



VNIVERSITATIS VALÈNCIA

**Facultat de Farmàcia**

*Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública, Ciències de  
l'Alimentació, Toxicologia i Medicina Legal*

**Programa de Doctorado en Ciencias de la Alimentación**

**EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A CONTAMINANTES  
QUÍMICOS A TRAVÉS DEL CONSUMO DE ALIMENTOS EN LA  
POBLACIÓN DE LA COMUNIDAD VALENCIANA**

Valencia, Abril 2019

Presentada por:

**Leyre Quijano Echarte**

Dirigida por:

**Dra. Guillermina Font Pérez**

**Dra. Olga Pardo Marín**



La **Dra. Guillermina Font**, Catedrática de Toxicología de la Universitat de València y la **Dra. Olga Pardo**, Investigadora del Área de Seguridad Alimentaria de la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana (FISABIO),

**CERTIFICAN QUE:**

La licenciada en Farmacia Leyre Quijano Echarte ha realizado bajo su dirección el trabajo que lleva por título “Evaluación de la Exposición a Contaminantes Químicos a través del Consumo de Alimentos en la Población de la Comunidad Valenciana”, y autorizan su presentación para optar al título de Doctor por la Universitat de València.

Y para que así conste, expiden y firman el siguiente certificado.

Burjassot (Valencia), Abril 2019.

Dra. Guillermina Font

Dra. Olga Pardo



Este trabajo ha dado lugar a tres artículos publicados en las siguientes revistas científicas:

- 1. Chronic cumulative risk assessment of the exposure to organophosphorus, carbamate and pyrethroid and pyrethrin pesticides through fruit and vegetables consumption in the region of Valencia (Spain) (2016) Food and Chemical Toxicology 89, 39-46.*
- 2. Risk assessment and monitoring programme of nitrates through vegetables in the region of Valencia (Spain) (2017) Food and Chemical Toxicology 100, 42-49.*
- 3. Dietary exposure and risk assessment of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and dioxin-like polychlorinated biphenyls of the population in the region of Valencia (Spain) (2018) Food Additives & Contaminants: Part A, 35:4, 740-749.*



## Agradecimientos

A mis directoras de tesis: la *Dra. Guillermina Font*, por su profesionalidad y generosa dedicación en todo momento y la *Dra. Olga Pardo*, una lección constante de rigor científico y compromiso, a la que estaré siempre agradecida por brindarme la oportunidad de realizar esta tesis doctoral.

Al Dr. Vicent Yusà por creer en este proyecto, y a la Dra. Claudia McAllister y la Dra. Silvia Marín por su valiosa colaboración.

A mi marido, por su apoyo incondicional e incansable, sin él jamás hubiera podido realizar esta tesis doctoral.

A mis hermanos, por su incomparable ejemplo de esfuerzo y trabajo.

A mis padres, por todo.





*A mis maestros,*

*Javier y Carlos*



**ÍNDICE GENERAL**

<b>ÍNDICE DE TABLAS DE LA INTRODUCCIÓN</b>	<b>v</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS DE LA INTRODUCCIÓN</b>	<b>vi</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>vii</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
1.1. Preámbulo	7
1.2. Seguridad Alimentaria	11
1.3. Análisis del Riesgo	12
1.4. Evaluación de Riesgos en la Cadena Alimentaria	14
1.4.1. <i>Identificación de peligros químicos</i>	16
1.4.2. <i>Caracterización de peligros químicos</i>	17
1.4.3. <i>Evaluación de la exposición a peligros químicos</i>	20
1.4.4. <i>Caracterización del riesgo químico</i>	22
1.5. Metodologías para la Evaluación del Riesgo	23
1.5.1. <i>Metodología determinista</i>	24
1.5.2. <i>Metodología probabilística</i>	25
1.5.3. <i>Incertidumbres</i>	26
1.6. Contaminantes Químicos y sus Residuos en Alimentos	28

1.6.1. <i>Plaguicidas</i>	30
1.6.2. <i>Nitratos</i>	42
1.6.3. <i>Dioxinas</i>	50
1.7. Datos de Consumo y Niveles de Contaminantes	62
1.7.1. <i>Datos de consumo</i>	62
1.7.2. <i>Niveles de contaminantes</i>	66
1.7.3. <i>Factores de procesamiento</i>	70
1.7.4. <i>Consideraciones analíticas</i>	72
1.8. Referencias	76
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>101</b>
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>105</b>
3.1. Chronic cumulative risk assessment of the exposure to organophosphorus, carbamate and pyrethroid and pyrethrin pesticides through fruit and vegetables consumption in the region of Valencia.	107
3.2. Risk assessment and monitoring programme of nitrates through vegetables in the region of Valencia.	139
3.3. Dietary exposure and risk assessment of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and dioxin-like polychlorinated biphenyls of the population in the region of Valencia.	167

<b>4. DISCUSIÓN GENERAL</b>	<b>199</b>
4.1. Plaguicidas	201
4.1.1. <i>Niveles de residuos de plaguicidas</i>	201
4.1.2. <i>Evaluación de la exposición dietética a plaguicidas</i>	204
4.1.3. <i>Caracterización del riesgo a la ingesta dietética a plaguicidas</i>	208
4.2. Nitratos	209
4.2.1. <i>Niveles de nitratos</i>	209
4.2.2. <i>Evaluación de la exposición dietética a nitratos</i>	213
4.2.3. <i>Caracterización del riesgo a la ingesta dietética a nitratos</i>	215
4.3. Dioxinas	216
4.3.1. <i>Niveles de dioxinas</i>	216
4.3.2. <i>Evaluación de la exposición dietética a dioxinas</i>	220
4.3.3. <i>Caracterización del riesgo a la ingesta dietética a dioxinas</i>	223
4.4 Referencias	225
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>237</b>
<b>ANEXO I. DIFUSIÓN DE LA INVESTIGACIÓN</b>	<b>241</b>
<b>APÉNDICE</b>	<b>247</b>



## ÍNDICE DE TABLAS DE LA INTRODUCCIÓN

- Tabla 1.** Principales características de los contaminantes estudiados.
- Tabla 2.** Estudios procedentes de diferentes países sobre la evaluación de la exposición aguda, crónica y acumulada a residuos de plaguicidas a través de la dieta.
- Tabla 3.** Estudios procedentes de distintos países sobre la evaluación de la exposición a nitratos a través de la dieta.
- Tabla 4.** Estudios procedentes de distintos países sobre la evaluación de la exposición a dioxinas a través de la dieta.
- Tabla 5.** Diferentes diseños de muestreo para el análisis de contaminantes empleando el EDT.

## ÍNDICE DE FIGURAS DE LA INTRODUCCIÓN

- Figura 1.** Fuentes y vías de exposición humana a contaminantes ambientales.
- Figura 2.** Etapas del análisis del riesgo.
- Figura 3.** Metodologías para la evaluación de la exposición a contaminantes químicos en la población humana.
- Figura 4.** Vías y fuentes de exposición humana a plaguicidas.
- Figura 5.** Fuentes de exposición humana a nitratos.
- Figura 6.** Fuentes de exposición humana a dioxinas.



## ABREVIATURAS

AARP	Asociación Americana de Personas Retiradas
AChE	Acetilcolinesterasa
AECOSAN	Agencia Española de Consumo Seguridad Alimentaria y Nutrición
AEPLA	Asociación Empresarial de Fabricantes de Productos Fitosanitarios en España
AESAN	Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición
AhR	Receptor de hidrocarburo arilo
AINIA	Instituto Tecnológico Industria Agroalimentaria
AR	Análisis del riesgo
ATSDR	Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades
BAP	Buenas prácticas agrícolas
BMD	Benchmark dose
CALUX <sup>®</sup>	Chemically Activated Luciferase Assay
CBs	Carbamatos
CE	Comisión Europea
CFCA	Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos
Ci	Consumo de alimentos
ci	Concentración de contaminantes en el alimento

CONTAM	Comisión Técnica de Contaminantes de la Cadena Alimentaria de la EFSA
COP	Contaminantes orgánicos persistentes
CSISP	Centro Superior de Investigación en Salud Pública
CV	Comunidad Valenciana
DASH	Enfoques dietéticos para detener la hipertensión
DE	Dosis efectiva
DL-PCBs	Policlorobifenilos similares a dioxinas
DR	Dosis de referencia
DRA	Dosis de referencia aguda
EDT	Estudio de dieta total
EFCOSUM	Método Europeo de Encuesta de Consumo de Alimentos
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
EPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos
EPF	Encuesta de presupuestos familiares
EQB	Equivalentes bioanalíticos
EQT	Equivalentes tóxicos
EUCP	Programa Coordinado de Control de la Unión Europea
EUROSTAT	Oficina Europea de Estadística
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FET	Factor de equivalencia tóxica

FISABIO	Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana
FPR	Factor de potencia relativa
FSA	Agencia de Normas Alimentarias del Reino Unido
GAC	Grupo de acción acumulada
GC	Cromatografía de gases
GUS	Oficina Nacional de Estadística de Polonia
HI	Índice de peligro
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HQ	Cociente de riesgo
IARC	Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer
IC	Intervalo de confianza
IDA	Ingesta diaria admisible
IDE	Ingesta diaria estimada
IDT	Ingesta diaria tolerable
IMDTP	Ingesta máxima diaria tolerable provisional
IMT	Ingesta mensual tolerable
IMTP	Ingesta mensual tolerable provisional
IPCS	Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas
IPP	Índice de punto de partida
IRC	Índice de riesgo acumulado

IST	Ingesta semanal tolerable
ISTP	Ingesta semanal tolerable provisional
JEFCA	Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios
JMPR	Reunión Conjunta FAO/OMS sobre Residuos de Plaguicidas
KM	Kaplan- Meier method
LB	Escenario del límite inferior
LM	Límite máximo
LMR	Límite máximo de residuo
LOAEL	Mínimo nivel de una sustancia con efectos adversos detectables
LOD	Límite de determinación
LOQ	Límite de cuantificación
LOR	Límite de registro
MAPAMA	Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
MB	Escenario del límite intermedio
ME	Margen de exposición
MHLW	Ministerio de salud, trabajo y bienestar de Japón
MLE	Maximun likelihood estimation method
MITECO	Ministerio para la Transición Ecológica
MS	Espectrometría de masas
ND	Contaminantes no detectados

NIH	Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos
NOAEL	Máximo nivel de una sustancia sin efectos adversos detectables
NQ	Contaminantes no cuantificados
OIE	Organización Mundial de la Sanidad Animal
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPs	Organofosforados
P	Percentil
pc	Peso corporal
PCBs	Policlorobifenilos
PCDDs	Policlorodibenzo- <i>p</i> -dioxinas
PCDD/Fs	Policlorodibenzofuranos
PCOCA	Plan de Control Oficial de la Cadena Alimentaria
Pf	Peso fresco
pg	Picogramos
PPR	Comisión Técnica de Productos Fitosanitarios y sus Residuos
PPs	Piretrinas y piretroides
RAC	Materias primas agrícolas
RASFF	Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos
REACH	Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de las Sustancias y Preparados Químicos
REG	Cuestionario de registro de consumo de alimentos

SCF	Comité Científico sobre Alimentación Humana
SD	Desviación estándar
SGA	Sistema Globalmente Armonizado
SGSA	Subdirección General de Seguridad Alimentaria
UB	Escenario del límite superior
UE	Unión Europea
2,3,7,8-TCDD	2,3,7,8 tetraclorodibenzo- <i>p</i> -dioxina

## RESUMEN

El desarrollo industrial y tecnológico origina la exposición de los seres vivos y del medio ambiente a un gran número de contaminantes a través de los alimentos, aire, agua, suelo y productos de consumo.

Los plaguicidas son compuestos químicos que se emplean antes y después de la cosecha, para proteger los cultivos de la infestación por plagas y enfermedades vegetales.

Los nitratos se emplean en los cultivos como fertilizantes, contribuyendo a un incremento significativo en la producción de las cosechas.

La agricultura en la Comunidad Valenciana es intensiva, lo que conlleva un uso elevado de plaguicidas y nitratos en la producción, pudiendo ocasionar una acumulación de estas sustancias en los productos vegetales.

Otro grupo de contaminantes de interés en salud pública, debido a su elevada persistencia ambiental y toxicidad, son las dioxinas, furanos y policlorobifenilos similares a dioxinas (dl-PCBs). Éstas se generan como subproductos no intencionados en procesos de combustión de origen industrial o natural. Al ser de naturaleza lipofílica, se acumulan principalmente en alimentos de origen animal, constituyendo este grupo de alimentos, junto con las grasas y aceites, la principal fuente de exposición humana a dioxinas, furanos y dl-PCBs.

La presencia de contaminantes químicos como residuos de plaguicidas, nitratos, dioxinas y compuestos relacionados es motivo de preocupación, suscitando la necesidad de conocer el grado de exposición a

estos contaminantes a través de la dieta, y el riesgo derivado de dicha exposición en la población de la Comunidad Valenciana.

Para la evaluación de la exposición a contaminantes químicos a través de la dieta, son necesarios tanto los datos de consumo de alimentos como el conocimiento de la concentración de los mismos en dichos alimentos.

Los datos de consumo se obtuvieron de la encuesta de nutrición de la población de la Comunidad Valenciana, llevada a cabo durante el período 2010-2011. Consistió en una encuesta recordatorio de 24 horas en la que se recogieron los datos de consumo de alimentos y bebidas por el individuo, en el día anterior a la entrevista.

En cuanto a los datos de los niveles de los contaminantes químicos en alimentos, relativos a residuos de plaguicidas y nitratos se obtuvieron de los programas de vigilancia, y los de dioxinas, furanos y dl-PCBs a partir de un Estudio de Dieta Total (EDT).

Los niveles de plaguicidas se analizaron en el Laboratorio Agroalimentario de Valencia, laboratorio de referencia en la Unión Europea, empleando cromatografía de gases (CG) o cromatografía líquida (CL); mientras que, en el laboratorio de Salud Pública de Valencia se han llevado a cabo las determinaciones analíticas de nitratos empleando CL, y la de dioxinas, furanos y dl-PCBs empleando el método de bioensayo DR CALUX®.

La evaluación de la exposición a residuos de plaguicidas se realizó empleando la metodología determinista, mientras que la evaluación de la exposición a nitratos, dioxinas y compuestos relacionados se llevó a cabo



bajo un enfoque probabilístico empleando el software Creme Food<sup>®</sup>, que permite conocer la distribución de esta exposición en la población, así como, el porcentaje de la misma que podría estar en riesgo.

Para tratar los resultados inferiores al límite de cuantificación (LOQ), se asumieron dos escenarios: el escenario del límite inferior u optimista (LB) y el escenario del límite superior o pesimista (UB), en los que los resultados no cuantificados se sustituyeron por 0 o el valor de LOQ, respectivamente.

La evaluación de la exposición a residuos de plaguicidas y nitratos para la población adulta e infantil, en los dos escenarios de exposición, reveló ingestas diarias estimadas (IDEs) inferiores a los valores establecidos de ingestas diarias admisibles (IDAs). Sin embargo; para los nitratos y en la población infantil, se obtuvieron valores de ingestas superiores a dicho valor en el percentil 99 de exposición, en ambos escenarios (4.2/4.4 mg kg<sup>-1</sup> p.c. día<sup>-1</sup>).

Respecto a las dioxinas, furanos y dl-PCBs en los dos escenarios de exposición, los resultados de ingestas estimadas para la población adulta fueron inferiores a la ingesta semanal tolerable (IST); sin embargo, valores superiores se obtuvieron en las ingestas estimadas para la población infantil, 2/2.8 pg EQT (equivalentes tóxicos) kg<sup>-1</sup> p.c. día<sup>-1</sup> y, para la población adulta en el percentil 90 de exposición 2.2/3 pg EQT kg<sup>-1</sup> p.c. día<sup>-1</sup>.

Los resultados de la caracterización del riesgo debido a la exposición a nitratos en el escenario pesimista, ponen de manifiesto que hasta el 0.8% de la población de los adultos y el 1.4% de la población de los niños, podrían estar en riesgo debido a dicha exposición dietética. En este mismo

escenario, se obtuvo una mayor probabilidad de riesgo a la exposición a dioxinas y compuestos relacionados; hasta el 22.4% de la población de los adultos y 58.5% de la población de los niños, podrían estar en riesgo debida a la exposición dietética.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que es aconsejable proponer recomendaciones dietéticas a estos sectores de la población para prevenir la exposición a dioxinas, furanos y dl-PCBs; así como, la responsabilidad de las autoridades de salud pública, respecto a la necesidad de realizar controles y evaluar los riesgos de exposición a contaminantes químicos a través de los alimentos, con el fin de garantizar la salud de la población.

# 1. INTRODUCCIÓN

---



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Preámbulo

El desarrollo industrial y tecnológico acontecido en el pasado siglo ha contribuido a una fuerte reactivación económica y mejora en la calidad de vida de la población; pero al mismo tiempo, ha favorecido la exposición de los seres vivos y del medio ambiente en general, a un gran número de contaminantes químicos a través de los alimentos, aire, agua, suelo y productos de consumo. Por citar un ejemplo, la producción mundial de productos químicos antropogénicos aumentó de un millón de toneladas en el año 1930 a quinientos millones de toneladas anuales en el año 2013 (Muñoz E., 2013). En Europa, en el año 2017 se fabricaron 219.7 y 68.6 millones de toneladas de sustancias químicas peligrosas para la salud humana y medio ambiente, respectivamente (EUROSTAT, 2018). Estas sustancias antropogénicas han demostrado tener efectos tóxicos relevantes tanto en la salud de las personas (trastornos endocrinos, reproductivos y neurotóxicos, problemas cardiovasculares y respiratorios, efectos cancerígenos y síndromes: fibromialgia, fatiga crónica, sensibilidad química múltiple, etc.) (Silano et al., 2017; Gwenzi et al., 2018; Ma et al., 2019); como en el medio ambiente (lluvia ácida, smog fotoquímico, eutrofización, etc.) (Saaristo et al., 2018; Legradi et al., 2018; Cohen Hubal et al., 2014).

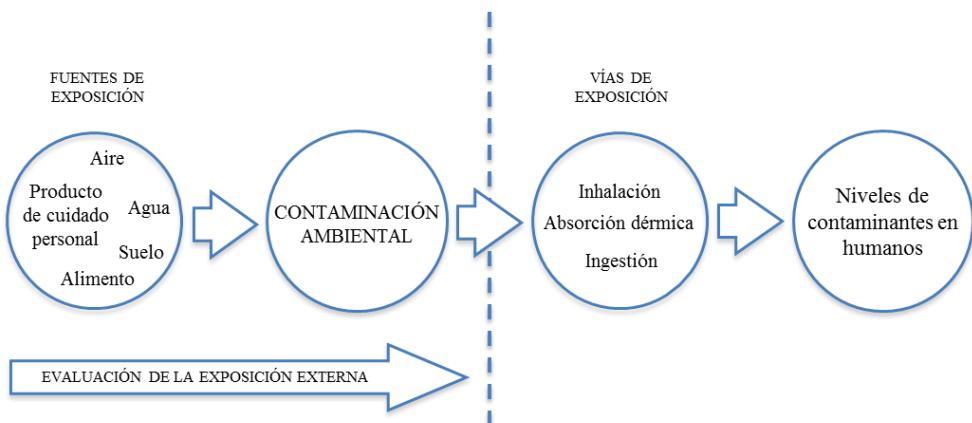
En Europa, las crisis alimentarias acaecidas a finales de los 90 del siglo pasado, pusieron de manifiesto los fallos en la concepción y aplicación de la normativa alimentaria en la Unión Europea (UE) incitando a la Comisión Europea (CE) a incluir la promoción de un alto nivel de seguridad alimentaria entre sus prioridades políticas. La publicación del Libro Blanco

en enero del 2000 (Comisión Europea, 2000) fue una consecuencia de esta estrategia, estableciendo las prioridades de la CE en materia de legislación alimentaria. De su plan de acción sobre seguridad alimentaria, ha derivado el Reglamento base que recoge los principios generales de la legislación alimentaria, el Reglamento (CE) N° 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y se fijan los procedimientos relativos a la seguridad alimentaria (Parlamento y Consejo UE, 2002).

Para elevar la protección de la salud humana y del medio ambiente contra los riesgos derivados por este aumento en la fabricación y uso de sustancias químicas, la UE en el año 2006 adoptó el Reglamento REACH (Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de las sustancias y preparados químicos) (Parlamento y Consejo UE, 2006), por el que se regula la producción, el uso y los potenciales efectos adversos de las sustancias químicas, y se fomenta el desarrollo de métodos alternativos para la evaluación de los riesgos que se puedan plantear. La Organización Mundial de la Salud (OMS) por su parte, ha contribuido a la mejora de la evaluación de riesgos a sustancias químicas, desarrollando una herramienta para la evaluación de riesgos a peligros químicos en la salud humana (WHO, 2017); y recientemente, ha manifestado que las enfermedades transmitidas por los alimentos constituyen una importante causa de morbilidad y mortalidad, y un significativo impedimento al desarrollo socioeconómico a nivel mundial (WHO, 2015).

Las propiedades químicas y toxicológicas de los contaminantes químicos varían ampliamente, y el riesgo para la salud humana depende tanto de la toxicidad de cada contaminante, como del nivel de exposición por parte de la población (Yusà V., 2011). Por consiguiente, conocer el riesgo de exposición a estos contaminantes en la población general y en los grupos más vulnerables (ancianos, niños, mujeres embarazadas, etc.), hace de la evaluación del riesgo una herramienta fundamental para la protección de la salud pública.

La evaluación del riesgo se puede realizar mediante el control ambiental (MA), a través de la vigilancia y control de los contaminantes en las diferentes matrices ambientales: aire, agua, suelo, alimentos, etc. (Roca, M. y Yusà, V., 2013); permitiendo conocer la exposición a éstos en los distintos grupos de población y el riesgo asociado a su presencia. La Figura 1 muestra las vías y rutas de exposición a contaminantes ambientales de la población.



**Figura 1.** Fuentes y vías de exposición humana a contaminantes ambientales

De todas las vías de evaluación de exposición ambiental, los alimentos constituyen la vía más relevante, tal y como señala la OMS: “la alimentación esta pasando a un primer plano como determinante importante de enfermedades crónicas que puede ser modificado, y no cesa de crecer la evidencia científica en apoyo al criterio que el tipo de dieta tiene una gran influencia tanto positiva como negativa en la salud a lo largo de la vida” (WHO/FAO, 2003).

En la Comunidad Valenciana, la vigilancia y control de contaminantes en alimentos se lleva a cabo mediante los controles oficiales del Plan de Control Oficial de la Cadena Alimentaria (PCOCA) realizados por la Subdirección General de Seguridad Alimentaria (SGSA). Así, a través de inspecciones y auditorías en los establecimientos alimentarios, toma de muestras y análisis de alimentos producidos y/o consumidos en la Comunidad Valenciana; se asegura un eficaz control y evaluación de los riesgos presentes en los alimentos, causados por los distintos tipos de contaminación (ambiental, agrícola, de procesado, etc.), facilitando la adopción de medidas de gestión para su posible eliminación o reducción. Al mismo tiempo, se garantiza el cumplimiento de la legislación en las distintas fases de la cadena alimentaria, desde la producción primaria hasta los puntos de venta a disposición del consumidor final. Estos controles oficiales se realizan de forma sistemática y con frecuencia apropiada de acuerdo a lo establecido en el Reglamento (CE) N° 882/04, sobre los controles oficiales para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos (Parlamento y Consejo UE, 2004).



