zhu, Du, Cordray, & Ahn, 2005). However, irradiation is known to cause several changes in lipids and proteins due to the formation of radiolytic products, and these changes alter the sensory properties of food products in ways that decrease consumer acceptance (Chen et al., 2007; Lacroix, Smoragiewicz, Jobin, Latreille, & Krzystyniak, 2000).

* Corresponding author. Tel.: +34 1 3943745.

E-mail address: selgar@vet.ucm.es (M.D. Selgas).

ARTÍCULO 2

Original article

Effects of ionising irradiation on quality and sensory attributes of ready-to-eat dry fermented sausages enriched with folic acid

Irene Galán, Maria L. García & Maria D. Selgas*

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

(Received 26 February 2010; Accepted in revised form 29 September 2010)

Summary Dry fermented sausages have been manufactured with different concentrations of folic acid (FA) (0.6, 1.2 and 2.4 mg per 100 g of original mixture). Then, they were prepared as ready-to-eat meat products by using E-beam radiation (2, 3 and 4 kGy) to increase their safety. The stability of this vitamin as well as the physico-chemical properties, microbiological counts, colour, texture and sensory properties of the sausages was studied after irradiation. The more important changes were observed in hardness, which increased with increasing FA amount; in contrast, colour was similar in all batches, independently of FA concentration or irradiation doses applied. The sensory properties of these products were judged acceptable to tasters, although significant differences were observed between the taste of nonirradiated and irradiated samples with 3 kGy. The ionising treatment caused a decrease of 15–29% in the FA content only at the highest dose (4 kGy). Despite this loss, this new product is suitable for assuring the daily intake of FA recommended as healthy (400 µg).

Keywords Dry fermented sausages, folic acid, irradiation.

Introduction

The production of dry fermented sausages in Mediterranean countries is a significant proportion of the meat industry. One of the products most frequently manufactured in Spain is salchichón. This dry fermented sausage is manufactured by mixing pork and fat meats with characteristic spices. At the end of the ripening, this product is characterised by acidity and semi-hard consistency (Comi *et al.*, 2005).

Owing to its composition, this product gives the consumer a substantial amount of macronutrients such as proteins and lipids, which have high nutritional quality, and of micronutrients such as iron. Nevertheless, some nutrients necessary for consumer health, such as vitamins or minerals, are absent from meat and meat products, or they are present in trace amounts. One of these nutrients is folic acid (FA). This vitamin is present mainly in green vegetables, beans and other types of food like orange juice (Öhrvik & Witthöft, 2008). It has been associated with the prevention of several diseases such as neural tube defects in birth, some cancers and some cardiovascular diseases (Lucock, 2000; Caudill, 2004; Gregory, 2004; Wald *et al.*, 2006; Wen *et al.*, 2008). For this reason, the World Health

Organization (2006) established recommended daily amounts (RDA) of FA: 400 dietary folate equivalents (DFE) for adults, 600 DFE for pregnant women and 500 DFE for lactating mothers. To provide this RDA, manufacturers have been enriching some products with this vitamin for the last several years.

The bioavailability of natural folates has been described as very low, close to the 80% of that FA (Winkels *et al.*, 2007). It is because of many factors including the food matrix, the deconjugation of polyglutamyl folates, the instability during the gastric phase and other more. Apart from the incomplete bioavailability, the poor stability of food folates, mainly green vegetables, under conditions of cooking can reduce the intake of this vitamin and, consequently, limits its healthy role (Sanderson *et al.*, 2003; McNulty & Pentieva, 2004; Winkels *et al.*, 2007). FA is, as consequence, a better choice for the enrichment of foods.

The main examples of FA-enriched food are cereals, breads and rice. Previous works performed in cooked sausages (Cáceres *et al.* 2008) indicate that the incorporation of this vitamin into meat products could also be a good way to provide consumers with this important nutrient, thereby improving the nutritional quality of meat products. Despite the potential nutritional value of

*Correspondent: E-mail: selgar@vet.ucm.es

ARTÍCULO 3



Irradiation is useful for manufacturing ready-to-eat cooked meat products enriched with folic acid

I. Galán, M^aL. García, M^aD. Selgas*

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 July 2010

Received in revised form 5 November 2010

Accepted 5 November 2010

Keywords:

E-beam irradiation

Folic acid

Cooked meat products

ABSTRACT

Cooked sausages enriched with folic acid (0.6, 1.2 and 2.4 mg/100 g) were manufactured as ready-to-eat (RTE) products using E-beam radiation (2–4 kGy) as a non-thermal technology. The effects of this treatment on the folic acid content, colour, texture and sensory properties of the final products were studied. The characteristics of sausages were not affected by the presence of folic acid, independently of the amount added, and their overall acceptability was good. Doses of 4 kGy caused losses of folic acid close to 20–30% and significantly decreased the sensory quality ($P < 0.05$). Despite this, the final content of folic acid in all products was sufficient so that 50 g of product gave 100% of the recommended daily allowance (RDA). This new RTE meat product can be considered as a source of folic acid that can help assure adequate levels of this vitamin in the general population.

© 2010 The American Meat Science Association. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Folic acid (FA) is the term most commonly used to refer to a family of vitamins found widely in foodstuffs. It is a water-soluble B vitamin that plays a critical role in the metabolism and synthesis of amino and nucleic acids in the human body. Various studies have established a relationship between intake of FA and reduction in the risk of megaloblastic anemia, neural tube defects during pregnancy (Liu et al., 2004; Wen et al., 2008), cardiovascular diseases (Van der Put, Van Straaten, Trijbels, & Blom, 2001; Wald, Wald, Morris, & Law, 2006) and several types of cancers such as colon, pancreas and breast (Caudill, 2004). For this reason, interest has been growing in how to fortify foods with this vitamin in order to prevent diseases related to its deficiency. In fact, the U.S. Food and Drug Administration (Food and Drug Administration, 1996) required enrichment of cereals and derivative products with this vitamin.

Recent years have seen a reduction in the consumption of meat and meat products due to their association with several diseases such as obesity and hypertension. This view disregards their importance in human nutrition because of their content of high-value proteins and nutrients such as minerals (Fe) and vitamins (B₁₂). Some strategies have been developed to restore consumer confidence by developing healthier meat and meat products. Thus, functional ingredients have been incorporated, including several types of fibre, minerals, and lipids (Cáceres, García, & Selgas, 2008; Fernández-Ginés, Fernández-López, Sayas-Barberá, & Pérez-Alvarez, 2005; Jiménez-Colmenero, Reig, &

Toldrá, 2006). FA is either absent from, or presents at low levels in, meat and meat products (2–3 µg/100 g) (Chan, Brown, Lee, & Buss, 1995); consequently, its incorporation into these types of foods can be considered a useful and innovative strategy.

However, a vitamin-rich diet is not the only thing important for consumers: their lifestyle requires the development of safe, healthy and nutritious products that are quick and easy to prepare but without loss of quality and sensory characteristics. These are “ready-to-eat” (RTE) products. The manufacture of RTE products involves operations such as cutting, slicing and packing which make them particularly vulnerable to contamination with pathogenic microorganism from utensils and personnel. This contamination compromises the sanitary background of the products because of the presence of several serovars of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica*. Thus, they require additional treatment with non-thermal technologies (high pressures, pulsed electric fields or irradiation) to control the microbiological quality without modifying the sensory quality (Cabeza, de la Hoz, Velasco, Cambero, & Ordóñez, 2009; Cabeza, Cambero, de la Hoz, & Ordóñez, 2007; Zhu, Du, Cordray & Ahn, 2005).

The functional food industry cannot remain immune from the RTE trend, and it seems likely that, in the near future, they will be prepared as RTE products. For this reason, it is important to know whether non-thermal technologies affect not only the general quality of the product but also the viability of the functional ingredients. Little work has been performed in this area.

So far, fresh and dry-fermented meat products enriched with FA have been developed and prepared as RTE using E-beam irradiation (Galán, García, & Selgas, 2010, in press). The aim of the present study was to manufacture cooked sausages enriched with FA and to prepare

* Corresponding author. Tel.: +34 91 3943745.

E-mail address: selgar@vet.ucm.es (M^aD. Selgas).

ARTÍCULO 4

Dear Mrs Irene Galán,

Your submission entitled "Effects of the storage time on the folic acid content of enriched ready-to-eat meat products" has been received by Radiation Physics and Chemistry

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/rpc/>.

Your username is: igalantr

If you need to retrieve password details, please go to:
http://ees.elsevier.com/rpc/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Radiation Physics and Chemistry

Effects of the storage time on the folic acid content of enriched ready-to-eat meat products

Galán I., García M.L., Selgas M.D.

Dpto. Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense Madrid, Spain

Abstract--- Three different meat products enriched with folic acid (2.4 mg/100 g) were manufactured: hamburgers, cooked and dry fermented sausages. They were prepared as ready-to-eat (RTE) products using E-beam radiation (2 and 3 kGy) to ensure their safety. The stability of FA and sensory properties of the irradiated meat products were studied during three months of storage under freezing for hamburgers and refrigeration for cooked and dry fermented sausages. FA content was stable in non-irradiated and irradiated hamburgers and cooked sausages over the storage period, whereas it decreased 20% in non irradiated dry fermented sausages and 12-8 in irradiated samples at 2 and 3 kGy respectively. Nevertheless, the final amount remained sufficient to provide the recommended daily intake. Panelists rated the sensory properties of the hamburger as satisfactory even after irradiation and 90 days of storage. The overall acceptability of RTE cooked and dry fermented sausages improved slightly with storage ($P > 0.05$).

Keywords: Irradiation, storage, folic acid, meat products

I. INTRODUCTION

In today's society consumers increasingly value products that improve their quality of life. Interest in increasing life expectancy and growing awareness about the relationship between diet and health have created demand for safe, nutritious and healthy food that remains pleasant and enjoyable to eat. In recent years, functional foods, including functional meat and

meat products, have attracted significant attention. These foods contain bioactive compounds that improve human health and decrease the risk of disease by modulating physiological processes.

Meat is one of the mainstays of our diet because of its nutritional value (e.g. high protein content), but its image has suffered because of the association between meat consumption and cardiovascular disease, hypertension and some types of cancers (Biesalski, 2005). Researchers and the food industry have gone to great efforts to produce more attractive meat products adapted to new nutritional guidelines (Decker and Park, 2010).

But not only is the market of functional foods a reality in our society. The accelerated lifestyle has created demand for foods that can be prepared and/or consumed more quickly, called ready-to-eat (RTE) foods. The industry manufactures RTE products in single-dose containers or as sliced foods, as is the case with meat products (ham, cooked sausages and dry fermented sausages). These manufacturing processes involve manipulations that can lead to microbial contamination, spoilage and the presence of pathogenic microorganisms, which can grow at refrigeration temperatures. To ensure microbiological quality, non-thermal technologies such as irradiation are used. These technologies reduce or eliminate microorganisms by damaging DNA (Patterson and Stevenson, 1995; Diehl, 2001; Zhu et al., 2005; Samelis et al., 2005; Cabeza et al., 2007; Cabeza et al., 2009). For example, Samelis et al. (2005) observed that irradiation with 1-4 kGy controlled the growth of *E. coli* O157: H7 and *L. monocytogenes*.

Functional foods should also take advantage of these new technologies and trends. Ideally functional products would be offered to the consumer under the same conditions as conventional foods. To achieve this, the functional ingredient should remain active not

***RESUMEN SOBRE EL ESTUDIO
DE LA BIOACCESIBILIDAD DEL
ÁCIDO FÓLICO***

6. RESUMEN DE ARTÍCULOS SOBRE EL ESTUDIO DE LA BIOACCESIBILIDAD DEL ÁCIDO FÓLICO EN PRODUCTOS CÁRNICOS RTE

- Introducción y objetivos:

El siguiente paso fue conocer si el ácido fólico vehiculado por estos productos cárnicos, sería absorbido por el organismo o no, en qué cantidades y si el tipo de matriz cárnica y la irradiación influyen en su bioaccesibilidad.

Para ello, se realizaron dos estudios *in vitro* para simular la digestión gastrointestinal aplicando para ello las condiciones que reinan en el proceso fisiológico: tiempo, temperatura, agitación, composición de la saliva y preparados enzimáticos (jugo gástrico, intestinal y sales biliares).

En el primero de ellos se ha hecho una primera aproximación mediante un método estático en el cual, la absorción intestinal se simula mediante el paso de la muestra digerida a través de una membrana de diálisis. El segundo método utilizado fue un método *in vitro* dinámico utilizando para ello el equipo TIM-1 en el centro de investigación TNO (Zeist, Holanda). Con este sistema se salvan las limitaciones de los sistemas estáticos como el movimiento peristáltico del estómago, mediante el uso de una bomba, o condiciones de pH del estómago e intestino a medida que pasa el alimento. Las características y el fundamento de este equipo se describen en el Anexo I.

La metodología utilizada para la realización del estudio aparece descrita en los artículos que se muestran a continuación.

- Resultados:

Los resultados obtenidos se han recogido en las siguientes publicaciones:

“Bioaccessibility of folic acid added to ready-to-eat meat products”.
Fleiswirstschaft, aceptado 2012.

Para el estudio de la bioaccesibilidad con el método estático se elaboraron todos los productos cárnicos descritos anteriormente. En el caso de los productos no irradiados, los resultados fueron muy similares en todos los productos, sin diferencias significativas

en la bioaccesibilidad: 38-41% en hamburguesas, 44-50% en productos cárnicos cocidos y 39-40% en productos cárnicos madurados. Sin embargo, en las muestras irradiadas, la bioaccesibilidad aumentó de forma significativa, llegando a valores de 69-72%. Este aumento puede ser debido a cambios estructurales inducidos por este tratamiento en la matriz cárnica que facilitan la liberación del ácido fólico.

“Effect of the E-beam treatment on the bioaccessibility of the folic acid incorporated to Ready To Eat meat products”.

LWT Food Science and Technology, en revisión.

Debido a la similitud de resultados obtenidos entre los lotes en el trabajo anterior, para este estudio se utilizaron tan sólo los lotes enriquecidos con la máxima cantidad de ácido fólico (2,4 mg/100g) y tratados con 3 kGy, dosis con la que se habían alcanzado los mejores resultados, sobre todo desde el punto de vista sensorial (ver artículos previos sobre viabilidad tecnológica).

Con el método dinámico TIM-1, los valores de bioaccesibilidad obtenidos en los lotes sin irradiar fueron superiores a los determinados con el método estático: un 82 y un 81% para hamburguesas y productos cárnicos madurados, respectivamente, y un 61% en el caso de los cocidos. Estos datos parecen indicar un cierto efecto de la matriz cárnica. En las muestras irradiadas, se observó el mismo efecto que con el método estático: así, la bioaccesibilidad en pasó de un 82% a un 100% en hamburguesas y de un 61% a un 79% en los productos cárnicos cocidos, mientras que en los madurados se observó un ligero aumento sin significancia estadística (hasta 82%). Este resultado confirma que los cambios en la estructura del producto irradiado promueven o facilitan la liberación de ácido fólico y en consecuencia, su bioaccesibilidad.

La conclusión que se puede obtener es que el ácido fólico es bioaccesible tanto a partir de los productos convencionales como de los preparados como RTE, siendo mayor en este último caso. Estos productos cárnicos podrían considerarse como fuente de ácido fólico (Normativa 1924/2006) y resultar adecuados para completar la cantidad diaria recomendada de folatos en una dieta convencional.

ANEXO I

DESCRIPCIÓN DEL EQUIPO TIM-1 UTILIZADO EN EL MÉTODO DINÁMICO *IN VITRO*.

El TNO tiene patentado un modelo gastrointestinal multi-compartimental computarizado denominado TIM-1. Es un sistema en el que se simula el proceso digestivo a nivel de estómago e intestino delgado. Con este sistema se ha estudiado el comportamiento de nutrientes definidos y de alimentos completos en el sistema gastrointestinal humano. Por ejemplo, se ha estudiado la disponibilidad de macro y micronutrientes, las interacciones entre nutrientes presentes de forma natural en el alimentos y compuestos funcionales incorporados, los efectos del procesado en la calidad nutritiva y funcional de los alimentos o la estabilidad y eficacia de pro- y prebióticos.

La versatilidad de este equipo y la buena relación establecida entre los resultados obtenidos con él y estudios realizados en animales y humanos, movió a la autora de esta tesis a desplazarse al TNO (Holanda) a desarrollar las pruebas relativas a la bioaccesibilidad del ácido fólico a partir de los productos cárnicos.

El TIM-1 está formado por cuatro compartimentos sucesivos que simulan el estómago (A), duodeno (C), yeyuno (E) e íleon (G) (Figura 1). En la Figura 2 se muestra una imagen del modelo TIM-1. Cada uno de ellos está formado por dos unidades básicas conectadas entre ellas. Estas unidades consisten en una cubierta de cristal (a) en cuyo interior se encuentra una pared flexible (b). El agua es impulsada alrededor de las paredes flexibles con el objetivo de controlar la temperatura en el interior de las paredes, así como la presión de las mismas. Los cambios en la presión del agua se obtienen mediante la activación de bombas rotatorias controladas por un programa informático. Un ejemplo de ese programa se muestra en la Figura 3. Esto permite que el quimo se mezcle por movimientos de compresión-relajación de las paredes flexibles. Los compartimentos están conectados por válvulas peristálticas (B, D, F) formadas por 3 tubos en forma de T, cada uno con un tubo flexible en su interior, similar al de los compartimentos. Si la presión se aplica desde el exterior de la pared flexible, la válvula se cierra, dejando un espacio mínimo dentro. Cuando las válvulas están abiertas, las paredes flexibles permiten el paso del quimo sin obstáculos. Los movimientos peristálticos se obtienen mediante la regulación de la secuencia de

apertura y cierre de las tres partes de la válvula. Durante cada ciclo peristáltico, se transfiere un volumen constante de quimo. La frecuencia de los ciclos está dictada por el ordenador de manera que el ratio de flujo de quimo esté controlado. El volumen de quimo en cada compartimento es monitorizado con un sensor de nivel conectado al ordenador.

Al comenzar, una cantidad determinada de alimento se introduce en el compartimento del estómago dentro de un periodo de tiempo pre-establecido mediante una bomba peristáltica. Todos los compartimentos están equipados con electrodos de pH (I). Los valores de pH son controlados a través del ordenador, mediante la adición de agua o HCl 1M en el caso del estómago o secretando agua o NaCO₃ 1M en el caso del duodeno. Las secreciones de electrolitos gástricos y enzimas, bilis y jugo pancreático son regulados usando bombas-jeringuilla (J, K) controlado por el ordenador.

Los compartimentos del yeyuno e íleon están conectados con unos dispositivos de fibra hueca (membranas) (N) para absorber los productos de la digestión y agua del quimo y modificar las concentraciones de electrolito y sales biliares del quimo.

Los productos de la digestión que son absorbidos a través de las membranas (absorción en el yeyuno y absorción en el íleon) se recogen en bolsas de diálisis que son sustituidas por unas nuevas cada hora. A la vez se recoge también la parte no absorbida a través de la válvula del íleon (H) (efluente). Así, las muestras que se obtendrán serán aquellas que se absorben en el yeyuno y las que se absorben en el íleon, además de los efluentes del íleon. El proceso total de la digestión dura 5 horas. Una vez que el proceso termina, se recogen los residuos del estómago y del duodeno con una pipeta Pasteur desde el punto de unión de las dos partes de ambos compartimentos. De igual forma se recogen los residuos del yeyuno y del íleon, que se juntan con el contenido final que hay en las membranas, una vez finalizada la digestión. De todas las muestras tomadas, se mide el volumen para poder calcular después la cantidad de ácido.

La bioaccesibilidad del ácido fólico se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Bioaccesibilidad (\%)} = (\text{AF dializado} / \text{AF alimento}) * 100.$$

Donde AF dializado es la cantidad de ácido fólico en los dializados del yeyuno y del íleon y AF alimento es la cantidad de ácido fólico presente en la matriz del alimento que se introduce en el estómago.

El porcentaje de recuperación fue calculado como sigue:

Recuperación (%) = ((AF dializado + AF efluente íleon + AF residuos) / (AF alimento)) * 100.

Donde AF efluente íleon es la fracción no absorbida y el AF residuos es la cantidad de ácido fólico recogida al final del experimento.

