

Nitratos: ¿buenos o malos?

Francesc Lloret Pastor

Resumen: El artículo realiza una revisión sobre el papel biológico del nitrato y de sus dos derivados, el ion nitrito y el óxido nítrico. Se discute el carácter nocivo o beneficioso de los mismos.

Palabras clave: Nitratos, nitritos, óxido nítrico, óxido-nítrico-sintasa, dietética.

Abstract: This paper reviews the biological role of nitrate and its two derivatives, the nitrite anion and nitric oxide. The harmful or beneficial character of them is discussed.

Keywords: Nitrates, nitrites, nitric oxide, nitric oxide synthase, dietary.

*“Solo los necios discuten los hechos”
Vladimir Ilich Uliánov, alias Lenin*

INTRODUCCIÓN

Tóxico, contaminante, nocivo, cancerígeno..., son conceptos comúnmente asociados al ion nitrato (NO_3^-). La severa normativa que la Organización Mundial de la Salud (OMS) mantiene sobre los nitratos del agua, junto con la constante repetición sobre la nocividad de los mismos por los medios de comunicación, la toxicidad de los nitratos se ha convertido en una verdad fundamental, incuestionable y que el ciudadano percibe como un hecho científicamente probado. Son muchos los núcleos urbanos que están invirtiendo enormes sumas de dinero en disminuir la concentración de nitratos de sus aguas municipales por debajo del límite que marca la OMS. Los ciudadanos, en general, han cerrado los grifos de sus casas y han empezado a consumir agua embotellada; de hecho, ésta se ha convertido en un fructífero negocio (el “oro azul”). Desgraciadamente, este hábito reciente está contribuyendo a incrementar, de forma alarmante, la contaminación medioambiental por plásticos cuya degradación es muy lenta (unos 500 años de media). Solo en el año 2016, consumimos unos 500.000 millones de envases (unas 20.000 botellas por segundo). Si solo consumiésemos agua del

grifo, esta contaminación se reduciría enormemente. Sin embargo, esto no será factible mientras los nitratos sigan manteniendo esta mala reputación.

No siempre los nitratos fueron considerados nocivos, sino todo lo contrario. Los nitratos gozaban de muy buena reputación como remedios versátiles para la salud. Sus efectos terapéuticos y beneficiosos se remontan a la época medieval y, a lo largo de los siglos, conservaron su buena reputación hasta tal punto que, en el siglo XVIII, adquirieron pleno estatus como medicina.^[1] A mediados del siglo XX cayeron en desgracia debido a unos informes sobre casos de *metahemoglobinemia* (cianosis o síndrome de los bebés azules) observados en lactantes después de la ingestión de agua rica en nitratos.^[2] Su mala prensa continuó durante los siguientes años con la sospecha del carácter cancerígeno de las *nitrosaminas*, puesto que éstas podían formarse por reacción del nitrito (NO_2^-) con aminas.^[3] A raíz de estos hechos, la OMS reguló la concentración de nitratos en el agua (50 mg/L).^[4] En el transcurso de los últimos años se han publicado una serie de estudios científicos mostrando que, no solo ninguna de las acusaciones formuladas contra los nitratos tenían fundamento sino que, por el contrario, son beneficiosos para la salud.^[5] A finales de los años ochenta se descubrió que la molécula de óxido nítrico, NO, (uno de los metabolitos del nitrato) se formaba en el endotelio (la superficie interna de arterias y venas) y se encargaba de iniciar y activar toda la defensa del sistema cardiovascular.^[6] A partir de ese momento se inició la reivindicación del carácter beneficioso del nitrato olvidado desde hacía décadas.

Sin embargo, la prensa negativa de estos últimos años ha seguido amortiguando el entusiasmo por estos importantes descubrimientos. Cada vez hay más científicos que aconsejan a la OMS una revisión de la actual normativa



F. Lloret Pastor

Instituto de Ciencia Molecular
Universidad de Valencia
C/ Catedrático José Beltrán, 2
46980-Paterna (Valencia)
C-e: francisco.lloret@uv.es

Recibido: 29/11/2019. Aceptado: 31/05/2019.

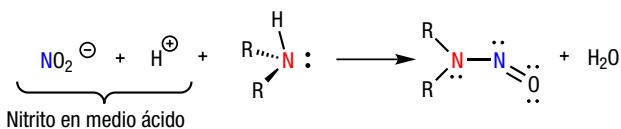
sobre el contenido de nitratos en el agua, la cual es demasiado severa, genera inquietud y conlleva enormes gastos y gran contaminación por plásticos sin ningún beneficio para la salud.^[1a] Ciertamente, existe una incongruencia entre los resultados científicos y las decisiones políticas.

En el presente artículo se revisa el papel biológico del nitrato a través de sus metabolitos, nitrito y óxido nítrico.^[7] Estas tres especies, nitrato-nitrito-óxido nítrico, se están transformando constantemente entre ellas, comportándose como una *Trinidad Bioquímica*. El nitrato es la especie estable y, por tanto, la que habitualmente encontramos en la tierra (generalmente como nitrato potásico o sódico) y que ingerimos con los alimentos, especialmente con los vegetales. Biológicamente, es inactivo e inocuo, sin embargo, una vez en nuestro cuerpo, nuestra flora bacteriana lo transforma parcialmente en nitrito y óxido nítrico, que son las especies biológicamente activas y esenciales para la vida.

HISTORIA DEL USO TERAPÉUTICO DEL NITRATO

Los efectos terapéuticos de los nitratos en el sistema cardiovascular se conocen desde la época medieval a través de la medicina china antigua.^[8] Hoy sabemos que las bacterias salivales reducen el nitrato a nitrito y éste se transforma en óxido nítrico, por lo que el beneficio cardiovascular se debe a este último. La medicina Salernitana, de gran reputación en el siglo XII, citaba al nitrato entre los fármacos más relevantes de la época. A lo largo de los siglos siguientes, el nitrato conservó su buena reputación hasta tal punto que, a partir del siglo XVII, adquirió pleno estatus como una medicina útil. Así apareció en *Pharmacopée Royale Galénique et Chymique*, de Moysse Charras (1676) y en el *Dictionnaire Universel des Drogues Simples*, de Nicolas Lémery (1733, 1.ª edición, 1687).^[1a] En el siglo XVIII, se convirtió en una panacea, un remedio para casi todo. Se prescribió como diurético y antiséptico urinario, así como en la retención de orina, enfermedades venéreas, antiinflamatorio, tisis, viruela, peste bubónica, fiebre aguda, etc. El diccionario *Abridged Dictionary of Medical Science* (1824) afirma que “pocas sales se usan más en la medicina que el nitrato de potasio”. Las dosis administradas en aquellos días podían ser enormes; tan altas como 60 g/día, aunque las concentraciones no debían de superar los 10 g/L, pues a altas concentraciones, el nitrato es corrosivo para el tracto digestivo. A pesar de las dosis utilizadas, se observaron muy pocos efectos secundarios, como náuseas o diarrea, los cuales desaparecían fácilmente sin mayor problema. Este hecho es especialmente relevante, puesto que contradice la creencia social actual sobre el carácter nocivo del nitrato.