### 1.2. Seguridad Alimentaria

La Seguridad Alimentaria es una de las grandes preocupaciones de la sociedad actual debido a que las enfermedades transmitidas por los alimentos constituyen una importante causa de morbilidad y mortalidad, y un significativo impedimento al desarrollo socioeconómico en todo el mundo. El suministro de alimentos inocuos fortalece las economías nacionales, el comercio y el turismo, contribuye a la seguridad alimentaria y nutricional, y sirve de fundamento para el desarrollo sostenible. Dado que la globalización ha potenciado la demanda de una mayor variedad de alimentos, la cadena alimentaria mundial es cada vez más larga y compleja (FAO, 2018).

Para la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), "Existe seguridad alimentaria cuando todas las personas tienen en todo momento acceso físico y económico a suficientes alimentos inocuos y nutritivos para satisfacer sus necesidades alimentarias y sus preferencias en cuanto a los alimentos, a fin de llevar una vida activa y sana".

Existe seguridad si se dan cuatro condiciones:

- una oferta y disponibilidad de alimentos adecuadas,
- la estabilidad de la oferta, sin fluctuaciones ni escasez, en función de la estación o del año,
- el acceso a los alimentos o la capacidad para adquirirlos,
- la buena calidad e inocuidad de los alimentos (FAO, 1996).

En el entorno de los países de la UE la consecución de las tres primeras condiciones está generalizada, por lo que se puede considerar que existe seguridad alimentaria cuando los alimentos están en buenas condiciones higiénicas y son inocuos para la salud.

El principio rector del Libro Blanco es que la política de seguridad alimentaria debe basarse en un planteamiento global e integrado; es decir, a lo largo de la cadena alimentaria (desde la alimentación de los animales y la producción, hasta la venta al consumidor, pasando por la transformación, el almacenamiento, el transporte, la importación y la exportación). Este planteamiento global e integrado indica que todos los alimentos que se producen y venden en la UE, tanto para el consumo humano como para la alimentación animal, pueden rastrearse de la granja a la mesa, y que los consumidores están bien informados de su contenido. Sus objetivos esenciales son facilitar el libre comercio de alimentos entre los países de la UE y garantizar el más alto nivel de protección al consumidor en todos ellos.

La EFSA, por su parte, proporciona asesoramiento científico e independiente sobre los riesgos alimentarios existentes y emergentes. Este asesoramiento se aplica en la legislación y en las políticas europeas, con el objetivo de proteger a los consumidores; así como, restablecer y mantener su confianza en los productos alimenticios europeos a lo largo de toda la cadena alimentaria.

### 1.3. Análisis del Riesgo

Existe un amplio reconocimiento a nivel internacional del análisis de riesgo (AR) como metodología de base para gestionar la Seguridad

Alimentaria. Varios organismos internacionales, como la OMS, la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), la FAO, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) y la EFSA (pionera en el desarrollo de los principios del AR como herramienta más adecuada para basar las políticas de seguridad alimentaria y su posterior aceptación internacional) han incorporado el AR como metodología útil para reforzar los sistemas de seguridad alimentaria y disminuir las enfermedades relacionadas con el consumo de alimentos (Comisión Europea, 2000; Parlamento y Consejo UE, 2002; FAO/WHO, 2009).

El AR es una forma sistemática de evaluar riesgos asociados a la presencia de peligros en los alimentos, para facilitar la adopción de decisiones en materia de gestión de riesgos y su comunicación. El AR ha sido definido por el Codex Alimentarius como un proceso constituido por tres componentes: evaluación del riesgo, gestión del riesgo y comunicación del riesgo (Figura 2) (FAO/WHO, 2006).



**Figura 2.** Etapas del Análisis del Riesgo (FAO/WHO, 2006)

#### 1.4. Evaluación de Riesgos en la Cadena Alimentaria

La evaluación de riesgos en seguridad alimentaria para la salud humana es el componente científico del análisis de riesgos y ha surgido como consecuencia de la necesidad de tomar decisiones para proteger la salud de la población en un contexto de incertidumbre científica. La evaluación de riesgos puede describirse también como la determinación de los posibles efectos adversos para la salud, resultantes de la exposición a peligros durante un determinado período de tiempo.

La evaluación del riesgo es un análisis científico, que debe distinguirse claramente de la gestión del riesgo, proceso normativo llevado a cabo por los reguladores en el que se tiene en cuenta las consideraciones socio-económicas o políticas, y se sopesan frente a las estimaciones del riesgo. Aún cuando es conveniente separar ambas actividades para garantizar la independencia del criterio científico; durante la formulación del problema, los gestores deben relacionarse e interactuar con quienes determinan el riesgo, para conocer el alcance del análisis (FAO/WHO, 2009).

La evaluación del riesgo es una de las actividades de mayor relevancia en el campo de la salud pública, que no sólo requiere la atención y dedicación coordinada de muchos laboratorios y agencias nacionales e internacionales de control, sino que supone un esfuerzo de investigación conjunto en distintos campos como la toxicología, la química analítica o la epidemiología (Yusà, 2011). Para la protección de la salud pública, las evaluaciones de riesgos habitualmente se realizan de un modo en que sea probable sobreestimar el riesgo real (WHO, 2017).

El Reglamento (CE) N° 178/2002 define riesgo como la ponderación de la probabilidad de un efecto perjudicial para la salud y de la gravedad de ese efecto, como consecuencia de un factor peligro (Parlamento y Consejo UE, 2002). Es decir, probabilidad de que se produzca un efecto adverso en la salud de la población expuesta, como consecuencia de un factor peligro (ej: contaminante químico) en un medio determinado (ej: alimento).

Las fases de la evaluación de riesgos en Seguridad Alimentaria son (FAO/WHO, 2009):

- **Identificación del peligro:** Proceso de determinación de las condiciones o agentes biológicos, químicos y físicos que pueden estar presentes en un determinado alimento o grupo de alimentos, y puedan causar efectos nocivos para la salud.
- **Caracterización del peligro:** Evaluación cualitativa y/o cuantitativa de la naturaleza de los efectos nocivos para la salud relacionados con agentes biológicos, químicos y físicos que pueden estar presentes en los alimentos.

En el caso de los agentes químicos, conviene realizar una evaluación de la relación dosis-respuesta. En lo que respecta a los agentes biológicos o físicos, se puede realizar una evaluación de la relación dosis-respuesta, sólo si se dispone de los datos necesarios (naturaleza, dosis infectiva, etc.).

- **Determinación de la exposición:** Evaluación cualitativa y/o cuantitativa de la ingestión probable de agentes biológicos, químicos y físicos a través de los alimentos; así como, en caso necesario de las exposiciones que derivan de otras fuentes.

- **Caracterización del riesgo:** Estimación cualitativa y/o cuantitativa, incluidas las incertidumbres concomitantes, de la probabilidad de que se produzca un efecto nocivo, conocido o potencial, y de su gravedad para la salud de una determinada población; basada en la determinación del peligro, su caracterización y la evaluación de la exposición.

#### 1.4.1. *Identificación de peligros químicos*

El propósito de la identificación de peligros químicos en alimentos es determinar si hay suficiente evidencia para considerar a una sustancia química como la causa de un efecto adverso para la salud, sobre la base de la evaluación de todos los datos disponibles sobre toxicidad, modo de acción y alcance de la población que puede estar en situación de riesgo (WHO, 2017). Está diseñado para abordar principalmente dos preguntas:

- la naturaleza de cualquier peligro para la salud de los seres humanos que un agente pueda plantear y
- las circunstancias en las que se puede expresar un peligro identificado.

La identificación del peligro se basa en el análisis de una variedad de datos, desde observaciones en seres humanos o animales domésticos y estudios en animales de laboratorio y estudios de laboratorio *in vitro*, hasta el análisis de las relaciones estructura-actividad. De la variedad de estudios y observaciones disponibles, se identifica la naturaleza de cualquier toxicidad o efectos adversos para la salud; así como, los órganos o tejidos diana afectados (FAO/WHO, 2009).

#### 1.4.2. Caracterización de peligros químicos

Se define como la evaluación cualitativa y, siempre que sea posible, la descripción cuantitativa de las propiedades inherentes de un agente o situación que tiene el potencial de causar efectos adversos. Esto debería, cuando sea posible, incluir una evaluación de dosis-respuesta y sus incertidumbres asociadas (FAO/WHO, 2004).

La caracterización del peligro describe la relación entre la dosis administrada o la exposición a un producto químico que puede estar presente en un alimento, y la incidencia de un efecto adverso para la salud. Esta determinación de la relación dosis-respuesta, se emplea para elaborar recomendaciones en la determinación del riesgo y deducir valores guía para la exposición basados en criterios de salud.

Entre los tipos de datos que se pueden utilizar para establecer las relaciones dosis-respuesta se incluyen los estudios epidemiológicos y los estudios toxicológicos. Éstos últimos pueden dividirse ampliamente en estudios *in vitro*; utilizando organismos o células en cultivo, muestras de tejidos de animales de laboratorio o humanos y en estudios *in vivo*; en animales de laboratorio o humanos (FAO/WHO, 2009).

Generalmente, la relación dosis-respuesta deriva de pruebas estandarizadas en animales de laboratorio llevadas a cabo en condiciones controladas y en un número limitado de casos, de estudios epidemiológicos en humanos (Dorne y Fink-Gremmels, 2013). En los casos en los que no se dispone de datos dosis-respuesta en humanos, se emplean datos en animales, abarcando un intervalo de la relación dosis-respuesta para poder extrapolarlos a humanos con incertidumbres asociadas. Las relaciones dosis-

respuesta observadas a partir de estudios en animales suelen estar a dosis mucho más altas en el caso de carcinógenos; con el fin de predecir la relación de los seres humanos, los resultados se deben extrapolar a dosis más bajas a las que están expuestos los seres humanos, lo que también presenta incertidumbres en el análisis dosis-respuesta.

A partir de estos datos toxicológicos y/o epidemiológicos, los productos químicos son clasificados de acuerdo a los riesgos para la salud humana que plantean, como neurológicos, sobre el desarrollo, reproductores, respiratorios, efectos cardiovasculares y cancerígenos, entre otros.

Se han empleado diferentes métodos para la caracterización del peligro de efectos tóxicos para los que existe un umbral (por encima del cual se observan los efectos adversos) y de efectos tóxicos para los que ese umbral no existe, como las sustancias genotóxicas y carcinógenas, que con cualquier nivel de exposición presentan algún grado de riesgo.

En la evaluación del efecto tóxico que rebasa el umbral de exposición, el primer paso es definir el nivel de exposición más alto sin aumentos estadística o biológicamente significativos en la frecuencia o severidad del efecto adverso, entre la población expuesta y su población de control apropiada (non observed adverse effect level, NOAEL) o una dosis de referencia (DR), que es la que provoca una respuesta adversa moderada pero medible.

En los casos en que un NOAEL no se ha demostrado experimentalmente, se utiliza como punto de partida el término “nivel de



efecto adverso observado más bajo” (LOAEL), que es la dosis más baja ensayada con efectos adversos observables (FAO/WHO, 2009).

Una alternativa que permite un avance metodológico importante es utilizar una dosis de punto de referencia (Benchmark Dose, (BMD)) en lugar de un NOAEL. Para obtener la BMD se utilizan métodos de modelación matemática que pueden incorporar más de una clase de efecto, es decir, que pueden tomar en cuenta varios NOAEL o LOAEL. Por ejemplo, se puede obtener un punto en el que 10% de la población exhibe una respuesta (Dosis Efectiva 10, DE10) (WHO, 2010).

Respecto al establecimiento de los valores guía para los límites de exposición basados en criterios de salud, en el caso de aditivos alimentarios y residuos de plaguicidas o de medicamentos de uso veterinario en alimentos, el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) y la Reunión Conjunta FAO/OMS sobre Residuos de plaguicidas (JMPR) fijan como valor guía la Ingesta Diaria Admisible (IDA) y el punto de partida para fijar este valor es el NOAEL.

En cuanto a los contaminantes en alimentos que en general son inevitables, como las dioxinas, el JECFA ha empleado para los valores guía el término “tolerable”, que indica que la ingestión de contaminantes asociada con el consumo de alimentos, por lo demás conformes a las normas de salubridad y nutritivas, es aceptable. Se puede utilizar como punto de partida el NOAEL o la DR. Los valores guía se pueden expresar como Ingesta Diaria Tolerable (IDT) o como Ingesta Máxima Diaria Tolerable Provisional (IMDTP), el término “provisional” indica que la evaluación es provisional cuando no hay suficientes datos fiables sobre las consecuencias

de la exposición humana a niveles aproximados a los que el JECFA considere preocupantes. La IMDTP se utiliza para contaminantes alimentarios que no se acumulan en el organismo. En el caso de los contaminantes que si se acumulan con el tiempo, el JECFA utiliza la Ingesta Semanal Tolerable Provisional (ISTP) o Ingesta Mensual Tolerable Provisional (IMTP) (FAO/WHO, 2009).

#### *1.4.3. Evaluación de la exposición a peligros químicos*

En la determinación de la exposición alimentaria a sustancias químicas, los datos sobre consumo de alimentos se combinan con los datos de concentración de sustancias químicas en alimentos (FAO/WHO, 2009), de tal manera que la ecuación básica para el cálculo de la Ingesta Diaria Estimada (IDE) sería:

IDE individual (IDE<sub>i</sub>):  $\Sigma [c_i \text{ (concentración de contaminante en el alimento)} \times C_i \text{ (consumo de alimento)}]$ .

La clasificación de la exposición puede variar según se consideren los efectos agudos o crónicos sobre la salud, éste último enfoque es el más utilizado para evaluar los peligros químicos a través de los alimentos.

Las determinaciones de la exposición alimentaria abarcan a la población general y también a grupos vulnerables o aquellos en los que se prevee una exposición significativamente diferente de la población general (por ejemplo, lactantes, niños, mujeres embarazadas, ancianos, etc.) (FAO/WHO, 2009).

La evaluación de la exposición puede resolverse a través de dos enfoques: cualitativo y cuantitativo. La evaluación cualitativa, realiza un

tratamiento descriptivo de la información y puede ser un primer paso en la evaluación del riesgo, con el fin de determinar si es necesario realizar posteriormente una evaluación cuantitativa (Kroes et al., 2002). Para la evaluación cuantitativa de la exposición, los datos de consumo de alimentos y concentración de contaminantes son combinados generalmente, empleando métodos deterministas (Jensen et al., 2003) o probabilísticos (Van der Voet et al., 2015).

Otro aspecto de gran importancia y desarrollo reciente, es la determinación del grado de exposición a múltiples sustancias químicas, los peligros asociados con tal exposición combinada y la extensión con la que interactúan dichas sustancias. Predecir el riesgo de exposición a mezclas de sustancias químicas es complejo, ya que éstas pueden interactuar tanto en términos de toxicocinética como de toxicodinámica. Las interacciones pueden dar como resultado efectos sinérgicos o antagónicos (FAO/WHO, 2009). La EFSA define la toxicidad combinada como “la respuesta de un sistema biológico a varias sustancias químicas, con exposiciones tanto simultáneas como secuenciales” y puede adoptar tres posibles formas: dosis acumulativa, respuesta acumulativa o interacción (EFSA, 2013a).

La dosis acumulativa asume que todos los componentes de una mezcla tienen el mismo mecanismo/modo de acción para los efectos toxicológicos y difieren sólo en sus potencias. Para sustancias que tienen umbral en su relación dosis respuesta, la actividad total de la mezcla es la suma de las exposiciones de cada componente multiplicado por su potencia relativa; como en el caso de los residuos de plaguicidas y dioxinas.

La respuesta acumulativa es posible cuando dos o más sustancias producen la misma respuesta o efecto por diferentes mecanismos.

Por último, las interacciones ocurren cuando el efecto de una mezcla difiere del efecto acumulativo basado en la dosis-respuesta de los componentes individuales.

#### *1.4.4. Caracterización del riesgo químico*

La caracterización del riesgo es la evaluación cualitativa y siempre que sea posible la determinación cuantitativa, incluidas las incertidumbres concomitantes, de la probabilidad de ocurrencia de los conocidos y posibles efectos adversos de un agente en un determinado organismo, sistema o subpoblación, en condiciones de exposición definidos (FAO/WHO, 2004). Esta definición de la etapa final de la evaluación del riesgo está restringida sólo a la población de consumidores y es la aceptada y utilizada por el Codex Alimentarius (FAO/WHO, 2008).

La caracterización del riesgo integra información de la caracterización del peligro y de la determinación de la exposición, para generar recomendaciones científicas destinadas a los gestores del riesgo.

Respecto a las sustancias que producen efectos por encima de un umbral, el JECFA y JMPR fijan valores guía para los límites de exposición basados en criterios de salud.

En esta caracterización del riesgo, los valores guía se comparan con la exposición estimada en humanos. Se debe tener en cuenta, que la IDA y la IDT se aplica a exposiciones a largo plazo e incorpora factores de incertidumbre a un nivel de exposición superior al valor de referencia, y esto

no necesariamente implica que puede conducir a efectos adversos inmediatos en humanos, y la interpretación tiene que ser hecha caso por caso (Dorne y Fink-Gremmels, 2013).

Por otro lado, el JECFA propone que las recomendaciones sobre compuestos genotóxicos y carcinógenos deben basarse en el cálculo del margen de seguridad, respecto a la dosis con la que se observa una incidencia baja pero definida de cáncer (habitualmente en bioensayos con animales) y la exposición humana estimada. Además subraya que en las recomendaciones a los gestores de riesgos se deben describir los puntos fuertes y las limitaciones propias de los datos empleados para calcular el margen de seguridad, y proporcionar orientación para la correcta interpretación de éstos (FAO/WHO, 2009).

### 1.5. Metodologías para la Evaluación del Riesgo

La OMS recomienda un enfoque gradual para la evaluación de la ingesta dietética. En el primer nivel, se debe aplicar un método de cribado para identificar aquellos niveles de residuos que no son preocupantes para la seguridad, utilizando un enfoque simplificado. Los métodos de cribado, generalmente sobreestiman la exposición real, ya que se basan en supuestos conservadores en términos de consumo de alimentos y niveles de residuos. Si no se identifica ningún riesgo para el consumidor con el método de cribado, no es necesario utilizar herramientas de cálculo más sofisticadas. Para los productos químicos para los cuales no se puede excluir un riesgo potencial en los cálculos del primer nivel, se necesita más información para permitir estimaciones más precisas en un cálculo más refinado de segundo nivel (FAO/WHO, 2009).

### *1.5.1. Metodología determinista*

El método determinista empleado en la evaluación del riesgo es un método simple, rápido y aceptado por organismos reguladores (Kroes et al., 2002), que se basa en puntos de partida fijos, por ejemplo: medias, percentiles (Keikothale B., 2011). En este método, un valor fijo de consumo de alimento (promedio o el valor más alto) se multiplica por un valor fijo de concentración de contaminante en el alimento (valor promedio empírico o máximo valor tolerado o permitido por la legislación) (Dorne et al., 2009) obteniendo una única estimación del riesgo. Inherente a este modelo se encuentra la asunción de que todos los individuos consumen la misma cantidad de alimento especificado y que los contaminantes se encuentran siempre presentes en los alimentos en cantidades especificadas (Marín S., 2014). El riesgo de estar sujeto a efectos adversos para la salud por los productos químicos en los alimentos difiere entre los individuos de una población, debido a la variación en la exposición (consumo de alimentos, concentraciones de las sustancias químicas en los alimentos, hábitos culinarios) y en la sensibilidad individual hacia estas sustancias químicas (Bosgra et al., 2009). Además de esta variabilidad entre individuos, se debe tener en cuenta las incertidumbres en la estimación de la exposición y los valores límite de salud. Por incertidumbre se entiende el conocimiento limitado del evaluador de riesgos sobre los datos y modelos utilizados, mientras que la variabilidad refleja la heterogeneidad biológica inherente en la exposición o la respuesta (FAO/WHO, 2008). En el enfoque determinista, la variabilidad y la incertidumbre se tratan de la misma manera: eligiendo estimaciones conservadoras para los parámetros intermedios en la evaluación. Este enfoque determinista es satisfactorio

como un enfoque de nivel inferior para indicar que no se esperan efectos adversos, incluso bajo las suposiciones en el peor de los casos. Cuando tal evaluación indica que podría haber un riesgo y no está claro si realmente se producirán efectos adversos, sería necesario realizar una evaluación más realista de los posibles efectos sobre la salud de la población para determinar si se esperan o no efectos adversos para la salud. Además, sería útil para abordar problemas de gestión de riesgos más complejos, como el análisis del riesgo-beneficio o la ponderación de efectos adversos para la salud con respecto a otros factores (costo reducción del riesgo, beneficios económicos o de producción de alimentos) (Bosgra et al., 2009).

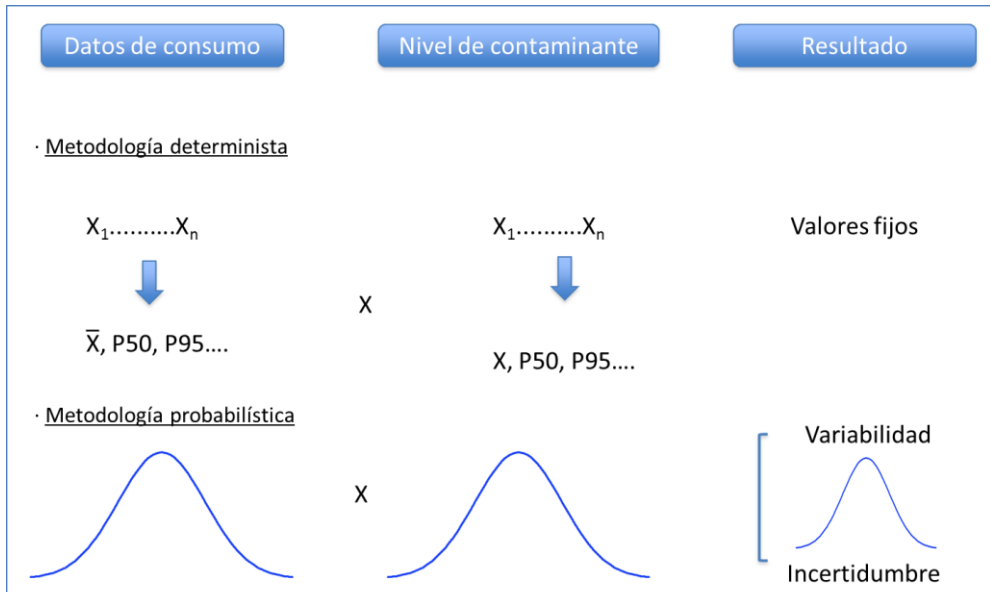
### *1.5.2. Metodología probabilística*

El método probabilístico es un método más avanzado en la estimación de la exposición. Permite conocer la distribución de ingestas entre múltiples individuos de una población específica, teniendo en consideración la variabilidad en el consumo de alimentos entre y dentro de los individuos y en la aparición de residuos en los productos alimenticios (EFSA, 2012a), así como las incertidumbres asociadas a los datos y modelos utilizados.

La principal ventaja que presenta este método frente a la metodología determinista, es la obtención de datos más realistas, al obtener un rango de posibles valores correspondientes a los diferentes niveles de exposición de los individuos de una población, en lugar de obtener un único dato como en el método determinista. Este enfoque requiere la previa definición de un modelo matemático para la exposición, que tenga en cuenta las distribuciones de las dos variables, y el uso de softwares adecuados que

realizan las iteraciones y los cálculos estadísticos necesarios, así como un alto nivel técnico (Kroes et al., 2002).