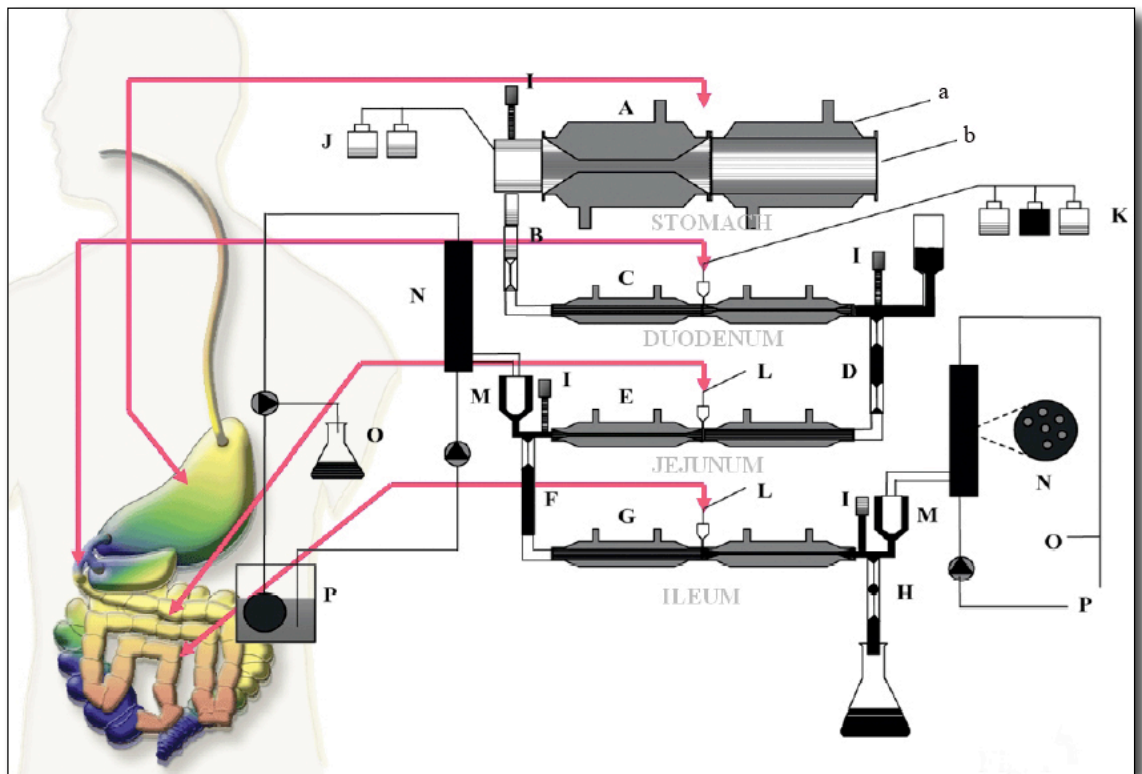
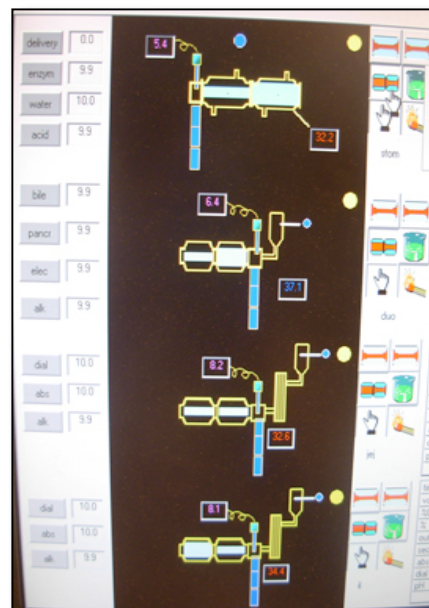
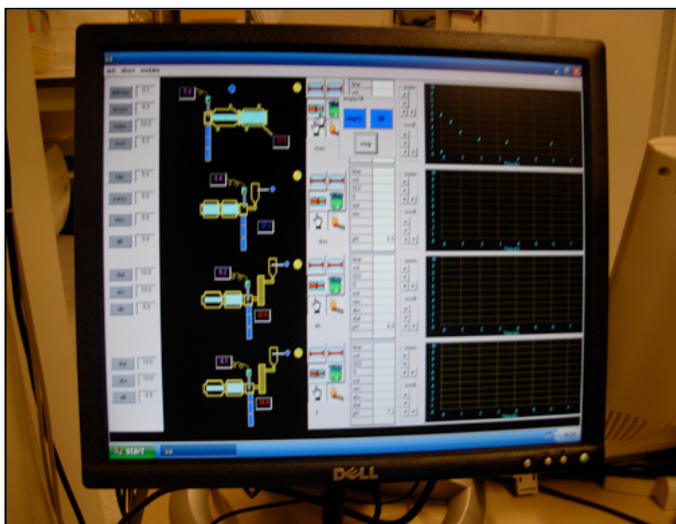
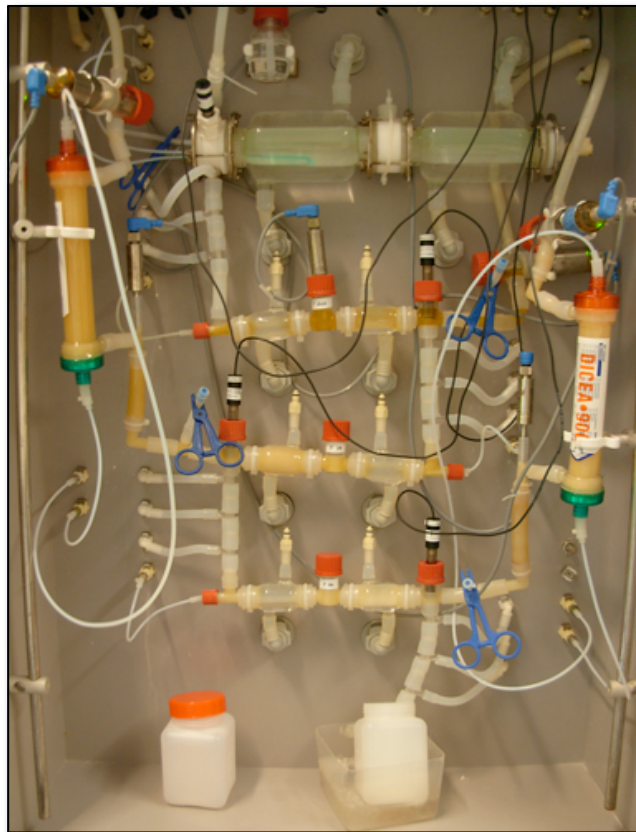


Figure 1. Schematic diagram of the dynamic, multi-compartmental model of the stomach and small intestine (TIM-1): A, gastric compartment; B, pyloric sphincter; C, duodenal compartment; D, peristaltic valve; E, jejuna compartment; F, peristaltic valve; G, ileal compartment; H, ileo-caecal valve; I, pH electrodes; J, K, syringe pumps; L, secretion of bicarbonate to control the intestinal pH; M, pre-filter system; N, hollow fibre semi-permeable membrane system.



Figures 2 and 3. Computerized simulation of the gastrointestinal process.

Minekus, M. and Havenaar, R. (1996). *In vitro* model of an *in vivo* digestive tract. US Patent. Patent number 5,525,305.

***PUBLICACIONES SOBRE EL ESTUDIO
DE LA BIOACCESIBILIDAD DEL
ÁCIDO FÓLICO***

7. PUBLICACIONES SOBRE EL ESTUDIO DE LA BIOACCESIBILIDAD DEL ÁCIDO FÓLICO EN PRODUCTOS CÁRNICOS RTE

7.1. Bioaccessibility of folic acid added to ready-to-eat meat products. *Fleiswirstchaft*. Accepted.

7.2. Effect of e-beam treatment on the bioaccessibility of the folic acid incorporated to ready to eat meat products. *LWT- Food Science and Technology*. Under review.

ARTÍCULO 5

Date: Tue, 29 Nov 2011 14:17:33 +0100
From: "Weisenfels, Michael" <Michael.Weisenfels@dfv.de>
Subject: Manuscript "Bioaccessibility of folic acid ..." for publishing at
Fleischwirtschaft International
To: Maria Dolores Selgas Cortecero <selgar@vet.ucm.es>

Dear Prof. Selgas and Mrs Galan,

Thank you very much for your inquiry.

Your manuscript is prepared for publishing at the next available issue of Fleischwirtschaft International. Up to now, we were always running out of available space in the recent issues. This is the reason, why we were not able to print your manuscript up to now. In the moment it seems, that your manuscript will be published at issue 2/2012.

Of course we will send you a proof for corrections before printing.

Thank you for your understanding and cooperation!

With kind regards from Frankfurt/Main

Michael Weisenfels

FLEISCHWIRTSCHAFT International
Editor
Mainzer Landstraße 251
60326 Frankfurt/Main
Germany

Bioaccessibility of folic acid added to ready-to-eat meat products

Irene Galán, M^a Luisa García, M^a Dolores Selgas

Dpto. Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense Madrid, Spain

Abstract--- This work describes the preliminary studies performed to know the bioaccessibility of folic acid (FA) from previously designed conventional and ready-to-eat (RTE) meat products: fresh hamburger, cooked and dry fermented sausages. E-beam irradiation (2, 3 and 4 kGy) was used to assure the safety of RTE meat products. Neither the type of matrix nor the amount of folic acid used influenced the bioaccessibility, with similar values achieved for all meat products: 38-41% for hamburgers, 44-50% for cooked sausages, and 39-40% for dry fermented sausages. The irradiation treatment increased the bioaccessibility of FA. It could be due to that the E-beam irradiation disrupts the meat matrix and facilitate the release of FA

Keywords: Bioaccessibility, folic acid, irradiation, ready-to-eat meat products

I. INTRODUCTION

Folic acid (FA) has been shown to be important in the prevention of different diseases such as neural tube defects, anemia or cardiovascular diseases (Honein et al., 2001; Wald et al., 2006). Thus, international organizations recommend a daily intake of FA between 400-600 dietary folate equivalents depending on nutritional requirements (WHO, 2006). To provide this recommended daily allowance (RDA), manufacturers have been enriching some products (mainly cereal, rice and bakery products) with this vitamin for the last several years.

In previous studies, Galán et al. (2010; 2011) designed meat products enriched with sufficient FA to provide the RDA. They manufactured both conventional and

RTE meat products, which were treated by E-beam irradiation at doses described as high enough to ensure their hygienic quality Cabeza et al., 2007; Zhu et al., 2005).

Several bioaccessibility studies have been developed on FA-enriched foods such as cereals, vegetables, citrus fruits Brouwer et al. (1999), as well as milk and dairy products (Verwei et al., 2005). To our knowledge, no data have been published on the bioaccessibility of FA added to meat matrices. The present study addresses the bioaccessibility of FA added to RTE meat products using a static *in vitro* method in which gastrointestinal digestion is simulated by a dialysis system.

II. MATERIAL AND METHODS

A. Meat Products Manufacture

The meat products were manufactured according to the methodologies described by Galán et al. (2010) for hamburgers, which we used as a model of fresh meat product and Galán et al. (2011) for conventional cooked sausages. Dry fermented sausages with a medium fat content (15%) were also manufacture according to methodology of Selgas et al. (2009). All the meat products were enriched with FA in different quantities (0.6, 1.2 and 2.4 mg/100 g of final product). After their manufacture, the hamburgers were moulded into plates with a diameter of 10 cm and a height of 1 cm, and the sausages were sliced. To facilitate their handling during the ionizing treatment, the meat products were placed in a single layer in laminated bags of low permeability (35 cm³/24 h m² bar for oxygen, 150 cm³/24 h m² bar for CO₂). Then, they were vacuum-packaged and stored under refrigeration (<4 °C) until treatment. All meat products were prepared in duplicate.

ARTÍCULO 6

Asunto Submission Confirmation

De ees.lwt.0.153463.20772a7d@eesmail.elsevier.com ; en nombre de; LWT - Food Science & Technology <lwt@elsevier.com>

Fecha Martes, Noviembre 15, 2011 15:52

Dear Mrs. Irene Galán,

We have received your article "EFFECT OF E-BEAM TREATMENT ON THE BIOACCESSIBILITY OF FOLIC ACID INCORPORATED TO READY TO EAT MEAT PRODUCTS" for consideration for publication in LWT - Food Science and Technology.

Your manuscript will be given a reference number once an editor has been assigned.

To track the status of your paper, please do the following:

1. Go to this URL: <http://ees.elsevier.com/lwt/>

2. Enter these login details:
Your username is: igalantr

If you need to retrieve password details, please go to:
http://ees.elsevier.com/lwt/automail_query.asp

3. Click [Author Login]
This takes you to the Author Main Menu.

4. Click [Submissions Being Processed]

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
LWT - Food Science and Technology

Effect of E-beam treatment on the bioaccessibility of folic acid incorporated to ready to eat meat products

Irene Galán.¹, María L. García¹, María D. Selgas¹ and Robert Havenaar²

¹ Dpto. Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense Madrid, Spain

² TNO, PO Box 360, 3700 AJ Zeist, The Netherland

Abstract--- Meat products are a potential matrix to fortify with folic acid (FA). In previous studies the effect of E-beam treatment on the stability of FA in ready to eat (RTE) meat products has been described. However, the FA bioaccessibility in both traditional and treated (3 kGy) RTE meat products has not yet been studied. We investigated the availability for intestinal absorption (bioaccessibility) of FA using a dynamic gastrointestinal model (TIM system). Three different types of meat products, hamburgers, cooked sausages and dry fermented sausages, initially fortified with 24 µg/g FA were tested as freshly prepared products and as RTE products. The bioaccessibility of FA during the passage through the TIM system was high for all three products, irrespective the E-beam treatment. From hamburgers the bioaccessibility was 82% and 100%, from cooked sausages, 61 and 79% and from dry fermented sausages 81 and 82%, with or without E-beam treatment, respectively.

Keywords: Folic Acid, Bioaccessibility, Meat Product, E-beam treatment

I. INTRODUCTION

Today, consumers ask more and more for convenience foods, which are easy to prepare, tasty to consume, safe and nutritious. For convenience, this has led to the manufacture of "ready to eat" (RTE) foods with free-service formats in which food portions are presented in unidos format, slices, fillets or small pieces which are packaged for exhibition and sale in refrigerated display cases. Meat products are no strangers to this trend. However, these RTE products

should fulfill a number of requirements, as discussed below.

RTE products must be tasty, nutritious and safe but their manufacture involves a manipulation, which can seriously compromise the hygienic quality by promoting access of pathogens (as *Listeria*, *Campylobacter* or *Yersinia spp.*) that can grow under refrigerated conditions during storage. RTE products have to be additionally treated after packaging with non-thermal technologies that assure the destruction of food borne microorganisms, without changing their characteristic organoleptic and nutritious properties. One of these technologies is irradiation, which eliminates pathogens and reduces the spoilage bacteria by disruption of genetic material (DNA) (Fu, Sebranek & Murano, 1995; Shenoy, Murano & Olson, 1998; Samelis, Kakouri, Savvaidis, Riganakos & Kontominas, 2005; Farkas, 2006; Gomes & da Silva, 2006). This treatment is very useful to increase the food shelf-life and it has been successfully applied for meat and meat products (Diehl, 2001; Molins, 2001; Cabeza, Cambero, de la Hoz & Ordóñez, 2007; Cabeza, de la Hoz, Velasco, Cambero, & Ordóñez, 2009; Zhu, Du, Cordray & Ahn, 2005; Hugas et al. 2002; Zhu et al., 2005; Selgas, García, & Calvo, 2009).

Folic acid (FA) is a donor of methyl groups and essential for the synthesis of purines and pyrimidines, methionine and serine (Scott, Rébeille & Fletcher, 2000). Of special importance is the direct relationship between folate deficiency and defects in neural tube development (spina bifida) (Molloy, 2005) and diseases such as colon, breast and pancreas cancer as well as macrocytic and megaloblastic anemia (Honein, Paulozzi, Mathews, Erickson & Wong, 2001; Richter et al. 2001; Graham & O'Allaghan, 2000; Wald et al., 2007). World Health Organization (WHO, 2006) established the recommended daily amounts (RDA) of 400 dietary folate equivalents (DFE) for adults, 600

DISCUSIÓN GENERAL

8. DISCUSIÓN GENERAL

Los consumidores muestran cada vez más una conciencia más saludable, han asimilado de una forma rápida que es mejor “prevenir antes que curar” y hay un creciente conocimiento de que nuestra perspectiva de salud, bienestar y longevidad está muy relacionada con la composición de los alimentos que comemos. El concepto de alimento funcional ha promovido grandes innovaciones en la industria alimentaria y ha contribuido al desarrollo de diferentes estrategias para el diseño de nuevos alimentos con declaraciones nutricionales o de salud. Una de las estrategias más comunes es la incorporación de nutrientes o compuestos bioactivos a alimentos con el fin de mejorar la calidad nutricional de la dieta contribuyendo, en parte, a eliminar el consumo de alimentos específicos para evitar deficiencias nutricionales.

El diseño de estos alimentos presenta algunas vertientes bien definidas: la elección del compuesto bioactivo, conocer su estabilidad frente a las condiciones del procesado habitual del alimento incluyendo su almacenamiento, evaluar las características físico-químicas y sensoriales del mismo y hacer un seguimiento de la actividad funcional teniendo en cuenta siempre el concepto de bioaccesibilidad.

Estos aspectos deben ser complementarios, ya que el criterio tecnológico ha de tener en cuenta siempre que el objetivo final ha de ser aportar nutrientes que puedan ser absorbidos por el organismo en cantidad suficiente para ejercer el papel para el que ha sido incorporado.

El ácido fólico es una vitamina esencial por su papel como donante universal de grupos metilo y por su importancia en la síntesis de DNA y RNA. Como se ha mencionado en la Introducción, también interviene directa y positivamente en el funcionamiento de los sistemas cardiovascular y nervioso, así como en desarrollo del feto.

Su repercusión en la salud es tan importante que ya desde 1996, la FDA hizo obligatoria la incorporación de ácido fólico en alimentos de consumo básico y universal como en las harinas que se utilizan como base para la elaboración de panes y pasta. Igualmente, los cereales de desayuno consumidos mayoritariamente por la población infantil, están enriquecidos en este compuesto bioactivo.

En Alemania, la organización BfR publicó un informe de prensa en 2005 (BfR, 2005) en el que se ponía de manifiesto que entre un 80 y un 90% de la población consume menos de la cantidad diaria recomendada.

Vaesken, Alonso-Aperte y Varela-Moreiras, (2009) realizaron un estudio sobre los alimentos fortificados en España con ácido fólico e identificaron seis grupos: cereales y derivados (52%), leches y derivados (17%), alimentos para lactantes y niños de corta edad (12%), productos dietéticos y de régimen (11%), bebidas no alcohólicas (6%) y grasas comestibles (2%).

En el apartado 2 se ha justificado el objetivo de este estudio: desarrollar productos cárnicos convencionales y listos para el consumo, enriquecidos con ácido fólico, estudiando a su vez la bioaccesibilidad de este nutriente a partir de cualquiera de ellos. La novedad del trabajo tiene una doble vertiente: ser la primera vez que se contempla a los productos cárnicos (frescos, cocidos o madurados) como vehículo de ácido fólico y ser la primera vez que se desarrollan productos cárnicos funcionales listos para el consumo mediante la aplicación radiaciones ionizantes (electrones acelerados) que aseguren su calidad higiénica haciendo que sean no sólo sanos y nutritivos, sino seguros. Son prácticamente inexistentes los trabajos realizados con productos cárnicos funcionales RTE a pesar de que, según indican las tendencias de mercado, dentro de muy poco veremos cómo estas preparaciones cárnicas se comercializan de igual forma que sus homólogos convencionales. Además, tampoco se ha estudiado hasta ahora el potencial de las radiaciones ionizantes como tratamiento no térmico en productos cárnicos funcionales, ni su efecto en el componente bioactivo incorporado sea el ácido fólico o cualquier otro.

La financiación conseguida por el Ministerio de Innovación, Ciencia e Investigación mediante dos proyectos de investigación, CITYC AGL2007-63666 y CONSOLIDER-Ingenio 2010 (Ref. CSD2007-00016), concretamente el Subproyecto FUNCIOCA, confirman el interés del presente estudio.

8.1. Viabilidad tecnológica del ácido fólico como ingrediente funcional de productos cárnicos convencionales y RTE

8.1.1. Contenido de ácido fólico

Sin lugar a dudas el aspecto más importante a tener en cuenta es la estabilidad del ácido fólico después del procesado de los productos estudiados. En términos generales, el efecto fue muy reducido en los productos cárnicos frescos y cocidos. La estabilidad del ácido fólico al calor ya ha sido descrita por algunos autores como Nguyun, Indrawati y Hendickx, (2003) quienes observaron que el ácido fólico no se veía afectado por el calentamiento incluso hasta temperaturas de esterilización. Es interesante el trabajo realizado por Vora, Riga, Dollimore y Alexander, (2004) quienes estudiaron la estabilidad térmica de esta vitamina en un abanico de temperaturas que alcanzó los 800°C, llegando a establecer cuál es la dinámica de degradación del ácido fólico utilizando diferentes técnicas espectroscópicas. Estos autores describen cómo los primeros cambios empiezan a observarse a los 90°C, pero la degradación térmica como tal tiene lugar entre 148-262°C; la primera reacción constituye la degradación del 40% de la molécula y conlleva la pérdida del ácido glutámico más dos moléculas de agua. El siguiente paso representa tan sólo un 8% de pérdida y ocurre a 208°C. El último paso es a 262°C y supone la degradación del 52% restante debido a la pérdida de la pteridina y del ácido p-amino benzoico. A 800°C la molécula ya se encuentra completamente degradada.

Esta estabilidad queda también patente en el trabajo de Cheung, Morrison, Small y Marriot, (2008) quienes llegaron a recuperar el 99% de la cantidad de ácido fólico presente en pastas alimenticias cocinadas a temperaturas de 150°C.

En nuestro caso, las temperaturas alcanzadas durante el cocinado de las hamburguesas (60°C) y el tratamiento térmico de los embutidos cocidos (72°C) no han sido suficientes para provocar cambios e, independiente de la cantidad inicial de ácido fólico incorporada (0,6, 1,2 o 2,4 mg/ 100 g), la concentración final fue prácticamente la misma. Nuestros resultados contrastan con los de Ottaway y Ottaway, (2002) quienes describen cómo los procesos culinarios pueden producir una pérdida de hasta el 50% de

los folatos. No hay que olvidar que en nuestro caso estamos trabajando con el ácido fólico que es mucho más estable.