Tras su cénit en el siglo XIX, tuvo una estrepitosa caída en el siglo XX, como consecuencia de unos informes del doctor Comly^[12] (1945) sobre casos de metahemoglobinemia observados en lactantes, después de la ingestión de biberones preparados con agua con altos contenidos en nitratos, y posteriormente con la sospecha del efecto carcinógeno de las nitrosaminas^[3] que se podían formar por reacción de los nitritos con aminas (Esquema 1). A raíz de estos hechos, la OMS reguló la concentración de nitratos



Esquema 1. Formación de nitrosoaminas

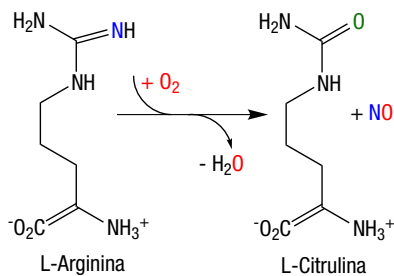
en el agua, así como la ingesta máxima permitida de los mismos.^[4]

El renacimiento y reivindicación del carácter beneficioso del nitrato reaparece con el descubrimiento del papel biológico del NO (uno de los metabolitos del nitrato) como una molécula de señalización en el sistema cardiovascular y que llevó, en 1998, a otorgar el premio Nobel de Medicina a sus descubridores.^[6]

Uso en la conservación de alimentos: El uso de los nitratos para conservar la carne se conoce desde hace más de 5.000 años. Sumerios, fenicios, griegos, romanos, indios y los antiguos chinos lo utilizaron.^[8,9] El mecanismo de la salazón comenzó a entenderse en 1891, cuando se observó la presencia de nitrito en la carne curada y se describió la conversión bacteriana del nitrato en nitrito, el cual actúa como bactericida impidiendo la proliferación bacteriana y el deterioro de los alimentos.^[10] La principal razón para utilizar tales aditivos es la necesidad de proteger a los consumidores contra la bacteria *Clostridium Botulinum*. Esta bacteria produce una toxina virulenta cuyos efectos pueden ser letales. Se ha demostrado el efecto antibacteriano del nitrito, no solo contra la *C. Botulinum*, sino contra otras muchas bacterias, incluyendo patógenos entéricos como *Salmonella* y *Escherichia Coli*.^[11] El mecanismo de la coloración roja de la carne por el nitrato se pudo entender más tarde, en 1914, cuando se observó la formación de nitrosilmioglobina (complejo de color rojo brillante) por coordinación del NO al grupo *hemo* de la mioglobina.^[10]

ÓXIDO NÍTRICO. EL FACTOR RELAJANTE DEL ENDOTELIO

En 1916, los estudios realizados por el bioquímico H. H. Mitchell pusieron de manifiesto que nuestro cuerpo producía nitrato, puesto que eliminábamos más del que ingeríamos. Incluso apuntó a la posibilidad de que los seres vivos producían óxido nítrico de forma natural.^[12] Sin embargo, la fuente endógena del nitrato fue un enigma durante mucho tiempo. En 1978, Furchgott (Universidad Estatal de Nueva York) observó que el endotelio, la capa unicelular que reviste el interior de las arterias (Figura 1a), producía una sustancia que permitía la relajación y dilatación de las arterias. Dicha sustancia se denominó factor relajante derivado del endotelio, EDRF (del inglés *endothelium-derived relaxing factor*). Estos resultados se publicaron en 1980, pasando el endotelio a jugar un papel fundamental en la regulación del cierre y apertura de los vasos sanguíneos.^[13] A partir de este descubrimiento, varios laboratorios se sumaron a la investigación de la especie química relacionada con el EDRF. La caracterización de dicha especie la realizaron, de forma independiente en 1987, los laboratorios de Louis Ignarro (Universidad de California, Los Ángeles)^[14]



Esquema 2. Obtención de NO a partir de L-Arginina

y de Salvador Moncada (Laboratorios Wellcome, Londres).^[15] La especie química en cuestión era el óxido nítrico (NO), ya sugerida 70 años atrás por H. H. Mitchell.^[12] Al año siguiente, Moncada y su grupo demostraron que el NO se producía en el endotelio a partir de la oxidación del aminoácido L-Arginina, catalizada por la enzima NO-sintasa (NOS, siglas del inglés Nitric Oxide Synthase), que se convierte en L-Citrulina y libera una molécula de NO (Esquema 2).^[15]

La comprensión de este mecanismo de acción se debe en gran parte a las aportaciones de Ferid Murad.^[16] En 1992 la prestigiosa revista Science consideró al NO la molécula del año y finalmente, en 1998 se concedió el Premio Nobel de Medicina y Fisiología a Robert Furchgott, Louis Ignarro y Ferid Murad, tres de los cuatro investigadores que descubrieron el papel cardiovascular del óxido nítrico. Quedó fuera Salvador Moncada, ya que el premio está limitado a un máximo de tres investigadores.^[17]

Síntesis Endógena de NO: El Mecanismo L-Arginina-NO-Sintasa. La vía de la L-arginina-NO-sintasa está bien definida.^[18] Las paredes de los vasos están formadas, esencialmente, por dos capas de células: el endotelio y otra capa más externa que forman el músculo liso (Figura 1a). Estas últimas tienen una gran capacidad para contraerse y relajarse, permitiendo un incremento del flujo sanguíneo sin aumentar excesivamente la presión arterial. El endotelio es muy sensible a estímulos bioquímicos, así como a estímulos mecánicos tales como un aumento de la presión arterial. Estos estímulos causan la liberación transitoria de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares. El Ca^{2+} se une a la Calmodulina para formar el complejo Ca^{2+} -Calmodulina que activa a la NOS (ver Figura 1b). La NOS cataliza la síntesis de NO, mediante la oxidación del átomo de nitrógeno del grupo guanidina terminal de L-Arginina, que se transforma en L-Citrulina (Esquema 2).

El NO es una pequeña molécula lipofílica que atraviesa fácilmente la capa del endotelio y llega rápidamente al músculo liso, donde se acopla al grupo hemo de la proteína Guanilato ciclasa (GCs, Figura 1b). Ésta transforma la Guanosin-tri-fosfato (GTP) en Guanosin-mono-fosfato-cíclico (GMPc). Es este nucleótido cíclico el que posee propiedades vasodilatadoras al reducir el calcio citoplasmático.