La Figura 3 muestra las distintas metodologías para la estimación de contaminantes a través de la dieta.



**Figura 3.** Metodologías para la evaluación de la exposición a contaminantes químicos en la población humana

### 1.5.3 Incertidumbres

El proceso de evaluación de la exposición a contaminantes químicos a través de la dieta, se ve afectado por numerosas fuentes de incertidumbre en cada etapa, contribuyendo cada una de ellas a la incertidumbre global del proceso de evaluación.



El criterio de incertidumbre definido por la EFSA, engloba todas aquellas limitaciones del conocimiento científico, incluidos los factores que determinan la exposición y la disponibilidad de datos; por ejemplo: la medición, el muestreo, la extrapolación, correlaciones o dependencias entre entradas, diferencias entre la opinión de expertos, etc. (EFSA, 2006).

Es tarea de los evaluadores del riesgo, a partir de la documentación científica y documentada disponible, caracterizar la incertidumbre para que los gestores del riesgo puedan tenerla en consideración en la siguiente fase.

El análisis de la incertidumbre puede no ser necesario en las evaluaciones de cribado, siempre que incluyan suposiciones conservadoras y valores por defecto para tener en cuenta la incertidumbre. Mientras que, en las refinadas, la evaluación de la incertidumbre, se debe realizar con un enfoque escalonado comenzando identificando las incertidumbres cualitativamente (nivel 1), éste puede ser suficiente si el resultado es suficientemente claro para los gestores del riesgo. De lo contrario, las incertidumbres que parecen críticas para el resultado pueden analizarse cuantitativamente; al principio, esto puede hacerse de manera determinista (Nivel 2) y luego, si es necesario y factible, probabilísticamente (Nivel 3) conduciendo a una mejor comprensión y caracterización de la incertidumbre. Las evaluaciones cuantitativas y probabilísticas, caracterizan la incertidumbre utilizando rangos, intervalos de confianza (IC) y distribuciones; acompañados de un texto explicativo y análisis cualitativo de las incertidumbres que siguen sin ser cuantificables (EFSA, 2006).

### 1.6. Contaminantes Químicos y sus Residuos en Alimentos

Los alimentos constituyen la principal ruta de entrada en el cuerpo humano de gran parte de contaminantes y otro tipo de sustancias indeseables o permitidas en cantidades superiores a los límites establecidos, que pueden entrañar graves riesgos para la salud de la población.

El Reglamento (CE) N° 315/93 define contaminante como cualquier sustancia que no haya sido agregada intencionadamente al alimento en cuestión, pero que sin embargo se encuentra en el mismo como residuo de la producción (incluidos los tratamientos administrados a los cultivos y al ganado y en la práctica de la medicina veterinaria), de la fabricación, transformación, preparación, tratamiento, acondicionamiento, empaquetado, transporte o almacenamiento de dicho alimento o como consecuencia de la contaminación medioambiental (Comisión Europea, 1993).

Los contaminantes químicos pueden tener diversos orígenes, tanto naturales como antropogénicos. Entre ellos podemos encontrar los residuos de productos fitosanitarios que se administran a los cultivos para la prevención de plagas o los contaminantes ambientales; que pueden generarse por actividades mineras o industriales y se distribuyen por tierra, aire y agua incorporándose a la cadena alimentaria, como las dioxinas, o los nitratos, cuya presencia deriva del uso de fertilizantes en producción primaria. Todos ellos son objeto de programas de vigilancia y de regulaciones internacionales que tienen como fin último preservar la calidad del medio ambiente, de los alimentos y la salud de la población. En Europa, los contenidos máximos de nitratos y dioxinas en los productos alimenticios quedan recogidos en el Reglamento (CE) N° 1881/2006 (Comisión Europea,

2006), y los límites máximos a residuos de plaguicidas en alimentos en el Reglamento (CE) N° 396/2005 (Parlamento y Consejo UE, 2005). En el contexto de esta tesis doctoral, los contaminantes seleccionados para la evaluación de su riesgo de exposición a través de la dieta han sido los plaguicidas y los nitratos, por su empleo intensivo en la agricultura de la Comunidad Valenciana y las dioxinas, debido a su peligrosidad (Tabla 1).

**Tabla 1.** Principales características de los contaminantes estudiados

SUSTANCIA QUÍMICA	RESIDUOS DE PLAGUICIDAS	NITRATOS	DIOXINAS
CLASIFICACIÓN	Agrícola	Ambiental	Ambiental
PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA EXPOSICIÓN	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Una buena limpieza y cocinado consigue eliminar parte</li> <li>· Cumplimiento LMR</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Eliminación de hojas verdes</li> <li>· Desechar agua de cocción</li> <li>· Cumplimiento de los contenidos máximos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Reducción de las emisiones en los procesos industriales</li> <li>· Vigilancia y Control a lo largo de la cadena alimentaria</li> </ul>
TOXICIDAD	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Pueden ser tóxicos, en función de la cantidad y modo de exposición</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· A dosis normales no hay toxicidad</li> <li>· Nitrato o nitrito en condiciones que den lugar a una nitrosación endógena, probable cancerígeno (2A)<sup>a</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Elevada toxicidad</li> <li>· Clasificada como carcinogénica la dioxina 2,3,7,8-TCDD (grupo 1)<sup>b</sup></li> </ul>
ALIMENTOS REGLAMENTADOS	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Frutas, verduras, semillas, cereales, especias, productos de origen animal, leche, huevos y miel (Reglamento (CE) N° 396/2005)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Verduras de hoja verde, agua, carne y alimentos infantiles elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad (Reglamento (CE) N° 1881/2006)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Carne y productos cárnicos, hígado, pescado y productos de la pesca, leche y productos lácteos, huevos, grasa y aceites de origen animal y vegetal (Reglamento (CE) N° 1881/2006)</li> </ul>

<sup>a</sup>IARC 2010, <sup>b</sup>IARC 1997

### *1.6.1 Plaguicidas*

Los productos fitosanitarios o plaguicidas son mezclas químicas que contienen una o varias sustancias activas y otros ingredientes, cuyo objetivo es proteger los vegetales y sus productos de organismos nocivos. También se consideran productos fitosanitarios a las sustancias que destruyen las plantas, regulan o inhiben la germinación. Los productos fitosanitarios contribuyen a aumentar los rendimientos en la agricultura y ayudan a asegurar una buena calidad en los alimentos. Pero al mismo tiempo, su utilización puede tener efectos desfavorables en la producción vegetal y también puede entrañar riesgos para los seres humanos, animales y el medio ambiente, lo que representa un coste demasiado alto para la sociedad (MITECO, 2018). Tales riesgos abarcan desde efectos de corta duración (irritación de la piel y ojos, dolores de cabeza, mareos y náuseas) hasta impactos crónicos (cáncer, asma y diabetes, entre otros) (Berrada et al., 2010). El riesgo a la exposición de residuos de plaguicidas es difícil de dilucidar debido a la participación de muchos factores: período y nivel de exposición, tipo de plaguicida (toxicidad y persistencia) y características ambientales de las áreas afectadas (Kim et al., 2017).

El uso de plaguicidas en España es intensivo. Sólo en 2016, se comercializaron 77.052 toneladas de productos fitosanitarios (MAPAMA, 2016). Además en el año 2014, la Comunidad Valenciana fue la segunda región en España y una de las regiones con el uso más alto de plaguicidas, con 11.839 toneladas consumidas (AEPLA, 2015). Por otra parte, se debe tener en consideración que, hasta el año 2015, la segunda causa de alerta en

el Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos (RASFF) de la UE fueron los plaguicidas.

En la UE la monitorización de los residuos de plaguicidas en alimentos esta armonizada a través del Reglamento (CE) N° 396/2005 (Parlamento y Consejo UE, 2005). Las concentraciones de residuos obtenidas en estos análisis permiten; por un lado, ayudar a identificar en un alimento la superación de un valor umbral, límite máximo de residuo (LMR), para poder asegurar que dichos residuos no presentan un riesgo inaceptable para los consumidores; y por otro, dar una estimación de la exposición a residuos de plaguicidas a través de la dieta. Al mismo tiempo, la predicción de esta exposición es esencial para aprobar el uso de plaguicidas y para obtener la aceptación oficial de los niveles de residuos mencionados anteriormente (Knezevic et al., 2012).

Los LMRs son límites legales que se calculan con el fin de garantizar que la exposición máxima esté muy por debajo del NOAEL, para el efecto toxicológico crítico en el que se basa la evaluación de riesgos (Boobis et al., 2008). Su cálculo se basa en las buenas prácticas agrícolas y no son límites toxicológicos, puesto que no representan la cantidad máxima de sustancia activa que puede ser perjudicial para la salud de los consumidores. Es decir, la superación de un LMR no implica necesariamente la existencia de un riesgo para la salud. Sin embargo, si se puede afirmar que son toxicológicamente aceptables porque su cumplimiento asegura que no producen efectos tóxicos en los individuos, incluidos los grupos vulnerables de la población, ni a corto ni a largo plazo.

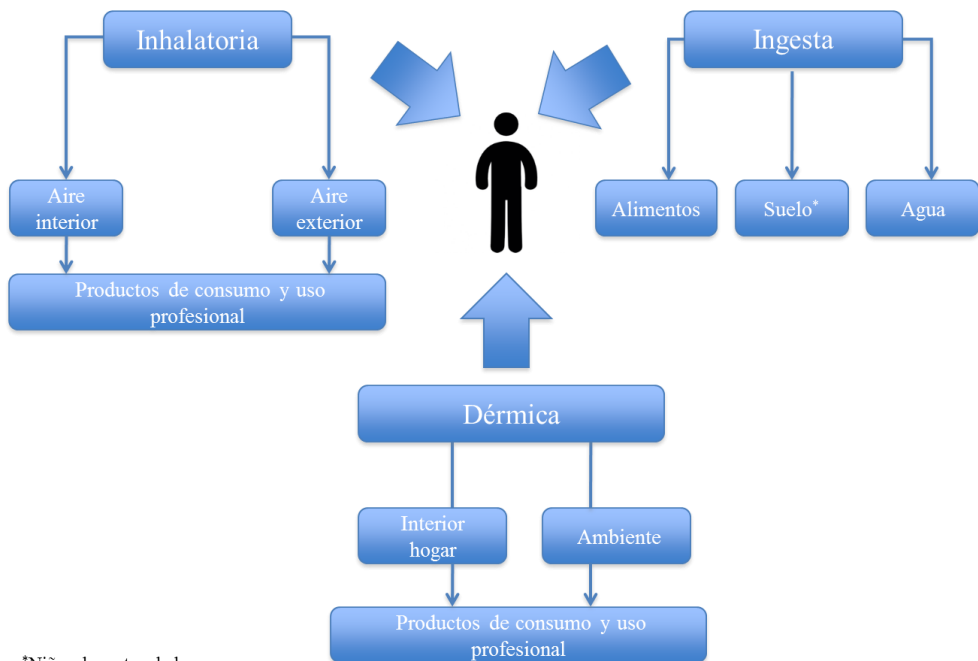
La EFSA recoge en un informe de 2017 los resultados del programa coordinado de control de la UE (EUCP) sobre residuos de plaguicidas en los alimentos correspondientes al año 2015 (EFSA, 2017a). Los resultados confirman la tendencia de los últimos años, mostrando que una amplia mayoría de los alimentos analizados, más de un 97%, cumplían con los LMRs fijados por la legislación alimentaria europea y, por lo tanto, eran seguros para el consumidor. Además, más del 53% de las muestras no contenían residuos en una cantidad cuantificable.

Dado que los alimentos deben estar libres de residuos de plaguicidas nocivos, los plaguicidas sólo se autorizarán para su uso una vez que una evaluación de riesgos independiente y la consiguiente acción de gestión del riesgo, confirmen que el uso correcto del producto no generará problemas de salud.

Aunque la exposición a plaguicidas puede ocurrir a través de diferentes vías: inhalatoria, dérmica e ingesta dietética (Figura 4); se estima que la exposición a través de la dieta es cinco veces mayor que otras vías o fuentes de exposición, tales como aire y agua potable (Juraske et al., 2009).

Son muchos los autores de distintos países los que han estudiado y publicado artículos referentes a dicha exposición (Boon et al., 2008; Caldas et al., 2006; Claeys et al., 2011; Knezevic et al., 2012; Wong et al., 2014; Gad Alla et al., 2015; Jensen et al., 2015; Lozowicka et al., 2016; Nasreddine et al., 2016; Li et al., 2016; Sieke et al., 2018; Elgueta et al., 2017; Larsson et al., 2018; Jardim et al., 2018 ;Li et al., 2017; Muller et al., 2009).

La mayoría de estudios han evaluado el riesgo derivado de la ingesta de frutas y verduras, debido a que son dos grupos de alimentos de especial importancia en la evaluación de la exposición a residuos de plaguicidas. Esto es atribuible a muchos motivos; por un lado, las frutas y las verduras están más expuestas a residuos de plaguicidas que otros grupos de alimentos



**Figura 4.** Vías y fuentes de exposición humana a plaguicidas

de origen vegetal y; además, la mayoría de ellas se ingieren crudas o semiprocesadas y, por tanto, el plaguicida suele persistir en su forma de aplicación original. Por otro lado, hay que tener en cuenta el aumento en la producción mundial de frutas, como resultado de una creciente demanda del consumo en los últimos años (FAOSTAT, 2013), haciendo de las frutas y

las verduras dos alimentos de especial importancia en la vigilancia y evaluación de la exposición a residuos de plaguicidas.

Respecto a la relación entre frutas y verduras tratadas con plaguicidas y la enfermedad del cáncer, un estudio llevado a cabo recientemente en Canadá (Valcke et al., 2017), evaluó los riesgos y beneficios para la salud humana asociados con el consumo a largo plazo de frutas y verduras que contenían residuos de plaguicidas. Los resultados de la evaluación sugirieron que, por cada cáncer inducido, se prevenían entre 87 y 113 casos de cáncer. Por lo tanto, desde la perspectiva del cáncer, el balance riesgo/beneficio es completamente favorable a los beneficios asociados con el consumo de frutas y verduras, a pesar de los residuos de plaguicidas que concurren (Valcke et al., 2017).

Los distintos autores que han evaluado el riesgo crónico a la exposición de plaguicidas a través de la ingesta de frutas y verduras, en general, apuestan por señalar que la exposición a largo plazo a organofosforados (OPs), carbamatos (CBs) y piretrinas y piretroides (PPs) no constituye una amenaza para la salud pública (Nasreddine et al., 2016; Wong et al., 2014) y, de haber un riesgo, éste es relativamente bajo para la salud de los consumidores (Nougadere et al., 2012).

En ocasiones se han publicado opiniones opuestas respecto a un posible riesgo agudo derivado de la exposición a residuos de plaguicidas, superando la dosis de referencia aguda (DRA) en algunos casos (Gad Alla et al., 2015), y otras con inapreciable riesgo tanto para adultos como niños (Claeys et al., 2011). La mayoría de los estudios que emplean una metodología determinista, plantean un posible riesgo evaluando la



exposición a OPs, en grupos vulnerables de población, como los niños; (Dimetoato 108% DRA) (Lozowicka et al., 2016); y asociados a un elevado consumo de frutas y verduras (Metidation 238% DRA) (Knezevic et al., 2012). Los plaguicidas OPs son los más empleados en agricultura y la población europea está más expuesta a residuos de OPs que otro tipo de regiones, como por ejemplo América (Kavvalakis y Tsatsakis, 2012).

Estas evaluaciones del riesgo agudo o crónico a la exposición de residuos plaguicidas generalmente se han llevado a cabo de manera individual; sin embargo, la población está expuesta diariamente a más de un plaguicida a través de la dieta, ya que los alimentos pueden contener más de un residuo, y al mismo tiempo, se consume una combinación de alimentos que contienen distintos residuos de plaguicidas. Si estos compuestos presentan efectos aditivos o sinérgicos, una evaluación de riesgos de manera individual puede dar lugar a una infraestimación del riesgo para la salud. Para abordar por tanto, el riesgo de exposición a estos compuestos, las exposiciones individuales deben abordarse de manera simultánea (Boon et al., 2008; Jensen et al., 2015; Li et al., 2016). Esta evaluación acumulada, permite alcanzar una mayor relevancia en la evaluación del riesgo (Gallagher et al., 2015), proporcionando a los responsables de la toma de decisiones, información basada en escenarios de exposición reales de una comunidad, asegurando por tanto, una caracterización del riesgo más realista.

Distintos organismos y agencias internacionales han mostrado la necesidad de una evaluación del riesgo de manera acumulada. Por primera vez en el año 1986, la EPA publicó directrices para una evaluación de

riesgos acumulada a mezclas químicas (EPA, 1986) y más tarde en el año 2002 a plaguicidas (EPA, 2002). En Europa, el informe “Evaluación de riesgos de mezclas de plaguicidas y mezclas similares” (FSA, 2002) publicado en el Reino Unido, recomendaba que se estableciera un marco científico y sistemático para decidir cuándo es apropiado llevar a cabo una evaluación de riesgos combinada de exposiciones a más de un plaguicida y/o medicamento veterinario. Más tarde el reglamento de la UE sobre LMR en los alimentos estipuló que las decisiones sobre los LMR deben tener en cuenta los efectos acumulativos de los plaguicidas, a medida que se disponga de los métodos para evaluar dichos efectos (Parlamento y Consejo UE, 2005). Además, el reglamento que regula la comercialización de plaguicidas estipula que éstos no deberían tener efectos nocivos, incluidos los efectos acumulativos, en los seres humanos (Parlamento y Consejo UE, 2009).

La EFSA ha publicado diversas opiniones sobre las metodologías para calcular el riesgo acumulado (EFSA, 2007; EFSA, 2008a, EFSA, 2013a). Por lo general, se recomienda el empleo de un enfoque escalonado para realizar evaluaciones de exposiciones acumuladas. Si una evaluación de nivel inferior (que probablemente sobreestime la exposición real del consumidor, no ofrece seguridad adecuada; entonces el evaluador de riesgos debe avanzar a un método de nivel superior, como la evaluación probabilística de la exposición basada en individuos (Muller et al., 2009; Sieke et al., 2018). Estas determinaciones se realizarán en grupos de plaguicidas cuyos efectos individuales podrían sumarse: grupos de acción acumulada (GAC). En el año 2013, la Comisión Técnica sobre Productos Fitosanitarios y sus Residuos (PPR) de la EFSA publicó una metodología

general para clasificar los plaguicidas en GAC. La metodología se basa en la suposición de que los plaguicidas que causan los mismos efectos tóxicos en los tejidos, órganos y sistemas fisiológicos, pueden producir toxicidad conjunta y acumulativa, incluso si no tienen modos de acción similares (EFSA, 2014).

La EFSA ha establecido GAC clasificándolos según los efectos neurotóxicos y sobre la tiroides que producen los plaguicidas (EFSA, 2013b), y actualmente está trabajando en el establecimiento de GAC para otros órganos, tejidos y sistemas. Por su parte, la EPA también ha identificado a algunos plaguicidas OPs, CBs y PPs que causan un efecto neurotóxico común (EPA, 2006; EPA, 2007; EPA, 2011). En la evaluación de la exposición acumulada a plaguicidas OPs y CBs, algunos autores agrupan ambos grupos, puesto que ambos producen el mismo efecto tóxico final, la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) (Jensen et al., 2003; Caldas et al., 2006; Li et al., 2017). Otros sin embargo, consideran que al no presentar los OPs y CBs el mismo mecanismo de acción (los OPs inhiben la AChE de manera casi irreversible, mientras que los CBs lo hacen de forma reversible), una evaluación acumulada de manera conjunta podría dar lugar a una sobreestimación del riesgo, y evalúan la exposición a OPs y CBs por separado (Boon et al., 2008; Jardim et al., 2018).

Son varios los métodos disponibles que se emplean para evaluar la toxicidad acumulada. Todos están interrelacionados, pero algunos son matemáticamente más complejos que otros. Los métodos más útiles en niveles crecientes de complejidad y refinamiento son: el índice de peligro (HI), el factor de potencia relativa (FPR) y el factor de equivalencia tóxica

(FET), (Boobis et al., 2008; Reffstrup et al., 2010; EPA, 2000). También se ha sugerido el índice de punto de partida (IPP), el margen de exposición (ME) y el índice de riesgo acumulado (IRC) (Reffstrup et al., 2010).

El índice de riesgo es la suma de los cocientes de riesgo (HQ), es decir, la relación entre la exposición y el valor de referencia respectivo para cada compuesto en el GAC. Estos índices pueden ser relativamente rápidos y simples de calcular, aparte de ser un método transparente y comprensible para evaluar el riesgo.

En el enfoque de factor de potencia relativa, la potencia toxicológica de cada sustancia se expresa en relación con la potencia de una de las sustancias, el compuesto índice (CI). Estos factores FPR se utilizan para normalizar la exposición de cada sustancia a un rendimiento de exposición total en equivalentes del CI, que posteriormente se suman y la evaluación de riesgos se realiza con un sólo compuesto químico. En el enfoque del FPR, los productos químicos se comportan de forma aditiva a la dosis, es decir, la dosis de cada producto químico puede reemplazarse por una dosis igualmente efectiva de otro. Los requisitos para la adición de dosis son que las sustancias tienen un modo de acción similar, que no interactúan y que sus curvas dosis-respuesta son paralelas (Larsen et al., 2002; Safe, 1998). El término FPR se aplica en evaluaciones del riesgo acumuladas a residuos de plaguicidas y en situaciones donde el modo de acción parece similar, pero el mecanismo exacto es complejo y tal vez no se conoce en detalle (EPA, 2000).

La mayoría de los estudios actuales que realizan una evaluación acumulada del riesgo a residuos de plaguicidas se centran principalmente en

el método HI (Elgueta et al., 2017; Larsson et al., 2018) y FPR (Zentai et al., 2016; Jardim et al., 2018; Quijano et al., 2016). Según el método empleado para la evaluación acumulada, los resultados de la caracterización del riesgo se expresan en relación al HI (Gad Alla et al., 2015; Li et al., 2016) o al valor de referencia toxicológico, DRA (Li et al., 2017; Zentai et al., 2016)) o IDA (Nasreddine et al., 2016; Quijano et al., 2016).

La Tabla 2 recoge distintos estudios publicados recientemente sobre la evaluación de la exposición aguda, crónica y acumulada a residuos de plaguicidas a través de la dieta. Los estudios que evalúan la exposición aguda acumulada a residuos de plaguicidas en el escenario UB (escenario del límite superior) y empleando una metodología probabilística, coinciden en la no posibilidad de riesgo para la población adulta en el nivel medio de exposición. Sin embargo, para la población infantil, algunos de ellos coinciden en la posibilidad de un mínimo riesgo al superar la DRA en niveles muy elevados de exposición (percentil 99); el 0.05% de la población húngara de 3 a 9 años (Zentai et al., 2016) y el 0.029% de la población de Shanghai de 2 a 6 años (Li et al., 2017).

Respecto a la evaluación de la exposición crónica acumulada, por lo general, no se aprecia un posible riesgo de exposición, tanto para adultos como para niños. Solamente se considera un posible riesgo empleando la metodología determinista, debido a la exposición de determinados plaguicidas OPs. Tal es el caso de Chile, HI<sub>c</sub>: 135% cuando se incluye metamidofos en la evaluación de la exposición (Elgueta et al., 2017); y Polonia HQ<sub>c</sub>: 528% y 135% para adultos y niños respectivamente, siendo diazinón, dimetoato y clorpirifos los principales contribuyentes a dicha exposición (Lozowicka et al., 2016).