En los productos cárnicos madurados, la cantidad de ácido fólico en el producto final fue superior a la incorporada a la masa inicial debido, lógicamente, a la concentración de solutos que conlleva la pérdida de agua que tiene lugar durante el proceso de maduración. En estos productos cabe destacar que cuando se hicieron los recuentos de la microbiota, se observó un ligero aumento (1-2 ciclos logarítmicos) de las bacterias ácido lácticas (BAL), en comparación con el lote control sin ácido fólico. El aumento fue más evidente en los lotes a la mayor concentración (2,4 mg/100 g). Esto puede deberse a que el ácido fólico favorece el crecimiento de las BAL ya que, de hecho, este es el fundamento de los ensayos microbiológicos tradicionalmente utilizados para determinar la presencia de folatos/fólico en los alimentos (Arcot y Shrestha, 2005). *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 7469) es la cepa más comúnmente utilizada ya que responde muy bien tanto al ácido fólico como a una amplia gama de folatos incluyendo el 5-Me-THF. En este sentido, Lin y Young (2000) describieron cómo las BAL son capaces de sintetizar o metabolizar folatos incluso a temperaturas de refrigeración y observaron que el metabolismo es más importante que la síntesis cuando la temperatura de refrigeración es inferior a 4°C.

Esta relación entre las BAL y el ácido fólico ha sido utilizada por diferentes autores (Sybesma, Starrenburg, Kleerebezem, Mierau, de Vos y Hugenholtz, 2003; Santos, Wegkamp, de Vos, Smid y Hugenholtz, 2008) quienes han modificado algunas cepas mediante ingeniería genética haciendo que produzcan ácido fólico en cantidades lo suficientemente altas como para que puedan ser utilizadas como posible fuente de ácido fólico en productos fermentados. Ellos describen esta propuesta como una realidad en productos vegetales fermentados en los que obtuvieron resultados muy prometedores.

Cuando se observó el efecto de los electrones acelerados sobre el contenido del ácido fólico, se pudo observar un descenso generalizado, entre el 20-30%, en los productos frescos y cocidos, y quizás algo más bajo en los embutidos madurados en los que se llegaron a determinar pérdidas del 15%. Se ha estimado que este descenso se debe al efecto de los radicales libres que se producen, sobre todo por la radiólisis del agua, y que pueden desestabilizar y desactivar la molécula del ácido fólico. En este

sentido, Giroux y Lacroix (1998) estudiaron las pérdidas de vitaminas del grupo B, incluyendo el ácido fólico, con las radiaciones ionizantes y observaron una pérdida generalizada. Estos autores lo justifican por la generación de radicales que ionizan estas vitaminas, dando lugar a otros compuestos que no poseen actividad.

Araújo, *et al.*, (2011) estudiaron el efecto de la irradiación en diferentes estados del ácido fólico, en estado sólido o en solución y observaron diferentes comportamientos en función de uno u otro. En general, describieron una mayor sensibilidad cuando se encuentra en solución que en forma cristalina (sólido). Como se ha mencionado previamente, cuando está en solución, el ácido fólico puede desestabilizarse por la acción de los radicales libres resultantes de la radiólisis del agua. Sin embargo, es importante tener en cuenta que el tratamiento de irradiación estudiado por estos autores (0,25-10 kGy) es, como ellos indican, un proceso más profundo que la propia radiólisis ya que la cantidad de energía que aporta puede provocar directamente cambios en los componentes de los alimentos (y en el ácido fólico también) y producir una mayor cantidad de productos de degradación.

Hasta el momento no se han determinado con precisión cuales son los productos resultantes de la degradación del ácido fólico por irradiación y, en la mayoría de los casos, la información se limita a explicar la pérdida de actividad vitamínica. No hay que olvidar que el ácido fólico está compuesto por tres moléculas diferentes (pteridina, ácido p-amino benzoico y ácido glutámico) y que, cuando se pierde o se transforma alguna de ellas, se pierde esta actividad. Resultados contradictorios fueron descritos por Thomas, Suárez, Cabrerizo, Martino y Capparelli, (2000) quienes describen al ácido fólico como una molécula radio-estable cuando se encuentra en soluciones acuosas.

Sin embargo, el ácido fólico en polvo, con un contenido bajo de humedad (8%), es más estable a la irradiación incluso a dosis de hasta 10 kGy (Araújo, *et al.*, 2011). Esto se debe a que, aunque el contenido en agua sea bajo, se puede producir radiólisis, especialmente a las dosis más altas. Estos mismos autores realizaron estudios con harinas fortificadas e irradiadas con haces de electrones y observaron una ligera pérdida de ácido fólico, inferior al 30%.

Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos previamente por Ottaway y Ottaway, (2002) quienes indicaron que las pérdidas de vitaminas por tratamientos

ionizantes no eran significativas cuando se aplicaban dosis bajas (hasta 1 kGy), pero iban en aumento cuando el tratamiento se realizaba con dosis superiores, entre 3 y 10 kGy. Estas pérdidas podrían reducirse si la irradiación se realizase a temperaturas bajas o si las muestras estuvieran envasadas a vacío.

En nuestro caso, las pérdidas por irradiación estarían relacionadas con el contenido en agua, sobre todo en las hamburguesas en las que su alto contenido hace que se produzcan pérdidas de ácido fólico ya con tratamientos de 2 kGy (20-30%). En el caso de los productos cocidos y madurados, estas pérdidas se observaron a dosis superiores, fundamentalmente a 4 kGy, lo que nos hace pensar en un cierto efecto protector de la matriz cárnica. Estos productos cárnicos tienen una estructura muy compleja debido a la fuerte interacción que se establece entre sus componentes; el agua se encuentra atrapada en la estructura de gel y en consecuencia, los componentes hidrosolubles entre los que se puede encontrar el ácido fólico. Este gel, esta red tridimensional compacta, es la que debe ejercer de elemento protector a las dosis más bajas aplicadas en este trabajo. A dosis mayores (4 kGy) la irradiación puede producir cambios en la matriz que lo dejen más libre y en consecuencia, sería fácilmente ionizable. En este sentido, Ahn (2002) describió como la irradiación contribuye a la degradación de los aminoácidos y por tanto, a una degradación proteica que conllevaría una pérdida de la estructura de la matriz que estos autores asociaron con un descenso de la dureza haciendo al producto cárnico más sensible a las fuerzas de corte. Además, esta degradación aminoacídica daría lugar a la aparición de compuestos azufrados responsables de los olores extraños característicos de los alimentos así procesados y que se identifican como olor “a irradiado”.

8.1.2. Textura

Una vez establecido el efecto del procesado en el contenido de ácido fólico, el siguiente paso fue caracterizar las propiedades organolépticas de los productos diseñados utilizando pruebas instrumentales y sensoriales. En este sentido hay que recordar lo importante que es mantener la calidad puesto que de ello depende que estos productos se consuman de igual forma que los productos convencionales.

Para determinar los cambios de textura, se realizaron ensayos de doble compresión (Análisis de Perfil de Textura) que permiten establecer los parámetros primarios que la definen (dureza, cohesión, elasticidad y adhesividad) así como los parámetros secundarios (gomosidad y masticabilidad) que de ellos se derivan. No se pudo establecer un comportamiento generalizado en los tres tipos de productos cárnicos enriquecidos lo cual nos hace pensar de nuevo en el efecto de la matriz cárnica.

Así, la presencia de ácido fólico no produjo cambios significativos ($P < 0,05$) en la textura de las hamburguesas o de los productos cocidos sin irradiar pero, sobre todo en estos últimos, cabe resaltar una tendencia a que la dureza y la fuerza de corte vayan aumentando a medida que lo hace la cantidad de ácido fólico añadida. Los resultados obtenidos en los embutidos madurados fueron diferentes ya que, en este caso, sí se observó un efecto significativo de la dureza a medida que aumentaba la concentración de ácido fólico. Es posible que el bajo pH de los embutidos sea suficiente como para ionizar el ácido fólico y hacer que en este estado reaccione con las proteínas desnaturalizadas durante la maduración rindiendo un gel más firme y consistente que sería el responsable de este aumento.

Sin embargo, cuando las muestras fueron irradiadas, en las hamburguesas se observó un aumento de la dureza y la cohesión, independientemente de la cantidad de ácido fólico añadida. En los cocidos no se observaron cambios de relevancia y en los embutidos madurados, la dureza fue descendiendo a medida que aumentaba la dosis de irradiación, llegando ser significativos ($P > 0,05$) sólo a 4 kGy; no se observaron cambios en las pruebas de corte, independientemente de la cantidad de ácido fólico añadida. Estos resultados tan dispares podrían explicarse por los posibles cambios estructurales que la irradiación provoca en la carne y productos cárnicos y que no son más que un reflejo de la disparidad de datos existentes en la bibliografía sobre el tema. Valgan las siguientes citas como una muestra.

Heath, Owens, Tesch y Hannah (1990) no observaron cambios relevantes en la textura de carne de pollo sometida a tratamientos de 3 kGy. Hasim, Resurreccion y McWatter, (1995) y Abu-Tarboush, Al-Kahtani, Atia, Abou-Arab, Bajaber y El-Mojaddidi, (1997) tampoco observaron cambios en la textura entre muestras de pollo irradiadas y no irradiadas. Byun, Lee, Jo y Yook, (2001) observaron un ablandamiento en carne de vacuno irradiada, lo que mejoraba su calidad global. Yoon (2003) obtuvo

resultados contradictorios ya que trabajando también con carne de pollo y aplicando un tratamiento de 2,9 kGy, observaron que la textura cambiaba por un aumento de la dureza. Este autor explicaba que podía deberse a la contracción de las miofibrillas y a la consiguiente contracción de los sarcómeros. Zhu, *et al.*, (2004) mostraron un ligero descenso en la dureza en carne de pato cuando se aplicaron electrones acelerados en dosis de 2 kGy. Sin embargo, Lee y Ahn (2005) tampoco observaron cambios en carne de pavo irradiada con 2 kGy. Esta variación parece sugerir, de acuerdo con Yoon (2003), que los efectos de la irradiación en la carne y los productos cárnicos depende también de la especie animal.

En lo que se refiere a productos cárnicos cocidos o madurados, son pocos los trabajos realizados en este sentido y caben destacar los realizado por Cabeza, Cambero, de la Hoz y Ordóñez, (2007) y Cabeza, de la Hoz, Velasco, Cambero y Ordóñez, (2009) quienes no observaron cambios significativos en ninguno de los parámetros de textura en jamones cocidos o embutidos madurados loncheados e irradiados con dosis de 1-4 kGy.

Todos estos resultados contradictorios muestran la compleja relación entre la irradiación y la textura de la carne y los productos cárnicos lo que hace difícil predecir cuál va a ser el efecto de la irradiación en productos cárnicos concretos y que sea indispensable tener en cuenta factores como el tamaño de la muestra a irradiar, condiciones de la irradiación o la propia fuente de irradiación. De acuerdo con Yoon (2003) se necesitan muchos más estudios para conocer el efecto real de la irradiación en la textura de la carne y los productos cárnicos y en consecuencia, poderlos minimizar.

8.1.3. Color

Los cambios en el color se analizaron determinando la evolución de los parámetros de luminosidad (L^*), rojo-verde (a^*) y amarillo-azul (b^*), Angulo Hue (Tonalidad) e Índice de Saturación (Vivacidad). En un principio cabía pensar que el color se iba a ver modificado por la incorporación del ácido fólico ya que la solución acuosa que lo vehiculaba presentaba un color amarillo que podría modificar el color de las muestras.

En el caso de las hamburguesas, la luminosidad (L^*) fue muy similar en todos los casos, independientemente la cantidad de ácido fólico incorporada. Sin embargo, el comportamiento del parámetro a^* sí que mostró cambios destacables ya que la presencia de ácido fólico modificó el color rojo típico de la carne picada, observándose una diferencia significativa incluso a las concentraciones más bajas (0,6 mg/100 g), probablemente debido al efecto del color de la solución. El parámetro b^* también se ve influido por la presencia de ácido fólico, siendo menor en los lotes enriquecidos.

El efecto de la irradiación fue un poco dispar entre los lotes sin ácido fólico y los enriquecidos. Sí que se puede generalizar que la luminosidad apenas cambió con la irradiación, hecho que ya ha sido descrito por otros autores como Kim, Nam y Ahn (2002) e Ismail, Lee, Ko y Ahn, (2008). Por otra parte, Nanke, Sebranek y Olson, (1999) describieron cómo la irradiación modificaba la luminosidad en carne de vacuno pero no en carne de cerdo y pavo; los valores que aportan son muy variables y estos mismos autores los definen como inconsistentes.

Así, en los lotes sin enriquecer, la irradiación provocó el desarrollo de una tonalidad parda con un claro descenso de a^* , incluso a las dosis más bajas. Esta tonalidad ha sido descrita por diferentes autores para los productos irradiados. Nuestros resultados concuerdan con los descritos por Kim, Nam y Ahn, (2002) e Ismail, Lee, Ko y Ahn, (2008) quienes observaron lo mismo en carne de vacuno y han sido ampliamente descritos en las revisiones de Brewer (2004, 2009) en donde se indica que la explicación de este cambio se encuentra en la formación de metamioglobina a partir de la mioglobina por la acción de los radicales libres producidos por los electrones acelerados. Esto mismo fue ya indicado por Giroux, Ouattara, Yefsah, Smoragiewicz, Saucier y Lacroix, (2001). Por el contrario, Nanke, Sebranek y Olson, (1999) indicaron que entre 0-10,5 kGy, a^* aumentaba con la dosis de irradiación en carne de cerdo envasada a vacío y Millar, Moss y Stevenson, (2000) describieron que los valores de a^* no cambiaban en la carne de cerdo tratada con dosis de 5 kGy, evidentemente en comparación con la misma carne sin irradiar.

Por el contrario, en los lotes enriquecidos, el parámetro a^* fue mayor que el correspondiente al lote sin irradiar ($P < 0,05$). La causa puede ser la degradación del ácido fólico. Como se ha descrito anteriormente, es posible que la irradiación provoque la descomposición de la molécula dando lugar a la liberación de uno de sus

componentes, el ácido glutámico. Como consecuencia, se puede crear un medio reductor que favorezca un cierto grado de reconversión de la metamioglobina formada en mioglobina con su característico color rojo. Esta hipótesis se basa en los trabajos realizados por El-Dessouky, Abd-Elwahab y Turk, (1988) quienes mencionaron que estos cambios pueden suceder aunque no se detecten cambios en el pH.

Este hecho estaría en consonancia con el descenso de b^* observado en las muestras con mayor contenido en ácido fólico tras la irradiación ya que la degradación de la molécula de fólico conllevaría la pérdida de su característico color amarillento. Nanke, Sebranek y Olson, (1999) ya describieron como b^* descendía cuando la carne se irradiaba con dosis comprendidas entre 1,5 y 3 kGy, y Kim, Nam y Ahn, (2002) que observaron este descenso hasta con 3 kGy. Este comportamiento se manifestó en un cambio importante en un descenso de la tonalidad (Ángulo Hue) de los productos enriquecidos y aumentaba el Índice de Saturación (Vivacidad).

Es importante tener en cuenta que todos estos cambios son evidentes en productos cárnicos crudos, pero se minimizan y prácticamente desaparecen cuando las hamburguesas se cocinan. Evidentemente, el intenso color pardo (“a cocinado”) inducido por la reacción de Maillard es suficiente para enmascarar los producidos por el ácido fólico o la irradiación.

En los productos cárnicos cocidos se observó, en términos generales, un mayor efecto del contenido de ácido fólico que de la irradiación. Así, la luminosidad aumentó ligeramente alcanzándose diferencias significativas con el lote control (sin enriquecer) a las mayores concentraciones de ácido fólico. Estos resultados son similares a los obtenidos previamente por Cáceres, García y Selgas, (2008) en productos cárnicos cocidos; estos autores relacionan este aumento con el brillo característico de la solución acuosa de ácido fólico. En el presente trabajo el ácido fólico fue incorporado directamente en forma de polvo; sin embargo, puesto que uno de los principales ingredientes de la masa del producto cárnico es el agua, es fácil de entender que el ácido fólico se haya disuelto en ella formando una solución acuosa que tendría el color amarillo-anaranjado descrito y que justifica los resultados obtenidos.

El valor a^* se mantuvo en valores muy similares en los lotes sin irradiar, pero se observó un descenso con la aplicación de este tratamiento. Resultados similares han

sido obtenidos por Cabeza, Cambero, de la Hoz y Ordóñez, (2007) quienes también observaron una disminución de a^* en jamón cocido irradiado. En nuestro caso el descenso fue más evidente en los lotes enriquecidos con las mayores concentraciones (1,2-2,4 mg/100 g) de ácido fólico, observándose diferencias significativas ($P < 0,05$) con los demás. De nuevo hay que tener en cuenta, la posible degradación del ácido fólico como resultado de la ionización.

Este mismo comportamiento se observó en b^* cuyos valores aumentaron con la irradiación en los lotes enriquecidos. De nuevo hay que tener en cuenta el color amarillo del ácido fólico y que, al mezclarse con los tonos rojo-rosado propios de una mortadela, hace que aparezcan tonalidades anaranjadas que modifican los valores de b^* , lo cual concuerda con lo observado por Cáceres, García y Selgas, (2008). De hecho, el cambio fue mayor a las mayores concentraciones de ácido fólico. En consecuencia, el Ángulo Hue fue aumentando y el Índice de Saturación descendiendo.

En los productos cárnicos madurados, ni la presencia de ácido fólico ni el tratamiento de irradiación afectaron de forma significativa en los parámetros de color. Ni la luminosidad ni el parámetro a^* mostraron variaciones significativas con la dosis empleadas. La mayor influencia en el color de los productos madurados se produce a través del parámetro b^* , el cual muestra una tendencia a disminuir a las dosis de irradiación más altas. Estos datos concuerdan con los obtenidos por Cabeza, de la Hoz, Velasco, Cambero y Ordóñez, (2009) quienes observaron valores similares en embutidos madurados sometidos a dosis entre 0 y 3 kGy. En este mismo sentido se encuentra el trabajo de Chouliara *et al.*, (2006) quienes observaron que no se producen cambios en el color de embutidos madurados elaborados con carne irradiada en dosis de hasta 4 kGy.

Es posible que todos los cambios descritos previamente para las carnes irradiadas tengan lugar en estos productos, pero lo que sí es cierto es que, de producirse, no se evidencian, muy probablemente porque queden enmascarados por el color de la mezcla de especias y la nitrosomioglobina producida durante el proceso de maduración que es el pigmento que confiere a estos productos el color rosado-púrpura característico.

Los valores del Ángulo Hue y el Índice de Saturación lógicamente no se modificaron de forma significativa, aunque se observaba una tendencia a disminuir con

la irradiación en los lotes enriquecidos con ácido fólico por el pequeño cambio observado en b*.

De forma general se puede concluir que los cambios que tienen lugar en el color de los productos cárnicos desarrollados en este trabajo no son de gran importancia y se producen tanto por la incorporación de ácido fólico como por la aplicación de las radiaciones ionizantes; por tanto, no parecen ser un factor limitante para la elaboración de estos productos en forma de RTE.

Como puede observarse, es más fácil contrastar nuestros resultados con los obtenidos por otros autores en diferentes tipos de carne irradiada (vacuno, cerdo, pollo o pavo) pero no ocurre lo mismo con los productos cárnicos, que han sido mucho menos estudiados y son escasos los realizados en este sentido. Aún así, los trabajos que existen en la bibliografía son más concordantes con nuestros resultados que discordantes.

8.1.4. Análisis sensorial

La presencia de ácido fólico no influyó, en general, en las características sensoriales ni en la aceptabilidad general de estos productos cárnicos; la peor valoración fue la obtenida por los embutidos madurados con mayor cantidad de ácido fólico si bien la aceptabilidad general alcanzó una puntuación de 5,3 sobre los 10 puntos de la escala hedónica. Como en los ensayos anteriores, fue la irradiación la que provocó la aparición de cambios sensoriales en algunos casos, bastante negativos.

En el caso de las hamburguesas primero se hizo un análisis descriptivo (olor, color, aceptabilidad general) en fresco (crudas) para ver cual sería la influencia en el aspecto visual, si la hubiere, del ácido fólico y/o de la irradiación ya que, de ser negativa, podría condicionar la elección del consumidor. A pesar de los cambios observados en el análisis instrumental del color, los panelistas valoraron como buenas todas las muestras, independientemente de la cantidad de ácido fólico adicionada. Sin embargo la irradiación sí que indujo cambios siendo las muestras con la dosis de 4 kGy las peor valoradas. En las hamburguesas cocinadas, se hizo un análisis descriptivo y los resultados fueron diferentes no encontrándose diferencias entre ninguno de los lotes estudiados. De nuevo hay que atribuir esta similitud a la influencia del cocinado, de las

reacciones de pardeamiento no enzimático que tienen lugar y en definitiva, a que los compuestos producidos por la reacción de Maillard enmascaran los cambios que se detectan en los productos sin cocinar. Estos resultados nos indican que son aceptables todos los lotes ya que, aunque en fresco se detecten olores extraños, desaparecen durante el cocinado haciendo que el producto sea considerado como bueno a la hora de su consumo.

Los productos cárnicos cocidos se comportan dentro del mismo patrón: no hay cambios en relación al contenido de ácido fólico y sí en relación con la irradiación ya que a medida que la dosis aumenta, la puntuación fue menor, alcanzándose los valores más bajos a 4 kGy. En el análisis descriptivo se pudo observar un descenso de la aceptabilidad general siendo el sabor el parámetro que más afecta. Sin embargo, hay que resaltar que la puntuación obtenida en todos los parámetros evaluados fue superior a 5, incluso a 4 kGy, lo cual indica que estos productos cárnicos pueden ser tratados hasta con esta dosis con buenos resultados sensoriales. Tal y como se ha descrito anteriormente, es probable que la mezcla de especias sea la responsable de matizar las características sensoriales que aporta la irradiación, actuando como un agente neutralizante de sabores y olores anómalos.