Isoformas de la Enzima NO-sintasa (NOS). Hasta la fecha se han descrito tres isoformas de NOS, es decir, tres enzimas similares que sintetizan NO, pero en diferentes

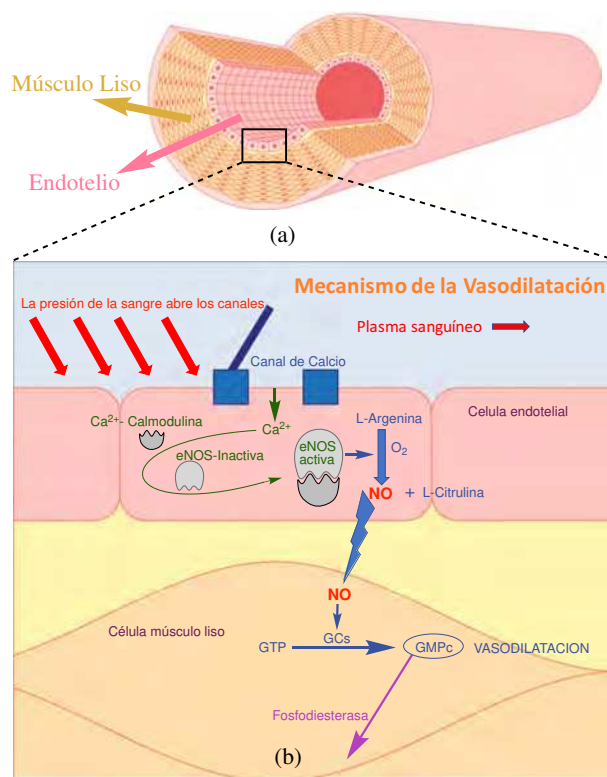


Figura 1. (a) Esquema de una arteria mostrando el músculo liso y la capa unicelular del endotelio. (b) Detalle de la parte interna de la arteria mostrando el mecanismo de la relajación arterial (ver texto)

tejidos y distintos objetivos.^[19] Comparten entre un 50-60% de homología secuencial. La NOS descrita anteriormente, que produce NO en el endotelio y permite la relajación arterial, se denomina endotelial (eNOS). Otra isoforma se localiza en las neuronas y se la conoce como neuronal (nNOS). El NO se desplaza rápidamente entre las células neuronales transmitiendo información. Recientemente, se han encontrado neuronas capaces de producir NO en el hipocampo, que es una región relacionada con el aprendizaje y la memoria. Se ha detectado la producción de NO en las áreas visual y olfativa, lo que destaca su importancia en la percepción sensorial. En el sistema nervioso, el NO actúa como neuromodulador, interviene tanto en la memoria y el aprendizaje, como en prevenir enfermedades como el Alzheimer y el Parkinson.^[20]

Hay una tercera isoforma que sintetiza NO cuando las células reciben un estímulo y se denomina inducible (iNOS). Produce NO en el sistema inmunitario y los macrófagos usan el NO producido contra los agentes extraños. La iNOS, a diferencia de eNOS y nNOS, no depende del calcio y es capaz de sintetizar mayores cantidades de NO, por períodos de tiempo prolongados, durante los procesos patológicos. Algunos investigadores han descrito una cuarta isoforma de la enzima NOS, cuya actividad se encuentra en las mitocondrias (mtNOS).^[21] Se tiene la sensación de que posiblemente casi todas las células tengan la capacidad de sintetizar NO.

SÍNTESIS EXÓGENA DE NO: EL MECANISMO SALIVAL

Tal como se indica en el Esquema 2, la vía *L*-Arginina-NOS requiere oxígeno para la producción de NO, por lo que su producción queda bloqueada en las regiones hipóxicas. Además, a medida que envejecemos, perdemos nuestra capacidad de sintetizar el NO por esta vía. A los 70-80 años ya hemos perdido un 75% de su producción, en comparación con jóvenes sanos de 20 años. Para suplir esta deficiencia, nuestro cuerpo ha generado una vía exógena basada en la ingesta de nitratos y su transformación en nitritos por la flora bacteriana bucal. El nitrato dietético está sujeto a una circulación gastro-intestinal-salival que exhibe el siguiente ciclo: alimentos → boca → esófago → estómago → intestino delgado → sangre → saliva → boca, etc. (Figura 2).

El nitrato salival se convierte parcialmente en nitrito en la boca gracias a las bacterias anaeróbicas bucales que habitan en las cavidades de la parte interior de la lengua. Éstas usan el nitrato como aceptor de electrones para generar adenosina trifosfato (ATP) en ausencia de oxígeno, transformándolo en nitrito.^[22] Esta reducción bacteriana es un bello ejemplo de simbiosis. Nosotros les damos el nitrato, un compuesto necesario para su respiración y, a cambio, ellas nos proporcionan nitrito, un sustrato necesario para la generación del NO gastro- y cardioprotector. El 25% del nitrato ingerido, después de su absorción desde el intestino delgado superior y su transporte por el plasma, pasa a las glándulas salivales y el 20% de dicho nitrato se reduce a nitrito en la boca. Por lo tanto, aproximadamente el 5% de la ingesta dietética de nitrato se transforma en nitrito salival.

Cuando la saliva rica en nitritos se encuentra con el ácido gástrico (pH 1-3), se forma NO, el cual es tóxico para una serie de enteropatógenos (efecto antibacteriano), incluyendo *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia Coli* y *Helicobacter Pylori*.^[11] La mezcla nitrato-nitrito-óxido nítrico es absorbida por los intestinos de donde pasa al plasma sanguíneo. Aparte del medio ácido estomacal, existen otras vías en el organismo para la reducción del nitrito a NO, como son a través de la acción de la hemoglobina, mioglobina y antioxidantes como el ácido ascórbico o vitamina C (Esquema 3).^[23] Esta vía le confiere un carácter esencial al nitrato dietético como un sistema de reserva para la producción de NO, cuando el oxígeno se agota y la vía *L*-arginina-NO sintasa no es operativa. En condiciones hipóxicas o isquémicas, el nitrito es la principal fuente de NO.