**Tabla 2.** Estudios procedentes de diferentes países sobre la evaluación de la exposición aguda, crónica y acumulada a residuos de plaguicidas a través de la dieta

Año	País	Plaguicida	Metodología	Alimento	Datos de consumo	Población	Evaluación	Caracterización del riesgo en el nivel medio de exposición	Referencia
2016	Hungría	OPs	Probabilístico	18 grupos de diferentes frutas y verduras	REG de 3 días	Población general	Evaluación del riesgo agudo acumulado	DRA <sup>d</sup> : <100% <sup>b</sup>	Zentai et al., 2016
2018	Brasil	OPs, CBs y PPs	Probabilístico	30 grupos de diferentes frutas y verduras	REG de 2 días	Población >10 años	Evaluación del riesgo agudo acumulado	DRA <sup>d</sup> : <100% <sup>b</sup>	Jardim et al., 2018
2017	China (Shanghai)	OPs y CBs	Probabilístico	Diferentes grupos de 9 vegetales y 7 frutas	Recordatorio de 24 horas	Población general	Evaluación del riesgo agudo acumulado	DRA <sup>d</sup> : <100% <sup>f</sup>	Li et al., 2017
2015	Dinamarca	OPs y CBs <sup>a</sup>	Determinista	25 grupos de diferentes frutas, verduras y cereales	REG de 7 días	Adultos y niños	Evaluación del riesgo crónico acumulado	HI<1 adultos y niños <sup>e</sup>	Jensen et al., 2015
2016	China	PPs	Semi-probabilístico	4 grupos de diferentes frutas	GEMS/Food Cluster Diet 2012	Población general y niños	Evaluación del riesgo crónico acumulado	IDA <sup>d</sup> : <100%	Li et al., 2016
2017	Chile	OPs, CBs y PPs <sup>a</sup>	Determinista	Vegetales de hoja verde (lechuga, acelga y espinaca)	GEMS/Food Cluster Diet 2012	Población general	Evaluación del riesgo crónico acumulado	Hi <sub>c</sub> : 135% debido a methamidophos	Elgueta et al., 2017

Continúa en página siguiente.

Continuación de la Tabla 2

Año	País	Plaguicida	Metodología	Alimento	Datos de consumo	Población	Evaluación	Caracterización del riesgo en el nivel medio de exposición	Referencia
2017	Dinamarca	OPs, CBs, PPs <sup>a</sup>	Determinista	47 grupos de diferentes frutas, verduras, bebidas y cereales	REG de 7 días	Población general	Evaluación del riesgo crónico acumulado	IDA <sup>d</sup> : <100%	Larsson et al., 2018
2016	Libano	OPs y CBs <sup>a</sup>	Determinista	21 grupos de diferentes alimentos de origen vegetal y bebidas	CFCA semicuantitativo	Adultos	Evaluación del riesgo crónico	IDA <sup>c</sup> : <100%	Nasreddin e et al., 2016
2014	China (Hong Kong)	OPs CBs y PPs <sup>a</sup>	Semi-probabilístico	15 grupos de diferentes frutas, verduras, cereales, bebidas, carne, productos lácteos, huevos, aceites y snacks	Recordatorio de 24 horas	Adultos	Evaluación del riesgo crónico	IDA <sup>c</sup> : <100%	Wong et al., 2014
2015	Egipto	OPs, CBs y PPs <sup>a</sup>	Determinista	6 grupos de diferentes verduras	GEMS/food Total Diet Studies 2006	Población general y niños	Evaluación del riesgo crónico	IDA: <100%	Gad Alla et al., 2015
2016	Polonia	OPs, CBs y PPs <sup>a</sup>	Determinista	11 grupos de diferentes frutas	GEMS/food Cluster Diet 2012	Adultos, niños y lactantes	Evaluación aguda, crónica y acumulada	HQ <sub>c</sub> lactantes y adultos <sup>c*</sup> : 528.33% y 135% OPs <24% y <5% PPs 2.34 % y 0.58% CBs	Lozowicka et al., 2016
2017	Alemania	OPs, CBs y PPs <sup>a</sup>	Probabilístico	24 grupos de frutas, verduras, cereales, lácteos y carnes	REG de 3 días y CFCA	Población general	Evaluación aguda, crónica y acumulada	IDA <sup>c</sup> : <100% <sup>e</sup> DRA <sup>c</sup> : <100% <sup>e</sup>	Sieke et al., 2017

<sup>a</sup>Para el cálculo de la exposición contemplan otros plaguicidas diferentes a los que son objeto de estudio, <sup>b</sup>Percentil 99 de exposición, <sup>c</sup>LB: escenario del límite inferior, <sup>d</sup>UB: escenario del límite superior, <sup>e</sup>MB: escenario límite intermedio, <sup>f</sup>: chlorpyrifos como compuesto índice, <sup>\*</sup>consumidores y concentraciones más altas IDA: ingesta diaria admisible, DRA: dosis de referencia aguda, HQ: índice de riesgo, HI<sub>c</sub>: índice de riesgo acumulado, CFCA: cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos, REG: cuestionario del registro de consumo de alimentos

### *1.6.2 Nitratos*

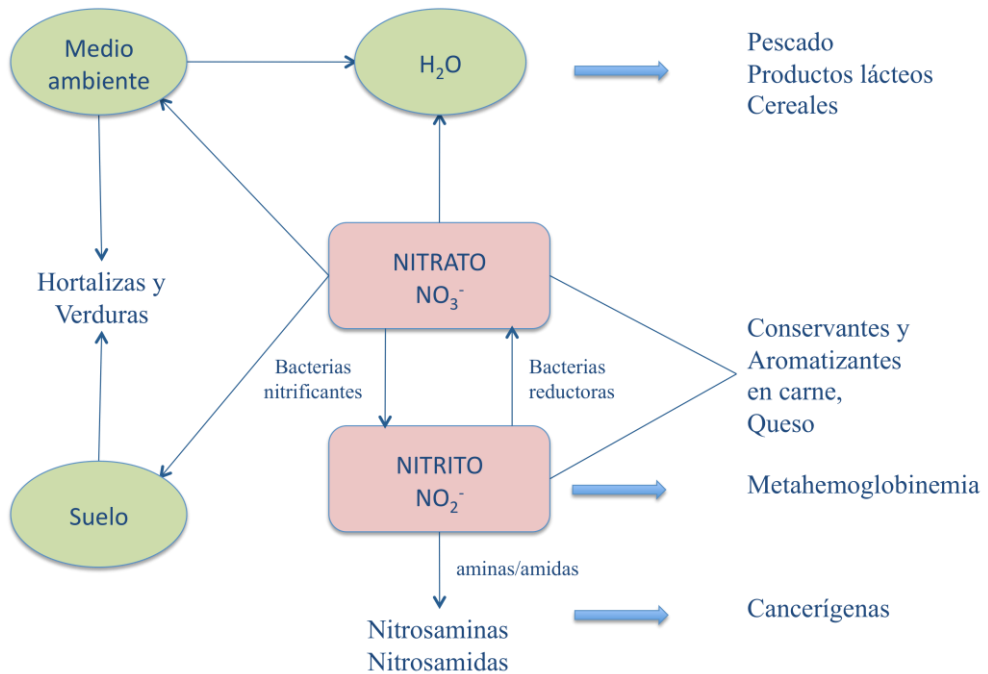
Los nitratos son compuestos iónicos que forman parte del ciclo del nitrógeno, son esenciales para el ecosistema y pueden encontrarse de forma natural en el suelo, la superficie, el agua subterránea y en la biomasa (EFSA, 2013c). Son empleados de manera intensiva en la agricultura de la Comunidad Valenciana.

Debido a diversas actividades agrícolas o industriales como el uso de fertilizantes químicos, que ha permitido un incremento significativo en la producción de alimentos (Mosier et al., 2005); el exceso de residuos por explotaciones ganaderas intensivas y la alta concentración en aguas residuales urbanas; los nitratos producen un excedente de nitrógeno en el suelo. Este exceso de nitrógeno se absorbe en forma de nitrato por las plantas, o se acumula en el suelo, filtrándose fácilmente a los sistemas acuíferos y finalmente al agua de bebida. Las plantas absorben más nitratos de los que necesitan, y como consecuencia, altos niveles de nitratos pueden acumularse en las plantas y en los vegetales (EFSA, 2013c). Los nitratos están autorizados como aditivos en la industria alimentaria, identificados por los códigos europeos E-251 y E-252 (Parlamento y Consejo UE, 2011). Se utilizan en productos de carne, pescado y queso para mejorar su sabor, proporcionar el color rojo característico de la carne e inhibir el crecimiento de bacterias (Gassara et al., 2016).

La exposición humana a nitratos es principalmente exógena a través del consumo de vegetales (Archer, 2002; WHO, 2007) y en menor medida a través de agua y aditivos autorizados usados en la conservación de productos cárnicos (Figura 5). Los niveles más altos de nitratos tienden a



encontrarse en las hojas, mientras que los niveles más bajos en semillas y tubérculos. Como consecuencia, los cultivos de hoja, como lechuga y espinaca, generalmente presentan concentraciones más altas de nitratos (EFSA, 2008b; EFSA, 2013c).



**Figura 5.** Fuentes de exposición humana a nitratos

Los nitratos son relativamente poco tóxicos por debajo de los límites máximos, su toxicidad está asociada a su conversión a nitrito; por reducción bacteriana durante el procesado y almacenamiento de los alimentos, y también en el propio organismo (saliva y tracto gastrointestinal) (EFSA, 2008b). Los nitritos pueden reaccionar con los aminoácidos de los alimentos en el estómago, formando compuestos N-nitroso (Santamaria, 2006;

Lundberg et al., 2008), conocidos por su carcinogenicidad. Por otro lado, al pasar a la sangre oxidan la hemoglobina, impidiendo el transporte de oxígeno a los tejidos y generando la enfermedad conocida como metahemoglobinemia, enfermedad grave sobre todo para los bebés. Estos efectos, hacen que el nitrato tenga importancia desde el punto de vista regulador debido a sus implicaciones potencialmente adversas para la salud, como metahemoglobinemia y carcinogénesis (EFSA, 2008b).

Es bien conocido, que los niños lactantes (0 a 3 años) son el grupo más sensible a la exposición de nitratos (Fan A., 2011), probablemente al consumo de las altas cantidades contenidas en los vegetales (principalmente espinaca) y al almacenamiento inadecuado de los vegetales cocidos (EFSA, 2010a).

Recientemente se han llevado a cabo varios estudios en los que se intenta demostrar la asociación entre consumo de nitratos y nitritos con distintos tipos de cáncer, incluido cerebro, esófago, estómago o cáncer colorrectal. Si bien la evidencia obtenida no es concluyente (Gumanova et al., 2016; Milkowski et al., 2010; Bryan et al., 2012), la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC/WHO, 2010) concluyó que el nitrato o el nitrito ingeridos en condiciones que den lugar a la nitrosación endógena, son probables cancerígenos para los seres humanos (grupo 2A).

Los resultados del estudio desarrollado por el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos en miembros de la Asociación Americana de Personas Retiradas (NIH-AARP) (Habermeyer et al., 2015), obtuvieron riesgos elevados asociados con la ingesta de nitrato con varios tipos de

cáncer en humanos, incluidos los tumores de la glándula tiroides, el ovario, el riñón y la vejiga, concluyendo que el nitrato ingerido en condiciones que den lugar a una nitrosación endógena, no se puede excluir que pueda conducir a un mayor riesgo de cáncer y probablemente sean cancerígenos para los humanos.

Sobre la base de la evidencia disponible, los expertos de la EFSA en el año 2017 determinaron que los niveles seguros existentes para nitratos y nitritos añadidos a la carne y otros alimentos son suficientemente protectores para los consumidores, y no hay necesidad de modificar los niveles de seguridad previamente establecidos para dichas sustancias. En una evaluación de la exposición más refinada, los expertos analizaron dos estimaciones. Por un lado, observaron que la exposición de los consumidores únicamente a partir de los aditivos alimentarios era inferior al 5% de la exposición general al nitrato en los alimentos, y por lo tanto no excedía los niveles de seguridad, excepto por una ligera superación en los niños cuya dieta puede ser alta en alimentos que contienen estos aditivos. Por otro lado, si se consideran todas las fuentes de nitrato en la dieta (aditivos alimentarios, presencia natural en los alimentos, aguas y contaminantes ambientales), el nivel de seguridad puede excederse para las personas de todos los grupos de edad con una exposición de media a alta (EFSA, 2017b).

A pesar de estos efectos perjudiciales reconocidos, la ingesta de nitratos se ha relacionado con distintos efectos beneficiosos para la salud humana, debido al óxido nítrico que se obtiene por su reducción bacteriana en la saliva y tracto gastrointestinal. El óxido nítrico es un potente

vasodilatador y presenta un papel crítico en la homeostasis vascular, reduciendo la presión arterial en individuos sanos (Larsen et al., 2006), no siendo tan evidente en pacientes con morbilidad (Bondonno et al., 2017), generando una mayor tolerancia al ejercicio físico (Habermeyer et al., 2015; Clements et al., 2014) y obteniendo un menor riesgo de enfermedad cardiovascular, infarto de miocardio y accidente cardiovascular (d'El-Rei et al., 2016; Joshipura et al., 2001; Bondonno et al., 2016).

Con el fin de evitar posibles efectos adversos en la salud humana, la Comisión Europea ha establecido niveles máximos para nitratos en determinados vegetales de hoja comestible (espinacas, lechugas y rúcula), en alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles destinados a lactantes y niños de corta edad (Comisión Europea, 2006). Por su parte, la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) ha publicado recomendaciones en relación al consumo de acelgas y espinacas, para bebés y niños de corta edad, con el objetivo de disminuir su exposición (AECOSAN, 2011).

Previamente, el Comité Científico sobre Alimentación Humana (SCF) en 1990 estableció una IDA para el nitrato a partir de un NOAEL de 370 mg de nitrato/ kg p.c./día determinado en estudios a largo plazo en ratas y de toxicidad subcrónica en perros. Aplicando un factor de incertidumbre de 100, una IDA de 222 mg/día (0-3.7 mg /kg p.c. /día) fue establecida para el nitrato (SCF, 1992). Ésta fue confirmada en 1995 (SCF, 1997) y más tarde por el JECFA en 2002 (FAO/WHO, 2003).

Por su parte, el Panel de Contaminantes de la Cadena Alimentaria (CONTAM) de la EFSA concluyó que a falta de nuevas medidas

toxicológicas y datos toxicocinéticos, no había necesidad de reconsiderar esta IDA (EFSA, 2008b). En su evaluación a la ingesta de nitratos, este mismo panel de la EFSA, observó que los hábitos de consumo difieren significativamente entre individuos, así como la mediana de las concentraciones de nitrato en diferentes vegetales (de 1 mg/kg en guisantes y coles de Bruselas a 4800 mg/kg en rúcula). Debido a estas variaciones en la exposición al nitrato, las estimaciones de la ingesta media de los estudios de población varían entre países e incluso entre regiones, observándose una mayor ingesta en los países mediterráneos y una menor ingesta en el norte de Europa (Mensinga et al., 2003).

En Europa, una persona que consume 400 gramos de diferentes vegetales al día, la ingesta media estimada de nitrato es de aproximadamente 157 mg /día equivalente a 2,6 mg /kg de peso corporal/día basado en un peso corporal de 60 kg (EFSA, 2008b). Esta concentración no supera la IDA incluso teniendo en cuenta la exposición al nitrato a través de otras fuentes dietéticas. Considerando que para la mayoría de la población la fruta, que contiene bajos niveles de nitrato, del orden de 10mg /kg (EFSA, 2008b), comprende hasta la mitad de la ingesta diaria total recomendada de 400 gramos de vegetales y frutas; la ingesta real de nitrato se reduciría entre 81-106 mg/día para la mayoría de la población de la UE.

La exposición a nitratos en personas que consumen grandes cantidades de verduras ricas en nitratos como la lechuga, la espinaca, la rúcula y la remolacha pueden ser considerablemente más altas que el valor medio y por consiguiente puede exceder la IDA (Habermeyer et al., 2015).

Una revisión llevada a cabo por (Weitzberg y Lundberg, 2013) en Suecia, estudió las implicaciones nutricionales del nitrato en la salud humana, analizando dos variantes de la dieta “Enfoques Dietéticos para Detener la Hipertensión” (Dieta DASH), eligiendo alimentos pertenecientes a la dieta DASH con alto y bajo contenido en nitratos. La dieta DASH alta en nitratos, contenía un nivel de 1,222 mg de nitrato, mientras que la dieta DASH baja en nitratos, 147 mg; demostrando que los patrones dietéticos que cumplen con la ingesta recomendada de frutas y verduras pueden variar tanto como un 700 % en contenido de nitrato (Weitzberg y Lundberg, 2013).

Este hecho, aparte de ser tomado en consideración en relación con algunas de las recomendaciones dietéticas actuales emanadas por las autoridades nacionales e internacionales; teniendo en cuenta que el 80% de la ingesta de nitratos procede del consumo de vegetales y que su consumo aumenta constantemente, especialmente en los países desarrollados (Brkic et al., 2017); así como las controversias de seguridad humana en torno a los nitratos en la dieta que todavía existen en la comunidad académica (Sindelar y Milkowski, 2012), hace de los nitratos uno de los compuestos más importantes en la evaluación del riesgo a través de la dieta.

En la evaluación de la exposición a nitratos a través de la dieta, hay que tener en cuenta que el nitrato, al formar parte del ciclo del nitrógeno, la concentración en los vegetales se ve afectada por factores como la especie vegetal, las condiciones climáticas, las características del suelo y los fertilizantes aplicados (Czech y Rusinek, 2005). Las concentraciones en las partes comestibles de los vegetales pueden variar. Es por esto, que el factor

determinante para una alta exposición a nitrato a través de la dieta no es el consumo de vegetales, sino el tipo de vegetal y la concentración de nitratos relacionada con las condiciones de producción. Así, algunos vegetales especialmente los de hoja comestible, como lechugas y espinacas, suelen aportar altas concentraciones de nitratos. Y los vegetales cultivados en condiciones con baja intensidad luminosa, como en el período de invierno o en invernadero, presentan concentraciones más elevadas de nitratos. De esta manera, dos estudios llevados a cabo en Croacia (Brkic et al., 2017) e Irán (Nowrouz et al., 2012) estudiaron la variación del contenido de nitratos en vegetales en relación con los periodos estacionales; determinando concentraciones de nitratos significativamente superiores en los vegetales cultivados en otoño, respecto a los cultivados en primavera.

Son muchos los autores procedentes de distintos países como Francia (Menard et al., 2008), España (Pardo-Marin et al., 2010), China (Chen et al., 2011), Bélgica (Temme et al., 2011), Nueva Zelanda (Thomson et al., 2007), Polonia (Anyzewska y Wawrzyniak, 2014; Mitek et al., 2013; Raczuk et al., 2014) y Croacia (Brkic et al., 2017) los que han evaluado el riesgo a la ingesta de nitratos a través de la dieta. Temme et al., 2011; Menard et al., 2008 y Thomson et al., 2007 estimaron la ingesta de nitratos en diferentes grupos de alimentos, y observaron que los vegetales eran los principales contribuyentes a la ingesta dietética de nitratos.

El resto de autores evaluaron la ingesta de nitratos a través del consumo de vegetales (Pardo-Marin et al., 2010; Anyzewska y Wawrzyniak, 2014; Raczuk et al., 2014) apreciaron que no existía un posible riesgo a

través de la ingesta de vegetales para el consumidor medio, mientras que (Chen et al., 2011) en China demostró lo contrario.

Por otra parte, algunos autores determinaron probabilidades de riesgo en consumidores que ingieren elevadas cantidades de vegetales, como los vegetarianos (Mitek et al., 2013), y especialmente de hoja (Brkic et al., 2017).

La Tabla 3 muestra diferentes estudios publicados sobre la evaluación de la exposición crónica a nitratos a través de la dieta. Ni la población adulta ni la población de los niños, presentan un posible riesgo debido a la exposición a nitratos a través de la dieta. Solamente se ha apreciado un posible riesgo de exposición, cuando no se siguen buenas prácticas agrícolas (bpa) 120% IDA (Chen et al., 2011); o se consumen vegetales de hoja verde cultivados en otoño 135.9% IDA (Brkic et al., 2017)

### *1.6.3. Dioxinas*

Las policlorodibenzodioxinas (PCDDs), policlorodibenzofuranos (PCDFs) y policlorobifenilos (PCBs) son contaminantes orgánicos persistentes (COP) de gran preocupación debido a su persistencia, bioacumulación en el medio ambiente y tendencia a la biomagnificación en las redes alimentarias (EFSA, 2012b; Kulkarni et al., 2008), así como su elevada toxicidad. El término “dioxinas” se refiere en un principio a un grupo de 75 PCDDs y 135 congéneres de PCDFs. De todos ellos, sólo los sustituidos en cada una de las posiciones 2, 3, 7 y 8 de los dos anillos aromáticos (7 PCDDs y 10 PCDFs), son relevantes por su asociación con



**Tabla 3.** Estudios procedentes de distintos países sobre la evaluación de la exposición a nitratos a través de la dieta

<b>Año</b>	<b>País</b>	<b>Alimento</b>	<b>Población</b>	<b>Datos de Consumo</b>	<b>Resultado de la caracterización del riesgo en el nivel medio de exposición</b>	<b>Referencia</b>
2007	Nueva Zelanda	Diferentes grupos de alimentos	Adultos	Recordatorio de 24 horas	14% IDA	Thomson et al., 2007
2011	Bélgica	Diferentes grupos de alimentos	Adultos	Recordatorio de 24 horas	38 % IDA	Temme et al., 2011
2008	Francia	Diferentes grupos de alimentos	Adultos y niños	REG 7 días consecutivos	40.5 % IDA adultos 51.4 % <sup>a</sup> - 54.1 % <sup>b</sup> IDA niños	Menard et al., 2008
2010	España	Vegetales	Adultos y niños	REG 3 días consecutivos	29% IDA adultos 15.1% IDA niños	Pardo et al., 2010
2011	China	Vegetales	Adultos	Recordatorio de 24 horas	120 %IDA	Chen et al., 2011

Continúa en la página siguiente

Continuación de la Tabla 3

<b>Año</b>	<b>País</b>	<b>Alimento</b>	<b>Población</b>	<b>Datos de Consumo</b>	<b>Resultado de la caracterización del riesgo en el nivel medio de exposición</b>	<b>Referencia</b>
2013	Polonia	Vegetales	Adultos	Consumidor medio: GUS Vegetarianos: REG	35.4 % IDA	Mitek et al., 2013
2014	Polonia	Vegetales	Adultos	EPF	41 % IDA	Anyzewska y Wawrzyniak, 2014
2014	Polonia	Vegetales	Adultos	Hipotético consumo de 100gr	96 % IDA*	Raczuk et al., 2014
2017	Croacia	Vegetales de hoja	Adultos	EFSA, 2008	40.7 % <sup>c</sup> -135.9 % <sup>d</sup> IDA	Brić et al., 2017

<sup>a</sup>LB: escenario del límite inferior,

<sup>b</sup>UB: escenario del límite superior, <sup>c</sup>col rizada, <sup>d</sup>espinaca en otoño

REG: cuestionario de registro del consumo de alimentos,

GUS: oficina central de estadística de Polonia,

EPF: encuesta de presupuesto familiar,

\*por 100 gr de consumo de vegetales

posibles efectos adversos para la salud humana y animal (EFSA, 2015). Especialmente 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (2,3,7,8-TCDD) que fue evaluada como carcinogénica para los seres humanos (carcinógeno de grupo 1) por la IARC en 1997 (IARC/WHO, 1997). La toxicidad está principalmente determinada por la unión al receptor de hidrocarburo de arilo (Ah), induciendo la síntesis de proteínas.