También se obtuvieron resultados similares en los productos cárnicos madurados. Así, cuando se hizo un análisis preferencial, los panelistas no detectaron cambios significativos con la presencia de ácido fólico, pero cuando se analizó el efecto de la irradiación, se rechazaron los lotes tratados con las dosis más altas (4 kGy) por lo que ya no se consideraron adecuados para la realización de un análisis descriptivo. Ya dentro de este análisis, los lotes tratados con 3 kGy fueron peor valorados que los tratados a 2 kGy siendo el sabor y el olor los parámetros más afectados. Similares resultados fueron obtenidos por Cabeza, de la Hoz, Velasco, Cambero y Ordóñez, (2009) quienes observaron estos cambios en embutidos madurados con 3 kGy. Como se ha mencionado anteriormente, son varios los autores (Ahn, Jo, & Olson, 2000; Zhu, *et al.*, 2004; Lee & Ahn, 2005; Farkas, 2006; Kwon, Kwon, Nam, Lee, & Ahn, 2008; Brewer, 2009) que describen olores anómalos en las carnes irradiadas; esto es debido a los compuestos volátiles azufrados, dimetilsulfóxido, básicamente que se producen durante la irradiación cuya formación ha sido ampliamente documentada y comentada en apartados anteriores. Estos compuestos pueden influir igualmente en el sabor

(Patterson & Stevenson 1995). Yan, Lee, Nam, Min y Ahn, (2006) detectaron estos cambios incluso a dosis tan bajas como 1,5 kGy.

8.1.5. Estabilidad del ácido fólico durante el almacenamiento de los productos cárnicos diseñados

El siguiente paso fue conocer cómo se comportarían estos productos cárnicos cuando se almacenasen durante un periodo de tiempo prolongado. Para ello, los embutidos cocidos y madurados se mantuvieron durante 90 días en condiciones de refrigeración (<4°C) mientras que las hamburguesas se mantuvieron en congelación (-18 °C). Esta diferencia de condiciones obedece a que, en trabajos anteriores (Murano, Murano, & Olson, 1998; Selgas, García, & Calvo, 2009), se ha descrito que la máxima vida útil de las hamburguesas mantenidas en refrigeración y a vacío es alrededor de 15 días, ya que al cabo de ese tiempo la microbiota se encarga de alterar el producto lo suficiente para que el interés del enriquecimiento con ácido fólico pasase a un segundo plano.

El ácido fólico se mantuvo constante en las hamburguesas y en los productos cárnicos cocidos (convencionales y RTE). Esta estabilidad concuerda con los resultados obtenidos por otros autores, por ejemplo, Phillips, *et al.*, (2005) quienes observaron una alta estabilidad de los folatos en vegetales después de 12 meses de almacenamiento en condiciones de congelación (-60°C) o Papastoyiannidis, Polychoniadou, Michaelidou y Alichanidis, (2006) quienes describieron la estabilidad de las vitaminas del grupo B en leches enriquecidas y mantenidas en condiciones de refrigeración durante un tiempo de almacenamiento superior a los 16 días. Sin embargo, Gujska, Michalak y Klepacka, (2009) observaron pérdidas en torno al 14% en dos tipos diferentes de panes después de 5 semanas de almacenamiento a -18°C. Estas pérdidas alcanzaron el 25 y 38% después de 16 semanas y dependiendo del tipo de pan. Estos resultados nos hacen pensar en un cierto efecto protector de la matriz cárnica, en nuestro caso, que sería la responsable de que no se produjeran pérdidas durante el almacenamiento.

Sin embargo, en los productos cárnicos madurados, el contenido de ácido fólico disminuyó un 20% en los no irradiados y un 12 y 8 % en los irradiados con 2 y 3 kGy,

respectivamente. Este hecho hay que relacionarlo con el descenso de las BAL. Hay que recordar que los recuentos realizados tras la irradiación, han determinado que dosis de 2 y 4 kGy, provocan un descenso de 2 y 5 ciclos logarítmicos, respectivamente. Por tanto, al disminuir el número de estas bacterias presentes en el producto, el consumo de ácido fólico es menor y la cantidad residual, mayor (Lin & Young, 2000). Sin embargo, Kariluoto, Aittamaa, Korhola, Salovaara, Vahteristo y Piironen, (2006) observaron pérdidas menores de ácido fólico en productos irradiados.

A pesar de ello, es importante tener en cuenta que la cantidad final fue, en todos los casos, suficiente para que una ración de 50 g de embutido cocido o madurado o una hamburguesa de 100 g, pueda cubrir la ingesta diaria recomendada.

La valoración sensorial fue buena en todos los productos incluso después de 90 días de almacenamiento. Cabe destacar que en el caso de los embutidos cocidos y madurados, la aceptabilidad general mejoró durante el almacenamiento debido a que los olores “a irradiado” que se percibían en un primer momento fueron disminuyendo con el tiempo. Jo, Lee y Ahn, (1999) observaron este mismo efecto en embutidos cocidos irradiados, describiendo como los compuestos generados por la oxidación lipídica y que contribuían a los malos olores, iban desapareciendo durante el almacenamiento sobre todo cuando se envasaban a vacío. Resultados similares fueron obtenidos por Cabeza, Cambero, de la Hoz y Ordóñez (2007), cuando irradiaron muestras de jamón cocido con dosis de 1 a 4 kGy y las almacenaron durante 18 días. Medina, *et al.*, (2009) también observaron que los olores que aparecen en salmón ahumado irradiado con 2 kGy, desaparecían con el almacenamiento y Cambero, Cabeza, Ordóñez y de la Hoz, (2010) realizaron observaciones similares con muestras de ensaladilla rusa después de 22 días de almacenamiento.

Sin embargo aún no está claro a qué se debe este efecto. Es posible que los compuestos radicales volátiles formados por la irradiación reaccionen unos con otros o con otros componentes de los alimentos haciendo desaparecer los olores extraños. Es posible también que estas reacciones tengan lugar de una forma lenta y progresiva siendo evidentes tan solo después de un periodo de almacenamiento relativamente largo como son los 90 días de este estudio. Si esto es así, es posible que, cuando se almacenan productos irradiados, sean otros parámetros diferentes como el color o la textura, los responsables de la alteración sensorial.

8.2. Bioaccesibilidad del ácido fólico en productos cárnicos

En el apartado anterior se han discutido los resultados obtenidos en relación con la viabilidad tecnológica y sensorial de los productos cárnicos diseñados, tanto en los convencionales como en los RTE. Es en este momento cuando surge la necesidad de conocer si es bioaccesible el ácido fólico incorporado a estos alimentos. Para dar una respuesta, el siguiente paso en nuestro trabajo fue estudiar la bioaccesibilidad en todos y cada uno de ellos.

En el capítulo de Introducción se han descrito las principales características de los ensayos *in vitro* e *in vivo*. En él se hizo constar que, aunque los estudios en humanos son la meta a la que se debe llegar en estudios de bioaccesibilidad, es muy frecuente encontrar dificultades para su desarrollo; son metodológicamente complicados, llevan mucho tiempo, son costosos, en algunas ocasiones poco viables desde un punto de vista tecnológico y muy complejos debido a la gran cantidad de factores intrínsecos y extrínsecos a tener en cuenta en relación con el proceso de digestión. Esta apreciación ha sido ya realizada por diferentes autores y por ello, los estudios *in vitro* se han convertido en un potente aliado en estudios de esta naturaleza ya que pueden dar una visión rápida y objetiva de la absorción de nutrientes. En este sentido recomendamos la lectura de trabajos como el de Van de Wiele, *et al.*, (2007) quienes hicieron una comparativa entre cinco diferentes ensayos de bioaccesibilidad *in vitro* y comprobaron la eficacia y buena relación con ensayos *in vivo* recomendando dos de ellos entre los que se encontraba el sistema TIM utilizado en nuestro trabajo. Por lo tanto, nos decidimos a realizar ensayos *in vitro* y concretamente dos: uno estático y el otro, dinámico.

8.2.1. Bioaccesibilidad por el método estático

Este primer estudio, se realizó utilizando un método experimental *in vitro* estático basado en el descrito por Hazell y Johnson (1987) y mejorado por Wolfgor, Drago, Rodríguez, Pellegrino y Valencia, (2002) y Oomen, Rompelberg, Bruil, Dobbe, Pereboom y Sips, (2003). El método consiste en simular la digestión gastrointestinal mediante la incubación de la muestra homogeneizada con soluciones salinas,

enzimáticas y bilis, controlando los parámetros físico-químicos (pH, temperatura, agitación) del proceso humano; la absorción a nivel intestinal se simula mediante el paso del digerido a través de una membrana de diálisis (ver artículo publicado “Bioaccessibility of folic acid added to ready-to-eat meat products”).

Los resultados obtenidos mostraron una bioaccesibilidad similar en los tres productos cárnicos. En las muestras sin irradiar no se observaron diferencias significativas, si bien los valores obtenidos con los productos cárnicos cocidos (44-50%) fueron ligeramente superiores; el valor obtenido para las hamburguesas fue del 38-41% y del 39-40% para los productos madurados. Estos resultados indican que la bioaccesibilidad se encontraría más o menos en el 50% de la cantidad de ácido fólico añadida, menor de la que se podría esperar.

Es posible que la compleja composición de cualquiera de las matrices cárnicas estudiadas pueda causar la retención del ácido fólico, disminuyendo su bioaccesibilidad y haciendo que no sea completa. De acuerdo con diferentes autores (Verwei, Arkbåge, Havenaar, van den Berg, Witthöft, & Schaafsma, 2003; McNulty & Pentieva, 2004; Parada & Aguilera, 2007; Öhrvik, Öhrvik, Tallkvist, & Witthöft, 2010), el ácido fólico y los folatos pueden unirse covalentemente a macromoléculas, como proteínas, quedando así retenidos en la matriz del alimento y reduciéndose en definitiva su difusión a las superficies de absorción durante la digestión.

No se ha encontrado en la bibliografía ningún trabajo referente a la presencia de ácido fólico en productos cárnicos por lo que es difícil discutir estos resultados con datos previos, pero sí se pueden comparar con los descritos por otros autores en otros alimentos. Así, existen numerosos estudios que avalan el hecho de que la matriz del alimento influya en la bioaccesibilidad de esta vitamina (Brouwer, van Dusseldorp, West, & Steegers-Theunissen, 2001; McNulty & Pentieva, 2004; Gregory, Quinlivan, & Davis, 2005). Van het Hof, Tijburg, Pietrzik, & Weststrate (1999) observaron, en estudios realizados con espinacas y otros productos vegetales, que la ruptura de la matriz aumentaba la bioaccesibilidad de folatos. En 2009, Öhrvik observó que el ácido fólico se encontraba de forma más biodisponible en zumos de naranja (100%) que a partir de panes integrales (75%). Este autor indica que es posible que los componentes del pan atrapen el ácido fólico e inhiban su absorción.

Cuando los estudios de bioaccesibilidad se realizaron con las muestras irradiadas, se observó un aumento de la bioaccesibilidad a medida que lo hacía la dosis de irradiación; así, con 4 kGy, la bioaccesibilidad era significativamente más alta que en el caso de las muestras control sin irradiar alcanzándose valores de hasta un 69%. Es muy probable que este aumento se deba a los cambios que la irradiación haya inducido en la estructura de los productos cárnicos y que favorece la salida, y consecuentemente su mayor extracción, desde la matriz cárnica.

8.2.2. Bioaccesibilidad por el método dinámico

La Netherlands Organization for Applied Scientific Research TNO (TNO Nutrition and Food Research) ha patentado un modelo gastrointestinal multi-compartimental, dinámico y computarizado denominado TIM-1 (Minekus & Havenaar, 1996). Es un simulador del estómago y el intestino delgado donde se pueden controlar las condiciones en las que se realiza el proceso de digestión: a) la temperatura corporal, b) pH gástrico e intestinal, c) el flujo de saliva, jugos gástricos y pancreáticos incluyendo las enzimas digestivas y bilis, d) los movimientos peristálticos y e) el tiempo de tránsito gastrointestinal. Con él se han hecho estudios sobre disponibilidad de macro y micronutrientes definidos, comportamiento de nutrientes en comidas completas, interacción entre nutrientes y compuestos funcionales, efectos del procesado en la calidad nutritiva de los alimentos o la estabilidad y eficacia de pro- y prebióticos en el tracto gastrointestinal. Los trabajos realizados, más de 40, se pueden obtener a partir de la página web de Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Havenaar>). De ellos, una decena se han centrado en estudios de bioaccesibilidad del ácido fólico y los folatos a partir de alimentos, fundamentalmente de productos lácteos. Sus resultados han sido validados por estudios nutricionales realizados en humanos y en animales, lo cual motivó una estancia en TNO, concretamente en el equipo del Dr. Havenaar, para estudiar con este equipo la bioaccesibilidad del ácido fólico a partir de nuestros productos.

Los valores obtenidos con el TIM-1 fueron superiores a los obtenidos con el método estático aunque el comportamiento fue el mismo. Así, en hamburguesas la bioaccesibilidad fue de un $82 \pm 6\%$ y en embutidos madurados, un $81 \pm 8\%$ mientras

que en los productos cocidos, la bioaccesibilidad se situaba en torno a un $61 \pm 13\%$. Estas diferencias, que tampoco fueron significativas, pueden explicarse igualmente por la estructuras de unos productos cárnicos y otros. En hamburguesas, que realmente son carne picada, no existe esa red que pueda retener al ácido fólico en su interior y en los productos madurados, la desnaturalización de las proteínas cárnicas se produce por el bajo pH (Ordóñez, Hierro, Bruna, & de la Hoz, 1999), no por el calor, lo que daría lugar a un gel menos firme que el originado tras el proceso de cocción.

Sin embargo, estos valores son mucho más próximos a los descritos por diferentes autores en otros productos enriquecidos en ácido fólico y analizados con el mismo método TIM-1. Así, Arkbåge, Verwei, Havenaar, & Witthöft (2003), obtuvieron en yogures una bioaccesibilidad del 82% y en leche UHT o pasteurizada enriquecida con ácido fólico, del 61 y 58% respectivamente o Verwei, Olivares, van Vliet, van den Berg y Havenaar (2004) que observaron valores próximos al 90% en zumos de frutas, del 86% en knäckebröd (un tipo de pan escandinavo).

Estudiando la “absorción” del ácido fólico a través de los compartimentos, los mayores valores se observaron en el compartimento del yeyuno y durante las 2 primeras horas de “digestión”; en el íleon, la mayor absorción se observó entre la 2ª y la 3ª hora pero no se llegaron a alcanzar los altos valores detectados en el yeyuno. Este comportamiento es también similar al descrito en productos lácteos (Arkbåge, Verwei, Havenaar, & Witthöft, 2003; Verwei, Olivares, van Vliet, van den Berg, & Havenaar, 2004) y en zumo de naranja natural (Öhrvik & Witthöft, 2008).

El efluente del compartimento que corresponde al íleon representa la fracción que pasaría al intestino grueso. La cantidad de ácido fólico en nuestro caso, osciló entre 4-6% de la cantidad inicial, es decir, de la que sería ingerida. Esta fracción, sumada con la cantidad absorbida nos daría un balance de masas entre 90-93%, nivel considerado como muy aceptable y adecuado de acuerdo con los resultados obtenidos no solamente por los autores previamente citados con el TIM, sino en nuestro control de leche UHT enriquecida con ácido fólico.

Cuando se hizo el mismo estudio con las muestras irradiadas, se observó, al igual que con el método estático, un aumento de la bioaccesibilidad, concretamente, un 20% para hamburguesas, un 30% para los productos cocidos y un 6% para los

madurados. Este hecho se puede explicar, como se ha indicado anteriormente, por los cambios que produce la irradiación en los componentes de los productos cárnicos y en definitiva, en su estructura y, concretamente, en el efecto producido en las proteínas y que tiene como consecuencia su desnaturalización.

El estudio de la bioaccesibilidad del ácido fólico ha sido objeto de muchas investigaciones desde hace décadas. El interés sobre el tema comenzó con los trabajos de Tamura y Stokstad (1973) y Babu y Srikantia (1976) quienes estudiaron la biodisponibilidad del ácido fólico en humanos a partir de un amplio rango de alimentos. El hecho de ser los primeros estudios hizo que el rango de posibilidades (cantidades ensayadas, número de alimentos) fuera tan amplio que su metodología fuera muy criticada y considerada como incompleta. Sin embargo, estos trabajos sí que sirvieron para despertar el interés en esta línea de investigación y a ellos les siguieron una serie de estudios realizados por Colman (1982) en los que ya se estudió la biodisponibilidad del ácido fólico en determinados alimentos y siguiendo quizás las primeras estrategias de intervención en humanos; fundamentalmente este trabajo se realizó con cereales enriquecidos y con una población de madres lactantes en Sudáfrica con el fin de estudiar el efecto preventivo frente al desarrollo de anemia megaloblástica.

La biodisponibilidad del ácido fólico es, como se ha indicado previamente (Capítulo 1) notablemente mayor que la de los folatos naturalmente presentes en los alimentos, debido a una serie de factores tales como la liberación incompleta de los folatos de las estructuras celulares en donde se concentran en las plantas, la inestabilidad a las condiciones que reinan durante la digestión gastrointestinal, la presencia de las proteínas ligantes de folatos, la forma en la que están atrapados por la matriz del alimento y que puede dificultar su liberación durante el proceso digestivo o, por supuesto, el complicado proceso de desconjugación que ha de desarrollarse para poder pasar a través de las células del epitelio intestinal (Sanderson *et al.*, 2003). Este último punto es en nuestro trabajo de gran importancia y es lo que justifica la utilización del ácido fólico como tal.

La biodisponibilidad de los folatos es muy dependiente del paso del alimento digerido a través del intestino. Los poliglutamatos deben sufrir un proceso complejo de desconjugación en el intestino delgado antes de su absorción. Como se ha explicado previamente, este proceso lleva consigo la actividad de enzimas como las hidrolasas

localizadas en la membrana celular del epitelio intestinal y que permiten la formación de los monoglutamatos, lo cuales se transportan al interior de la célula de forma óptima a los valores de pH que reinan en el intestino. En este sentido hay que tener en cuenta que la absorción a nivel celular se produce a un pH de 5 mientras que el pH para la desconjugación es de 6-7 (Halsted, 1990). Esto quiere decir que pequeños cambios de pH debidos a, por ejemplo, los alimentos ingeridos junto con el ácido fólico, pueden inhibir la desconjugación, pero no la absorción, probablemente por su efecto inhibitorio sobre la actividad de esta hidrolasa (conjugasa) (Gregory, 2001).

La utilización del ácido fólico resulta, por lo tanto más ventajosa que la de cualquier folato cuando se busca el enriquecimiento de la dieta con esta vitamina y esto es lo que parecen demostrar nuestros resultados con los que se ha llegado a absorber hasta el 100% del ácido fólico añadido. Es posible pensar que esta cantidad puede ser lo suficientemente elevada, como en los productos elaborados con 2,4 mg de ácido fólico/100 g de producto como para saturar las membranas celulares e impedir la absorción de esta vitamina (Gregory, 2001). No parece ser éste el caso ya que, de serlo, se hubiera observado un cierto descenso en la bioaccesibilidad a las mayores cantidades, y eso no ha ocurrido. En cualquier caso, es importante tener en cuenta que se han ensayado estas cantidades buscando siempre compensar una posible pérdida durante el procesado, bien en el producto cárnico convencional o sobre todo, en el caso de los productos RTE, en los que se pudo observar el descenso del ácido fólico. Ahora, el siguiente paso, sería comprobar si realmente existe esa saturación o no, pero, en cualquier caso lo que sí es cierto es que se puede reducir la cantidad incorporada. Tecnológicamente los productos cárnicos son viables y se sigue absorbiendo la suficiente cantidad de ácido fólico como para seguir recomendándolos como aptos para enriquecer cualquier dieta con esta vitamina.

Otro de los factores mencionados y que pueden afectar a la bioaccesibilidad es la propia irradiación. Es un hecho descrito previamente y demostrado a nivel científico que la irradiación produce cambios en las estructuras de los alimentos. Uno de los cambios más importantes es la pérdida de la estructura terciaria de las proteínas. La irradiación, incluso a bajas dosis, puede producir la coagulación de las proteínas e incluso romper enlaces peptídicos, puentes disulfuro y de hidrógeno (Rahman, 1999). Este hecho lleva consigo un aumento del nitrógeno aminoacídico y la pérdida de la

estructura de la propia proteína. En este sentido, Giroux y Lacroix (1998), Ahn, Jo y Olson, (2000) y Nam, *et al.*, (2007) describieron cómo la irradiación inducía estos cambios asociados a procesos de desaminación y descarboxilación y la ruptura de los enlaces peptídicos. Como consecuencia de este fenómeno, se generan compuestos volátiles (Nam, *et al.*, 2007) responsables de los cambios en el sabor y aroma de los alimentos irradiados y lo que es más importante, la ruptura de las fibras musculares. Este último hecho fue también descrito por Yoon (2003) quien observó que la irradiación (2-5 kGy) producía un descenso de la dureza de la misma carne como consecuencia de esta rotura fibrilar. Estos cambios facilitarían la liberación de la vitamina, dejándola más bioaccesible.