Parte del nitrato-nitrito es almacenado por diferentes células y debajo de la piel. Alrededor de la mitad del nitrato ingerido se excreta con la orina. El resto del nitrato es dirigido a las glándulas salivales y con la saliva a la boca, donde son parcialmente reducidos a nitritos por las bacterias, completándose así el ciclo. La falta de producción de NO puede originar hipertensión, arterosclerosis, enfermedad arterial periférica, insuficiencia cardíaca y trombosis que puede provocar un ataque cardíaco y accidente cerebrovascular, la principal causa de muerte en el mundo occidental.^[24]

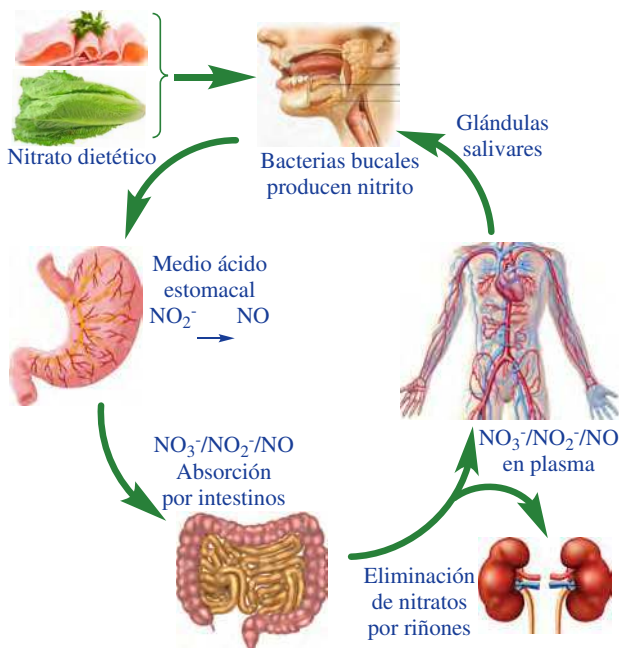


Figura 2. El mecanismo salival: Nitrato – Nitrito – óxido nítrico

Los niños menores de 6 meses carecen de una microflora oral reductora de nitratos, por lo que la concentración de nitrito en la saliva es muy baja. Curiosamente, la leche materna es rica en nitritos y nitratos y la proporción de estos aniones cambia en el tiempo. Al principio, en el calostro, la concentración de nitritos es muy alta (más de 10 veces la ingesta máxima de nitrito recomendada por la OMS) dado que el bebé aún no puede transformar el nitrato en nitrito. A partir del sexto mes (cuando el bebé ya tiene su flora bacteriana) la concentración de nitritos en la leche disminuye y aumenta la de nitratos.^[25]

El uso excesivo de enjuagues bucales antisépticos puede afectar a esta vía al eliminar las bacterias bucales. Además, el uso continuado de inhibidores de la bomba de protones (como Omeoprazol) puede disminuir la secreción ácida en el estómago, disminuyendo la eficacia en la transformación del nitrito a NO. Todo ello facilita las infecciones gastrointestinales.

Transporte de NO por la Hemoglobina. Recientemente, se ha observado que la hemoglobina (Hb), aparte de transportar dióxido de carbono y dióxígeno, también transporta óxido nítrico.^[26] La reacción del nitrito (almacenado en células) y el grupo *hemo* de la hemoglobina genera óxido nítrico, formándose la nitrosil-hemoglobina. Ésta, cuando se oxigena en los pulmones, desplaza al NO del grupo *hemo* hacia la cisteína $\beta 93$ (en la cadena β de Hb), donde se une covalentemente al azufre para formar S-nitrosohemoglobina (SNO-Hb), adquiriendo así un potencial carácter dilatador. Cuando los niveles de oxígeno en los tejidos son bajos y los microvasos presentan dificultad para la circulación, la hemoglobina libera el NO dilatando los microvasos y capilares en esa área para que pueda entrar más sangre y permitir la oxigenación. En este sentido, la sangre autorregula la oxigenación.

PROPIEDADES DEL ÓXIDO NÍTRICO

Reactividad y Movilidad (difusión y señalización). La molécula NO es pequeña, neutra y lipofílica, lo que le permite difundirse libremente a través de las membranas biológicas activando todas las células de su alrededor (molécula mensajera) y transmitiendo información de una célula a otra en pocos segundos. Cuando su trabajo ha terminado, es eliminado rápidamente, pasando a nitrito y nitrato. El NO como radical, reacciona fácilmente con otras moléculas radicales, tales como el dióxígeno (O_2), superóxido (O_2^-) o metaloenzimas. El NO tiene una vida media de solo unos pocos milisegundos cuando está en estrecho contacto con otros bio-reactantes como hemoglobina. Sin embargo, en la zona libre de glóbulos rojos, cercana a la superficie endotelial, la vida bioquímica del NO puede llegar a 100-500 segundos. La mayoría del NO que no se difunde a través de las membranas biológicas para activar la GMPc, es eliminado mediante reacción con el oxígeno, la hemoglobina u la oxihemoglobina. El NO es oxidado por la oxihemoglobina para formar nitrato y metahemoglobina (Fe^{III}), mientras que la reacción con hemoglobina da como resultado la formación de nitrosil-hemoglobina. El NO también reacciona rápidamente con el superóxido (O_2^-) para formar peroxinitrito ($ONOO^-$), una especie altamente reactiva y que usa el sistema inmune para eliminar patógenos.^[27]

Efecto Vasodilatador y Ejercicio Físico. Cada vez son más los deportistas que toman aminoácido *L*-Arginina (precursor natural de NO) o concentrados ricos en nitratos, tales como zumo de remolacha (un vaso de zumo puede contener unos 400 mg de nitratos), para mejorar la circulación sanguínea y la oxigenación, así como evitar disfunciones cardiovasculares por agotamiento. La ingesta de nitratos no solo reduce la presión arterial, sino también el consumo de O_2 durante el ejercicio físico, disminuyendo así el agotamiento.^[28] Ello ocurre sin aumento concomitante del lactato plasmático, lo que sugiere que la producción de energía es mucho más eficiente. Estudios recientes demuestran claramente que, la ingestión de alimentos ricos en nitratos, mejoran el rendimiento del ejercicio físico, por lo que una dieta con altos contenidos de nitratos es una estrategia factible para mejorar el rendimiento físico de alta o moderada intensidad.^[29]

Carácter Inmunitario. En el sistema inmunitario, los macrófagos producen NO en abundancia, mediante la iNOS, y lo usan como gas bélico contra los microorganismos invasores. En algunas ocasiones lo mezclan con el anión superóxido para producir peróxinitrito que es mucho más reactivo y letal.^[27] Como en cualquier combate, existen efectos colaterales. Por ejemplo, en caso de una infección generalizada, la producción de NO puede ser tan elevada que llega a dilatar los vasos sanguíneos de tal forma que la tensión arterial baja bruscamente y el paciente queda inconsciente. Ésta puede ser la primera indicación de un choque séptico que puede ser mortal. Uno de los síntomas más irritantes de la tosferina es la propia tos, que está originada por una producción excesiva de NO en la tráquea. Es bastante común que los lactantes con diarrea aguda (gastroenteritis) presenten también episodios de

metahemoglobinemia debido a que la gran formación de NO generado por el sistema inmune se transforma en nitrito, el cual oxida a la hemoglobina.