Además, 12 congéneres de PCBs (PCB coplanar no-orto y mono-orto) son también estructuralmente capaces de unirse al receptor Ah y tienen propiedades toxicológicas similares a 2,3,7,8-TCDD, por lo que reciben el nombre de PCB similares a dioxinas (dl-PCB) (EFSA, 2015).

Las PCDDs y PCDFs se generan como subproductos no intencionados en numerosos procesos de combustión: incineración de residuos, incendios forestales, erupciones volcánicas, etc. Otros procesos industriales, como el blanqueo de la pasta de papel y fabricación de plaguicidas clorados, son también una fuente importante de emisión de dioxinas al medio ambiente. Los PCBs, son compuestos químicos sintéticos que se han empleado en numerosas aplicaciones industriales, como fluidos dieléctricos en transformadores y fluidos de transferencia de calor, debido a su no inflamabilidad y propiedades de aislamiento eléctrico. Aunque su producción y uso se prohibió en el año 1985, actualmente se detectan PCBs en diversos tejidos de animales y de humanos, así como en la cadena alimentaria (EFSA, 2010b).

Se ha encontrado que la exposición crónica en humanos a dioxinas causa serios efectos adversos para la salud, incluidos los reproductores y de desarrollo, efectos neurológicos y de comportamiento, toxicidad dérmica,

efectos inmunomoduladores y carcinogénicos (Van den Berg et al., 1998; WHO, 1998; Birnbaum y Tuomisto, 2000; ATSDR, 2002; Bencko, 2003; Hays y Aylward, 2003; Steenland et al., 2004)

Además, se ha observado un mayor riesgo de padecer diabetes tipo 2 debido a la exposición a dioxinas (Fujiyoshi et al., 2006) y se han relacionado con aterosclerosis, hipertensión, y problemas endocrinos; y a corto plazo, con la alteración de la función hepática y cloracné (Marinkovic et al., 2010).

Para fines de evaluación de riesgos, la OMS desarrolló una equivalencia de toxicidad (EQT) para describir la toxicidad acumulada de las mezclas complejas de estos compuestos. Por definición, al congénere más tóxico, 2,3,7,8-TCDD, se le asigna un FET de 1. Los FET para las otras dioxinas tóxicas y dl-PCB están entre 0 y 1, lo que indica la magnitud de su toxicidad en comparación con la 2,3,7,8-TCDD. Aplicando el enfoque FET, los efectos aditivos de los compuestos químicos en una mezcla pueden evaluarse sumando los productos de las concentraciones o dosis de cada congénere individual multiplicados por su FET correspondiente, dando como resultado, EQT de las mezclas existentes (Schwarz et al., 2014).

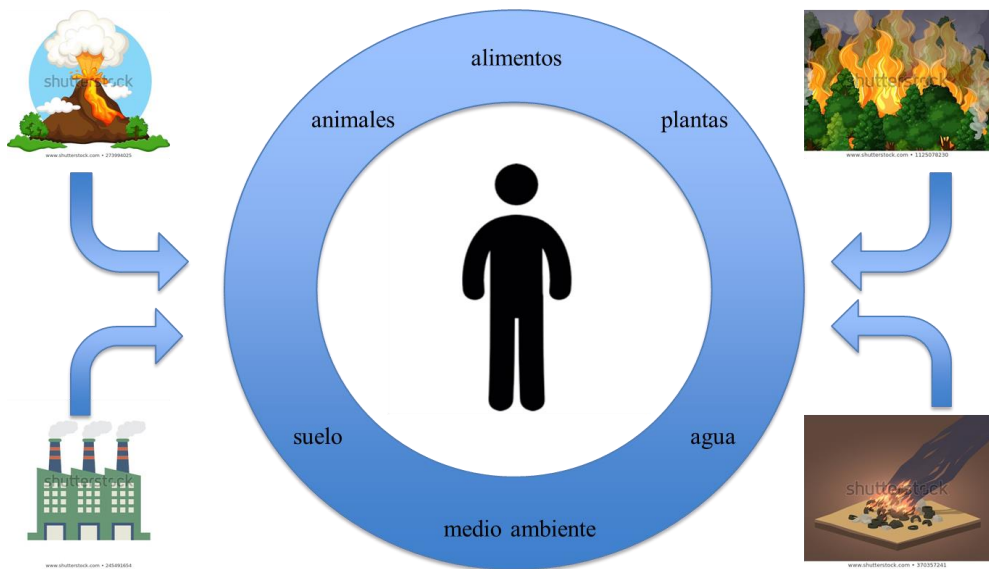
El método de FET es un caso especial de FPR, y se aplica a grupos de sustancias con un alto grado de similitud y equivalencia toxicológica en todos los puntos finales y en todas las condiciones de exposición (EPA, 2000), como en el caso de las dioxinas.

La actual legislación de la UE emplea los FET establecidos por la OMS en 2005, de manera que los resultados son expresados como EQT WHO<sub>05</sub> (EFSA, 2015).

Debido a la considerable preocupación pública, científica y legislativa sobre los efectos negativos en la salud humana y en el medio ambiente de la exposición a largo plazo, incluso a las cantidades más pequeñas, de dioxinas, diversos organismos internacionales, europeos y nacionales han desarrollado distintas recomendaciones, estrategias y han establecido límites máximos de exposición. Así, en el año 2000 la OMS estableció un rango de ingesta diaria tolerable (IDT) de 1-4 pg de EQT kg<sup>-1</sup> peso corporal (pc) para las dioxinas (WHO, 2000). En el mismo año, el SCF evaluó los riesgos para la salud pública derivados de la presencia de dioxinas en los alimentos, y en consecuencia se estableció una ingesta semanal tolerable (IST) de 14 pg WHO-TEQ kg<sup>-1</sup> pc y se implementó una estrategia para reducir los niveles de ingesta humana por debajo de este umbral, actuando en las fuentes de emisión y disminuyendo la presencia de los mismos en los alimentos (SCF, 2001). Asimismo, como parte de esta estrategia y para prevenir el riesgo de exposición a estos contaminantes, la Comisión introdujo un control regular por parte de los estados miembros en alimentos y piensos, tanto para dioxinas y furanos como para PCBs; y el Reglamento N° 1881/2006 estableció niveles máximos para dioxinas y la suma de dioxinas y dl-PCBs en alimentos de origen animal y aceites vegetales (Comisión Europea, 2006). Recientemente, el Panel de Contaminantes de la EFSA ha establecido una nueva IST para dioxinas y dl-PCBs de 2 pg kg<sup>-1</sup> p.c., un valor siete veces menor que el establecido en 2001 (EFSA, 2018).

La principal fuente de exposición humana a dioxinas son los alimentos (Liem et al., 2000), especialmente los productos grasos de origen

animal (Costopoulou et al., 2016) y los productos de la pesca (Fernandez-Gonzalez et al., 2015; Domingo y Bocio, 2007; Malisch y Kotz, 2014) debido a su carácter lipofílico. La Figura 6 muestra las vías de exposición humana a dioxinas. Se estima que más del 90% de esta exposición es debida a la dieta; y en menor medida, a la exposición dérmica o inhalatoria. Por tanto, la evaluación de la ingesta dietética es crucial en la evaluación del riesgo de exposición a dioxinas (Arisawa et al., 2008).



**Figura 6.** Fuentes de exposición humana a dioxinas

Los grupos de población más vulnerables a esta exposición, integran aquellos individuos que pueden estar expuestos a mayores concentraciones, bien por sus dietas (grandes consumidores de alimentos grasos de origen

animal o de productos de la pesca) o su trabajo (trabajadores de la industria del papel, plantas de incineración y vertederos de desechos peligrosos).

Se ha relacionado también la dieta de las mujeres embarazadas con la concentración de dioxinas en sangre del cordón umbilical (Halldorsson et al., 2008), puesto que durante el embarazo las dioxinas pueden transferirse de la madre, a la placenta y al feto (Tsukimori et al., 2013); y más tarde, debido a su carácter lipofílico a la leche materna (Halldorsson et al., 2008), constituyendo una vía considerable de exposición al recién nacido.

Se ha estudiado por diferentes autores la exposición a dioxinas en mujeres en edad fértil (Ingelido et al., 2017) y en período de lactancia (Ulaszewska et al., 2011); determinando que la edad, la ingesta de pescado, y la residencia en áreas industriales frente a áreas urbanas, se asocia significativamente con la concentración de PCDDs, PCDFs y PCBs. En cuanto a la evolución temporal, se observa una disminución en los últimos años en la concentración de estos contaminantes, debido probablemente a las reglamentaciones y restricciones sobre el uso y producción de estas sustancias. Esta tendencia a la disminución en el tiempo de estos contaminantes fue confirmada más tarde por Van den Berg et al., en 2017, evaluando las tres últimas encuestas mundiales realizadas por la OMS sobre PCDDs, PCDFs y PCBs en muestras de leche humana de 2000 a 2010. Este ha sido el primer estudio que ha permitido identificar las diferencias cuantitativas globales y las tendencias temporales en muestras de leche humana procedentes de 52 países; pudiendo así, proporcionarles a todos ellos información de referencia. Los niveles más elevados de PCDDs y PCDFs se observaron en la India, Egipto, Bélgica y Países Bajos, y de PCBs

en la República Checa y Checoslovaquia. A pesar de estos niveles, la evaluación riesgo/ beneficio concluye, que los beneficios de la leche materna supera las desventajas toxicológicas.

Dopico y Gomez, 2015 destacaron la evolución temporal y distribución geográfica de PCDDs y PCDFs durante los últimos años a nivel mundial, en la que se ha podido apreciar una disminución en las emisiones procedentes de áreas industriales, mientras que las emisiones no industriales se han mantenido constantes. Los países con mayor actividad industrial y económica como Norte América, Europa, Sur y Este de Asia presentan concentraciones más elevadas a dioxinas (los países pertenecientes al G20 constituyen más del 80% de la emisión anual). Las mayores tasas de emisión industriales proceden de las incineradoras de residuos y de los fabricantes de metal. Mientras que los incendios accidentales, los motores diésel y la incineración ilegal de desechos domésticos lo son de las fuentes no industriales.

En términos cuantitativos, de la tasa de emisión anual total de dioxinas a la atmósfera, el 9% se deposita en el aire, el 57% en áreas terrestres (encontrándose los niveles más elevados en Europa), mientras que el 40% es absorbido por las aguas oceánicas (el Océano Pacífico y el Mar Mediterráneo presentan los niveles más elevados en el agua). Los efectos más peligrosos de las dioxinas se relacionaron cuando éstas se depositan en el tejido graso animal y pueden ser ingeridos más tarde por el ser humano provocando los efectos adversos conocidos (Dopico y Gomez, 2015).

En cuanto a la caracterización del riesgo, son muchos los autores procedentes de distintos países los que han evaluado la exposición a



dioxinas a través de la dieta, (Tlustos et al., 2014; Schwarz et al., 2014; Diletti et al., 2018; Zhang et al., 2015; Wong et al., 2014; Sirot et al., 2012.; Bramwell et al., 2017; Rauscher-Gabernig et al., 2013; De Filippis et al., 2014). En la mayoría de estos estudios se obtienen niveles de exposición inferiores a los valores de referencia toxicológicos, salvo Schwarz et al.; 2014 que los supera ligeramente en el escenario pesimista para la población general y los grandes consumidores. Respecto al alimento que más contribuye a la exposición de dioxinas, el pescado es el principal contribuyente en Irlanda (Tlustos et al., 2014), Italia, (Diletti et al., 2018), Hong Kong (Wong et al., 2013), Francia (Sirot et al., 2012) y Reino Unido (Bramwell et al., 2017); mientras que en Austria (Rauscher-Gabernig et al., 2013) y Alemania (Schwarz et al., 2014) son la leche y los productos lácteos; y por último, la carne constituye la mayor contribución en China (Zhang, et al 2015).

La Tabla 4 recoge distintos estudios sobre la evaluación de la exposición a dioxinas a través de la dieta, publicados en los últimos años. Todos ellos coinciden en la no superación de las dosis de referencia toxicológicas establecidas diaria, semanal o mensualmente. Por lo tanto, se puede excluir un posible riesgo de exposición a largo plazo a dioxinas en la población infantil y adulta.

**Tabla 4.** Estudios procedentes de distintos países sobre la evaluación de la exposición a dioxinas a través de la dieta

Año	País	Alimento	Población	Datos de consumo	Estimación de la ingesta dietética a PCDD/F+dl PCB en el nivel medio de exposición	Referencia
2011	China	8 grupos de alimentos de origen animal y vegetal	Adultos	Recordatorio de 24 horas	20.1 pg TEQ <sub>who-98</sub> kg <sup>-1</sup> p.c.mes <sup>-1</sup> hombres adultos	Zhang et al., 2011
2014	Irlanda	6 grupos de alimentos de origen animal	Adultos	REG de 4 días	0.3 <sup>b</sup> pg TEQ <sub>who-05</sub> kg <sup>-1</sup> p.c.día <sup>-1</sup>	Thustlos et al., 2014
2013	Hong Kong	9 grupos de alimentos de origen animal y vegetal	Adultos	Recordatorio de 24 horas	21.9 <sup>c</sup> pg TEQ kg <sup>-1</sup> p.c.mes <sup>-1</sup>	Wong et al., 2013
2014	Alemania	10 diferentes grupos de alimentos	Adultos	3 metodologías: Entrevista historia dietética Recordatorio de 24 horas REG de 4 días	1.53 <sup>a</sup> -2.11 <sup>b</sup> pg TEQ <sub>who-05</sub> kg <sup>-1</sup> p.c.día <sup>-1</sup>	Schwarz et al., 2014
2016	Reino Unido	20 diferentes grupos de alimentos	Adultos	REG de 4 días	0.52 <sup>b</sup> pg TEQ <sub>who-05</sub> kg <sup>-1</sup> p.c.día <sup>-1</sup>	Bramwell et al., 2016

Continúa en la página siguiente

Continuación de la Tabla 4

Año	País	Alimento	Población	Datos de consumo	Estimación de la ingesta dietética a PCDD/F+ di PCB en el nivel medio de exposición	Referencia
2012	Francia	19 grupos de alimentos más representativos	Adultos y niños	REG de 7 días	0.57 pg TEQ <sub>WHO-98</sub> kg <sup>-1</sup> p.c.día <sup>-1</sup> adultos 0.89 pg TEQ <sub>WHO-98</sub> kg <sup>-1</sup> p.c.día <sup>-1</sup> niños	Sirot et al., 2012
2013	Austria	9 grupos de alimentos de origen animal	Adultos y niños	Adultos: recordatorio de 24 horas Niños: REG de 3 días	0.4 <sup>a</sup> -0.61 <sup>b</sup> pg TEQ <sub>WHO-98</sub> kg <sup>-1</sup> p.c.día <sup>-1</sup> hombres adultos 0.5 <sup>a</sup> -0.75 <sup>b</sup> pg TEQ <sub>WHO-98</sub> kg <sup>-1</sup> p.c.día <sup>-1</sup> mujeres adultas 0.5 <sup>a</sup> -0.77 <sup>b</sup> pg TEQ <sub>WHO-98</sub> kg <sup>-1</sup> p.c.día <sup>-1</sup> niños	Rauscher-Gabernig et al., 2013
2018	Italia	7 diferentes grupos de alimentos de origen animal y vegetal	Niños, adolescentes y adultos	REG de 3 días	1.98pg TEQ <sub>WHO-05</sub> kg <sup>-1</sup> p.c.día <sup>-1</sup> 1.16pg TEQ <sub>WHO-05</sub> kg <sup>-1</sup> p.c.día <sup>-1</sup> 0.90pg TEQ <sub>WHO-05</sub> kg <sup>-1</sup> p.c.día <sup>-1</sup>	Diletti et al., 2018
2014	Italia	Diferentes grupos de alimentos correspondientes a 6 grupos de hábitos alimentarios	Lactantes, niños y adultos	Duplicado de dieta	0.67 pg TEQ <sub>WHO-05</sub> kg <sup>-1</sup> p.c.día <sup>-1</sup> lactantes <sup>b</sup> 0.63-0.92 pg TEQ <sub>WHO-05</sub> kg <sup>-1</sup> p.c.día <sup>-1</sup> niños <sup>b</sup> 0.27-0.63 pg TEQ <sub>WHO-05</sub> kg <sup>-1</sup> p.c.día <sup>-1</sup> adultos <sup>b</sup>	Filippis et al., 2014

p.c: peso corporal, REG: registro de alimentos, <sup>a</sup>LB: escenario del límite inferior, <sup>b</sup>UB: escenario del límite superior, <sup>c</sup>MB: escenario del límite intermedio

## 1.7. Datos de Consumo y Niveles de Contaminantes

### *1.7.1 Datos de consumo*

Los datos de consumo de alimentos informan sobre los alimentos sólidos, bebidas y complementos alimenticios consumidos por los individuos o sus grupos (EFSA, 2011). El consumo de alimentos se puede estimar a partir de encuestas de consumo de alimentos (a nivel individual, doméstico o poblacional) (FAO/WHO, 2008) y de datos obtenidos en los programas de vigilancia.

Los datos de consumo de alimentos utilizados para evaluaciones de la exposición dietética, deberían incluir información sobre aquellos factores que pueden influir en dicha exposición o en los patrones de consumo. Estos factores abarcan desde las características demográficas (edad, sexo, etnia, grupo socioeconómico) y peso corporal de la población muestreada; hasta la región geográfica, temporada y día de la semana en que se recopilan los datos.

La calidad de los datos de encuestas de consumo dependen del diseño, metodología y herramientas utilizadas en la encuesta; motivación y memoria de los encuestados y del tratamiento estadístico y presentación (alimentos comprados versus alimentos consumidos) de los datos (FAO/WHO, 2008).

#### *a) Métodos basados en la población*

Estos métodos como las hojas de balance alimentario o de suministro de alimentos, proporcionan estimaciones sobre la disponibilidad de

alimentos a nivel nacional y pueden utilizarse para establecer comparaciones entre países (Kroes et al., 2002). Las principales limitaciones de estos datos son: por un lado, reflejar la disponibilidad de alimentos en lugar del consumo de los mismos, pudiendo dar una impresión sobreestimada del potencial consumo medio de una población; y por otro, no incluir los datos sobre el consumo de agua. Las pérdidas de alimentos y nutrientes antes del consumo; debido al procesamiento, deterioro, recorte y desperdicio, pueden también no ser consideradas adecuadamente, obteniendo valores aproximadamente un 15% más altos que las estimaciones de consumo derivadas de las encuestas del hogar.

Estos datos suelen emplearse para conocer las tendencias en el suministro de alimentos y la disponibilidad de los mismos que contienen fuentes potencialmente importantes de nutrientes o sustancias químicas; así como, definir aquellos grupos de alimentos a los que se pretende controlar (FAO/WHO, 2008).

### *b) Métodos basados en el hogar*

Estos métodos (encuestas de presupuesto y encuestas de consumo) incluyen datos sobre los alimentos comprados para el hogar, el seguimiento de los alimentos consumidos o los cambios en las reservas de los mismos.

Dichos datos son útiles para comparar la disponibilidad de alimentos entre diferentes comunidades, áreas geográficas y grupos socioeconómicos, y para conocer las variaciones en la dieta de la población total y de los diferentes subgrupos de población. Sin embargo, no proporcionan información sobre la distribución del consumo de alimentos entre los

miembros del hogar (FAO/WHO, 2008), ni del consumo de aquellos alimentos consumidos fuera de éste (EFSA, 2011).

*c) Métodos basados en el individuo*

A diferencia de las encuestas nacionales y del hogar, estos métodos proporcionan información sobre el consumo medio de alimentos, nutrientes y su distribución en los diferentes individuos y sus grupos, reflejando de una manera más realista el consumo (Kroes et al., 2002). Para la recolección de estos datos, se pueden emplear varios métodos: encuesta de registro de alimentos, encuesta de recuerdo de 24 horas y cuestionario de frecuencia de alimentos.

La encuesta de registro de alimentos recoge información sobre los alimentos consumidos durante un período específico de tiempo (generalmente siete días o menos), la fuente del alimento (comprado o cocinado en casa), y la hora o el lugar donde se consumen.

La encuesta de recuerdo de 24 horas, consiste en una lista de alimentos, bebidas e incluso suplementos dietéticos consumidos el día anterior o durante las 24 horas antes de la entrevista. Al igual que las encuestas de registro de alimentos recopilan información sobre la hora y el lugar donde se consumen los alimentos. La entrevista generalmente se realiza en persona, pero puede realizarse también por teléfono o internet. En algunas situaciones, el recuerdo es autoadministrado por el sujeto, pero este enfoque puede estar sujeto a datos menos fiables.

El cuestionario de frecuencia de alimentos consiste en una lista estructurada de alimentos individuales o grupos de alimentos, en la que se

pregunta al encuestado que calcule la cantidad de veces que consume cada alimento por día, semana, mes o año. En ocasiones incluyen también preguntas sobre los métodos habituales de preparación de alimentos, el recorte de carnes y el uso de suplementos dietéticos; así como, la identificación de la marca más común para ciertos alimentos consumidos (FAO/WHO, 2008).

Los cuestionarios de frecuencia pueden emplearse para clasificar a los individuos por ingesta de alimentos o nutrientes; o bien, por ingesta de grupos de alimentos en aquellas categorías que permitan estudiar ingestas altas y bajas (Kroes et al., 2002). Además, en ocasiones pueden ser más precisas que otros métodos para estimar la exposición dietética de aquellas sustancias químicas que tiene una gran variabilidad diaria y que se encuentran en pocos alimentos (FAO/WHO, 2008).

### *d) Encuesta de historia dietética*

Consiste en una lista detallada de los diferentes alimentos y bebidas consumidos por un individuo habitualmente cada día durante un período de tiempo definido, que a menudo es una "semana típica". El marco de tiempo de referencia suele ser el último mes, los últimos meses o puede reflejar diferencias estacionales si el marco de tiempo de referencia es el año pasado (FAO/WHO, 2008).

### *e) Cuestionario de hábitos alimentarios*

El cuestionario sobre hábitos alimentarios puede diseñarse para recopilar información general o específica como: percepciones y creencias de los alimentos, gustos y aversiones, métodos de preparación, uso de

suplementos dietéticos y entornos sociales relacionados con las ocasiones gastronómicas. Estos tipos de información se incluyen frecuentemente junto con los otros cuatro métodos, pero también se pueden usar como la única base para la recopilación de datos (FAO/WHO, 2008).

Conviene resaltar que no hay un método ideal para evaluar el consumo de alimentos en una población. La elección depende de los objetivos del estudio, de la selección de alimentos y de las características de la población (edad, sexo, motivación, diversidad cultural) (Kroes et al., 2002). Una posible opción es la combinación de métodos, tal y como recomienda el proyecto del Método Europeo de Encuesta de Consumo de Alimentos (EFCOSUM) con objetivo de armonizar los datos de consumo de alimentos entre los diferentes países. Consiste en realizar un recuerdo de 24 horas para cada individuo en días no consecutivos, combinándolo con un cuestionario sobre el consumo habitual de alimentos consumidos con poca frecuencia para obtener información sobre la proporción de no consumidores (Brussaard et al., 2002; FAO/WHO, 2008).