En el caso de las hamburguesas, es la propia carne la que sufre los cambios descritos. Los electrones acelerados accederían directamente a las proteínas cárnicas y, aunque se produjeran pocos cambios, el ácido fólico se liberaría con facilidad ya que en este producto cárnico estaría directamente situado en la fase acuosa, no estando ligado a ninguna estructura compleja. Sin embargo, en el caso de los productos cocidos y madurados, nos encontramos frente a matrices más complejas. Ambos tipos de productos son geles cárnicos, geles proteicos establecidos mediante la desnaturalización de las proteínas provocada por un tratamiento térmico o la reducción del pH, respectivamente; el posterior establecimiento de puentes de unión entre estas proteínas, conlleva la formación de una red tridimensional que deja atrapada el agua en su interior, agua que vehicula compuestos hidrosolubles entre los que se encontraría el ácido fólico y que, por otra parte, es fundamental para la textura de ambos tipos de derivados cárnicos. Estas complejas matrices cárnicas, las redes proteicas que las conforman, pueden ser tan susceptibles a la acción de los electrones acelerados como las propias proteínas, ya que los enlaces que se establecen son de la misma naturaleza que los que conforman las proteínas antes de su desnaturalización. La rotura de los enlaces interproteicos facilita la liberación de parte del agua que el gel mantiene atrapada en su interior. Es muy posible, por lo tanto, que este agua liberada arrastre al ácido fólico, lo que facilitaría su mayor extracción y en consecuencia, habría una mayor cantidad de esta vitamina dispuesta para ser absorbida. Esta hipótesis justificaría el aumento de la biodisponibilidad. Sin embargo, no sería tan alto como en el caso de las hamburguesas ya que la pérdida de estructura no es total; si así lo fuera, los cambios en el aspecto y la textura de los productos irradiados hubieran sido mucho más notables y, en caso

extremo, se hubiera podido llegar a perder la calidad sensorial, lo que desaconsejaría su comercialización. Como se puede observar de los resultados obtenidos, esta situación no ha llegado a producirse lo cual confirma nuestra hipótesis.

Vistos desde una forma global, estos resultados nos indican que los productos diseñados son viables desde el punto de vista tecnológico y sensorial, seguros al ser sometidos a tratamientos que aseguren su calidad higiénica, y nutritivos ya que aportan ácido fólico en cantidades que aporten el 100% de la CDR en una ración del producto. Además, en el caso más desfavorable, sería bioaccesible más del 60%.

Todo ello nos permite decir que productos aquí diseñados, incluso los RTE podrían entrar en la categoría de *fente de ácido fólico* encontrándonos, en consecuencia, con nuevos alimentos adecuados para vehicular en la dieta este nutriente esencial. (Reglamento (CE) N° 1924/2006).

CONCLUSIONES

9. CONCLUSIONES

1. El ácido fólico es un compuesto bioactivo adecuado para ser incorporado a productos cárnicos tanto convencionales como “listos para el consumo” o RTE. Su incorporación es viable tecnológicamente y los productos obtenidos presentan unas características sensoriales adecuadas con una buena aceptabilidad general.
2. El tratamiento de irradiación mediante la aplicación de electrones acelerados es útil para la elaboración de estos nuevos productos RTE. Las pérdidas de ácido fólico con este tratamiento oscilan entre un 20-30%, dependiendo de la matriz cárnica. La dosis máxima recomendada es de 3 kGy, ya que dosis superiores reducen significativamente la calidad sensorial.
3. Tanto los productos convencionales como los RTE mantienen sus características sensoriales tras un periodo de almacenamiento de tres meses. El ácido fólico permanece estable tras este tiempo.
4. La bioaccesibilidad del ácido fólico a partir de los productos cárnicos convencionales es elevada, situándose en un 80% para los productos cárnicos frescos y madurados, y en un 60% para los cocidos. La aplicación de radiaciones ionizantes aumentó la bioaccesibilidad en torno a un 20% en los productos frescos y cocidos, mientras que en los madurados se mantuvo en valores similares.
5. Los productos cárnicos diseñados en este trabajo constituyen una nueva vía para aumentar el consumo de ácido fólico en la dieta incluso cuando se presentan como RTE mediante un tratamiento de radiaciones ionizantes. A pesar de las pérdidas inducidas por el tratamiento de irradiación la cantidad final de ácido fólico es suficiente para que una ración media de 50 o 100 g, dependiendo del tipo de producto, aporten el 100 de la RDA. De acuerdo con el Reglamento (CE) N° 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo (20/diciembre/2006) los productos desarrollados se pueden considerar como *fuentes de ácido fólico*.

CONCLUSIONS

1. Folic acid is a bioactive compound adequate to be incorporated to conventional and RTE meat products. The incorporation of folic acid is technologically viable and the final products have good sensory characteristics with a good overall acceptability.
2. The irradiation treatment is useful to manufacture these new RTE functional meat products. The losses of folic acid due to the irradiation treatment were approximately 20-30%, depending on the food matrix.
3. After 3 month of storage, the sensory characteristics were maintained in both conventional and RTE meat products. Folic acid was stable during the time storage.
4. The folic acid bioaccessibility from conventional meat product was high, being approximately 80% from fresh products and dry fermented sausages, and 60% from cooked sausages. The irradiation treatment increased the bioaccessibility a 20% from fresh meat products and cooked sausages, whereas in dry fermented sausages the bioaccessibility was similar.
5. The functional meat product designed in that work are a new way to increase the folic acid consume in the diet even when they are prepared as ready to eat meat product using ionizing radiation. In spite of the losses produced by E-beam treatment the final folic acid amount is enough to cover the 100% of RDA with a portion of 50 or 100 g, depending on the meat product. According to the Regulation (EC) No 1924/2006 of the European Parliament and of the Council (20/December/2006) the developed products can be considered as *source of folic acid*.

BIBLIOGRAFÍA

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abu-Tarboush, H. M., Al-Kahtani, H. A., Atia, M., Abou-Arab, A. A., Bajaber, A. S., & El-Mojaddidi, M. A. (1997). Sensory and microbial quality of chicken as affected by irradiation and postirradiation storage at 4°C. *Journal of Food Protection*, 60 (7), 761-770.
- ADA Reports. (2004). Position of the American Dietetic Association: Functional Foods. *Journal of The American Dietetic Association*, 104, 814-826.
- AESA (Agencia Española de Seguridad Alimentaria). (2004). Aplicación de radiaciones ionizantes a alimentos. Opinión del Comité científico de la AESA sobre una cuestión presentada por la Presidencia de la AESA, en relación con la aplicación de radiaciones ionizantes a los alimentos. *Revista del Comité Científico*, 2, 11-43.
- Ahn, D. U. (2002). Production of volatiles from amino acid homopolymers by irradiation. *Food Science*, 67 (7), 2565-2570.
- Ahn, D. U., Jo, C., & Olson, D. G. (2000). Analysis of volatile components and sensory characteristics of irradiated raw pork. *Meat Science*, 54 (3), 209-215.
- Akhtar, M. J., Khan, M. A., & Ahmad, I. (1997). Photodegradation of folic acid in aqueous solution. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 25, 269-275.
- Al Bsoul, A., Magnin, J. P., Commenges-Bernole, N., Gondrexon, N., Willison, J., & Petrier, C. (2010). Effectiveness of ultrasound for the destruction of *Mycobacterium sp.* strain (6PY1). *Ultrasonics Sonochemistry*, 17 (1), 106-110.
- Al-Bachir, M., & Mehio, A. (2001). Irradiated luncheon meat: microbiological, chemical and sensory characteristics during storage. *Food Chemistry*, 75, 169-175.
- Albert, C., Cook, N., Gaziano, J., Zaharris, E., MacFadyen, J., Danielson, E., Buring, J.E., & Manson, J.E. (2008). Effect of folic acid and B vitamins on risk of cardiovascular events and total mortality among women at high risk for cardiovascular disease. A randomized trial. *The American Journal of Medical Association*, 299 (17), 2027-2036.
- Aliste, A. J., Vieira, F. F., & Del Maestro, N. L. (2000). Radiation effects on agar, alginates and carrageenan to be used as food additives. *Radiation Physics and Chemistry*, 57, 305-308.
- Álvarez, D., Delles, R. M., Xiong, Y. L., Castillo, M., Payne, F. A., & Laencina, J. (2011). Influence of canola-olive oils, rice bran and walnut on functionality and emulsion stability of frankfurters. *LWT-Food Science and Technology*, 44 (6), 1435-1442.
- Álvarez, V. B., & Ji, T. (2003). Emerging technologies and processing and preservation technologies for milk and dairy products. En J. Gutiérrez-López, & G. Barbosa-Cánovas, *Food Science and Food Biotechnology* (págs. 313-327). Boca Raton, EEUU: CRC Press. ISBN: 9781566768924.

- Alvidrez-Morales, A., González-Martínez, B. E., & Jiménez-Salas, Z. (2002). Tendencias en la producción de alimentos: alimentos funcionales. *Revista de Salud Pública y Nutrición*, 3 (3). Disponible en: http://www.respyn.uanl.mx/iii/3/ensayos/alimentos_funcionales.html
- Andújar, A. M., Moreiras-Varela, O., & Gil, E. F. (1994). *Tablas de composición de alimentos*. Instituto de Nutrición y Bromatología (C.S.I.C.).
- Andrés, A. I., Adamsen, C. E., Møller, K. J., Ruiz, J., & Skibsted, L. H. (2006). High-pressure treatment of dry-cured Iberian ham. Effect on colour and oxidative stability during chill storage packed in modified atmosphere. *European Food Research Technology*, 222, 486-491.
- Andrews, L. S., Marshall, D. L., & Grodner, R. M. (1995). Radiosensitivity of *Listeria monocytogenes* at various temperatures and cell concentrations. *Journal of Food Protection*, 58 (7), 748-751.
- Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2004). Effect of storage and packaging on fatty acid composition and oxidation in dry fermented sausages made with added olive oil and antioxidants. *Meat Science*, 67, 237-244.
- Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2007). Functional Meat Products. En F. Toldrá, *Handbook of fermented meat and poultry* (págs. 257-266). Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing. ISBN: 9780813814773.
- Appel, L., Miller, E. R., Jee, S. H., Stolzenberg-Solomon, R., Lin, P.-H., Erlinger, T., Nadeau, M. R., & Selhub, J. (2000). Effect of dietary patterns on serum homocysteine. Results of a randomized, controlled feeding study. *Circulation*, 102, 852-857.
- Araújo, M. M., Marchioni, E., Bergaentzle, M., Zhao, M., Kuntz, F., Hahn, E., & Villavicencio, A.L.C.H. (2011). Irradiation stability of folic acid in powder and aqueous solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 1244-1248.
- Arai, S. (2002). Global view on functional foods: Asian perspectives. *British Journal of Nutrition*, 88 (2), 139-143.
- Arboleya, J., Lasa, D., Olabarrieta, I., & Martínez de Marañón, I. (2010). New trends for food product design. En J. Smith, & E. Charter, *Functional Food product development* (págs. 229-239). Reino Unido: Wiley-Blackwell. ISBN: 9781405178761.
- Arcot, J., Shrestha, A. K., & Gusanov, U. (2002). Enzyme protein binding assay for determining folic acid in fortified cereal foods and stability of folic acid under different extraction conditions. *Food Control*, 13, 245-252.
- Arihara, K. (2006). Strategies for designing novel functional meat products. *Meat Science*, 74, 219-229.
- Arkbåge, K., Verwei, M., Havenaar, R., & Witthöft, C. (2003). Bioaccessibility of folic acid and (6S)-5-Methyltetrahydrofolate decreases after the addition of folate-binding protein to yogurt as studied in a dynamic *in vitro* gastrointestinal model. *Journal of Nutrition*, 133, 3678-3683.
- Arola, L. (2010). Functional food design: the role of *in vitro* biomarkers. *Functional Foods: Some Pointers for Success*, 102-106.

- Ashwell, M. (2002). Conceptos sobre los alimentos funcionales. *ILSI Europe Concise Monograph Series*. Disponible en:
<http://www.argenbio.org/adu/uploads/pdf/alimentosfuncionalesiLSI.pdf> (Pp.5-6)
- Assaraf, Y. G. (2006). The role of multidrug resistance efflux transporters in antifolate resistance and folate homeostasis. *Drug Resistance Updates*, 9 (4-5), 227-246.
- Aymerich, T., Picouet, P. A., & Monfort, J. M. (2008). Decontamination technologies for meat products. *Meat Science*, 78, 114-129.
- Ayo, J., Carballo, J., Serrano, J., Olmedilla-Alonso, B., Ruiz-Capillas, C., & Jiméñez-Colmenero, F. (2007). Effect of total replacement of pork backfat with walnut on the nutritional profile of frankfurters. *Meat Science*, 77 (2), 173-181.
- Babu, S., & Srikantia, S. G. (1976). Availability of folates from some foods. *American Journal of Clinical Nutrition*, 29, 376-379.
- Bailey, L. B., & Gregory, J. F. (1999). Folate metabolism and requirements. *Journal of Nutrition*, 129, 779-782.
- Barba, C., Santa-María, G., Flores, G., Herraiz, M., & Calvo, M. M. (2010). Enantiomeric analysis of chiral compounds in irradiated foods using multidimensional gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 752-756.
- Barbosa-Cánovas, G. V. (2008). Global view of challenges of nonthermal technologies. Innovative application of nonthermal technologies in foods: technology, safety, health and consumer acceptability. *NDP-IFT/EFFoST Joint Workshop. Innovative Applications of Nonthermal Technologies in Foods: Technology, Safety, Health and Consumer Acceptability*. Madrid, España.
- Beardsworth, A., Bryman, A., Keil, T., Goode, J., Haslam, C., & Lancashire, E. (2002). Women, men and food: the significance of gender for nutritional attitudes and choices. *British Food Journal*, 107, 470-491.
- Bech-Larsen, T., & Grunert, K. G. (2003). The perceived healthiness of functional foods-A conjoint study of Danish, Finnish and American consumers' perception of functional foods. *Appetite*, 40, 9-14.
- Bech-Larsen, T., & Scholderer, J. (2007). Functional foods in Europe: consumer research, market experiences and regulatory aspects. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 231-234.
- Beguiristain, B., Fuentes, C., Pintó, R., & Bosch, A. (2011). Nuevas técnicas de eliminación de virus en alimentos. En J. A. Ordóñez, J. J. Córdoba, & J. Ventanas, *Productos cárnicos para el siglo XXI. Seguros, nutritivos y saludables*. (págs. 197-200). Cáceres, España: Universidad de Extremadura. ISBN: 8495872579.
- Bellamy, M. F., McDowell, I. F., Ramsey, M. W., Brownlee, M., Newcombe, R. G., & Lewis, M. J. (1999). Oral folate enhances endothelial function in hyperhomocysteinaemic subjects. *European Journal of Clinical Investigation*, 29, 659-662.
- Benkouider, C. (2004). Functional foods: A global overview. *International Food Ingredients*, 5, 66-68.

- Benkouider, C. (2004). *Functional Ingredients Magazine-Nutrition Science, Innovation. NewHope360*. Obtenido de The world's emerging markets. Functional Foods and Nutraceuticals. Disponible en:
<http://newhope360.com/market-making>
- Berasategi, I., Legarra, S., García-Íñiguez de Ciriano, M., Rehecho, S., Calvo, M. I., Cavero, R. Y., Navarro-Blasco, I., Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2011). High in omega-3 fatty acids" bologna-type sausages stabilized with an aqueous-ethanol extract of *Melissa officinalis*. *Meat Science*, 88 (4), 705-711.
- Berry, R. J., Bailey, L., Mulinare, J., Bower, C., & Dary, O. (2010). Fortification of flour with folic acid. *Food and Nutrition Bulletin*, 31 (1), S22-S35.
- Betti, M., Schneider, B. L., Wismer, W. V., Carney, V. L., Zuidhof, M. J., & Renema, R. A. (2009). Omega-3-enriched broiler meat: 2. Functional properties, oxidative stability, and consumer acceptance. *Poultry Science*, 88, 1085-1095.
- Bhandari, S. D., & Gregory, J. F. (1990). Inhibition by selected food components of human and porcine intestinal pteroylpolyglutamate hydrolase activity. *American Journal of Clinical Nutrition*, 51, 87-94.
- Biesalski, H. K. (2005). Meat as a component of a healthy diet—are there any risks or benefits if meat is avoided in the diet?. *Meat Science*, 70 (3), 509-524.
- Bintsis, T., Litopoulou-Tzanetaki, E., & Robinson, R. K. (2000). Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry—a critical review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 637-645.
- Bodnar, L. M., Tang, G., Ness, R. B., Harger, G., & Roberts, J. M. (2006). Periconceptional multivitamin use reduces the risk of preeclampsia. *American Journal of Epidemiology*, 64 (5), 470-477.
- Brasch, A., & Huber. (1947). Ultrashort application time of penetrating electrons: a tool for sterilization and preservation of food in the raw state. *Science*, 105, 112-117.
- Brewer, M. S. (2004). Irradiation effects on meat color: A review. *Meat Science*, 68, 1-17.
- Brewer, M. S. (2009). Irradiation effects on meat flavour: A review. *Meat Science*, 81 (1), 1-14.
- Brouwer, I. A., van Dusseldorp, M., West, C. E., Meyboom, S., Thomas, C. M., Duran, M., van het Hof, K. H., Eskes, T. K. A. B., Hautvast, J. G. A. J., & Steegers-Theunissen, R. P. M. (1999). Dietary folate from vegetables and citrus fruit decrease plasma homocysteine concentration in humans in a dietary controlled trial. *Journal of Nutrition*, 129, 1135-1139.
- Brouwer, I. A., van Dusseldorp, M., West, C., & Steegers-Theunissen, R. P. (2001). Bioavailability and bioefficacy of folate and folic acid in man. *Nutrition Research Reviews*, 14, 267-293.
- Bruhn, C. M. (1995). Strategies for communicating the facts on food irradiation to consumers. *Journal of Food Protection*, 58 (1), 213-216.
- Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR). (27 de September de 2005). *Folic acid intake in Germany is inadequate*. Germany.

- Buttriss, J. L., & Benelam, B. (2010). Nutrition and health claims: the role of food composition data. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64, S8-S13.
- Byun, M., Lee, J. W., Jo, C., & Yook, H. S. (2001). Quality properties of sausage made with gamma-irradiated natural pork and lamb casing. *Meat Science*, 59 (3), 223-228.
- Cabeza, M. C., Cambero, I., de la Hoz, L., & Ordóñez, J. A. (2007). Optimization of E-beam irradiation treatment to eliminate *Listeria monocytogenes* from ready-to-eat (RTE) cooked ham. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, 299-305.
- Cabeza, M. C., de la Hoz, L., Velasco, R., Cambero, I., & Ordóñez, J. A. (2009). Safety and quality of Ready-to-Eat dry fermented sausages subjected to E-beam radiation. *Meat Science*, 83 (2), 320-327.
- Cabeza, M. C., Ordóñez, J. A., Cambero, I., de la Hoz, L., & García, M. L. (2004). Effect of thermoultrasonication on *Salmonella enterica* serovar enteritidis in distilled water and intact shell eggs. *Journal of Food Protection*, 67 (9), 1886-1891.
- Cáceres, E., García, M. L., & Selgas, M. D. (2006). Design of a new cooked meat sausage enriched with calcium. *Meat Science*, 73 (2), 368-377.
- Cáceres, E., García, M. L., & Selgas, M. D. (2008). Conventional and fat-reduced cooked sausages enriched with folic acid. *Fleischwirtschaft International*, 5, 58-60.
- Cáceres, E., García, M. L., & Selgas, M. D. (2008). Effect of pre-emulsified fish oil-as source of PUFA n-3-on microstructure and sensory properties of mortadella, a Spanish bologna-type sausage. *Meat Science*, 80 (2), 183-193.
- Cáceres, E., García, M. L., Toro, J., & Selgas, M. D. (2004). The effect of fructooligosaccharides on the sensory characteristics of cooked sausages. *Meat Science*, 68 (1), 87-96.
- Calvo, M. M., García, M. L., & Selgas, M. D. (2008). Dry fermented sausages enriched with lycopene from tomato peel. *Meat Science*, 80 (2), 167-172.
- Cambero, I., Cabeza, M. C., Ordóñez, J. A., & de la Hoz, L. (2010). Effect of E-Beam treatment on the safety and shelf life of mayonnaise potato salad. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8 (2), 221-229.
- Carbajal, A. (2004). Consumo de carne y tendencias. Calidad de vida y epidemiología de enfermedades asociadas. En F. Jiménez Colmenero, F. Sánchez-Muniz, & B. Olmedilla Alonso, *La carne y los productos cárnicos como alimentos funcionales* (págs. 15-38). Madrid, España: editec@red.
- Carnicer, R., Navarro, M. A., Arbones-Mainar, J. M., Acin, S., Guzman, M. A., Surra, J. C., Arnal, C., de Las Heras, M., Blanco-Vaca, F., & Osada, J. (2007). Folic acid supplementation delays atherosclerotic lesion development in apoE-deficient mice. *Life Science*, 80, 638-643.
- Carpenter, R., O'Grady, M. N., O'Callaghan, Y. C., O'Brien, N. M., & Kerry, J. P. (2007). Evaluation of the antioxidant potential of grape seed and bearberry extracts in raw and cooked pork. *Meat Science*, 76 (4), 604-610.