Carácter Dermoprotector. En 1996, se observó que una parte de los nitratos (endógenos o exógenos) queda almacenada debajo de la piel, donde van produciendo continuamente pequeñas cantidades de NO, que sale por los poros, e iones nitrito, que salen con el sudor.^[30] Nuestro cuerpo usa este mecanismo para eliminar bacterias patógenas, evitando infecciones de la piel y estimulando la cicatrización de heridas. Los rayos UVA de la luz solar facilitan la producción de NO mediante la fotodescomposición de los nitratos almacenados. Por eso, tomar el sol es relajante y baja la tensión arterial, siendo beneficioso contra la hipertensión y los problemas cardiovasculares en general. Ésta es una de las más importantes razones por la que los países con mucho sol tienen menos enfermedades cardiovasculares. Los nitratos almacenados también se usan para asegurar un continuo aporte de NO y/o nitritos a la circulación sistémica para ejercer como vasodilatador coronario y cardioprotector.

Las dos Caras del Óxido Nítrico: Dr. Jekyll y Mr. Hyde. El descubrimiento del papel esencial del óxido nítrico en el sistema cardiovascular y su carácter beneficioso para la salud fue una enorme sorpresa, puesto que el NO era, y sigue siendo, uno de los gases responsables de la contaminación medioambiental. Su producción en los motores de combustión y posterior oxidación a NO_2 , lo convierte en uno de los contaminantes más peligrosos del aire, generador de la lluvia ácida, colaborador, junto el CO_2 y CH_4 , del efecto invernadero y destructor de la capa de ozono. Éstas son las dos sorprendentes facetas de esta pequeña molécula: enormemente beneficiosa en interior de nuestro cuerpo y altamente nociva fuera de él.

NITRATOS ORGÁNICOS: NITROGLICERINA

El uso médico de fármacos precursores de NO se remonta a más de un siglo, cuando en 1867 Thomas Lauder Brunton observó que al inhalar nitrito de amilo (3-metilbutilnitrito) durante una crisis dolorosa de angina de pecho causaba una rápida disminución de los síntomas, sugiriendo una posible dilatación de los vasos sanguíneos. El nitrito de amilo es un líquido volátil que hierve a 98 °C. Quienes tenían el riesgo de padecer una angina de pecho solían llevar una pequeña ampolla de cristal con nitrito de amilo, de modo que podían romperla en un pañuelo y respirar el vapor para notar alivio.

La nitroglicerina es una sustancia altamente explosiva, sintetizada por Ascanio Sobrero en 1846, quien observó que, el contacto con este compuesto producía un violento dolor de cabeza, de forma análoga al nitrito de amilo. Alfred Nobel padecía dolores de cabeza cuando iba a trabajar a su fábrica en Suecia, donde se usaba la nitroglicerina para la preparación de dinamita. Algunos de sus empleados, que sufrían problemas cardíacos, observaron que los dolores cardíacos desaparecían cuando estaban trabajando. Cuando midieron su tensión arterial encontraron que

era muy baja y la razón era que absorbían suficiente nitroglicerina a través de los pulmones y de la piel para que la sustancia produjera esos efectos vasodilatadores. Otros explosivos, como trinitrotolueno (TNT) o nitrocelulosa, causaban efectos similares. Durante la Primera Guerra Mundial, los médicos notaron estos efectos en las mujeres que preparaban proyectiles con estos explosivos. Sufrían mareos y tenían una tensión arterial muy baja. En algunos casos llegó a causarles la muerte.

En 1879, William Murrell, introdujo la nitroglicerina sublingual para suprimir la angina de pecho. Incluso Nobel fue tratado con ella cuando enfermó. En 2002 Louis J. Ignarro desveló el mecanismo vasodilatador de la nitroglicerina, en el cual la enzima aldehído-deshidrogenasa mitocondrial es la responsable de la liberación de NO de la nitroglicerina.^[31] Si bien la nitroglicerina fue el primer nitrato orgánico sintetizado, actualmente existen varios nitratos orgánicos, siendo el Mononitrato de Isosorbida uno de última generación.

DISFUNCIÓN ERÉCTIL: VIAGRA

Cuando el hombre se hace mayor, la producción de NO puede ser deficitaria y su deseo de llevar a cabo el acto sexual puede verse frustrado por un miembro viril poco entusiasta. Sufren lo que técnicamente se denomina disfunción eréctil, y es entonces cuando buscan la ayuda de Viagra.^[32] Viagra es el nombre comercial del citrato de Sildenafil, descubierto a finales de los años ochenta.^[32] Posteriormente, han aparecido otros fármacos competidores, como el Tadalafilo y el Vardenafilo. Todos ellos actúan de forma similar. Bajo una estimulación erótica, el cerebro envía una señal a los nervios de los cuerpos cavernosos (una estructura esponjosa del pene formada por tejido eréctil) para que liberen óxido nítrico, el cual activa la producción de GMPc, que dilata el tejido eréctil, aumenta el flujo de sangre y produce la erección. Mientras tanto, otra enzima llamada fosfodiesterasa-5 elimina GMPc, aunque a una velocidad que no le permite competir con la cantidad de NO y de GMPc presente. Sin embargo, a medida que el hombre envejece, la producción de NO es insuficiente para contrarrestar el efecto neutralizante de la fosfodiesterasa-5, y el resultado es la impotencia. El papel de Viagra es bloquear la fosfodiesterasa-5, permitiendo aumentar la concentración de GMPc y la consiguiente dilatación. Curiosamente, Viagra tiene el tamaño y forma molecular justa para encajar en el centro activo de la fosfodiesterasa-5, pero no encaja con otras fosfodiesterasas, como la del músculo cardíaco (fosfodiesterasa-3). Sin embargo, sí puede bloquear a otras fosfodiesterasas-5 de otras regiones del cuerpo (efectos secundarios), como la del cerebro (dilata los vasos y produce los típicos mareos) o la de la retina, donde produce una alteración de la visión de color azulado. No todos los efectos secundarios de Viagra son negativos; de hecho, han sido muy positivos en lo que se refiere a los rinocerontes y las focas macho de Groenlandia. El rinoceronte africano estaba amenazado de extinción, porque la medicina china creía que el cuerno era muy eficaz en la cura de la impoten-

cia. Por la misma razón, los machos foca de Groenlandia también eran masacrados para conseguir una parte de su cuerpo: el pene. Ahora, la mayoría de estos consumidores toman Viagra.

REGULACIÓN DE LOS NITRATOS DEL AGUA

En la segunda mitad del siglo xx se desató una polémica sobre el posible carácter tóxico de los nitratos a raíz de unos informes del Dr. Hunter H. Comly^[2a] (1945) sobre casos de metahemoglobinemia (cianosis o síndrome de los bebés azules) observados en lactantes después de la ingestión de biberones preparados con agua rica en nitratos (unos 250 mg/L). Este documento tuvo un gran impacto y en los años siguientes se publicaron casos similares en Estados Unidos y Europa.^[2] Unos años más tarde, en 1956, se informó sobre el carácter cancerígeno de algunas nitrosoaminas y la posibilidad de que éstas se pudiesen formar a partir del nitrito.^[3] A raíz de estos informes, en 1961, la FAO (Organización Mundial de Agricultura y Alimentos) y la OMS establecieron un valor máximo para el contenido de nitrato en el agua (50 mg/L),^[4] así como los valores para la ingesta máxima diaria permitida de nitratos y nitritos (3,65 mg/Kg de masa corporal para el nitrato y de 0,065 mg/Kg para el nitrito).^[4b] Estos valores, excesivamente bajos y totalmente arbitrarios, fueron muy criticados por científicos de la época, puesto que no existía ninguna base científica o epidemiológica que corroborase tal normativa. Incluso actualmente, resulta sumamente difícil, si no imposible, hallar en la literatura científica los datos epidemiológicos sobre los cuales basar esta normativa o encontrar estudios que hayan determinado, de forma no ambigua, un umbral de toxicidad para el ser humano.