### *1.7.2 Niveles de contaminantes en alimentos*

En función del propósito de la estimación de la exposición (pre-regulación o post-regulación) (Marín S., 2014), los datos de niveles de contaminantes en alimentos pueden proceder de ensayos supervisados (solamente para residuos de plaguicidas y de medicamentos veterinarios), programas de vigilancia, estudios de dieta total (EDT), etc.



*a) Ensayos supervisados*

Tradicionalmente la fuente principal de datos de residuos de plaguicidas y de medicamentos veterinarios en alimentos han sido los datos de ensayos supervisados y presentados en el apoyo del registro de un plaguicida o fármaco veterinario. Están diseñados para determinar los residuos máximos que pueden estar presentes en alimentos de origen animal o vegetal en el punto más próximo al que estos productos alimenticios pudieran ingresar a la venta.

Simulan un escenario de uso en el peor de los casos (con respecto a las tasas de aplicación, el número de aplicaciones, la precosecha o los intervalos de extracción...), sobreestimando con frecuencia los residuos que probablemente se encontrarán en los alimentos. Por lo tanto, estos datos no deben ser la primera opción al evaluar la exposición dietética real; sin embargo, para establecer límites de residuos legalmente exigibles son muy útiles y para evaluar la seguridad de los consumidores a un producto que contiene residuos inferior al LMR, son la primera opción (FAO/WHO, 2008).

*b) Programas de vigilancia*

Hoy en día, distintos organismos disponen de multitud de datos de concentración de contaminantes en alimentos procedentes de los Programas de Vigilancia llevados a cabo para valorar la inocuidad de los alimentos producidos y/o consumidos en su ámbito geográfico. La principal ventaja de los programas de vigilancia es la obtención de datos de contaminantes en muestras de alimentos situadas más próximas al consumidor (centros de

distribución, supermercados, etc.) que en el resto de la cadena comercial. Consiguen obtener información muy útil sobre la degradación de residuos durante el tránsito y almacenamiento, así como de los residuos resultantes de las aplicaciones a fungicidas y reguladores del crecimiento posteriores a la cosecha, utilizados como conservantes durante la entrega de alimentos.

Son la primera elección en evaluaciones de la exposición a largo plazo, ya que representan mejor la cantidad de alimento y sustancia química que se consume. Sin embargo, las estimaciones de ingestas obtenidas deben tomarse con cierta cautela, ya que el objetivo de estos programas no es valorar la exposición de la población a ciertos contaminantes a través de la dieta, sino evaluar el grado de inocuidad de los alimentos. No obstante, estos datos pueden ser empleados cuando no hay otros disponibles, siempre que se reconozca que el uso de los mismos focaliza la exposición a los alimentos que tienen contenidos máximos regulados. Además, desde el punto de vista de gestión del riesgo, centrar el muestreo en determinados alimentos, períodos o áreas geográficas puede ser considerado correcto por razones de limitación de presupuestos y de coste/beneficio (FAO/WHO, 2008; Marín, 2014).

### *c) Estudio de Dieta Total*

Los estudios de dieta total (EDT) son estudios nacionales cuyo objetivo es proporcionar datos representativos sobre la contaminación de los alimentos consumidos por una población, y su exposición a sustancias de interés desde el punto de vista de la salud pública.

A partir de encuestas dietéticas, los alimentos son recolectados en diferentes ciudades o regiones de un país, cocinados y preparados de acuerdo con los hábitos de la población y agrupados para ser analizados como “composites” (EFSA/WHO, 2011). Este método permite proporcionar una media aproximada de la concentración de sustancias químicas presentes en los alimentos más consumidos, para el cálculo de una exposición dietética crónica en la población, considerando la variabilidad en la concentración de sustancias químicas en los alimentos que se consumen. Éste es el método recomendado por la FAO/WHO para estimar la exposición de una población a sustancias químicas a través de la dieta (FAO/WHO, 2008).

Los EDT se diferencian de otros estudios en los que también se analizan niveles de contaminantes en los alimentos porque: 1) incluyen muestras de alimentos representativos de la dieta total de la población a estudio, 2) analizan los alimentos después de su preparación tal como se consumen, teniendo en cuenta los cambios en los niveles de contaminantes en el procesado y 3) evalúan la exposición de la población con propósitos de protección de la salud pública (EFSA/WHO, 2011).

El EDT puede tener distintas finalidades tales como: ser una herramienta de cribado para identificar grupos de alimentos y de sustancias químicas que requieran una vigilancia específica y obtener secuencias temporales de la exposición a peligros en los alimentos y permitir así, a los gestores del riesgo evaluar la efectividad de las políticas de seguridad alimentaria.

La Tabla 5 recoge diferentes diseños de muestreo para el análisis de contaminantes en alimentos empleando la metodología de EDT, procedentes de estudios de diversos países. En la mayoría de ellos, los alimentos se seleccionan en base a criterios de consumo o potencial de contribuir a la exposición del contaminante objeto de estudio. Así mismo, muchos de ellos recogen las muestras en diferentes períodos o estaciones, considerando así, la variabilidad en el consumo y en la concentración de los contaminantes en las diferentes estaciones.

### *1.7.3 Factores de procesamiento para refinar los datos de concentración de contaminantes en estimaciones de la exposición dietética*

Uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta en el proceso de evaluación de la exposición dietética, es la variabilidad en la concentración de contaminantes químicos contenidos en los alimentos a lo largo de toda la cadena alimentaria.

Así por ejemplo, respecto a los contaminantes agrícolas como los residuos de plaguicidas los factores más relevantes que influyen en la concentración de los mismos son: condiciones climáticas, grado de madurez en la recogida de la muestra, variedad de cultivo, transporte, procesado (lavado, pelado, cocinado), distribución, almacenamiento, etc.; mientras que los contaminantes ambientales, como las dioxinas, se encuentran más afectados por el origen geográfico o bien por las características del animal (edad, cantidad de grasa), etc. (Kroes et al., 2002). Todos estos factores, pueden aumentar o disminuir las concentraciones de sustancias químicas o modificar la naturaleza de estas en los alimentos, por

**Tabla 5.** Diferentes diseños de muestreo para el análisis de contaminantes empleando el EDT

Año	País	Número de alimentos	Frecuencia de muestreo	Criterio de inclusión de alimentos	Numero de muestras agregadas	Numero de muestras por cada alimentos individual	Cocinado	Referencia
2004	Bélgica	529	Muestras recogidas en otoño	Susceptible de contribuir a la exposición del contaminante objeto de estudio	43	nd	nd	Windal et al., 2010
2010-2011 1º EDT	Hong Kong	150	4 veces al año (intervalo de tres meses)	Más consumidos por la población Susceptible de contribuir a la exposición del contaminante objeto de estudio	600	3	Sí	Wong et al., 2014
2007-2009 2º EDT	Francia	194	En cada estación	Representativos de la dieta	1235	15	Sí	Gavelle et al., 2016
2010	Libano	63	4 veces al año (intervalo de tres meses)	Consumo >1gr/persona /día Susceptible de contribuir a la exposición del contaminante objeto de estudio	126	5	Sí	Nasreddine et al., 2016
2011 5º EDT	China	662		Susceptible de contribuir a la exposición del contaminante objeto de estudio	80	nd	Sí	Shi et al., 2017
2010-2011	Valencia (España)	77	En cada estación	Consumo >2gr/kg pc /día Susceptible de contribuir a la exposición del contaminante objeto de estudio	770	100	No	Quijano et al.,2018

pc: peso corporal, Nd: dato no disponible

lo que la incorporación de los factores de procesamiento en los procesos de evaluación dietética de la exposición, puede conseguir resultados que reflejen mejor las exposiciones reales; siendo específicos para el alimento, la sustancia activa o el proceso (EPA, 1996).

### *1.7.4 Consideraciones analíticas*

Según la finalidad de las muestras analizadas (por ejemplo: proporcionar datos para la evaluación de la exposición alimentaria, cumplimiento de LMR...) existen diferencias importantes en la metodología a aplicar.

#### *a) Sensibilidad*

En evaluaciones precisas de la exposición, generalmente el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) debe ser tan bajo como sea técnicamente posible para poder detectar y cuantificar respectivamente, la mayor parte de contaminantes contenidos en los alimentos. Además, dado que en numerosas ocasiones los alimentos no contienen cantidades de residuos detectables, el valor asignado de LOD y LOQ en estas muestras, afectará en mayor o menor medida a las exposiciones estimadas. Sin embargo, en los programas de vigilancia de alimentos, se emplean métodos menos sensibles para el LOD y LOQ, puesto que el objetivo principal es confirmar que los contaminantes contenidos en ellos se encuentran dentro de los límites legales, no el riesgo de exposición a través de su ingesta.

#### *b) Calidad de los datos*

Conviene tener en cuenta, que las mejores estimaciones para la evaluación de la exposición dietética, dependen fundamentalmente de la

calidad de los datos de concentración química. Estos deben obtenerse utilizando métodos validados que sean adecuados para el propósito de la evaluación, y que cuenten con programas integrales de garantía de calidad y control de calidad. Esto incluye pruebas de sesgo/ precisión, reproducibilidad y sensibilidad de los procedimientos, así como personal especializado con los objetivos específicos de las tareas realizadas (FAO/WHO, 2008).

### *c) Tratamiento de los valores no detectados y no cuantificados*

Un paso crucial en la evaluación de la exposición dietética es el tratamiento de los niveles de contaminantes no detectables (ND) o no cuantificables (NQ) en alimentos. La proporción de estos valores variará según el grupo de sustancias analizadas. Así, por ejemplo, los COP tales como las dioxinas y PBDEs, que se encuentran presentes prácticamente en todos los alimentos, aunque sea a bajas concentraciones, generalmente presentan bajas proporciones de ND; mientras que, determinadas muestras de ciertos residuos de plaguicidas en ocasiones presentan todos los valores ND cuando el plaguicida objeto de estudio no se ha empleado en el cultivo.

El criterio para asignar valores de concentración a los resultados ND o no NQ es crucial para la estimación de la exposición dietética y corresponde al evaluador de riesgos decidir qué valor asignar a esas muestras. Las concentraciones deben errar por el lado de la precaución nutricional o toxicológica, mientras se mantengan en valores científicamente defendibles (FAO/WHO, 2008).

La OMS propone aplicar el método de sustitución en función de los valores ND o NQ y del tamaño de la muestra objeto a estudiar. Una opción es sustituir los valores ND por  $LOD/2$ ; sin embargo, si se aplica a un número elevado de valores ND, tal reemplazo distorsionaría la media calculada y los valores de variabilidad química.

Otra alternativa es el cálculo del límite inferior o superior. El límite inferior se obtiene asignando un valor 0 a aquellas muestras en las que los valores de la sustancia química sean ND o NQ; y el límite superior, asignando el LOD a todas las muestras con resultados ND o el LOQ a todas las muestras con menos del LOQ, pero más que el LOD. En algunos casos, el LOD puede ser igual al LOQ (FAO/WHO, 2008).

Esta elección es recomendable para aquellos contaminantes que probablemente se encuentran en los alimentos como los contaminantes naturales (dioxinas y PBDEs), puesto que permite estimar la concentración media de cada sustancia química en los escenarios del límite inferior y superior. Para aquellas sustancias químicas que probablemente no se presenten, a menos que se agregue específicamente (plaguicidas y residuos de medicamentos veterinarios, aditivos), el cálculo de una concentración media en el límite inferior es generalmente la norma.

El método de sustitución es el más ampliamente utilizado en la evaluación de la exposición, ya que es fácil de implementar, comprensible y en ellos se puede asumir que el límite superior ( $ND=LOD/LOQ$ ) conduce a estimaciones conservadoras tales como la sobreestimación de la media y una infraestimación de la variabilidad (Marín S., 2014).



La EFSA por su parte, ha tratado hasta ahora los valores ND o NQ aplicando este método extensamente utilizado y recomendado por organizaciones internacionales. La idoneidad de este enfoque tiene una limitación natural en el cálculo de los percentiles y en la aplicación de técnicas estadísticas; por ello, la EFSA recomienda el uso de enfoques estadísticos alternativos más avanzados como Paramétric maximum likelihood estimation (MLE), Log-probit regression y the Kaplan-Meier method (KM). Debido a la complejidad de estos métodos, se recomienda identificar para su empleo las posibles fuentes de heterogeneidad en un conjunto de datos, como el país de recolección/origen de la muestra, el grupo de alimentos, el laboratorio y aplicarlos cuando se obtienen valores ND con números analíticos altos, así como usuarios experimentados (EFSA, 2010c).

## 1.8 Referencias

AECOSAN, 2011. Recomendaciones de consumo por la presencia de nitratos en hortalizas. 2011.

AEPLA, 2015. Memoria AEPLA: [http:// www.aepla.es](http://www.aepla.es) (fecha de acceso enero 2109).

Anyzewska, A. and Wawrzyniak, A., 2014. Evaluating adult dietary intakes of nitrate and nitrite in Polish households during 2006-2012. *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.* 65, 107-111.

Archer, D.L., 2002. Evidence that ingested nitrate and nitrite are beneficial to health. *J. Food Prot.* 65, 872-875.

Arisawa, K., Uemura, H., Hiyoshi, M., Satoh, H., Sumiyoshi, Y., Morinaga, K., Kodama, K., Suzuki, T., Nagai, M. and Suzuki, T., 2008. Dietary intake of PCDDs/PCDFs and coplanar PCBs among the Japanese population estimated by duplicate portion analysis: A low proportion of adults exceed the tolerable daily intake. *Environ. Res.* 108, 252-259.

ATSDR, 2002. ATSDR Tox Profiles. Atlanta. GA: Department of Health & Human Services, Public Helath Service.

Bencko, V., 2003. Risk assessment and human exposure to endocrine disrupters. *Molecular epidemiology in Preventive Medicine*, Jedrychovsk, W.A., Petera, F.P., Maugeri, U. (Ed), International Center for studies and Research in Biomedicine in Luxembourg, pp. 315-327.

Berrada, H., Fernández, M., Ruiz, M.J., Moltó, J.C., Mañes, J. and Font, G., 2010. Surveillance of pesticide residues in fruits from Valencia during twenty months (2004/05). *Food Control* 21, 36-44.

Birnbaum, L.S. and Tuomisto, J., 2000. Non-carcinogenic effects of TCDD in animals. *Food Addit. Contam.* 17, 275-288.

Bondonno, C.P., Blekkenhorst, L.C., Liu, A.H., Bondonno, N.P., Ward, N.C., Croft, K.D. and Hodgson, J.M., 2017. Vegetable-derived bioactive nitrate and cardiovascular health. *Mol. Aspects Med.* 61, 83-91.

Bondonno, C.P., Croft, K.D. and Hodgson, J.M., 2016. Dietary Nitrate, Nitric Oxide, and Cardiovascular Health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 56, 2036-2052.

Boobis, A.R., Ossendorp, B.C., Banasiak, U., Hamey, P.Y., Sebestyen, I. and Moretto, A., 2008. Cumulative risk assessment of pesticide residues in food. *Toxicol. Lett.* 180, 137-150.

Boon, P.E., Van der Voet, H., Van Raaij, M.T. and Van Klaveren, J.D., 2008. Cumulative risk assessment of the exposure to organophosphorus and carbamate insecticides in the Dutch diet. *Food Chem. Toxicol.* 46, 3090-3098.

Bosgra, S., Van der Voet, H., Boon, P.E. and Slob, W., 2009. An integrated probabilistic framework for cumulative risk assessment of common mechanism chemicals in food: an example with organophosphorus pesticides. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 54, 124-133.

Bramwell, L., Mortimer, D., Rose, M., Fernandes, A., Harrad, S. and Pless-Mullooli, T., 2017. UK dietary exposure to PCDD/Fs, PCBs, PBDD/Fs, PBBs and PBDEs: comparison of results from 24-h duplicate diets and total diet studies. *Food Addit Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 34, 65-77.

Brkic, D., Bosnir, J., Bevardi, M., Boskovic, A.G., Milos, S., Lasic, D., Krivohlavek, A., Racz, A., Cuic, A.M. and Trstenjak, N.U., 2017. Nitrate in Leafy Green Vegetables and Estimated Intake. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* 14, 31-41.

Brussaard, J.H., Lowik, M.R., Steingrimsdottir, L., Moller, A., Kearney, J., De Henauw, S., Becker, W. and EFCOSUM Group, 2002. A European food consumption survey method, conclusions and recommendations. *Eur. J. Clin. Nutr.* 56 Suppl 2, S89-94.

Bryan, N.S., Alexander, D.D., Coughlin, J.R., Milkowski, A.L. and Boffetta, P., 2012. Ingested nitrate and nitrite and stomach cancer risk: An updated review. *Food Chem Toxicol.* 50, 3646-3665.

Caldas, E.D., Tressou, J. and Boon, P.E., 2006. Dietary exposure of Brazilian consumers to dithiocarbamate pesticides-a probabilistic approach. *Food Chem. Toxicol.* 44, 1562-1571.

Chen, M.Y., Chung, S.W., Tran, J.C., Tong, K.S., Ho, Y.Y., Chan, C.H. and Xiao, Y., 2011. Dietary exposure of Hong Kong adults to nitrate and nitrite from vegetable intake. *Food Addit Contam. Part B. Surveill.* 4, 94-98.

Claeys, W.L., Schmit, J., Bragard, C., Maghuin-Rogister, G., Pussemier, L. and Schiffers, B., 2011. Exposure of several Belgian consumer groups to

pesticide residues through fresh fruit and vegetable consumption. *Food Control* 22, 508-516.

Clements, W.T., Lee, S.R. and Bloomer, R.J., 2014. Nitrate ingestion: a review of the health and physical performance effects. *Nutrients* 6, 5224-5264.

Cohen Hubal, E.A., de Wet, T., Du Toit, L., Firestone, M.P., Ruchirawat, M., van Engelen, J. and Vickers, C., 2014. Identifying important life stages for monitoring and assessing risks from exposures to environmental contaminants: Results of a World Health Organization review. *Regul Toxicol and Pharmacol* 69, 113-124.

Comisión Europea, 2006. Reglamento (CE) N° 1881/2006, de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. *DOUE L*, 364;5-24.

Comisión Europea, 2000. Libro Blanco sobre Seguridad Alimentaria, del 12 de enero del 2000. *COM/99/0719 final*.

Comisión Europea, 1993. Reglamento 315/93 del Consejo de 8 de febrero de 1993, por el que se establecen procedimientos comunitarios en relación con los contaminantes presentes en los productos alimenticios. *L 37/1993*.

Costopoulou, D., Vassiliadou, I. and Leondiadis, L., 2016. PCDDs, PCDFs and PCBs in farmed fish produced in Greece: Levels and human population exposure assessment. *Chemosphere* 146, 511-518.

Czech, A. and Rusinek, E., 2005. The heavy metals, nitrates and nitrites content in the selected vegetables from Lublin area. *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.* 56, 229-236.

De Filippis, S.P., Brambilla, G., Dellatte, E., Corrado, F. and Esposito, M., 2014. Exposure to polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs), dioxin-like polychlorinated biphenyls (DL-PCBs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) through the consumption of prepared meals in Italy. *Food Addit Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 31, 1114-1126.

d'El-Rei, J., Cunha, A.R., Trindade, M. and Neves, M.F., 2016. Beneficial Effects of Dietary Nitrate on Endothelial Function and Blood Pressure Levels. *Int. J. Hypertens.* 2016, 6791519.

Diletti, G., Scortichini, G., Abete, M.C., Binato, G., Candeloro, L., Ceci, R., Chessa, G., Conte, A., Di Sandro, A., Esposito, M., Fedrizzi, G., Ferrantelli, V., Ferretti, E., Menotta, S., Nardelli, V., Neri, B., Piersanti, A., Roberti, F., Ubaldi, A. and Brambilla, G., 2018. Intake estimates of dioxins and dioxin-like polychlorobiphenyls in the Italian general population from the 2013-2016 results of official monitoring plans in food. *Sci. Total Environ.* 627, 11-19.

Domingo, J.L. and Bocio, A., 2007. Levels of PCDD/PCDFs and PCBs in edible marine species and human intake: a literature review. *Environ. Int.* 33, 397-405.

Dopico, M. and Gomez, A., 2015. Review of the current state and main sources of dioxins around the world. *J. Air Waste Manag. Assoc.* 65, 1033-1049.

Dorne J.L.C.M., Bordajandi L.R, Amzal B, Ferrari P, Verger P., 2009. Combining analytical techniques exposure assessment and biological effects for risk assessment of chemicals in food. *Trend. Anal. Chem.* 28, 695-707.

Dorne, J.L. and Fink-Gremmels, J., 2013. Human and animal health risk assessments of chemicals in the food chain: comparative aspects and future perspectives. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 270, 187-195.

EFSA, 2018. Scientific Opinion on the risk for animal and human health related to the presence of dioxins and dioxin-like PCBs in feed and food. *EFSA Journal* 16 (11): 5333,331pp.

EFSA, 2017a. The 2015 European Union report on pesticide residues in food. 15 (4): 4791.

EFSA, 2017b. Re-evaluation of sodium nitrate (E 251) and potassium nitrate (E 252) as food aditives. *EFSA Journal.* 15 (6): 4787.

EFSA, 2015. Scientific statement on the health based guidance values for dioxins and dioxin-like PCBs. 13(5): 4124.

EFSA, 2014. The 2011 European Union Report on Pesticide Residues in Food. 12 (5): 3694.

EFSA, 2013a. International Framework Dealing with human Risk Assessment of Combined Exposure to Multiple Chemicals. *EFSA Journal.* 11 (7): 3313.

EFSA, 2013b. The 2010 European Union Report on Pesticides Residues in Food. EFSA Journal. 11 (3): 3130.

EFSA, 2013c. Study on the influence of food processing on nitrate levels in vegetables. EFSA supporting publication. En-514.

EFSA, 2012a. Guidance on the use of probabilistic methodology for modelling dietary exposure to pesticide residues. EFSA Journal 2012. 10 (10): 2839.

EFSA, 2012b. Update of the monitoring of levels of dioxins and PCBs in food and feed. 10 (7): 2832.

EFSA, 2011. Overview of the procedures currently used at EFSA for the assessment of dietary exposure to different chemical substances. 9 (12): 2490.

EFSA, 2010a. Statement on possible public health risks for infants and young children from the presence of nitrates in leafy vegetables. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). 8 (12): 1935.

EFSA, 2010b. Results of the monitoring of dioxin levels in food and feed. 8 (3):1385.

EFSA, 2010c. Management of left- censored data in dietary exposure asseement of chemical substances. 8 (3): 1557.

EFSA, 2008a. Opinion ofthe Scientific Panel on Plant Protection Products and their Residues to evaluate the suitability of existing methodologies and, if appropriate, the idenification of new approaches to assess cumulative and



synergistic risk from pesticides in the frame of Regulation EC 396/2005. EFSA Journal. 704, 1-84.

EFSA, 2008b. Nitrate in vegetables. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. 689, 1-79.

EFSA, 2007. EFSA Scientific Colloquium Summary Report Cumulative Risk Assessment of Pesticides to Human Health: The way Forward. 7, 28-29.

EFSA, 2006. Guidance of the Scientific Committee on a request from EFSA related to Uncertainties in Dietary Exposure Assessment. 438, 1-54.

EFSA, FAO & WHO, 2011. Towards a harmonised total diet study approach: a guidance document. Joint Guidance of EFSA, FAO and WHO, 9:2450.

Elgueta, S., Moyano, S., Sepulveda, P., Quiroz, C. and Correa, A., 2017. Pesticide residues in leafy vegetables and human health risk assessment in North Central agricultural areas of Chile. Food Addit Contam. Part B. Surveill. 10, 105-112.