- Carter, B., Monsivais, P., & Drewnowski, A. (2010). Absorption of folic acid and ascorbic acid from nutrient comparable beverages. *Journal of Food Science*, 75 (9), 289-293.
- Castenmiller, J. J., van de Poll, C. J., West, C. E., Brouwer, I. A., Thomas, C. M., & van Dusseldorp, M. (2000). Bioavailability of folate from processed spinach in humans. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 44, 163-169.
- Caudill, M. (2010). Folate bioavailability: implications for establishing dietary recommendations and optimizing status. *American Journal of Clinical Nutrition*, 91, 1455S-1460S.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2010). Food Irradiation. Disponible en:
<http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/foodirradiation.htm>
- Chambers, J. C., Ueland, P. M., Obeid, O. A., Wrigley, J., Refsum, H., & Kooner, J. S. (2000). Improved vascular endothelial function after oral B vitamins: an effect mediated through reduced concentrations of free plasma homocysteine. *Circulation*, 102, 2479-2483.
- Char, C. D., Mitilinaki, E., Guerrero, S. N., & Alzamora, S. M. (2010). Use of high-intensity ultrasound and UV-C light to inactivate some microorganisms in fruit juices. *Food and Bioprocess Technology*, 3, 797-803.
- Chen, L., & Eitenmiller, R. R. (2007). Optimization of the trienzyme extraction for the microbiological assay of folate in vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (10), 3884-3888.
- Cheung, R. H., Morrison, P. H., Small, D. M., & Marriot, P. J. (2008). Investigation of folic acid stability in fortified instant noodles by use of capillary electrophoresis and reversephase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography Analysis*, 1213, 93-99.
- Chiao, J. H., Roy, K., Tolner, B., Yang, C. H., & Sirotnak, F. M. (1997). RFC-1 gene expression regulates folate absorption in mouse small intestine. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 11165-11170.
- Cho, S., Choi, Y., Lee, J., & Eitenmiller, R. R. (2010). Optimization of enzyme extractions for total folate in cereals using response surface methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (19), 10781-10786.
- Choi, Y. S., Choi, J. H., Han, D. J., Kim, H. Y., Lee, M. A., Lee, E. S., Jeong, J. Y., Paik, H. D., & Kim, C. J. (2008). Effects of rice bran fiber on quality of low-fat tteokgalbi. *Food Science and Biotechnology*, 17 (5), 959-964.
- Chouliara, I., Samelis, J., Kakouri, A., Badeka, A., Savvaidis, I. N., Riganakos, K., & Kontominas, M. G. (2006). Effect of irradiation of frozen meat / fat trimmings on microbiological and physico-chemical quality attributes of dry fermented sausages. *Meat Science*, 74, (2), 303-311.
- CIE (1971) *Colorimetry: Official recommendations of the International Commission on Illumination*. Publication CIE N°15 (E-1.3.1). Bureau Central de la CIE, Paris, Francia.

- Clardy, S., Foley, D. M., Caporaso, F., Calicchia, M. L., & Prakash, A. (2002). Effect of gamma irradiation on *Listeria monocytogenes* in frozen, artificially contaminated sandwiches. *Journal of Food Protection*, 65 (11), 1740-1744.
- Clavero, M. R., Monk, J. D., Beuchat, L. R., Doyle, M. P., & Brackett, R. E. (1994). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Campylobacter jejuni* in raw ground beef by gamma irradiation. *Applied Environmental Microbiology*, 60 (6), 2069-2075.
- Cleland, M. R. (2006). Advances in gamma ray, electron beam, and X-ray technologies for food irradiation. En C. H. Sommers, & X. Fan, *Food Irradiation Research and Technologies* (págs. 11-35). Oxford, Reino Unido: Blackwell Publishing. ISBN: 9780813808826.
- Clifford, A., Heid, M., Peerson, J., & Bills, N. (1991). Bioavailability of food folates and evaluation of food matrix effects with a rat bioassay. *Journal of Nutrition*, 121, 445-453.
- Cofrades, S., López-Lopez, I., Bravo, L., Ruiz-Capillas, C., Bastida, S., Larrea, M. T., & Jiménez-Colmenero, F. (2010). Nutritional and antioxidant properties of different brown and red spanish edible seaweeds. *Food Science and Technology International*, 16 (5), 361-370.
- Cofrades, S., López-López, I., Ruiz-Capillas, C., Triki, M., & Jiménez-Colmenero, F. (2011). Quality characteristics of low-salt restructured poultry with microbial transglutaminase and seaweed. *Meat Science*, 87 (4), 373-380.
- Colman, N. (1982). Addition of folic acid to staple foods as a selective nutrition intervention strategy. *Nutrition Reviews*, 40, 225-233.
- Coppens, P., da Silva, M. F., & Pettman, S. (2006). European regulations on nutraceuticals, dietary supplements and functional foods: A framework based on safety. *Toxicology*, 221, 59-74.
- Coutrelis, N. (2008). Non thermal technologies. Regulation and legal aspects. Innovative application of nonthermal technologies in foods: technology, safety, health and consumer acceptability. *NDP-IFT/EFFoST Joint Workshop. Innovative Applications of Nonthermal Technologies in Foods: Technology, Safety, Health and Consumer Acceptability*. Madrid, España.
- D'Amico, D. J., Silk, T. M., Wu, J., & Guo, M. (2006). Inactivation of microorganisms in milk and apple cider treated with ultrasound. *Journal of Food Protection*, 69 (3), 556-563.
- de Groot, C. P., West, C. E., & van Staveren, W. A. (2001). Meeting nutrient and energy requirements in old age. *Maturitas*, 38, 75-81.
- de Jong, R. J., Verwei, M., West, C. E., van Vliet, T., Siebelink, E., van den Berg, H., & Castenmiller, J. J. M. (2005). Bioavailability of folic acid from fortified pasteurised and UHT-treated milk in humans. *European Journal of Clinical Nutrition*, 59, 906-913.
- de la Hoz, L., D'Arrigo, M., Cambero, I., & Ordóñez, J. A. (2004). Development of an n-3 fatty acid and α -tocopherol enriched dry fermented sausage. *Meat Science*, 67, (3), 485-495.

- de Vuyst, L., Falony, G., & Leroy, F. (2008). Probiotics in fermented sausages. *Meat Science*, 80 (1), 75-78.
- Decreto 2725/1966 de 6 de octubre, por el que se regula el trámite de aprobación de la conservación por irradiación de alimentos destinados al consumo humano.* BOE (Boletín Oficial del Estado) Nº 260, págs. 13715-13716.
- Decreto, 2728/1966 de 13 de octubre por el que se crea la Comisión Asesora de Cousevación de Alimentos por Irradiación.* BOE (Boletín Oficial del Estado) Nº 260, págs. 13719-13720.
- Diario Oficial de las Comunidades Europeas. (2001). *Comunicación de la Comisión relativa a los alimentos e ingredientes alimentarios autorizados para el tratamiento con radiación ionizante en la Comunidad.* C 241/6 - C 241/11.
- Dickson, J. S. (2001). Radiation inactivation of microorganism. En R. A. Molins, *Food Irradiation: Principles and Applications* (págs. 23-36). New York, EEUU: Wiley/Interscience. ISBN: 9780471356349.
- Diehl, J. F. (1990). Chemical effects of ionizing radiation. En O. Fennema, G. Sanderson, P. Walstra, M. Karel, S. Tannenbaum, & J. Whitaker, *Safety of irradiated Foods* (págs. 66-67). New York and Basel: Marcel Dekker. ISBN: 9780824781378.
- Diehl, J. F. (2001). Achievements in food irradiation during the 20th century. En P. Loaharanu, & P. Thomas, *Irradiation for Food Safety and Quality* (págs. 1-16). Lancaster, UK: Technomic Publishing Company, Inc.
- Diplock, A. T., Ashwell, P. J., Bornet, M. F., Fern, E. B., & Roberfroid, M. B. (1999). Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. *British Journal of Nutrition*, 81, S1.
- Directiva 1999/2/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de febrero de 1999, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros sobre alimentos e ingredientes alimentarios tratados con radiaciones ionizantes.*
- Directiva 1999/3/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de febrero de 1999 relativa al establecimiento de una lista comunitaria de alimentos e ingredientes alimentarios tratados con radiaciones ionizantes.*
- Doherty, R. F., & Beecher, G. R. (2003). A method for the analysis of natural and synthetic folate in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 354-361.
- Doyle, M. E. (1999). *Literature survey of the various techniques used in Listeria intervention. Ultraviolet light.* FRI Briefings. Madison: University of Wisconsin.
- Doyon, M., & Labrecque, J. (2008). Functional foods: a conceptual definition. *British Food Journal*, 110 (11), 1133-1149.
- Ehlermann, D. E. A. (2009). The RADURA-terminology and food irradiation. *Food Control*, 20, 526-528.
- Eim, V. S., Simal, S., Rosselló, C., & Femenia, A. (2008). Effects of addition of carrot dietary fibre on the ripening process of a dry fermented sausage (sobrassada). *Meat Science*, 80 (2), 173-182.

- El-Dessouky, M. M., Abd-Elwahab, B. M., & Turk, S. A. (1988). Effect of gamma radiation on folic acid and its cobalt complex solution. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 125 (2), 255-263.
- Enomoto, A., Nakamura, K., & Hakoda, M. (1997). Inactivation of food microorganism by high pressure carbon dioxide treatment with or without explosive decompression. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry*, 61, 1133.
- Eurobarometer. (2006). *Special eurobarometer 244b/Wave 64.3: Europeans and biotechnology in 2005: Patterns and trends*. Survey requested by Directorate General for Research and coordinated by Directorate General Press and Communication (European Commission), Brussels: TNS Opinion & Social.
- European Commission Community Research. (2000). *Project Report: Functional food science in Europe, Volume 1; Functional food science in Europe, Volume 2; Scientific concepts of functional foods in Europe, Volume 3. EUR-18591*. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, L-2985.
- Fan, X., & Sokorai, K. J. B. (2008). Effect of ionizing radiation on furan formation in fresh-cut fruits and vegetables. *Journal of Food Science*, 73 (2), C79-C83.
- Farkas, J. (2006). Irradiation for better foods. *Trends in Food Science and Technology*, 17 (4), 148-152.
- Farkas, J., Andrassy, E., & Polyak-Feher, K. (2005). Improvement of the microbiological safety of two chilled semi-prepared meals by gamma irradiation. *Food Technology & Biotechnology*, 43 (3), 263-269.
- FDA, Food and Drug Administration. (1996). Food standars: Amendment of standars of identity for enriched grain products to require addition of folic acid. *Federal Register*, 61, 8781-8797.
- Fennema, O. (2000). *Química de los Alimentos*. Zaragoza, España: Acribia S.A. ISBN: 8420009148.
- Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., & Pérez-Gálvez, A. (2009). *In vitro* bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research*, 29, 751-760.
- Fernández-Ginés, J. M., Fernández-López, J., Sayas-Barberá, E., & Pérez-Alvarez, J. A. (2005). Meat products as functional foods: a review. *Journal of Food Science*, 70, R37-R43.
- Fernández-López, J., Fernández-Ginés, J. M., Aleson-Carbonell, L., Sendra, E., Sayas-Barberá, E., & Pérez-Alvarez, J. A. (2004). Application of functional citrus by-products to meat products. *Trends in Food Science & Technology*, 15 (3-4), 176-185.
- Fernández-López, J., Sendra, E., Sayas-Barberá, E., Navarro, C., & Pérez-Alvarez, J. A. (2008). Physico-chemical and microbiological profiles of “salchichón” (Spanish dry-fermented sausage) enriched with orange fiber. *Meat Science*, 80 (2), 410-417.
- Finglas, P. M., Witthöft, C. M., Vahteristo, L., Wright, A. J., Southon, S., Mellon, F. A., Ridge, B. & Maunder, P. (2002). Use of an oral/intravenous dual-label stable-

- isotope protocol to determine folic acid bioavailability from fortified cereal grain foods in women. *Journal of Nutrition*, 132, 936-939.
- Fowler, B. (1998). Genetic defects of folate and cobalamin metabolism. *European Journal of Pediatrics*, 157 (2), S60-S66.
- Freisleben, A., Schieberle, P., & Rychlik, M. (2002). Syntheses of labeled vitamers of folic acid to be used as internal standards in stable isotope dilution assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4760-4768.
- Gabarra, A. G. (2006). Ingesta de Nutrientes: conceptos y recomendaciones internacionales. *Nutrición Hospitalaria*, 21 (4), 437-447.
- GAO, United State Government Accountability Office (2010). *Congressional Committees*. Washington, DC. Subject: *Food Irradiation: FDA Could Improve Its Documentation and Communication of Key Decisions on Food Irradiation Petitions*. Disponible en: <http://www.gao.gov/assets/100/96545.pdf>
- García, M. L., Burgos, J., Sanz, B., & Ordóñez, J. A. (1989). Effect of heat and ultrasonic waves on the survival of two strains of *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology*, 67 (6), 619-628.
- García, M. L., Cáceres, E., & Selgas, M. D. (2006). Effect of inulin on the textural and sensory properties of mortadella, a Spanish cooked meat product. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 1207-1215.
- García, M. L., Calvo, M. M., & Selgas, M. D. (2009). Beef hamburgers enriched in lycopene using dry tomato peel as an ingredient. *Meat Science*, 83 (1), 45-49.
- García-Íñiguez de Ciriano, M., Larequi, E., Rehecho, S., Calvo, M. I., Clavero, R. Y., Navarro-Blasco, I., Astiasarán, I., & Ansorena, D. (2010). Selenium, iodine, ω -3 PUFA and natural antioxidant from *Melissa officinalis* L.: A combination of components from healthier dry fermented sausages formulation. *Meat Science*, 85 (2), 274-279.
- Gelabert, J., Gou, P., Guerrero, L., & Arnau, J. (2003). Effect of sodium chloride replacement on some characteristics of fermented sausages. *Meat Science*, 65 (2), 833-839.
- Gimeno, O., Astiasarán, I., & Bello, J. (1999). Influence of partial replacement of NaCl with KCl and CaCl₂ on texture and color of dry fermented sausages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (3), 873-877.
- Giroux, M., & Lacroix, M. (1998). Nutritional adequacy of irradiated meat: a review. *Food Research International*, 31 (4), 257-264.
- Giroux, M., Ouattara, B., Yefsah, R., Smoragiewicz, W., Saucier, L., & Lacroix, M. (2001). Combined effect of ascorbic acid and gamma irradiation on microbial and sensorial characteristics of beef patties during refrigerated storage. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 49 (2), 919-925.
- Gou, P., Guerrero, L., Gelabert, J., & Arnau, J. (1996). Potassium chloride, potassium lactate and glycine as sodium chloride substitutes in fermented sausages and in dry-cured pork loin. *Meat Science*, 42 (1), 37-48.
- Granado-Lorencio, F., López-López, I., Herrero-Barbudo, C., Blanco-Navarro, I., Cofrades, S., Pérez-Sacristán, B., Delgado-Pando, G., & Jiménez-Colmenero, F.

- (2010). Lutein-enriched frankfurter-type products: Physicochemical characteristics and lutein *in vitro* bioaccessibility. *Food Chemistry*, 120 (3), 741-748.
- Grant, I. R., & Patterson, M. F. (1992). Sensitivity of foodborne pathogens to irradiation in the components of a chilled ready meal. *Food Microbiology*, 9, 95-103.
- Grant, I., & Patterson, M. F. (1995). Combined effect of gamma radiation and heating on the destruction of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimorium* in cook-chill roast beef and gravy. *International Journal of Food Microbiology*, 27 (2-3), 117-128.
- Gregory, J. F. (1995). The Bioavailability of Folate. En L. Bailey, *Folate in Health and Disease*. (págs. 195-235). New York: Marcel Deeker.
- Gregory, J. F. (2001). Case study: Folate bioavailability. *The Journal of Nutrition*, 131, 1376S-1382S.
- Gregory, J. F. (2004). Dietary folate in a changing environment: Bioavailability, fortification and requirements. *Journal of Food Science*, 69 (1), 59-60.
- Gregory, J. F., Bhandari, S. D., Bailey, L. B., Toth, J. P., Baumgartner, T. G., & Cerda, J. J. (1992). Relative bioavailability of deuterium-labeled monoglutamyl tetrahydrofolates and folic acid in human subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 55, 1147-1153.
- Gregory, J. F., Quilivan, E. P., & Davis, S. R. (2005). Integrating the issues of folate bioavailability, intake and metabolism in the era of fortification. *Trends in Food Science & Technology*, 16 (6-7), 229-240.
- Grolichová, M., Dvorák, P., & Musilová, H. (2004). Employing ionizing radiation to enhance food safety. A review. *Acta Veterinaria Brno*, 73, 143-149.
- Gujaska, E., Michalak, J., & Klepacka, J. (2009). Folate stability on two types of rye breads during processing and frozen storage. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64 (2), 129-134.
- Gómez-López, V. M., Ragaert, P., Debevere, J., & Devlieghere, F. (2007). Pulsed light for food decontamination: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 18 (9), 464-473.
- Gursel, B., & Gurakan, G. C. (1997). Effects of gamma irradiation on the survival of *Listeria monocytogenes* and on its growth at refrigeration temperature in poultry and red meat. *Poultry Science*, 76 (12), 1661-1664.
- Halsted, C. H. (1995). Alcohol and folate interactions: Clinical implications. En L. B. Bailey, *Folate in Health and Disease* (págs. 313-327). New York, EEUU: Marcel Dekker. ISBN: 9780824792800.
- Halsted, C. (1990). Intestinal Absorption of Dietary Folates. En M. Picciano, M.F., Stokstad, E.L.R., & Gregory, J.F. *Folic acid metabolism in health and disease* (págs. 23-46). New York, EEUU: Wiley-Liss. ISBN: 0471567442.
- Hannon-Fletcher, M. P., Armstrong, N. C., Scott, J. M., Pentieva, C., Bradbury, I., Ward, M., Strain, J. J., Dunn, A. A., Molloy, A. M., Kerr, M. A. & McNulty, H. (2004). Determining bioavailability of food folates in a controlled intervention study. *The American Journal of Nutrition*, 80, 911-918.

- Hasim, B., Resurrección, A. V. A., & McWatter, K. H. (1995). Descriptive sensory analysis of irradiated frozen or refrigerated chicken. *Journal Food Science*, *60*, 664-666.
- Hazell, B. Y., & Johnson, I. T. (1987). *In vitro* estimation of iron availability from a range of plant foods: influence of phytate, ascorbate and citrate. *British Journal of Nutrition*, *57*, 223-233.
- Heath, J. L., Owens, S. L., Tesch, S., & Hannah, K. W. (1990). Effect of high-energy electron irradiation of chicken meat on thiobarbituric acid values, shear values, odor, and cooked yield. *Poultry Science Journal*, *69* (2), 313-319.
- Hoegger, D., Morier, P., Vollet, C., Heini, D., Reymond, F., & Rossier, J. S. (2007). Disposable microfluidic ELISA for the rapid determination of folic acid content in food products. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, *387*, 267-275.
- Hoffpauer, D. W., & Bonnette, R. E. (1998). Enrichment update on folic acid. *Cereals Foods World*, 365-367.
- Holm, L. (2003). Food health policies and ethics: lay perspectives on functional foods. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, *16*, 531-544.
- Huhtanen, C. N., Jenkins, R. K., & Thayler, D. W. (1989). Gamma radiation sensitivity of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, *52*, 610-613.
- Hultdin, J., van Guelpen, B., Bergh, A., Hallmans, G., & Stattin, P. (2005). Plasma folate, vitamin B12, and homocysteine and prostate cancer risk: A prospective study. *International Journal of Cancer*, *113*, 819-824.
- Hur, S. J., Ye, B. W., Lee, J. L., Ha, Y. L., Park, G. B., & Joo, S. T. (2004). Effects of conjugated linoleic acid on color and lipid oxidation of beef patties during cold storage. *Meat Science*, *66*, 771-775.
- Hyun, T. H., & Tamura, T. (2005). Trienzyme extraction in combination with microbiologic assay in food folate analysis: an updated review. *Experimental Biology and Medicine*, *230*, 444-454.
- Hyun-Joo, K., Jun-Sang, H., Ju-Woon, L., Keehyuk, K., Sang-Do, H., & Cheorun, J. (2010). Effects of gamma and electron beam irradiation on the survival of pathogens inoculated into sliced and pizza cheeses. *Radiation Physics and Chemistry*, *79*, 731-734.
- IAEA, International Atomic Energy Agency (2002). *Dosimetry for food irradiation, TRS, N°409*. Viena, Austria.
- Ibáñez, C., Quintanilla, L., Astiasarán, I., & Bello, J. (1997). Dry fermented sausages elaborated with *Lactobacillus plantarum-Staphylococcus carnosus*. Part II. Effect of partial replacement of NaCl with KCl on the proteolytic and insolubilization processes. *Meat Science*, *46* (3), 277-284.
- ICMSF, International Commission on Microbiological Specifications for Foods. (1996). *Listeria monocytogenes*. En ICMSF, *Microorganisms in foods, Microbiological specifications of food pathogens* (Vol. 5, págs. 141-182). New York, EEUU: Academic Press. ISBN: 041247350X.
- ILSI Europe (International Life Science Institute). (2010). *Beyond PASSCLAIM. Guidance to substantiate health claims on foods*. Bruselas: ILSI Europe Reports Series.

- Ismail, H. A., Lee, E. J., Ko, K. Y., & Ahn, D. U. (2008). Effects of aging time and natural antioxidants on the color, lipid oxidation and volatiles of irradiated ground beef. *Meat Science*, 80 (3), 582-591.
- ISO (International Organization for Standardization). (1985). *Sensory analysis. Methodology. General guidance (ISO-DP 6658)*.
- Jackson, M. J. (1997). The assessment of bioavailability of micronutrients: Introduction. *European Journal of Clinical Nutrition*, 51, S1-S2.
- Jiménez-Colmenero, F., Carballo, J., & Cofrades, S. (2001). Healthier meat and meat products: their role as functional foods. *Meat Science*, 59 (1), 5-13.
- Jiménez-Colmenero, F., Reig, M., & Toldrá, F. (2006). New approaches for the development of functional meat products. En L. M. L. Nollet, & F. Toldrá, *Advanced technologies for meat processing* (págs. 275-308). Boca Raton, EEUU: CRC Press. ISBN: 9781574445879.
- Jo, C., Ahn, D. U., & Byun, M. W. (2002). Irradiation-induced oxidative and production of volatile compounds in sausages prepared with vitamin E enriched commercial soybean oil. *Food Chemistry*, 76, 299-305.
- Jo, C., Ho Son, J., Bae Son, C., & Woo Byun, M. (2003). Functional properties of raw and cooked pork patties with added irradiated, freeze-dried green tea leaf extract powder during storage at 4°C. *Meat Science*, 64 (1), 13-17.
- Jo, C., Lee, J. I., & Ahn, D. U. (1999). Lipid oxidation, color changes and volatiles production in irradiated pork sausage with different fat content and packaging during storage. *Meat Science*, 51 (4), 355-361.
- Jo, C., Lee, J. W., Cho, K. H., Yook, H. S., & Byun, M. W. (2002). Quality properties of sausage made with gamma irradiated natural casing from intestine of pork and lamb. *Radiation Physics and Chemistry*, 63, 365-367.
- Johnson, A. M., & Resurrección, A. V. A. (2009). Sensory profiling of electron-beam irradiated ready-to-eat poultry frankfurters. *LWT-Food Science and Technology*, 42, 265-274.
- Johnston, K. E., Lofgren, P. A., & Tamura, T. (2002). Folate concentrations of fast foods measured by trienzyme extraction method. *Food Research International*, 35, 565-569.
- Kamat, A. S., & Nair, M. P. (1995). Gamma irradiation as a means to eliminate *Listeria monocytogenes* from frozen chicken meat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 69 (4), 415-422.
- Kariluoto, S., Aittamaa, M., Korhola, M., Salovaara, H., Vahteristo, L., & Piironen, V. (2006). Effects of yeasts and bacteria on the levels of folates in rye sourdoughs. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 137-143.
- Katan, M. B., & de Roos, N. M. (2004). Promises and problems of functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 369-377.
- Kaushik, N., & Kaushik, D. (2010). Functional Foods: overview and global regulation. *International Journal of Pharma Recent Research*, 2 (2), 47-52.