Metahemoglobinemia por Nitratos. El ion nitrito oxida a la hemoglobina (Fe^{2+}) a metahemoglobina (Fe^{3+}) impidiendo su uso para el transporte de oxígeno, por lo que excesos de nitrito pueden provocar metahemoglobinemia. La oxidación de la hemoglobina a metahemoglobina tiene lugar continuamente en los glóbulos rojos. Sin embargo, los potentes sistemas enzimáticos, conocidos como metahemoglobina-reductasa, reducen la metahemoglobina a hemoglobina.^[1a] En lactantes (menores de 6 meses), la metahemoglobina-reductasa no ha alcanzado todavía su actividad completa (un 50% más baja), por lo que son mucho más susceptibles a la metahemoglobinemia.^[3-4]

En todos los casos de metahemoglobinemia en lactantes descritos, tanto por Comly, como por otros investigadores, el agua provenía de pozos muy poco higiénicos, que se encontraban en corrales de granjas, cerca de letrinas y de excrementos de animales. La concentración de nitratos superaba los 250 mg/L.^[1a,9] Sin embargo, no fueron los nitratos los responsables directos de la metahemoglobinemia, sino la reducción del nitrato a nitrito en los biberones debido a la contaminación bacteriana asociada a las malas condiciones de los pozos y a la leche que proporcionaba la sustancia ideal para su proliferación. De hecho, la metahemoglobinemia infantil, atribuida al nitrato del agua, ha desaparecido totalmente con la cloración del agua. Esto

lleva a la conclusión de que el agua potable municipal, donde se controla la contaminación microbiana, es segura para la salud y no existen casos de metahemoglobinemia por uso del agua potable municipal, independientemente de su contenido en nitratos.

La dosis fatal de nitrito debido a metahemoglobinemia está en el intervalo de 22-23 mg/Kg de masa corporal. Por lo tanto, solo concentraciones extremadamente altas de nitrito pueden causar metahemoglobinemia grave. No obstante, los casos de metahemoglobinemia inducida por ingesta de purés de zanahoria o espinacas son bien conocidos. Un puré de 500 g de zanahorias proporciona un promedio 300 mg NO₃⁻, en el caso de las espinacas es 12 veces mayor. La metahemoglobinemia aparece por la formación de nitritos en el puré por la presencia de bacterias, las cuales aparecen por el mal estado de conservación de los vegetales, así como por guardar los purés a temperatura ambiente de un día para otro y a que los azúcares del puré proporcionan un caldo de cultivo ideal. Cuando el oxígeno se agota, las bacterias usan sus enzimas nitrato-reductasa para transformar el nitrato en nitrito. Este mecanismo puede producir cantidades significativas de nitrito.

Nitratos, Nitritos, Nitrosoaminas y Cáncer. En 1956, los científicos británicos J. Barnes y P. Magee informaron que la dimetilnitrosamina producía tumores de hígado en ratas.^[36a] Se emprendió la investigación y alrededor del 90% de nitrosaminas fueron consideradas cancerígenas.^[36b] El hecho de que las nitrosoaminas se forman mediante reacción del nitrito con aminas, inició el debate sobre la posible relación nitrato-nitrito-nitrosaminas-cáncer.^[36c] El nitrito es reactivo en condiciones ácidas y en principio, en el medio ácido estomacal, podría reaccionar con aminas para formar nitrosocompuestos (Esquema 1). La OMS pensó que esta nueva causa de cáncer podría ser controlada si se controlaban los nitritos y nitratos. Desde entonces, se han realizado numerosos y diversos estudios epidemiológicos, los cuales fueron evaluados en Europa por el Comité Científico para la Alimentación (EU, 1995) y en Estados Unidos por el Subcomité de Nitrato y Nitrito en Agua Potable (NRC, 1995). Ambos comités llegaron a la conclusión de que, en general, no se podía demostrar una asociación directa entre la exposición exógena al nitrato y la carcinogénesis humana. En su documento *Opinion on Nitrate and Nitrite*, indica: «Los estudios epidemiológicos realizados hasta la fecha no han conseguido aportar pruebas de una

asociación causal entre la exposición a los nitratos y el riesgo de cáncer en seres humanos».^[35]

Si se les tiene miedo a los nitratos será mejor abstenerse de comer lechugas, espinacas, acelgas, remolacha roja, rábanos..., que pueden llegar a contener hasta 5.000 mg/Kg de nitratos. En la Tabla 1 se indica el contenido máximo de nitratos permitido por la OMS para diferentes vegetales de consumo habitual.^[36,37]

A la vista de estos contenidos, y aplicando la ingesta máxima permitida por la OMS, se deberían retirar del mercado casi todas las verduras. Una dieta vegetariana debería considerarse suicida. Al comer nuestro plato de ensalada estamos ingiriendo tantos nitratos como los que se hallan en más de 10 litros de agua pretendidamente contaminada.

A la vista de la Tabla 1, es obvio que nuestra ingesta de nitratos se debe principalmente al consumo de vegetales (80%) y bastante menos al agua (menos del 10%). En este sentido, si fuese cierta la relación entre nitrato y cáncer, tendríamos que admitir que las verduras y hortalizas son la principal fuente de riesgo de cáncer para la mayoría de la población. Sin embargo, los estudios demuestran todo lo contrario y que las dietas ricas en vegetales han demostrado consistentemente reducir el riesgo de cáncer. Esta aparente contradicción crea una gran confusión. Por una parte, se mantiene una exagerada precaución sobre los nitratos del agua y por otra, se recomienda encarecidamente el consumo de vegetales. Esta aparente contradicción se puede entender teniendo en cuenta la existencia de antioxidantes (vitaminas C y E, polifenoles, flavonoides, ...) en los vegetales, los cuales son inhibidores muy potentes de las reacciones de nitrosación (Esquema 1), puesto que eliminan el nitrito transformándolo en NO (Esquema 3).^[38]