EPA, 2011. Pyrethrins/pyrethroid Cumulative Risk Assessment.

EPA, 2007. Revised N-methyl Carbamate Cumulative Risk Assessment.

EPA, 2006. Organophosphorus Cumulative Risk Assessment.

EPA, 2002. Organophosphate Pesticides: Revised Cumulative Risk assessment. Office of Pesticide Programs: Washington DC, USA.

EPA, 2000. Supplementary Guidance for Conducting Health Risk Assessment of Chemical Mixtures. Risk Assessment Forum Technical Panel.

EPA, 1996. Residue Chemistry Test Guidelines. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances (OPPTS). Washington, DC.

EPA, 1986. Guidelines for the Health Risk Assessment of Chemical Mixtures Risk Assessment Forum, Office of Research and Development. Washington, DC.

EUROSTAT,2018. Chemical indicators. <https://ec.europa.eu/eurostat>. Fecha de acceso enero 2019.

Fan, A.M., 2011. Nitrate and Nitrite in Drinking Water: A Toxicological Review. Environ. Health. 137-145.

FAO, 2018. The future of food and agriculture. Alternative Pathways to 2050. Rome.Italy.

FAO, 1996. World Food Summit. 13-17 Nov. Rome. Italy.

FAOSTAT, 2013. Balances alimentarios. <https://fao.org/faostat/es>. Fecha de acceso febrero 2019.

FAO/WHO, 2009. Principles and Methods for the Risk Assessment of Cheemicals in Food. Environmental Health Criteria. 240. IPCS. Chapter 6. Dietary Exposure Assessment of Chemicals in Food.

FAO/WHO, 2008. Dietary Exposure Assessment of Chemicals in Food. May 2–6; Annapolis, MD. Geneva.

FAO/WHO, 2006. Food Safety Risk Analysis. A Guide for National Food Safety Authorities. FAO Food and Nutrition Paper 87.

FAO/WHO, 2004. International Programme on Chemical Safety. Harmonization Project Document. No,1.

FAO/WHO, 2003. Nitrate and Potential endogenous Formation of N-nitroso Compounds. WHO Food Additive Series No.50, World Health Organization, Geneva.

Fernandez-Gonzalez, R., Yebra-Pimentel, I., Martinez-Carballo, E. and Simal-Gandara, J., 2015. A Critical Review about Human Exposure to Polychlorinated Dibenzop-Dioxins (PCDDs), Polychlorinated Dibenzofurans (PCDFs) and Polychlorinated Biphenyls (PCBs) through Foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 55, 1590-1617.

FSA, 2002. Risk Assessment of Mixtures of Pesticides and Similar Substances. Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consum Products and the Environment (COT report).

Fujiyoshi, P.T., Michalek, J.E. and Matsumura, F., 2006. Molecular epidemiologic evidence for diabetogenic effects of dioxin exposure in U.S. Air force veterans of the Vietnam war. *Environ. Health Perspect.* 114, 1677-1683.

Gad Alla, S.A., Loutfy, N.M., Shendy, A.H. and Ahmed, M.T., 2015. Hazard index, a tool for a long term risk assessment of pesticide residues in some commodities, a pilot study. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 73, 985-991.

Gallagher, S.S., Rice, G.E., Scarano, L.J., Teuschler, L.K., Bollweg, G. and Martin, L., 2015. Cumulative risk assessment lessons learned: A review of case studies and issue papers. *Chemosphere* 120, 697-705.

Gassara, F., Kouassi A., Kaur S., & Belkacemi K., 2016. Green Alternatives to Nitrates and Nitrites in Meat-based Products-A Review. *Critic.Rev. in Food Sci. and Nutr.* 56: 13, 2133-2148,

Gumanova, N.G., Deev, A.D., Klimushina, M.V., Kots, A.Y. and Shalnova, S.A., 2016. Serum nitrate and nitrite are associated with the prevalence of various chronic diseases except cancer. *Int. Angiol.* 36 (2): 160-6.

Gwenzi, W., Mangori, L., Danha, C., Chaukura, N., Dunjana, N. and Sanganyado, E., 2018. Sources, behaviour, and environmental and human health risks of high-technology rare earth elements as emerging contaminants. *Sci. Total Environ.* 636, 299-313.

Habermeyer, M., Roth, A., Guth, S., Diel, P., Engel, K.H., Epe, B., Furst, P., Heinz, V., Humpf, H.U., Joost, H.G., Knorr, D., de Kok, T., Kulling, S., Lampen, A., Marko, D., Rechkemmer, G., Rietjens, I., Stadler, R.H., Vieths, S., Vogel, R., Steinberg, P. and Eisenbrand, G., 2015. Nitrate and nitrite in the diet: how to assess their benefit and risk for human health. *Mol. Nutr. Food Res.* 59, 106-128.

Halldorsson, T.I., Thorsdottir, I., Meltzer, H.M., Nielsen, F. and Olsen, S.F., 2008. Linking exposure to polychlorinated biphenyls with fatty fish consumption and reduced fetal growth among Danish pregnant women: a cause for concern? *Am. J. Epidemiol.* 168, 958-965.

Hays, S.M. and Aylward, L.L., 2003. Dioxin risks in perspective: past, present, and future. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 37, 202-217.

IARC/ WHO, 2015. IARC Monographs evaluate consumption of red meat and processed meat.

IARC/WHO, 2010. Ingested nitrate and nitrite, and cyanobacterial peptide toxins.

IARC/WHO, 1997. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 69: Polychlorinated Dibenzo-para-dioxins and Polychlorinated Dibenzofurans.

Ingelido, A.M., Abate, V., Abballe, A., Albano, F.L., Battista, T., Carraro, V., Conversano, M., Corvetti, R., De Luca, S., Franchini, S., Fulgenzi, A.R., Giambanco, L., Iacovella, N., Iamiceli, A.L., Maiorana, A., Maneschi, F., Marra, V., Pirola, F., Porpora, M.G., Procopio, E., Suma, N., Valentini, S., Valsenti, L., Vecchie, V. and De Felip, E., 2017. Concentrations of polychlorinated dibenzodioxins, polychlorodibenzofurans, and polychlorobiphenyls in women of reproductive age in Italy: A human biomonitoring study. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 220, 378-386.

Jardim, A.N.O., Brito, A.P., van Donkersgoed, G., Boon, P.E. and Caldas, E.D., 2018. Dietary cumulative acute risk assessment of organophosphorus, carbamates and pyrethroids insecticides for the Brazilian population. *Food Chem. Toxicol.* 112, 108-117.

Jensen, A.F., Petersen, A. and Granby, K., 2003. Cumulative risk assessment of the intake of organophosphorus and carbamate pesticides in the Danish diet. *Food Addit. Contam.* 20, 776-785.

Jensen, B.H., Petersen, A., Nielsen, E., Christensen, T., Poulsen, M.E. and Andersen, J.H., 2015. Cumulative dietary exposure of the population of Denmark to pesticides. *Food Chem. Toxicol.* 83, 300-307.

Joshiyura, K.J., Hu, F.B., Manson, J.E., Stampfer, M.J., Rimm, E.B., Speizer, F.E., Colditz, G., Ascherio, A., Rosner, B., Spiegelman, D. and

Willett, W.C., 2001. The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. *Ann. Intern. Med.* 134, 1106-1114.

Juraske, R., Mutel, C.L., Stoessel, F. and Hellweg, S., 2009. Life cycle human toxicity assessment of pesticides: comparing fruit and vegetable diets in Switzerland and the United States. *Chemosphere* 77, 939-945.

Kavvalakis, M.P. and Tsatsakis, A.M., 2012. The atlas of dialkylphosphates; assessment of cumulative human organophosphorus pesticides exposure. *Forensic Sci. Int.* 218, 111-122.

Keikothaile B.M, S.P., 2011. Pesticide residues in fruits and vegetables. In: Stoytcheva (Ed.) *Pesticides: formulations, effects, fate*. Rijeka, Intech.

Kim, K.H., Kabir, E. and Jahan, S.A., 2017. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Sci. Total Environ.* 575, 525-535.

Knezevic, Z., Serdar, M. and Ahel, M., 2012. Risk assessment of the intake of pesticides in Croatian diet. *Food Control* 23, 59-65.

Kroes, R., Muller, D., Lambe, J., Lowik, M.R., van Klaveren, J., Kleiner, J., Massey, R., Mayer, S., Urieta, I., Verger, P. and Visconti, A., 2002. Assessment of intake from the diet. *Food Chem. Toxicol.* 40, 327-385.

Kulkarni P., Crespo J., Alfonso C., 2008. Dioxins sources and current remediation technologies-A review. *Environ. Int.* 34, 139-153.

Larsen, E.H., Andersen, N.L., Moller, A., Petersen, A., Mortensen, G.K. and Petersen, J., 2002. Monitoring the content and intake of trace elements from food in Denmark. *Food Addit. Contam.* 19, 33-46.

Larsen, F.J., Ekblom, B., Sahlin, K., Lundberg, J.O. and Weitzberg, E., 2006. Effects of dietary nitrate on blood pressure in healthy volunteers. *N. Engl. J. Med.* 355, 2792-2793.

Larsson, M.O., Sloth Nielsen, V., Bjerre, N., Laporte, F. and Cedergreen, N., 2018. Refined assessment and perspectives on the cumulative risk resulting from the dietary exposure to pesticide residues in the Danish population. *Food Chem. Toxicol.* 111, 207-267.

Legradi, J.B., Di Paolo, C., Kraak, M.H.S., van der Geest, H.G., Schymanski, E.L., Williams, et al., 2018. An ecotoxicological view on neurotoxicity assessment. *Environ. Sci. Eur.* 30 (1): 46.

Li, F., Yuan, Y., Meng, P., Wu, M., Li, S. and Chen, B., 2017. Probabilistic acute risk assessment of cumulative exposure to organophosphorus and carbamate pesticides from dietary vegetables and fruits in Shanghai populations. *Food Addit Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 34, 819-831.

Li, Z., Nie, J., Lu, Z., Xie, H., Kang, L., Chen, Q., Li, A., Zhao, X., Xu, G. and Yan, Z., 2016. Cumulative risk assessment of the exposure to pyrethroids through fruits consumption in China - Based on a 3-year investigation. *Food Chem. Toxicol.* 96, 234-243.

Liem, A.K., Furst, P. and Rappe, C., 2000. Exposure of populations to dioxins and related compounds. *Food Addit. Contam.* 17, 241-259.

Lozowicka, B., Mojsak, P., Jankowska, M., Kaczynski, P., Hrynko, I., Rutkowska, E., Szabunko, J. and Borusiewicz, A., 2016. Toxicological studies for adults and children of insecticide residues with common mode of

action (MoA) in pome, stone, berries and other small fruit. *Sci. Total Environ.* 566-567, 144-156.

Lundberg, J.O., Weitzberg, E. and Gladwin, M.T., 2008. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 156-167.

Ma, Y., He, X., Qi, K., Wang, T., Qi, Y., Cui, L., Wang, F. and Song, M., 2019. Effects of environmental contaminants on fertility and reproductive health. *Journal of Environ. Sci.* 77, 210-217.

Malisch, R. and Kotz, A., 2014. Dioxins and PCBs in feed and food - Review from European perspective. *Sci. Total Environ.* 491-492, 2-10.

MAPAMA, 2016. Resultados Encuesta Comercialización Fitosanitarios 2016.

Marín Villuendas Silvia, 2014. Tesis doctoral. Estudios de Dieta Total. Exposición de la Población de la Comunidad Valenciana a Metales y Evaluación del Riesgo. Valencia.

Marinkovic, N., Pasalic, D., Ferencak, G., Grskovic, B. and Stavljenic Rukavina, A., 2010. Dioxins and human toxicity. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* 61, 445-453.

Menard, C., Heraud, F., Volatier, J.L. and Leblanc, J.C., 2008. Assessment of dietary exposure of nitrate and nitrite in France. *Food Addit Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 25, 971-988.



Mensinga, T.T., Speijers, G.J. and Meulenbelt, J., 2003. Health implications of exposure to environmental nitrogenous compounds. *Toxicol. Rev.* 22, 41-51.

Milkowski, A., Garg, H.K., Coughlin, J.R. and Bryan, N.S., 2010. Nutritional epidemiology in the context of nitric oxide biology: A risk-benefit evaluation for dietary nitrite and nitrate. *Nitric Oxide* 22, 110-119.

MITECO, 2018. Productos fitosanitarios. <https://www.miteco.gob.es>. (fecha de acceso febrero 2019).

Mitek, M., Anyzewska, A. and Wawrzyniak, A., 2013. Estimated dietary intakes of nitrates in vegetarians compared to a traditional diet in Poland and acceptable daily intakes: is there a risk? *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.* 64, 105-109.

Mosier, A.R., Syers, J.K. and Freney, J.R., 2005. Global assessment of nitrogen fertilizer: the SCOPE/IGBP nitrogen fertilizer rapid assessment project. *Sci. China C. Life. Sci.* 48 Spec No, 759-766.

Muller, A.K., Bosgra, S., Boon, P.E., van der Voet, H., Nielsen, E. and Ladefoged, O., 2009. Probabilistic cumulative risk assessment of anti-androgenic pesticides in food. *Food Chem. Toxicol.* 47, 2951-2962.

Muñoz E., 2013. Ingeniería Química. Uned publicaciones. Madrid.

Nasreddine, L., Rehaime, M., Kassaify, Z., Rechmany, R. and Jaber, F., 2016. Dietary exposure to pesticide residues from foods of plant origin and drinks in Lebanon. *Environ. Monit. Assess.* 188, 485-016-5505.

Nougadere, A., Sirot, V., Kadar, A., Fastier, A., Truchot, E., Vergnet, C., Hommet, F., Bayle, J., Gros, P. and Leblanc, J.C., 2012. Total diet study on pesticide residues in France: levels in food as consumed and chronic dietary risk to consumers. *Environ. Int.* 45, 135-150.

Nowrouz, P., Taghipour, H., Dastgiri, S., Bafandeh, Y. and Hashemimajd, K., 2012. Nitrate Determination of Vegetables in Varzeghan City, Northwestern Iran. *Health. Promot. Perspect.* 2, 244-250.

Pardo-Marin, O., Yusa-Pelecha, V., Villalba-Martin, P. and Perez-Dasi, J.A., 2010. Monitoring programme on nitrates in vegetables and vegetable-based baby foods marketed in the Region of Valencia, Spain: levels and estimated daily intake. *Food Addit Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 27, 478-486.

Parlamento y Consejo, 2011. Reglamento (UE) No. 1129/2011 del 11 de noviembre de 2011, por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) No. 1333/2008 para establecer una lista de aditivos de la Unión. *DOUE L* 295, 1-77.

Parlamento y Consejo UE, 2009. Reglamento (CE) No. 1107/2009 del 21 de octubre de 2009, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios por el que se derogan las Directivas 79/117/CEE y 91/414/CEE del Consejo. *DOUE L* 309, 1-50.

Parlamento y Consejo UE, 2006. Reglamento (CE) nº 1907/2006, de 18 de diciembre sobre el registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH), por el que se crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos, se modifica la

Directiva 1999/45/CE y se derogan el Reglamento (CEE) no 793/93 del Consejo y el Reglamento (CE) nº 1488/94 de la Comisión así como la Directiva 76/769/CEE del Consejo y las Directivas 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE y 2000/21/CE de la Comisión. DOUE. L396, 1-852.

Parlamento y Consejo UE, 2005. Reglamento (CE) Nº 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de febrero de 2005, relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo. DOUE L 70.

Parlamento y Consejo UE, 2004. Reglamento (CE) nº 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre los controles oficiales efectuados para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar de los animales. DOUE. L 165, 1-141.

Parlamento y Consejo UE, 2002. Reglamento (CE) Nº178/2002 de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan los procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. DOUE L31, 1-24.

Quijano, L., Yusa, V., Font, G. and Pardo, O., 2016. Chronic cumulative risk assessment of the exposure to organophosphorus, carbamate and pyrethroid and pyrethrin pesticides through fruit and vegetables consumption in the region of Valencia (Spain). Food Chem. Toxicol. 89, 39-46.

Raczuk, J., Wadas, W. and Glozak, K., 2014. Nitrates and nitrites in selected vegetables purchased at supermarkets in Siedlce, Poland. *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.* 65, 15-20.

Rauscher-Gabernig, E., Mischek, D., Moche, W. and Prean, M., 2013. Dietary intake of dioxins, furans and dioxin-like PCBs in Austria. *Food Addit Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 30, 1770-1779.

Reffstrup, T.K., Larsen, J.C. and Meyer, O., 2010. Risk assessment of mixtures of pesticides. Current approaches and future strategies. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 56, 174-192.

Roca, M., Yusà, V., 2013. Biomonitorización Humana de Contaminantes Ambientales. *Nemus : revista de l'Ateneu de Natura* 3, 59-69.

Saaristo, M., Brodin, T., Balshine, S., Bertram, M.G., Brooks, B.W., Ehlman, S.M., McCallum, E.S., Sih, A., Sundin, J., Wong, B.B.M. and Arnold, K.E., 2018. Direct and indirect effects of chemical contaminants on the behaviour, ecology and evolution of wildlife. *Proc. Biol. Sci.* 285.

Safe, S.H., 1998. Hazard and risk assessment of chemical mixtures using the toxic equivalency factor approach. *Environ. Health Perspect.* 106 Suppl 4, 1051-1058.

Santamaria, P., 2006. Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation. *J. Sci. Food Agric.* 86, 10-17.

Schwarz, M.A., Lindtner, O., Blume, K., Heinemeyer, G. and Schneider, K., 2014. Dioxin and dl-PCB exposure from food: the German LExUKon

project. Food Addit Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess. 31, 688-702.

SCF, 2001. Opinion of the SCF on the risk assessment of dioxins and dioxin-like PCBs in food. Update based on new scientific information available since the adoption of the SCF opinion of 22nd November 2000.

SCF, 1997. Opinion on nitrate and nitrite, Reports of the Scientific Committee for Food (SCF), Series 38, European Commission, Brussels.

SCF, 1992. Opinion on nitrate and nitrite. Reports of the Scientific Committee for Food (SCF), Series 26, European Commission, Brussels.

Sieke, C., Michalski, B. and Kuhl, T., 2018. Probabilistic dietary risk assessment of pesticide residues in foods for the German population based on food monitoring data from 2009 to 2014. J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol. 28, 46-54.

Silano, V., 2017. Food and feed chemical contaminants in the European Union: Regulatory, scientific, and technical issues concerning chemical contaminants occurrence, risk assessment, and risk management in the European Union AU - Silano, Marco. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 57, 2162-2217.

Sindelar, J.J. and Milkowski, A.L., 2012. Human safety controversies surrounding nitrate and nitrite in the diet. Nitric Oxide 26, 259-266.

Sirot, V., Tard, A., Venisseau, A., Brosseaud, A., Marchand, P., Le Bizec, B. and Leblanc, J., 2012. Dietary exposure to polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and polychlorinated biphenyls of the

French population: Results of the second French Total Diet Study. *Chemosphere* 88, 492-500.

Steenland, K., Bertazzi, P., Baccarelli, A. and Kogevinas, M., 2004. Dioxin revisited: developments since the 1997 IARC classification of dioxin as a human carcinogen. *Environ. Health Perspect.* 112, 1265-1268.

Temme, E.H., Vandevijvere, S., Vinx, C., Huybrechts, I., Goeyens, L. and Van Oyen, H., 2011. Average daily nitrate and nitrite intake in the Belgian population older than 15 years. *Food Addit Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 28, 1193-1204.

Thomson, B.M., Nokes, C.J. and Cressey, P.J., 2007. Intake and risk assessment of nitrate and nitrite from New Zealand foods and drinking water. *Food Addit. Contam.* 24, 113-121.

Tlustos, C., Anderson, W., Flynn, A. and Pratt, I., 2014. Exposure of the adult population resident in Ireland to dioxins and PCBs from the diet. *Food Addit Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 31, 1100-1113.

Tsukimori, K., Morokuma, S., Hori, T., Takahashi, K., Hirata, T., Otera, Y., Fukushima, K., Kawamoto, T. and Wake, N., 2013. Characterization of placental transfer of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and polychlorinated biphenyls in normal pregnancy. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 39, 83-90.

Ulaszewska, M.M., Zuccato, E. and Davoli, E., 2011. PCDD/Fs and dioxin-like PCBs in human milk and estimation of infant daily intake: a review. *Chemosphere* 83, 774-782.

Valcke, M., Bourgault, M.H., Rochette, L., Normandin, L., Samuel, O., Belleville, D., Blanchet, C. and Phaneuf, D., 2017. Human health risk assessment on the consumption of fruits and vegetables containing residual pesticides: A cancer and non-cancer risk/benefit perspective. *Environ. Int.* 108, 63-74.

Van den Berg, M., Kypke, K., Kotz, A., Tritscher, A., Lee, S.Y., Magulova, K., Fiedler, H. and Malisch, R., 2017. WHO/UNEP global surveys of PCDDs, PCDFs, PCBs and DDTs in human milk and benefit-risk evaluation of breastfeeding. *Arch. Toxicol.* 91, 83-96.

Van den Berg, M., Birnbaum, L., Bosveld, A.T., Brunstrom, B., Cook, P. et al., 1998. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ. Health Perspect.* 106, 775-792.

Van der Voet, H., de Boer, W.J., Kruisselbrink, J.W., Goedhart, P.W., van der Heijden, G.W., Kennedy, M.C., Boon, P.E. and van Klaveren, J.D., 2015. The MCRA model for probabilistic single-compound and cumulative risk assessment of pesticides. *Food Chem. Toxicol.* 79, 5-12.

Weitzberg, E. and Lundberg, J.O., 2013. Novel aspects of dietary nitrate and human health. *Annu. Rev. Nutr.* 33, 129-159.

WHO, 2017. Human health risk assessment toolkit: chemical hazards. (IPCS) International Program on Chemical Safety. Harmonization Project Document No 8.

WHO, 2015. WHO Estimates of the Global Burden of Foodborne Diseases: Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group 2007-2015.

WHO, 2010. Human health risk assessment toolkit: chemical hazards. IPCS (International Program on Chemical Safety). Harmonization Project Document; no 8.

WHO, 2007. Nitrate and Nitrite in Drinking Water Development of WHO Guidelines for Drinking Water Quality (pp.21). Geneva. Switzerland, 1-21.

WHO, 2000. Consultation on assessment of the health risk of dioxins; re-evaluation of the tolerable daily intake (TDI): executive summary. Food Addit. Contam. 17, 223-240.

WHO, 1998. Consultation on assessment of the health risk of dioxin; re-evaluation of the tolerable daily intake (TDI). Food Addit. Contam. 17 (4), 223-240.

WHO/FAO, 2003. Joint WHO/FAO Expert Report on Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Disease.

Wong, W.W., Yau, A.T., Chung, S.W., Lam, C.H., Ma, S., Ho, Y.Y. and Xiao, Y., 2014. Dietary exposure of Hong Kong adults to pesticide residues: results of the first Hong Kong Total Diet Study. Food Addit Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess. 31, 852-871.

Wong, W.W., Yip, Y.C., Choi, K.K., Ho, Y.Y. and Xiao, Y., 2013. Dietary exposure to dioxins and dioxin-like PCBs of Hong Kong adults: results of the first Hong Kong Total Diet Study. Food Addit Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess. 30, 2152-2158.

Yusà, V., 2011. Contaminats ambientals presents en el nostre cos. Viure en salut 89, 7-8.