- Keagy, P. M., Shane, B., & Oace, M. S. (1988). Folate bioavailability in humans: effects of wheat bran and beans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 47, 80-88.
- Kim, H. Y., Nam, K. C., & Ahn, D. U. (2002). Color, oxidation-reduction potential, and gas production of irradiated meats from different animal species. *Journal of Food Science*, 67 (5), 1692-1695.
- Kim, J. H., Ahn, H. J., Kim, D. H., Jo, C., Yook, H. S., Park, H. J., & Byun, M.W. (2003). Irradiation effects on biogenic amines in korean fermented soybean paste during fermentation. *Journal of Food Science*, 68 (1), 80-84.
- Kim, J. H., Ahn, H. J., Lee, J. W., Park, H. J., Ryu, G. H., Kang, I. J., & Byun, M.W. (2005). Effects of gamma irradiation on the biogenic amines in pepperoni with different packaging conditions. *Food Chemistry*, 89, 199-205.
- Kim, Y. (2004). Folate and DNA methylation: a mechanistic link between folate deficiency and colorectal cancer?. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 13 (4), 511-519.
- Konings, E. J. M., Troost, F. J., Castenmiller, J. J. M., Roomans, H. H. S., van den Brandt, P. A., & Saris, W. H. M. (2002). Intestinal absorption of different types of folate in healthy subjects with an ileostomy. *British Journal of Nutrition*, 88 (3), 235-242.
- Kume, T., Furuta, M., Todoriki, S., Uenoyama, N., & Kobayashi, Y. (2009). Status of food irradiation in the world. *Radiation Physics and Chemistry*, 78 (3), 222-226.
- Kwak, N. S., & Jukes, D. J. (2001). Functional Foods.Part 1: the development of a regulatory concept. *Food Control*, 12, 99-107.
- Kwakwa, A., & Prakash, A. (2006). Irradiation treatment of nuts. En C. Sommers, & X. Fan, *Food Irradiation Research and Thechnology*. (págs. 221-235). Oxford, Reino Unido: Blackwell Publishing. ISBN: 9780813808826.
- Kwon, J. K., Kwon, Y., Nam, K. C., Lee, E. J., & Ahn, D. U. (2008). Effect of electron-beam irradiation before and after cooking on the chemical properties of beef, pork, and chicken. *Meat Science*, 80 (3), 903-909.
- Labuza, T. P. (1976). Drying food: Technology improves on the sun. *Food Technology*, 30 (6), 37-46.
- Lacroix, M., & Ouattara, B. (2000). Combined industrial processes with irradiation to assure innocuity and preservation of food products-a review. *Food Research International*, 33 (9), 719-724.
- Lado, B. H., & Yousef, A. E. (2002). Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms. *Microbes and Infection*, 4 (4), 433-440.
- Lagunas-Solar, M. C. (1995). Radiation processing of foods: an overview of scientific principles and current status. *Journal of Food Protection*, 58 (2), 186-192.
- Lamprecht, S. A., & Lipkin, M. (2003). Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: molecular mechanisms. *Nature Reviews Cancer*, 3, 601-614.
- Lee, E. J., & Ahn, D. U. (2005). Quality characteristics of irradiated turkey breast rolls formulated with plum extract. *Meat Science*, 71 (2), 300-305.

- Lee, H. C., Shoda, R., Krall, J. A., Foster, I. D., Selhub, J., & Rosenberry, T. L. (1992). Folate binding protein from kidney brush border membranes contains components of a glycoinositol phospholipid anchor. *Biochemistry*, *31*, 3236-3243.
- Lee, M., Lim, D. G., Seol, K. H., Jeon, H. J., & Jo, C. (2008). Application of electron-beam irradiation combined with antioxidants for fermented sausage and its quality characteristic. *Radiation Physics and Chemistry*, *77*, 818-824.
- Lin, M. Y., & Young, C. M. (2000). Folate level in cultures of lactic acid bacteria. *International Daily Journal*, *10*, 409-413.
- Lonn, E., Yusuf, S., Arnold, M. J., Sheridan, P., Pogue, J., Micks, M., & Genest, J. Jr. (2006). Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *The New England Journal of Medicine*, *354* (15), 1567-1577.
- Lucock, M. (2000). Folic acid: Nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Molecular Genetics and Metabolism*, *71*, 121-138.
- Lund, W. (1994). *Pharmaceutical codex (12th ed.) Principles and practice of pharmaceuticals*. London, Reino Unido: Pharmaceutical Press.
- López-López, I., Cofrades, S., & Jiménez-Colmenero, F. (2009). Low-fat frankfurters enriched with n-3 PUFA and edible seaweed: Effects of olive oil and chilled storage on physicochemical, sensory and microbial characteristics. *Meat Science*, *83* (1), 148-154.
- Lupton, J. R. (2009). Scientific substantiation of claims in the USA: focus on functional foods. *European Journal of Nutrition*, *49* (1), S27-S31.
- Malinow, M. R., Duell, P. B., Hess, D. L., Anderson, P. H., Kruger, W. D., Phillipson, B. E., Gluckman, R. A., Block, P. C., & Upson, B. M. (1998). Reduction of plasma homocysteine levels by breakfast cereal fortified with folic acid in patients with coronary heart disease. *New England Journal of Medicine*, *338*, 1009-1015.
- MAPA. (1996). *Boletín Mensual de Estadística*. Diciembre, 1996, Madrid.
- MAPA. (2011). *Boletín Mensual de Estadística*. Octubre, 2011, Madrid.
- Marchioni, E. (2006). Detection of irradiated foods. En C. Sommers, & X. Fan, *Food Irradiation Research and Technology* (págs. 85-103). Ames, Iowa: Blackwell Publishing. ISBN: 9780813808826.
- Maruti, S. S., Ulrich, C. M., & White, E. (2009). Folate and one-carbon metabolism nutrients from supplements and diet in relation to breast cancer risk. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *89*, 624-633.
- Maryam, A., Varidi, M. J., Shahidi, F., & Marashi, S. H. (2009). Study the effect of melonseed meal as fat replacer on chemical & organoleptical characteristics of meat products. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, *6* (4), 51-58.
- Mason, J. B. (2009). Folate, cancer risk, and the Greek god, Proteus: a tale of two chameleons. *Nutrition Reviews*, *67* (4), 206-212.
- Massy, Z. A. (1999). Reversal of hyperhomocystinaemia in chronic renal failure-is folic or folinic acid the answer?. *Nephrology Dialysis Transplantation*, *14* (12), 2810-2812.

- Mataix Verdú, J., & Ochoa Herrera, J. (2002). Vitaminas. En J. Mataix Verdú, *Nutrición y Alimentación Humana* (Vol. 1). Majadahonda, Madrid, España: Ergon. ISBN: 8484730883.
- McNulty, H., & Pentieva, K. (2004). Folate bioavailability. *Proceedings of the Nutrition Society*, 63, 529-536.
- Medina, M., Cabeza, M. C., Bravo, D., Cambero, I., Montiel, R., Ordóñez, J. A., Nuñez, M., & de la Hoz, L. (2009). A comparison between E-beam irradiation and high pressure treatment for cold-smoked salmon sanitation: microbiological aspects. *Food Microbiology*, 26, 224-227.
- Mendoza, E., García, M. L., Casas, C., & Selgas, M. D. (2001). Inulin as fat substitute in low fat, dry fermented sausages. *Meat Science*, 57 (4), 387-393.
- Mielnik, M. B., Olsen, E., Vogt, G., Adeline, D., & Skrede, G. (2006). Grape seed extract as antioxidant in cooked, cold stored turkey meat. *LWT-Food Science and Technology*, 39 (3), 191-198.
- Millar, S. J., Moss, B. W., & Stevenson, M. H. (2000). The effect of ionizing radiation on the colour beef, pork and lamb. *Meat Science*, 55 (3), 349-360.
- Milner, J. A. (2000). Functional foods: the US perspective. *American Journal Clinical Nutrition*, 71, 1654S-1659S.
- Minekus, M., & Havenaar, R. (1996). *In vitro* model of an *in vivo* digestive tract. *Patente n° 5525305*. United States.
- Minekus, M., Marteau, P., Havenaar, R., & Huis in 't Veld, J. H. J. (1995). A multicompartimental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small intestine. *Alternatives to Laboratory Animals*, 23, 197-209.
- Moens, A. L., Vrints, C. J., Claeys, M. J., Timmermans, J. P., Champion, H. C., & Kass, D. A. (2008). Mechanisms and potential therapeutic targets for folic acid in cardiovascular disease. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 294, H1971-H1977.
- Molins, R. (2001). Introduction. En R. A. Molins, *Food Irradiation: Principles and Applications* (págs. 1-22). New York, EEUU: Wiley/Interscience. ISBN: 9780471356349.
- Mónar, J. (2007). The Spanish functional food market: Present and future perspectives. *Functional FoodNet (FFNet) network meeting*.
- Monk, J. D., Beuchat, L. R., & Doyle, M. P. (1995). Irradiation inactivation of food-borne microorganisms. *Journal of Food Protection*, 58, 197-208.
- Morales, A. S. (2002). Ácido fólico en la prevención de defectos del tubo neural. *Fronteras en Obstetricia y Ginecología*, 2 (1), 25-30.
- Morehouse, K. M., & Komolprasert, V. (2004). Irradiation of Food and Packaging: An Overview. En V. Komolprasert & K. M. Morehouse, *Irradiation of Food and Packaging. ACS Symposium Series* (Vol. 875, págs. 1-11). Washinton: ACS Symposium Series. American Chemical Society.
- Muguerza, E., Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2003). Improvement of nutritional properties of Chorizo de Pamplona by replacement of pork backfat with soy oil. *Meat Science*, 65, 1361-1367.

- Muguerza, E., Fista, G., Ansorena, D., Astiasarán, I., & Bloukas, J. G. (2002). Effect of fat level and partial replacement of pork backfat with olive oil on processing and quality characteristics of fermented sausages. *Meat Science*, *61*, 397–404.
- Muguerza, E., Gimeno, O., Ansorena, D., Bloukas, J. G., & Astiasarán, I. (2001). effect of replacing pork backfat with pre-emulsified olive oil on lipid fraction and sensory quality of Chorizo de Pamplona-a tradicional Spanish fermented sausage. *Meat Science*, *59* (3), 251-258.
- Müller, H. (1995). Intake of folic acid in the total daily diet – effect of food preparation on its folic acid content. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, *200* (3), 209-212.
- Müller, H., & Diehl, J. F. (1996). Effect of Ionizing Radiation on Folates in Food. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, *29*, 187-199.
- Murano, P. S., Murano, E. A., & Olson, D. G. (1998). Irradiated ground beef: Sensory and quality changes during storage under various packaging condition. *Journal of Food Science*, *63* (3), 548-551.
- Murthy, S. N., Matta, A. S., Mondal, D., & McNamara, D. B. (2003). Metabolic syndrome and related disorders. *Methods in Assessing Homocysteine Metabolism*, *1* (2), 129-140.
- Nakai, Y., Yasuoka, A., Kato, H., & Abe, K. (2010). Genomics applied to nutrients and functional foods in Japan: state of art. En D. Bagchi, F. Lau, & M. Bagchi, *Genomics, proteomics and metabolism in nutraceutical and functional foods*. (págs. 127). USA: Wiley-Blackwell. doi: 10.1002/9780813821474.ch10.
- Nakamura, K., Enomoto, A., Fukushima, H., Nagai, K., & Hakoda, M. (1994). Disruption of microbial cells by flash discharge of high-pressure carbon dioxide. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, *58* (7), 1297.
- Nam, K. C., Ko, K. Y., Min, B. R., Ismail, H., Lee, E. J., Cordray, J., & Ahn, D. U. (2007). Effects of oleoresin–tocopherol combinations on lipid oxidation, off-odor, and color of irradiated raw and cooked pork patties. *Meat Science*, *75* (1), 61-70.
- Nanke, K. E., Sebranek, J. G., & Olson, D. G. (1999). Color characteristics of irradiated aerobically packaged pork, beef, and turkey. *Journal of Food Science*, *64* (2), 272-278.
- Neal, J. A., Cabrera-Diaz, E., Márquez-González, M., Maxim, J. E., & Castillo, A. (2008). Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on baby spinach, using electron beam radiation. *Journal of Food Protection*, *71* (12), 2415-2420.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2005). *Lehninger Principios en Bioquímica. Parte I: Componentes Moleculares de las células, capítulo 13 Vitaminas y coenzimas*. Barcelona, España: Omega. ISBN: 9788428214100.
- Nguyen, M. T., Isndrawati, & Hendickx, M. (2003). Model studies on the stability of folic acid and 5-methyl-tetrahydrofolic acid degradation during thermal treatment in combination with high hydrostatic pressure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51* (11), 3352-3357.

- Nisha, P., Rekha, S. S., & Pandit, A. B. (2005). Degradation kinetics of folic acid in cowpea (*Vigna catjang L.*) during cooking. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 56 (6), 389-397.
- Nygren-Babol, L., Sternesjö, A., Jägerstad, M., & Björck, L. (2005). Affinity and rate constants for interactions of bovine folate-binding protein and folate derivatives determined by optical biosensor technology. Effect of stereoselectivity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (13), 5473-5478.
- Obana, H., Furuta, M., & Tanaka, Y. (2007). Effects of temperature during irradiation on the production of 2-alkylcyclobutanones in beef. *Journal of Health Science*, 53 (2), 215-219.
- Ohlsson, T., Gothenburg, & Bengtsson, N. (2002). Minimal processing of foods with non-thermal methods. En T. Ohlsson, & N. Bengtsson, *Minimal processing technologies in the food industry* (págs. 34-60). Cambridge, Inglaterra: Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC. ISBN: 9780849314544.
- Öhrvik, V. (2009). *Folate Bioavailability. In vitro Experiments and Human Trials. (Doctoral Thesis)*. Uppsala, Suecia. ISBN 9789157674104.
- Öhrvik, V., Öhrvik, H., Tallkvist, J., & Witthöft, C. (2010). Foliates in bread: retention during bread-making and *in vitro* bioaccessibility. *European Journal of Nutrition*, 49, 365-372.
- Öhrvik, V., & Witthöft, C. (2008). Orange juice as a good folate source in respect to folate content and satiability during storage and simulated digestion. *European Journal of Nutrition*, 47, 92-98.
- Oms-Oliu, G., Martín-Belloso, O., & Soliva-Fortuny, R. (2010). Pulsed light treatments for food preservation. A review. *Food Bioprocess Technology*, 3, 13-23.
- Oomen, A. G., Rompelberg, C. J. M., Bruil, M. A., Dobbe, C. J. G., Pereboom, D. P. K. H., & Sips, A. J. A. M. (2003). Development of an *in vitro* digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 44, 281-287.
- Ordóñez, J. A., Aguilera, M. A., García, M. L., & Sanz, B. (1987). Effect of combined ultrasonic and heat treatment (thermoultrasonication) on the survival of a strain of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Dairy Research*, 54, 61-67.
- Ordóñez, J. A., Cambero, I., Fernández, L., García, M. L., García de Fernando, G., de la Hoz, L., y otros. (1998). Capítulo 7: Características generales de la carne y componentes fundamentales. En J. A. Ordóñez, *Tecnología de los Alimentos. Vol.II Alimentos de origen animal* (págs. 170-184). Madrid, España: Síntesis. ISBN: 9788477385769.
- Ordóñez, J. A., Hierro, E. M., Bruna, J. M., & de la Hoz, L. (1999). Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 39, 329-367.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). (2006). Defining and setting programme goals. En L. Allen, B. de Benoist, O. Dary, & R. Hurrell (Edits.), *Guidelines on food fortifications with micronutrients* (págs. 139-177).

- Osseyi, E. S., Wehling, R. L., & Albrecht, J. A. (1998). Liquid chromatographic method for determining added folic acid in fortified cereal products. *Journal of Chromatography A*, 862, 235-240.
- Ottaway, P., & Ottaway, B. L. (2002). The stability of vitamins during food processing. En C. Henry, & C. Chapman, *The nutrition handbook for food processors* (págs. 247-264). Boca Raton, EEUU: Woodhead Publishing. ISBN: 9781855734647.
- Özvural, E. B., & Vural, H. (2008). Utilization of interesterified oil blends in the production of frankfurters. *Meat Science*, 78 (3), 211-216.
- Pagán, R., Mañas, P., Palop, A., & Sala, F. J. (1999). Resistance of heat-shocked cells of *Listeria monocytogenes* to mano-sonication and mano-thermo-sonication. *Letters in Applied Microbiology*, 28, 71-75.
- Palou, A., & Serra, F. (2000). Perspectivas europeas sobre alimentos funcionales. *Alimentación, Nutrición y Salud*, 7 (13), 76-90.
- Paneras, E. D., Bloukas, J. G., & Filis, D. G. (1998). Production of low-fat frankfurters with vegetable oils following the dietary guidelines for fatty acids. *Journal of Muscle Foods*, 9, 111-126.
- Pappa, I. C., Bloukas, J. G., & Arvanitoyannis, I. S. (2000). Optimization of salt, olive oil and pectin level for low-fat frankfurters produced by replacing pork backfat with olive oil. *Meat Science*, 56 (1), 81-88.
- Parada, J., & Aguilera, J. M. (2007). Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *Journal of Food Science*, 72 (2), R21-R32.
- Patterson, R. L., & Stevenson, M. H. (1995). Irradiation-induced off-odour in chicken and its possible control. *British Poultry Science*, 36, 425-441.
- Pauli, G. H., & Tarantino, L. M. (1995). FDA Regulatory aspects of food irradiation. *Journal of Food Protection*, 58 (2), 209-214.
- Pelucchi, C., Galeone, C., Talamini, R., Negri, E., Parpinel, M., Franceschi, S., Montella, M., & La Vecchia, C. (2005). Dietary folate and risk of prostate cancer in Italy. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 14 (4), 944-948.
- Pérez-Alvarez, J. A. (2008). Overview of meat products as functional foods. En J. Fernández López, & J. A. Pérez-ALvarez, *Technological strategies for functional meat products development* (págs. 1-17). Kerala, India: Transworld Research Network.
- Pfeiffer, C. M., Rogers, L. M., Bailey, L. B., & Gregory, J. F. (1997). Absorption of folate from fortified cereal-grain products and of supplemental folate consumed with or without food determined by using a dual-label stable-isotope protocol. *American Journal of Clinical Nutrition*, 66, 1388-1397.
- Phillips, K. M., Wunderlich, K. M., Holden, J. M., Exler, J., Gebhardt, S. E., Haytowitz, D. B., Beecher, G. R., & Doherty, R. F. (2005). Stability of 5-methyltetrahydrofolate in frozen fresh fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 92, 587-595.
- Propuesta (COM/2003/0424) de Reglamento sobre alegaciones nutricionales y propiedades saludables en los alimentos.* Comisión Europea.

- Pszczola, D. (1992). Irradiated produce reaches Midwest market. *Food Technology*, 46, 89-92.
- Qui, A., Jansen, M., Sakaris, A., Min, S. H., Chattopadhyay, S., Tsai E., Sandoval C., Zhao, R., Akabas, M. H., & Goldman, I. D. (2006). Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell*, 127 (5), 917-928.
- Rahman, M. (1999). Irradiation preservation of foods. En M. Rahman, *Handbook of food preservation* (págs. 397-419). New York, EEUU: Marcel Dekker A.G.
- Real Decreto 1669/2009, de 6 de noviembre, por el que se modifica la norma de etiquetado sobre propiedades nutritivas de los productos alimenticios, aprobada por el Real Decreto 930/1992, de 17 de julio.* BOE (Boletín Oficial del Estado) N° 269, págs. 92956-92959.
- Real Decreto 348/2001, de 4 de abril, por el que se regula la elaboración, comercialización e importación de productos alimenticios e ingredientes alimentarios tratados con radiaciones ionizantes.* BOE (Boletín Oficial del Estado) N° 82, págs. 12825-12830.
- 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.*
- Riddell, L. J., Chisholm, A., Williams, S., & Mann, L. J. (2000). Dietary strategies for lowering homocysteine concentrations. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 1448-1454.
- Ristow, K., Gregory, J., & Damron, B. (1982). Effects of dietary fiber on the bioavailability of folic acid monoglutamate. *Journal of Nutrition*, 112, 750-758.
- Roberfroid, M. B. (2002). Global view on functional foods: European perspectives. *British Journal of Nutrition*, 82 (2), S133-S138.
- Roberts, T. (1998). Cold pasteurization of foods by irradiation. *Food Safety*, 458-300, 1-12. *Virginia Cooperative Extension*.
- Rodríguez, R., Jiménez, A., Fernández-Bolaños, J., Guillén, R., & Heredia, A. (2006). Dietary fibre from vegetable products as source of functional ingredients. *Trends in Food Science and Technology*, 17, 3-15.
- Rollin, F., Kennedy, J., & Wills, J. (2011). Consumers and new food technologies. *Trends in Food Science and Technology*, 22, 99-111.
- Rosenberg, I. H. (2005). Science-based micronutrient fortification: which nutrients, how much, and how to know?. *American Journal of Clinical Nutrition*, 82, 279-280.
- Rosenblatt, D. S. (1995). Inherited disorders of folate transport and metabolism. En R. C. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, & D. Valle, *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. (págs. 3897-3933). New York, EEUU: McGraw-Hill. ISBN: 007913035.
- Ross, M. E. (2010). Gene-environment interactions, folate metabolism and the embryonic nervous system. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 2 (4), 471-480.