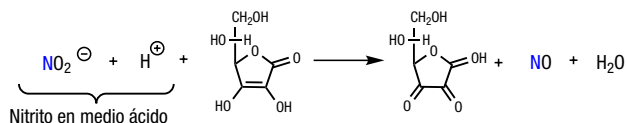
La limitación de nitratos en el agua por la OMS también contrasta con la regulación del uso de nitratos y nitritos en la conservación de alimentos. En la Tabla 2 se indica la cantidad máxima de nitratos y nitritos que deben añadirse al producto alimenticio, así como la dosis residual máxima que debe contener dicho producto, una vez preparado y dispuesto para el consumo.^[39]

Curiosamente, unos 100 g de jamón superan la ingesta diaria máxima de nitrito permitida por la OMS para una persona de 70 Kg (0,065 mg/Kg de masa corporal) mientras que 100 g de beicon curado la cuadruplica. Recientemente, para evitar la formación de nitrososaminas en las

Tabla 1. Legislación de la Unión Europea sobre contenido máximo de nitratos en algunos vegetales (expresado como NO₃⁻ en mg/Kg de producto fresco)^[37a]

Producto	Contenido
Rúcula (<i>Eruca Sativa</i> , <i>Diplotaxis sp.</i> , <i>Brassica Tenuifolia</i> , <i>Sysimbrium Tenuifolium</i>)	7.000
Lechuga fresca (<i>Lactua Sativa L.</i>) cultivada en invernadero	5.000
Lechuga fresca (<i>Lactua Sativa L.</i>) cultivada al aire libre*	4.000
Lechuga del tipo Iceberg cultivada en invernadero	2.500
Lechuga del tipo Iceberg cultivada al aire libre*	2.000
Espinacas frescas (<i>Spinacia Oleracea</i>)	3.500
Espinacas en conserva, ultracongeladas o congeladas	2.000

* La exposición al sol disminuye el contenido de nitratos debido a su fotodescomposición a NO.



Esquema 3. Reacción del nitrito con el ácido ascórbico (Vitamina C)

conservas, embutidos, carnes curadas..., se adiciona ácido ascórbico (E-300) junto con los nitritos y nitratos (Esquema 3). No obstante, hay que tener presente que la formación de nitrosoaminas se ve favorecida a altas temperaturas, por lo que pueden formarse en asados, barbacoas...

Tabla 2. Cantidades límites (expresadas como NaNO₃ o NaNO₂ en mg/Kg) para los nitratos y nitritos establecidos en la legislación europea (EFSA, *Journal* 2003, 14, 11-31; www.efsa.eu.int)

Aditivo	Denominación	Tipos de productos	Cantidad añadida	Cantidad residual*
E249	Nitrito potásico	Productos cárnicos desecados	150	50
E250	Nitrito sódico	Productos cárnicos curados o enlatados	150	100
E250	Nitrito sódico	Beicon curado		175
E251	Nitrato sódico	Productos cárnicos curados o enlatados	300	250
E252	Nitrato potásico	Quesos y sucedáneos lácticos		50
E252	Nitrato potásico	Pescados escabechados		200

* Cantidad residual al punto de venta del consumidor final.

CONCLUSIONES

Las diversas recomendaciones, normas, reglamentos y leyes vigentes que regulan el uso y la exposición humana al nitrato están respaldadas por informes de peso publicados por órganos y autoridades de reconocido prestigio. Sin embargo, cuando examinamos el fundamento científico de esta legislación, nos encontramos con importantes contradicciones entre estas normas y los recientes estudios científicos. La realidad es que son innegables los beneficios del nitrato para la salud, mientras que hay una importante incertidumbre y duda respecto a sus posibles efectos tóxicos, dentro de los límites de una ingesta o nutrición razonable. Puede ser el momento de reconsiderar las vigentes directrices reglamentarias para las fuentes dietéticas de nitritos y nitratos, especialmente para el agua de consumo, las cuales están obligando a invertir enormes cantidades de dinero para rebajar su contenido en nitratos, así como incitar al consumo de agua embotellada con el consiguiente incremento de contaminación ambiental por plásticos y todo ello sin aportar beneficio alguno para la salud pública.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] a) J. L'Hirondel y J.-L. L'Hirondel en "Nitrate and Man. Toxic, Harmless or Beneficial?". Edited by J. L'Hirondel and J.-L. L'Hirondel, CABI Publishing, 2002. b) E. F. Binkerd, O. E. Kolari, *Food and Cosmetics Toxicology*, 1975, 13, 655-661.
- [2] a) H. H. Comly, *JAMA*, 1945, 129, 112-116. b) W.E. Donohoe, *Paediatrics*, 1949, 3, 308-311. c) H. I. Lecks, *Am. J. Dis. Child*, 1950, 79, 117-123.
- [3] a) P. N. Magee, J. M. Barnes, *British Journal of Cancer*, 1956, 10, 114. b) J. M. Barnes, *Essays Toxicol.* 1974, 5, 1-15.
- [4] World Health Organization WHO. Guidelines for drinking-water quality (4th ed.) Geneva, 2011.
- [5] a) R. T. Rana, S. Chopra, G. Rakhra, S. N. Singh. *IJPSR* 2018, 9, 5. b) N. S. Bryan, *Functional Foods in Health and Disease* 2016, 6, 691-701. c) C. P. Bondonno, L. C. Blekkenhorst, A. H. Liu, N. P. Bondonno, N. C. Ward, K. D. Croft, J. M. Hodgson. *Mol. Aspects Med.* 2018, 61, 83-91. c) J. L. L'Hirondel, *Med. Sci. (Paris)*, 1998, 14, 636-9.
- [6] D. E. Koshland Jr., *Science* 1992, 258, 1861.
- [7] a) "Nitric Oxide: Biology and Pathobiology". Edited by Louis J. Ignarro and Bruce A. Freeman, Academic Press. Elsevier. 2017. b) J. S. Stamler, D. J. Singel, J. Loscalzo, *Science*, 1992, 258, 1898-1902. c) J. O. Lundberg, E. Weitzberg, M. T. Gladwin, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2008, 7, 156-167.
- [8] J. O. Lundberg, E. Weitzberg, M. T. Gladwin, *Nature Reviews*, 2008, 7, 156-167.
- [9] N. S. Bryan, Ph.D. J. Loscalzo, Editores, *Nitrite and Nitrate in Human Health and Disease*. Springer, New York, 2011.
- [10] J. S. Haldane, *J. Hygiene*, 1901, 1, 115-122. b) B. R. Pegg, F. Shahidi, *Food Chem.* 2000, 56, 105-110.
- [11] C. D. Kocha, M. T. Gladwin, B. A. Freeman, J. O. Lundberg, E. Weitzberg, A. Morrisa, *Free Radical Biology and Medicine* 2017, 105, 48-67.
- [12] H. H. Mitchell, H. A. Shonle, H. S. Grindlay, *J. Biol. Chem.* 1916, 24, 461-490.
- [13] a) R. F. Furchgott, S. Bhadrakom, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1953, 108, 129-143. b) R. F. Furchgott, J. V. Zawadzki, *Nature*, 1980, 288, 373-376. c) R. F. Furchgott, *Bioscience Reports*, 1999, 19, 235-251.
- [14] a) L. J. Ignarro *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84, 9265-9269. b) L. J. Ignarro, C. A. Gruetter, *Biochim. Biophys. Acta* 1980, 631, 221-231. c) L. J. Ignarro, H. Lippton, J. C. Edwards, W. H. Baricos, A. L. Hyman, P. J. Kadowitz, C. A. Gruetter, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1981, 218, 739-749. d) R. F. Furchgott, *Bioscience Reports*, 1999, 19, 235-251.
- [15] S. Moncada, R. M. J. Palmer, A. Higgs, *Pharmacol. Rev.*, 1991, 43, 109-142.
- [16] C. K. Mittal, W. P. Arnold, F. Murad, *J. Biol. Chem.* 1978, 253, 1266-1271.
- [17] En 1990 se le concedió a Salvador Moncada el premio Príncipe de Asturias. b) J. R. Berrazueta, *Revista Española de Cardiología*, 1999, 52, 221-226.
- [18] A. de Mel, F. Murad, A. M. Seifalian, *Chem. Rev.* 2011, 111, 5742-5767.
- [19] a) X. Shu, T. C. S. Keller, D. Begandt, J. T. Butcher, L. Biber, A. S. Keller, L. Columbus, B. E. Isakson, *Cell. Mol. Life Sci.* 2015,

- 72, 4561-4575. b) U. Forstermann, W. C. Sessa, *Eur. Heart J.*, **2012**, *33*, 829-837.
- [20] a) J. Garthwaite, *Trends. Neurosci.* **1995**, *18*, 51-52. b) J. L. Dinerman, T. M. Dawson, M. J. Schell, A. Snowman, S. H. Snyder, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, *91*, 4214-4218.
- [21] Z. Lacza, E. Pankotai, D. W. Busija, *Front. Biosci.*, **2009**, *14*, 4436-4443.
- [22] a) M. C. Burleigha, L. Liddlea, C. Monaghana, D. J. Muggedridgeb, N. Sculthorpea, J. P. Butcherce, F. L. Henriquezc, J. D. Allend, C. Eastona, *Free Radical Biology and Medicine* **2018**, *120*, 80-88. b) C. D. Kocha, M. T. Gladwina, B. A. Freeman, J. O. Lundbergd, E. Weitzbergd, A. Morrisa. *Free Radical Biology and Medicine* **2017**, *105*, 48-67.
- [23] a) G. M. McKnight, L. M. Smith, R. S. Drummond, C. W. Duncan, M. Golden, *Gut.* **1997**, *40*, 211-214. b) N. Benjamin, F. O'Driscoll, H. Dougall, C. Duncan, L. Smith, M. Golden, *Nature*, **1994**, *368*, 502.
- [24] C. P. Bondonno, K. D. Croft, J. M. Hodgson, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **2016**, *56*, 2036-2052.
- [25] N. G. Hord, J. S. Ghannam, H. K. Garg, P. D. Berens, N. S. Bryan, *Breastfeeding Medicine* **2011**, *6*, 393-399.
- [26] a) A. C. Straub, A.W. Lohman, M. Billaud, S. R. Johnstone, S. T. Dwyer, *Nature* **2012**, *491*, 473-477. b) C. Helms, D. B. Kim-Shapiro, *Free Radic. Biol. Med.* **2013**, *61*, 464-472.
- [27] a) L. Virag, E. Szabo, P. Gergely, C. Szabo; *Toxicol. Lett.* **2003**; *140*, 113-24. b) P. Pacher, J. S. Beckman, L. Liaudet, *Physiological Reviews* **2007**, *87*, 315-424.
- [28] a) A. M. Jones, *Sports Med.* **2014**, *44*, S35-S45. b) W. T. Clements, S. R. Lee, R. J. Bloomer; *Nutrients*, **2014**, *6*, 5224-5264.
- [29] a) S. Porcelli *et al.*, *Nutrients* **2016**, *8*, 534. b) M. N. Woessner, L. C. McIlvenna, J. Ortiz de Zevallos, C. J. Neil, X. J. D. Allen, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2018**, *314*, H195-H212.
- [30] N. C. V. Suschek, C. Opländer, E. E. van Faassen, *Nitric Oxide* **2010**, *22*, 120-135.
- [31] L. J. Ignarro, *Proc. Natl. Acad. Sc.* **2002**, *99*, 7816-7817.
- [32] John Emsley en "Vanidad, Vitalidad, Virilidad. La química mejora nuestra calidad de vida". Espasa Calpe, S. A. 2005.
- [33] a) M. Boolell, M. J. Allen, S. A. Ballard, S. Gepi-Attee, G. J. Muirhead, A. M. Naylor, I. H. Osterloh, C. Gingell, *Int. J. Impot. Res.* **1996**, *8*, 47-52. b) M. Boolell, S. Gepi-Attee, C. Gingell, M. J. Allen, *Br. J. Urol.* **1996**, *78*, 257-261.
- [34] A. Nilsson, *et al.*, *Br J Anaesth*, 1990, *64*, 72-6.
- [35] *Nitrate and Nitrite in Drinking Water*. National Research Council (US) Subcommittee. Washington (DC): National Academies Press (US); **1995**.
- [36] a) H. Gorenjak, A. Cencič, *Acta Alimentaria*, **2013**, *42*, 158-172. b) C. P. Bondonno, L. C. Blekenhorst, A. H. Liu, *Molecular Aspects of Medicine*, **2018**, *61*, 83-91.
- [37] a) Reglamento (UE) n° 1258/2011 de la Comisión de 2 de diciembre de 2011 que modifica el Reglamento (CE) no 1881/2006 por lo que respecta al contenido máximo de nitratos en los productos alimenticios (Anexo, Sección I: Nitratos); *Diario Oficial de la Unión Europea* L320/15 (3.12.2011). b) *WHO Food Additives Series* 50, **2003**. c) R. T. Rana, S. Chopra, G. Rakhra, S. N. Singh, *IJPSR*, **2018**, *9*, 1737-1744. d) *Diet, nutrition, and the prevention of chronic diseases*. WHO Technical Report Series, Geneva, 2003. e) WHO guidelines for drinking-water quality (4th ed.), Geneva, 2011.
- [38] a) S. S. Mirvish, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1975**, *258*, 175-180. b) S. S. Mirvish, *Eur. J. Cancer Prev.*, **1996**, *5*, 131-6. c) J. A. Lovegrove, A. Stainer, D. A. Hobbs. *Proceedings of the Nutrition Society*, **2017**, *76*, 83-95.
- [39] *BOE*, núm. 221, de 14 de septiembre de 2007, págs. 37533 a 37544.