- Rubio, B., Martínez, B., García-Cachán, M. D., Rovira, J., & Jaime, I. (2007). The effects of high pressure treatment and of storage periods on the quality of vacuum-packed "salchichón" made of raw material enriched in monounsaturated and polyunsaturated fatty acids. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, 180-187.
- Saher, M., Arvola, A., Lindeman, M., & Lähteenmäki, L. (2004). Impresión formation of functional food consumers. *Appetite*, 42, 79-89.
- Salas-Salvadó, J., García-Lorda, P., & Sánchez Ripollés, J. (2005). *La alimentación y la nutrición a través de la historia*. Barcelona, España: Glosa. ISBN 9788474292572.
- Salazar, P., García, M. L., & Selgas, M. D. (2009). Short-chain fructooligosaccharides as potential functional ingredient in dry fermented sausages with different fat levels. *International Journal of Food Science and Technology*, 44 (6), 1100-1107.
- Samelis, J., Kakouri, A., Savvaidis, I. N., Riganakos, K., & Kontominas, M. G. (2005). Use of ionizing radiation doses of 2 and 4 kGy to control *Listeria* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 on frozen meat trimmings used for dry fermented sausage production. *Meat Science*, 70 (1), 189-195.
- Sanderson, P., McNulty, H., Mastroiacovo, P., McDowell, I., Melse-Boonstra, A., Finglas, P., & Gregory III, J.F. (2003). Folate bioavailability: UK food standards agency workshop report. *British Journal of Nutrition*, 90 (2), 473-479.
- Santos, F., Wegkamp, A., de Vos, W. M., Smid, E. J., & Hugenholtz, J. (2008). High-level folate production in fermented foods by the B12 producer *Lactobacillus reuteri* JCM1112. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 3291-3294.
- Satin, M. (2002). Use of irradiation for microbial decontamination of meat: Situation and perspectives. *Meat Science*, 62 (3), 277-283.
- Sauberlich, H. E., Kretsch, M. J., Skala, J. H., Johnson, H. L., & Taylor, P. C. (1987). Folate requirement and metabolism in nonpregnant women. *American Journal of Clinical Nutrition*, 46, 1016-1028.
- Sáyago-Ayerdi, S. G., Brenes, A., & Goni, I. (2009). Effect of grape antioxidant dietary fiber on the lipid oxidation of raw and cooked chicken hamburgers. *LWT-Food Science and Technology*, 42 (5), 971-976.
- Schneider, M., Klotzsche, M. A., Werzinger, C., Waibel, J. R., & Pischetsrieder, M. (2002). Reaction of folic acid with reducing sugars and sugar degradation products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (6), 1647-1651.
- Selgas, M. D., & García, M. L. (2008). Meat products enriched with calcium. En J. Fernández-López, *Technological strategies for functional meat products development*. (págs. 57-85). Kerala, India: Transworld Research Network. ISBN: 978-81-7895-303-8.
- Selgas, M. D., García, M. L., & Calvo, M. M. (2009). Effects of irradiation and storage on the physico-chemical and sensory properties of hamburgers enriched with lycopene. *International Journal of Food Science and Technology*, 44 (10), 1983-1989.

- Selgas, M. D., Salazar, P., & García, M. L. (2009). Usefulness of calcium lactate, citrate and gluconate for calcium enrichment of dry fermented sausages. *Meat Science*, 82 (4), 478-480.
- Shamah, T., & Villalpando, S. (2006). The role of enriched foods in infant and child nutrition. *British Journal of Nutrition*, 96 (1), S73-S77.
- Siró, I., Kápolnab, E., Kápolnac, B., & Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance. A review. *Appetite*, 51 (3), 456-467.
- Slatore, C. G., Littman, A. J., Au, D. H., Satia, J. A., & White, E. (2008). Long-term use of supplemental multivitamins, vitamin C, vitamin E, and folate does not reduce the risk of lung cancer. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 177, 524-530.
- Slattery, M. L., Potter, J. D., Samowitz, W., Schaffer, D., & Leppert, M. (1999). Methylene tetrahydrofolate reductase, diet, and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 8, 513-518.
- Smelt, J. P. P. M. (1999). Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends in Food Science and Technology*, 9 (4), 152-158.
- Sommers, C., Sommers, C. H., & Boyd, G. (2006). Radiation sensitivity and postirradiation growth of foodborne pathogens on a ready-to-eat frankfurter on a roll product in the presence of modified atmosphere and antimicrobials. *Journal of Food Protection*, 69 (10), 2436-2440.
- Spilimbergo, S., Elvassore, N., & Bertucco, A. (2002). Microbial inactivation by high-pressure. *Journal of Supercritical Fluids*, 22, 55-63.
- Stefanova, R., Toshkov, S., Vasilev, N. V., Vassilev, N. G., & Marekov, I. N. (2011). Effect of gamma-ray irradiation on the fatty acid profile of irradiated beef meat. *Food Chemistry*, 127 (2), 461-466.
- Stewart, E. M. (2001). Food irradiation chemistry. En R. A. Molins, *Food Irradiation: Principles and Applications* (págs. 37-76). New York, EEUU: Wiley/Interscience. ISBN: 9780471356349.
- Stranger, O. (2002). Physiology of folic acid in health and disease. *Current Drug Metabolism*, 3, 211-223.
- Suitor, C. W., & Bailey, L. B. (2000). Dietary folates equivalents: interpretation and application. *Journal of the American Dietetic Association*, 100 (1), 88-94.
- Swan-Choo, K., & E-Siong, T. (1996). Development of a HPLC method for the simultaneous determination of several B-vitamins and ascorbic acid. *Malaysian Journal of Nutrition*, 2, 49-65.
- Sybesma, W., Starrenburg, M., Kleerebezem, M., Mierau, I., de Vos, W. M., & Hugenholtz, J. (2003). Increased production of folate by metabolic engineering of *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (6), 3069-3076.
- Tamura, T., & Stokstad, E. L. (1973). The availability of food folate in man. *British Journal of Haematology*, 25, 513-532.

- Türkmen, M., Türkmen, A., Tepe, Y., Ateç, A., & Gökkuç, K. (2008). Determination of metal contaminations in sea foods from Marmara, Aegean and Mediterranean seas: Twelve fish spec. *Food Chemistry*, 108, 794-800.
- Thayler, D. W. (1995). Use of irradiation to kill enteric pathogens on meat and poultry. *Journal of Food Safety*, 15 (2), 181-192.
- Thayer, D. W., & Boyd, G. (1993). Elimination of *Escherichia coli* O157:H7 in meats by gamma irradiation. *Applied Environmental Microbiology*, 59 (4), 1030-1034.
- Thayer, D. W., & Boyd, G. (2001). Effect of irradiation temperature on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Protection*, 64, 1624-1626.
- Thomas, A. H., Suárez, G., Cabrerizo, F. M., Martino, R., & Capparelli, A. L. (2000). Study of photolysis of folic acid and 6-formylpterin in acid aqueous solutions. *Journal of Photochemistry and Photobiology A*, 135, 147-154.
- Thomas, P. M., Flanagan, V. P., & Pawlosky, R. J. (2003). Determination of 5-methyltetrahydrofolic acid and folic acid in citrus juices using stable isotope dilution-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (5), 1293-1296.
- Toepfl, S., Heinz, V., & Knorr, D. (2007). High intensity pulsed electric fields applied for food preservation. *Chemical Engineering and Processing*, 46, 537-546.
- Toshihiko, O. (1998). Recent progress of functional food research in Japan. En T. Shibamoto, J. Terao, & T. Osawa, *Functional Foods for Disease Prevention II* (págs. 2-9). Washington D.C., EEUU: American Chemical Society. ISBN: 9780841235731.
- Urala, N., & Lähteenmäki, L. (2007). Consumers' changing attitudes towards functional foods. *Food Quality and Preference*, 18, 1-12.
- Vaesken, M., Alonso-Aperte, E., & Varela-Moreiras, G. (2009). Alimentos fortificados con ácido fólico comercializados en España: tipo de productos, cantidad de ácido fólico que proporcionan y población a la que van dirigidos. *Nutrición Hospitalaria*, 24 (4), 459-466.
- Van de Wiele, T. R., Oomen, A. G., Wragg, J., Cave, M., Minekus, M., Hack, A., & Sips, A. J. A. M. (2007). Comparison of five *in vitro* digestion models to *in vivo* experimental results: Lead bioaccessibility in the human gastrointestinal tract. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 42 (9), 1203-1211.
- Van der Put, N. M. J., Van Straaten, H. W. M., Blom, H. J., & Trijbels, F. J. M. (2001). Folate, homocysteine and neural tube defects: an overview. *Experimental Biology Medicine*, 226 (4), 243-270.
- Van het Hof, H. K., Tijburg, L. B. M., Pietrzik, K., & Weststrate, J. A. (1999). Influence of feeding different vegetables on plasma levels of carotenoids, folate and vitamin C. Effect of disruption of the vegetable matrix. *British Journal of Nutrition*, 82 (3), 203-212.
- Vandendriessche, F. (2008). Meat products in the past, today and in the future. *Meat Science*, 78 (2), 104-113.

- Varela-Moreiras, G., Aperte, E. A., & Prieto, R. P. (2000). La determinación “*in vitro/in vivo*” de la biodisponibilidad del ácido fólico contenido en la cerveza. *Facultad de Ciencias Experimentales y Técnicas. Universidad San Pablo-CEU*.
- Venema, K., Havenaar, R., & Minekus, M. (2009). Improving *in vitro* simulation of the stomach and intestines. En J. McClements, & E. Decker, *Designing functional foods. Measuring and controlling food structure breakdown and nutrient absorption*. (págs. 314-339). Tonbridge, Reino Unido: CRC and Woodhead Publishing Limited. ISBN 1 84569 432 5.
- Verbeke, W. (2005). Consumer acceptance of functional foods: socio-demographics, cognitive and attitudinal determinants. *Food Quality and Preference*, 16, 45-57.
- Verbeke, W., & Vackier, I. (2004). Profile and effects of consumer involvement in fresh meat. *Meat Science*, 66 (1), 159-168.
- Verma, A. K., Sharma, B. D., & Banerjee, R. (2009). Quality characteristics and storage stability of low fat functional chicken nuggets with salt substitute blend and high fibre ingredients. *Fleischwirtschaft International*, 24 (6), 52-57.
- Verschuren, P. M. (2002). Summary report. Functional foods: scientific and global perspectives. *British Journal of Nutrition*, 88 (2), S125-S130.
- Verwei, M. (2004). *Bioavailability of folate from fortified milk products. (Doctoral Thesis)* Wageningen, The Netherlands: Wageningen University. ISBN: 9085040809.
- Verwei, M., Arkbåge, K., Havenaar, R., van den Berg, H., Witthöft, C., & Schaafsma, G. (2003). Folic acid and 5-Methyltetrahydrofolate in fortified milk are bioaccessible as determined in a dynamic *in vitro* gastrointestinal model. *Journal of Nutrition*, 133 (7), 2377-2383.
- Verwei, M., Arkbåge, K., Mocking, H., Havenaar, R., & Groten, J. (2004). The binding of folic acid and 5-Methyltetrahydrofolate to Folate-Binding Proteins during gastric passage differs in a dynamic *in vitro* gastrointestinal model. *Journal of Nutrition*, 134, 31-37.
- Verwei, M., Olivares, A. B., van Vliet, T., van den Berg, H., & Havenaar, R. (2004). Chapter 4. Bioaccessibility of folate from several liquid and solid food products. En M. Verwei, *Bioavailability of folate from fortified milk products. (Doctoral Thesis)*. (págs. 57-68). The Netherlands: University of Wageningen.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J., & Pérez-Alvarez, J. A. (2010). Effect of orange dietary fibre, oregano essential oil and packaging conditions on shelf-life of bologna sausages. *Food Control*, 21 (4), 436-443.
- Vora, A., Riga, A., Dollimore, D., & Alexander, K. (2004). Thermal stability of folic acid in the solid-state. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 75, 709-717.
- Wagner, C. (1995). Biochemical role of folate in cellular metabolism. En L. Bailey, *Folate in Health and Disease* (págs. 23-42). New York, EEUU: Marcel Dekker.
- Wals, D. S., Wald, N. J., Morris, J. K., & Law, M. (2006). Folic acid, homocysteine and cardiovascular disease: Judging causality in the face of inconclusive trial evidence. *British Medical Journal*, 33, 1114-1117.

- Wan, Q., & Yang, N. (2002). The direct electrochemistry of folic acid at a 2-mercaptobenzothiazole self-assembled gold electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 527 (1-2), 131-136.
- Weber, P., Flühmann, B., & Eggersdorfer, M. (2006). Development of bioactive substances for functional foods to improve health-scientific and other aspects. En M. Heinrich, W. Müller, & C. Galli, *Local Mediterranean Food Plants and Nutraceuticals* (págs. 171-181). Basel, Suiza: Karger. ISBN: 16600347.
- Wei, M. M., & Gregory, J. F. (1998). Organic acids in selected foods inhibit intestinal brush border pteroylpolyglutamate hydrolase *in vitro*: potential mechanism affecting the bioavailability of dietary polyglutamyl folate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (1), 211-219.
- Wen, S. W., Chen, S. K., Rodger, M., White, R. R., Yang, Q., Smith, G. N., Sigal, R.J., Perkins, S.L. & Walker, M.C. (2008). Folic acid supplementation in early second trimester and the risk of preeclampsia. *American Journal of Obstetrics Gynecology*, 198 (45), 1-7.
- Weststrate, J. A., Van Poppel, G., & Verschuren, P. M. (2002). Functional foods, trends and future. *British Journal of Nutrition*, 88 (2), S233-S235.
- WHO, World Health Organization. (2006). Defining and setting programme goals. En L. Allen, B. Benoist, O. Dary, & R. Hurrell, *Guidelines on food fortifications with micronutrients* (págs. 139-177). WHO Press.
- Winkels, R. M., Brouwer, I. A., Siebelink, E., Katan, M. B., & Verhoef, P. (2007). Bioavailability of food folates is 80% of that of folic acid. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85, 465-473.
- Witthöft, C. M., Arkbåge, K., Johansson, M., Lundin, E., Berglund, G., Zhang, J. X., Lennernäs, H., & Dainty, J. R. (2006). Folate absorption from folate-fortified and processed foods using a human ileostomy model. *British Journal of Nutrition*, 95, 181-187.
- Witthoft, C. M., Forsskn, K., Johannesson, L., & Jagerstad, M. (1999). Foliates-food sources, analyses, retention and bioavailability. *Scandinavian Journal of Nutrition*, 43, 138-146.
- Wolfgor, R., Drago, S. R., Rodríguez, V., Pellegrino, N., & Valencia, M. (2002). *In vitro* measurement of available iron in fortified foods. *Food Research International*, 35, 85-90.
- Wouters, P. C., & Smelt, J. P. P. M. (1997). Inactivation of microorganisms with pulsed electric fields: potential for food preservation. *Food Biotechnology*, 11 (3), 193-229.
- Wright, A., Dainty, J., & Finglas, P. (2007). Folic acid metabolism in human subjects revisited: potential implications for proposed mandatory folic acid fortification in the UK. *British Journal of Nutrition*, 98 (4), 667-675.
- Wright, A. J. A., Finglas, P. M., Dainty, J. R., Hart, D. J., Wolfe, C. A., Southon, S., & Gregory, J. F. (2003). Single oral doses of C-13 forms of pteroylmonoglutamic acid and 5- formyltetrahydrofolic acid elicit differences in short-term kinetics of labelled and unlabelled folates in plasma: potential problems in interpretation of folate bioavailability studies. *British Journal of Nutrition*, 90 (2), 363-371.

- Yan, H. J., Lee, E. J., Nam, K. C., Min, B. R., & Ahn, D. U. (2006). Effects of dietary functional ingredients and irradiation on the quality of cooked turkey breast meat during storage. *Journal of Food Science*, 71 (9), 556-563.
- Yilmaz, I., & Gegel, U. (2009). Effect of inulin addition on physicochemical and sensory characteristics of meatballs. *Journal of Food Science and Technology*, 46, 473-476.
- Yoon, K. S. (2003). Effect of gamma irradiation on the texture and microstructure of chicken breast meat. *Meat Science*, 63 (2), 273-277.
- Zeisel, S. (1999). Regulation of "nutraceuticals". *Science*, 285 (5435), 1853-1855.
- Zhang, S., Hunter, D. J., Hankinson, S. E., Giovannucci, E. L., Rosner, B. A., Colditz, G. A., Speizer, F. E., & Willett, E. C. (1999). A prospective study of folate intake and the risk of breast cancer. *Journal of the American Medical Association*, 281, 1632-1637.
- Zhang, W., Xiao, S., Samaraweera, H., Lee, E. J., & Ahn, D. U. (2010). Improving functional value of meat products. *Meat Science*, 86 (1), 15-31.
- Zhao, R., Matherly, L. H., & Goldman, I. D. (2009). Membrane transporters and folate homeostasis: intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 11 (e4).
- Zhu, M. J., Du, M., Cordray, J., & Ahn, D. U. (2005). Control of *Listeria monocytogenes* contamination in Ready-to-Eat meat products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 4, 34-42.
- Zhu, M. J., Mendoca, A., Min, B., Lee, E. J., Nam, K. C., Park, K., Ismail, H.A., & Ahn, D.U. (2004). Effects of electron beam irradiation and antimicrobials on the volatiles, color, and texture of Ready-to-Eat turkey breast roll. *Journal of Food Science*, 69 (5), C382-C387.

Esta bibliografía ha sido elaborada según la American Psychological Association (APA).

***OTROS ARTÍCULOS/CONGRESOS
RELACIONADOS CON ESTA TESIS***

PUBLICACIONES:

- **Galán I.**, García M.L., Selgas M.D. 2007. Biodisponibilidad del ácido fólico en productos cárnicos cocidos. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 1, 135-140.
- Selgas, M.D., García, M.L., **Galán, I.**, Soto, A., Gámez, M.C., Santa-María, G., Herraiz, M., Calvo, M.M. 2011. Actividades del grupo UCM-CSIC realizadas en el marco del Proyecto Consolider-Ingenio 2010 (Subproyecto FUNCIOCA). *Cárnica 2000*, 4, 67-73.

COMUNICACIONES A CONGRESOS:

INTERNACIONALES

- **Galán, I.**, García, M.L. y Selgas, M.D. Calidad sensorial de un producto cárnico enriquecido con ácido fólico y sometido a radiaciones ionizantes. Actas del II Congreso Iberoamericano sobre Seguridad Alimentaria y V Congreso Español de Ingeniería de Alimentos. Barcelona, 5-7 Noviembre.2008. ISBN:978-84-96736-57-3. Pp.89-95.
- **Galán, I.**, Gámez, M.C., García, M.L. y Selgas, M.D. Effect of ionizing irradiation on the characteristics of dry fermented sausages enriched with folic acid. Innovative Applications of Non-thermal Technologies in Foods: Technology, Safety, Health and Consumer Acceptability. Madrid, 19-22 November 2008. P C4. Pp. 57.

NACIONALES

- **Galán I.**, García, M.L., Selgas, M.D. Biodisponibilidad del ácido fólico en productos cárnicos cocidos. VI Congreso de Ciencias Veterinarias y Biomédicas, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 23/25 Abril de 2007. Madrid. Premio a la mejor aportación científica.

- **Galán I.**, García, M.L., Selgas, M.D. Efecto de las radiaciones ionizantes en hamburguesas enriquecidas con ácido fólico. XIII Congreso CYTALIA, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 9-11 Abril de 2008. Madrid.
- Cabeza, M.C., García, M.L., Selgas, M.D., **Galán, I.**, Cambero, I., de la Hoz, L. y Ordóñez, J.A. Calidad higiénica y sensorial de hamburguesas sometidas a radiaciones ionizantes XIII Congreso Anual de Ciencia y Tecnología de los Alimentos CYTALIA, p. 66. Madrid, 9-11 Abril 2008.
- **Galán I.**, García, M.L., Selgas, M.D. Alimentos enriquecidos con ácido fólico: dosis adecuadas. VII Congreso de Ciencias Veterinarias y Biomédicas, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28-30 Abril de 2008. Madrid.
- **Galán I.**, García, M.L., Selgas, M.D. Efecto del tratamiento de irradiación y el tiempo de almacenamiento en hamburguesas enriquecidas con ácido fólico. II FESNAD. Barcelona, 3-5 Marzo 2010.
- **Galán I.**, Gámez, M.C., García M.L. y Selgas M.D. Aplicación de radiación beta en embutidos madurados RTE enriquecidos con ácido fólico. Estudio de su vida útil. VI Congreso Español de Ingeniería de Alimentos CESIA 2010. TCE 18. Logroño, 6-8 Octubre 2010.