Zentai, A., Szabo, I.J., Kerekes, K. and Ambrus, A., 2016. Risk assessment of the cumulative acute exposure of Hungarian population to organophosphorus pesticide residues with regard to consumers of plant based foods. *Food Chem. Toxicol.* 89, 67-72.

Zhang, L., Yin, S., Wang, X., Li, J., Zhao, Y., Li, X., Shen, H. and Wu, Y., 2015. Assessment of dietary intake of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans and dioxin-like polychlorinated biphenyls from the Chinese Total Diet Study in 2011. *Chemosphere* 137, 178-184.



## **2. OBJETIVOS**

---



## 2. OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis doctoral, es la evaluación del riesgo de exposición a contaminantes a través de los alimentos, para ello se plantean los siguientes objetivos parciales:

1. Estimar bajo un enfoque determinista, la evaluación de la exposición a plaguicidas organofosforados, carbamatos y piretroides, a través del consumo de frutas y verduras para la población de la Comunidad Valenciana, y caracterizar el riesgo derivado de dicha exposición en adultos y niños.

2. Estimar bajo un enfoque probabilístico, la evaluación de la exposición a nitratos a través del consumo de vegetales en la población de la Comunidad Valenciana, y caracterizar el riesgo derivado de dicha exposición en adultos y niños.

3. Estimar bajo un enfoque probabilístico y con los datos provenientes del Estudio de Dieta Total, la evaluación de la exposición a dioxinas a través de la dieta, para la población de la Comunidad Valenciana, y caracterizar el riesgo derivado de dicha exposición en adultos y niños.

4. Determinar los principales grupos de alimentos que contribuyen a la exposición de plaguicidas, nitratos y dioxinas.



## **3. RESULTADOS**

---





**3.1 Chronic cumulative risk assessment of the exposure to organophosphorus, carbamate and pyrethroid and pyrethrin pesticides through fruit and vegetable consumption in the region of Valencia**

---



*Food and Chemical Toxicology* 89, (2016) 39-46

**Chronic cumulative risk assessment of the exposure to organophosphorus, carbamate and pyrethroid and pyrethrin pesticides through fruit and vegetable consumption in the region of Valencia**

Leyre Quijano<sup>a</sup>, Vicent Yusà<sup>b,c</sup>, Guillermina Font<sup>a</sup>, Olga Pardo<sup>b,c\*</sup>

<sup>a</sup>Preventive Medicine and Public Health, Food Sciences, Toxicology and Forensic Medicine Department, University of Valencia, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

<sup>b</sup>Food Safety Research Area, Center for Public Health Research (CSISP), FISABIO. Av. Catalunya, 21, 46020, Valencia, Spain

<sup>c</sup>Analytical Chemistry Department. University of Valencia, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

*Keywords:* Chronic cumulative dietary exposure; Deterministic risk assessment; Pesticides; RPF approach; Vegetables; Fruits

\*Corresponding author: Olga Pardo.

e-mail: pardo\_olg@gva.es (O. Pardo)

Tel.:+34961925784

## Abstract

In the present study, the chronic cumulative exposure to organophosphorus (OPs), carbamate (CBs) and pyrethroid and pyrethrin (PPs) pesticides in the region of Valencia through fruit and vegetables consumption is presented. A total of 752 samples and 84 pesticides were studied of which, 52 were OPs, 23 CBs and 9 PPs. Residue data were derived from the Valencia Region monitoring program 2007-2011 and food consumption levels from a questionnaire-based dietary survey conducted in 2010 in the same area. The relative potency factor (RPFs) approach was used to estimate chronic cumulative dietary exposure to OPs, CBs and PPs using acephate, oxamyl and deltamethrin as index compounds, respectively. The exposure was estimated using a deterministic approach and two scenarios were assumed for left-censored results: the lower-bound (LB) scenario, in which unquantified results (below the limit of quantification (LOQ)) were set to zero and the upper-bound (UB) scenario, in which unquantified results were set to the LOQ. Results demonstrate that the chronic exposure of the young (<16 years) and adult ( $\geq 16$  years) population to pesticides through fruits and vegetables is under control (even at high or frequent consumption of fruits and vegetables), for the three groups of pesticides.

## 1. Introduction

Pesticides are used before and after harvest to protect crops from infestation by pest and plant diseases. The use of pesticides in the European Union (EU) is intensive. Only in 2010, pesticide-active ingredient

consumption in the EU was about 208,000 tons (including insecticides, fungicides and herbicides), of which 19% (about 39,000 tonnes) had their origin in Spain (AEPLA, 2009). Valencia is the second most important agricultural area in Spain and one of the regions with the highest pesticide use, 12.1% of the national total in 2009 (ECPA, 2010). One possible consequence of pesticide use is the presence of their residues in treated commodities and eventually in the food chain. It is therefore necessary to ensure that such residues in food do not present an unacceptable risk for consumers, due to the fact that pesticides are biologically active compounds with a component-specific inherent toxicity. Although pesticide exposure can occur through different routes, such as inhalation, dermal exposure and dietary and non-dietary intake, food has been recognized as the main exposure route to pesticide residues for consumers not working with pesticides (Juraske et al., 2009). According to the World Health Organization (WHO), food consumption consists on average of 30% of fruits and vegetables (WHO, 2003) and it is well known that fruits and vegetables are more contaminated by pesticides than products of animal origin (Claeys et al., 2011). In addition, fruits and vegetables are frequently consumed raw or semi-processed and as a consequence it is expected that they contain higher pesticide-residue levels than other food groups of plant origin such as cereals.

To evaluate food safety, exposure needs to be assessed and compared to health safety limits or toxicological endpoint values. For quantitative exposure assessment, data on food consumption and chemical occurrence are usually combined using either a deterministic (Jensen et al.,

2003) or probabilistic approach (Nougadere et al. 2012). The Scientific Panel on Plant Protection products and their Residues (PPR) recommended (EFSA, 2010), for chronic exposure assessments, a tiered approach for exposure estimations, starting with different deterministic methodologies and ending with probabilistic approaches. If a lower tier assessment (such as the deterministic assessment) does not give adequate reassurance of safety, the risk assessor should progress to higher tier method (including probabilistic methodologies). For this reason, a deterministic approach was selected to carry out this chronic cumulative risk assessment. Dietary assessment of the exposure to pesticide residues is traditionally performed for single compounds. However, people are daily exposed to more than one pesticide through diet, because a food may contain more than one residue or people consume combinations of foods containing different pesticides. If these compounds have the same toxicologically endpoint and the same mechanism of action, the conventional way of assessing the dietary risk of exposure to pesticides separately may lead to an underestimation of the health risk (Boon et al., 2008). Therefore, to address the risk of exposure to such compounds, the individual exposures should be addressed simultaneously. In this respect, cumulative exposure can be defined as simultaneous or subsequent exposures to various chemicals that contribute to a cumulative effect.

To assess the pesticides as a mixture the first step is to identify the substances with a common mechanism of toxicity (Gallagher et al., 2015). Some organophosphorus (OPs), carbamate (CBs) and pyrethrin and pyrethroid (PPs) pesticides causing a common neurotoxic effect

(cholinesterase inhibition for OPs and carbamate and behavioural changes for PPs) have been identified by United States Environmental Protection Agency (USEPA) as members of the same cumulative assessment group (USEPA, 2006; USEPA, 2007; USEPA, 2011). To assess the cumulative dietary exposure, the relative potency factor (RPF) approach, based on dose addition is believed to be appropriate to estimate the cumulative effects of common mechanism chemicals (Jensen et al., 2013; Kennedy et al., 2015). This approach assumes doses of component chemicals that act in a toxicologically similar manner can be added together after scaling the doses by their potencies, relative to a selected index chemical, to generate exposure equivalents. By comparing the cumulative dietary exposure with a toxicological reference dose (in the case of chronic exposure, acceptable daily intake (ADI)) of the chosen index compound, the risk can be evaluated.

The aim of this study is to calculate, under a deterministic approach, the chronic cumulative chronic exposure to OPs, CBs and PPs pesticides through fruits and vegetables consumed by local inhabitants of the region of Valencia, and to characterize the associated risk. For the chronic cumulative risk assessment, acephate, oxamyl and deltamethrin were selected as index compounds for OPs, CBs and PPs, respectively.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Food sampling and residue data*

Residue data were obtained from the Valencia Region monitoring program 2007-2011.

A total of 752 individual samples of fruits and vegetables (see Table 1) were collected in different areas (covering rural and urban areas and different geographic location) and seasons to take into account potential variability. Sampling was carried out by inspectors from the Public Health Department and it was performed according to Directive 2002/63/EC on sampling for official control of pesticide residues (European Commission, 2002) at wholesalers. Although the sampling plan was set up to ensure compliance with the maximum residue limits set in the legislation, the most frequently consumed commodities in the Region of Valencia were considered based on risk assessment.

Only *pesticide-food* pairs with at least one quantified residue above the limit of reporting (LOR), corresponding to the LOQ value of 0.01 mg/kg, were included in the calculations. Analytical concentrations were normalised to wet sample weights and results were corrected by the recovery rate.

*Left-censored results* (data below the quantification limit) were processed according EFSA recommendations (EFSA, 2012). Residues below the LOR were treated as true zeros in the optimistic or lower-bound (LB) scenario assessment and were set to LOR in the pessimistic or upper-bound (UB) scenario assessment.

## 2.2 Analysis of pesticide residues

Analyses were conducted by the Laboratorio Agroalimentario de Valencia (Burjassot), a European Union Reference Laboratory, accredited following the ISO/IEC 17025 standard. Multiresidue methods based on



either gas chromatography (GC) or high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled with mass spectrometry (MS) were used to screen the 84 pesticides (52 OPs, 23 CBs and 9 PPs, see Table 1).

### *2.3. Consumption data*

Intake estimates were based on consumption data obtained from a questionnaire-based dietary survey that was conducted and validated in 2010-2011 by the Valencia Public Health Directorate. Dietary data were collected through a 24-hour recall in which 1478 subjects (195 young people from 6 to 15 years and mean 43.5 kg body weight and 1281 adults from 16 to 95 years and 71.2 kg mean body weight) were asked in a face-to-face interview to recall and describe the kinds and amounts of all foods and beverages ingested during the previous 24-hour period. The initial sample of individuals was divided in three waves or groups in order to take into account variations in consumption patterns according to season; the first wave was conducted between the months of June and July 2010, the second between September and November, and the third between November and February of 2011. Self-reported body weight was also collected in the face-to-face interview and used in exposure calculations.

In dietary surveys, the consumption is given for food eaten, while the residues of pesticides are usually determined in raw agricultural commodities (RACs). The approach used to convert “food as eaten” to edible RACs was that of P. E. Boon et al. (2008) using the Dutch conversion table.

#### 2.4. Chronic cumulative risk assessment and risk characterization

The first step for the calculation of the chronic cumulative exposure was to obtain the individual pesticide intakes (or the intake for each single compound), from the consumption data in our dietary survey and the analytical data from the present study. A deterministic approach, based on single point estimates that were used for each variable within the model (such as an average value or the 95<sup>th</sup> percentile) was used. The individual estimated daily intake (iEDI) in a pair pesticide-commodity was calculated for young children (6-15 years) and for adults (16-95 years) according to the following equation:

$$\text{iEDI (mg/mean kg body weight/day)} = C_i \times F_i$$

where

$C_i$ : Residue level for food commodity

$F_i$ : Food consumption of food commodity

**Table 1:** Pesticide levels found in the Valencia monitoring program (2007-2011)

Commodity	Active substance	No. of analysis performed	Frequency	Min (mg/kg)	Max (mg/kg)	Mean (LB) (mg/kg)	Mean (UB) (mg/kg)
			of detection %				
Apple	Azinphos -methyl (OP)	114	0.9	0.02	0.02	0.00	0.01
	Carbendazim (CB)	114	21.9	0.01	0.37	0.01	0.02
	Chlorpropham (CB)	114	0.9	0.03	0.03	0.00	0.03
	Chlorpyrifos (OP)	114	25.4	0.01	0.47	0.02	0.04
	Cypermethrin (P)	114	6.1	0.01	0.08	0.00	0.03

Commodity	Active substance	No. of analysis performed	Frequency	Min (mg/kg)	Max (mg/kg)	Mean (LB) (mg/kg)	Mean (UB) (mg/kg)
			of detection %				
	Dimethoate (OP)	114	0.9	0.12	0.12	0.00	0.01
	Fenoxycarb (CB)	105	1.0	0.01	0.01	0.00	0.01
	Fluvanilate (P)	105	1.0	0.02	0.02	0.00	0.01
	Iprovalicarb (CB)	105	5.7	0.03	0.20	0.01	0.03
	Lambda-Cyhalothrin (P)	114	5.3	0.01	0.04	0.00	0.02
	Phosmet (OP)	105	4.8	0.02	0.28	0.00	0.01
	Pirimicarb (CB)	105	1.9	0.04	0.05	0.00	0.04
	Thiophanate-methyl (CB)	105	2.9	0.01	0.42	0.00	0.03
	Trichlorphon (OP)	71	1.4	0.18	0.18	0.00	0.01
Banana	Bifentrin (P)	45	6.7	0.07	0.09	0.01	0.04
	Carbendazim (CB)	45	15.6	0.01	0.30	0.01	0.02
	Chlorpyrifos (OP)	45	66.7	0.02	1.96	0.14	0.15
	Cypermethrin (P)	45	2.2	0.07	0.07	0.00	0.03
	Lambda-Cyhalothrin (P)	45	2.2	0.04	0.04	0.00	0.02
	Phosmet (OP)	45	2.2	0.03	0.03	0.00	0.01
	Trichlorphon (OP)	33	3.0	0.07	0.07	0.00	0.01
Beans	Methiocarb (CB)	10	10.0	0.01	0.01	0.00	0.01
	Oxamyl (CB)	10	10.0	0.03	0.03	0.00	0.01
	Bifentrin (P)	10	10.0	0.02	0.02	0.00	0.01
Carrot	Carbendazim (CB)	35	5.7	0.01	0.01	0.00	0.01
	Chlorpyrifos (OP)	35	2.9	0.01	0.01	0.00	0.02
	Iprovalicarb (CB)	24	4.2	0.03	0.03	0.00	0.03
Citrus fruits	Lambda-Cyhalothrin (P)	94	5.3	0.01	0.12	0.00	0.02
	Carbaryl (CB)	94	1.1	0.03	0.03	0.00	0.01

Commodity	Active substance	No. of analysis performed	Frequency of detection %	Min (mg/kg)	Max (mg/kg)	Mean (LB) (mg/kg)	Mean (UB) (mg/kg)
	Carbendazim (CB)	94	11.7	0.01	0.07	0.00	0.01
	Carbofuran (CB)	94	2.1	0.02	0.05	0.00	0.01
	Chlorpyrifos (OP)	93	34.4	0.01	0.20	0.03	0.04
	Chlorpyrifos- methyl (OP)	3	33.3	0.06	0.06	0.00	0.04
	Malathion (OP)	95	4.2	0.05	0.10	0.00	0.03
	Oxamyl (CB)	94	1.1	0.03	0.03	0.00	0.03
	Phenthion (OP)	69	1.4	0.10	0.10	0.00	0.01
	Phosmet (OP)	70	4.3	0.02	0.04	0.00	0.01
	Thiophanate-methyl (CB)	69	1.4	0.04	0.04	0.00	0.03
	Pyrimiphos-methyl (OP)	94	1.1	0.03	0.03	0.00	0.03
Citrus juice	Carbendazim (CB)	10	20.0	0.03	0.03	0.01	0.01
	Phosmet (OP)	10	10.0	0.36	0.36	0.04	0.05
Cucumber	Cadusafos (OP)	25	4.0	0.01	0.01	0.00	0.01
	Chlorpyrifos (OP)	25	8.0	0.12	0.48	0.02	0.04
	Pirimicarb (CB)	26	3.8	0.36	0.36	0.01	0.08
Grape	Bifentrin (P)	9	11.1	0.08	0.08	0.01	0.05
	Carbendazim (CB)	9	55.6	0.02	0.29	0.05	0.05
	Chlorpyrifos (OP)	9	33.3	0.06	0.30	0.05	0.09
	Lambda-Cyhalothrin (P)	9	11.1	0.07	0.07	0.01	0.03
Lettuce	Bifentrin (P)	37	8.1	0.06	0.08	0.01	0.05
	Carbendazim (CB)	37	16.2	0.01	0.01	0.00	0.02
	Chlorpyrifos (OP)	37	2.7	0.02	0.02	0.00	0.02
	Cypermethrin (P)	37	5.4	0.05	0.09	0.00	0.03
	Dimethoate (OP)	37	2.7	0.03	0.03	0.00	0.01

Commodity	Active substance	No. of analysis performed	Frequency	Min (mg/kg)	Max (mg/kg)	Mean (LB) (mg/kg)	Mean (UB) (mg/kg)
			of detection %				
Peach	Lambda-Cyhalothrin (P)	37	2.7	0.07	0.07	0.00	0.02
	Methomyl (CB)	37	5.4	0.01	0.01	0.00	0.01
	Parathion-methyl (OP)	37	2.7	0.01	0.09	0.00	0.02
	Pyrazophos (OP)	37	2.7	0.02	0.02	0.00	0.04
	Thiophanate-methyl (CB)	21	4.8	0.07	0.07	0.00	0.05
	Azinphos -methyl (OP)	33	12.1	0.02	0.04	0.00	0.02
	Chlorpyrifos (OP)	33	12.1	0.02	0.03	0.00	0.03
	Chlorpyrifos- methyl (OP)	33	3.0	0.03	0.03	0.00	0.04
	Malathion (OP)	33	3.0	0.40	0.40	0.01	0.05
	Phention (OP)	25	4.0	0.06	0.06	0.00	0.01
	Carbendazim (CB)	33	27.3	0.01	0.45	0.02	0.03
	Cypermethrin (P)	33	3.0	0.03	0.03	0.02	0.03
	Deltamethrin (P)	33	3.0	0.01	0.01	0.04	0.05
	Fenoxycarb (CB)	25	4.0	0.02	0.02	0.00	0.01
	Fluvanilate (P)	25	4.0	0.01	0.01	0.00	0.01
Pear	Lambda-Cyhalothrin (P)	33	21.2	0.01	0.05	0.01	0.02
	Thiophanate-methyl (CB)	25	8.0	0.02	0.14	0.01	0.04
	Azinphos -methyl (OP)	68	1.5	0.04	0.04	0.00	0.01
	Bifentrin (P)	68	2.9	0.01	0.03	0.04	0.04
	Carbendazim (CB)	76	14.5	0.01	1.40	0.03	0.04
	Chlorpyrifos (OP)	68	19.1	0.02	0.12	0.01	0.03
	Chlorpyrifos- methyl (OP)	68	2.9	0.03	0.03	0.00	0.04
	Ciflutrin (P)	60	1.7	0.02	0.02	0.00	0.02
Cypermethrin (P)	68	17.6	0.01	0.12	0.01	0.04	

Commodity	Active substance	No. of analysis performed	Frequency	Min (mg/kg)	Max (mg/kg)	Mean (LB) (mg/kg)	Mean (UB) (mg/kg)
			of detection %				
	Deltamertrin (P)	68	1.5	0.01	0.01	0.04	0.04
	Dimethoate (OP)	68	1.5	0.01	0.01	0.00	0.01
	Esfenvarelate (P)	60	1.7	0.03	0.03	0.00	0.02
	Fenoxycarb (CB)	60	18.3	0.01	0.17	0.01	0.02
	Iprovalicarb (CB)	60	6.7	0.01	0.42	0.01	0.03
	Lambda-Cyhalothrin (P)	68	13.2	0.01	0.41	0.01	0.02
	Malathion (OP)	68	1.5	0.10	0.10	0.00	0.03
	Phosalon (OP)	68	1.5	0.20	0.20	0.00	0.07
	Phosmet (OP)	60	13.3	0.02	0.60	0.03	0.03
	Pyrazophos (OP)	49	2.0	0.02	0.02	0.00	0.05
	Thiophanate-methyl (CB)	60	3.3	0.01	0.03	0.00	0.03
Peas	Dimethoate (OP)	10	10.0	0.08	0.08	0.01	0.02
	Fenoxycarb (CB)	11	9.1	0.10	0.10	0.01	0.02
Pepper	Bifentrin (P)	27	3.7	0.19	0.19	0.01	0.06
	Carbendazim (CB)	27	40.7	0.01	0.01	0.00	0.01
	Ciflutrin (P)	26	3.8	0.02	0.02	0.00	0.02
	Thiophanate-methyl (CB)	26	3.8	0.36	0.36	0.01	0.08
Potatoe	Carbendazim (CB)	70	5.7	0.01	0.01	0.00	0.01
	Chlorpropham (CB)	70	27.1	0.03	3.60	0.32	0.34
	Chlorpyrifos (OP)	70	2.9	0.02	0.17	0.00	0.02
	Fenoxycarb (CB)	49	4.1	0.02	0.05	0.00	0.01
Spinach	Chlorpyrifos (OP)	24	8.3	0.05	0.08	0.01	0.02
	Cypermethrin (P)	24	12.5	0.02	0.38	0.02	0.04
	Deltamertrin (P)	24	12.5	0.05	0.23	0.02	0.04

Commodity	Active substance	No. of analysis performed	Frequency	Min (mg/kg)	Max (mg/kg)	Mean (LB) (mg/kg)	Mean (UB) (mg/kg)
			of detection %				
Strawberry	Dimethoate (OP)	24	4.2	0.01	0.01	0.00	0.01
	Lambda-Cyhalothrin (P)	24	25.0	0.02	0.20	0.02	0.04
	Methiocarb (CB)	24	8.3	0.31	0.79	0.05	0.05
	Pirimicarb (CB)	24	4.2	0.19	0.19	0.01	0.01
	Carbendazim (CB)	15	6.7	0.10	0.10	0.01	0.03
	Fenoxycarb (CB)	15	6.7	0.15	0.15	0.01	0.03
	Formethanate (CB)	12	25.0	0.09	0.47	0.07	0.09
Tomato	Thiophanate-methyl (CB)	15	6.7	0.10	0.10	0.01	0.08
	Bifentrin (P)	90	1.1	0.05	0.05	0.00	0.05
	Carbendazim (CB)	90	13.3	0.01	0.40	0.01	0.02
	Chlorpropham (CB)	90	1.1	0.08	0.08	0.00	0.04
	Chlorpyrifos (OP)	90	12.2	0.05	0.45	0.02	0.04
	Chlorpyrifos- methyl (OP)	90	2.2	0.08	0.13	0.00	0.04
	Ciflutrin (P)	69	1.4	0.02	0.02	0.00	0.02
	Cypermethrin (P)	90	6.7	0.02	0.08	0.00	0.04
	Diethofencarb (CB)	69	1.4	0.04	0.04	0.00	0.02
	Esfenvalerate (P)	69	2.9	0.04	0.04	0.00	0.02
	Fenoxycarb (CB)	69	1.4	0.50	0.50	0.01	0.02
	Lambda-Cyhalothrin (P)	90	4.4	0.01	0.04	0.00	0.02
	Methomyl (CB)	90	2.2	0.01	0.01	0.00	0.01
	Parathion-methyl (OP)	90	1.1	0.12	0.12	0.00	0.02
	Pyrazophos (OP)	90	2.2	0.02	0.02	0.00	0.04
	Pyrimiphos-methyl (OP)	90	1.1	0.06	0.06	0.00	0.04
Thiophanate-methyl (CB)	69	2.9	0.01	0.15	0.00	0.03	

Pesticides analysed in this study:

OPs: Acephate, Azinphos-methyl, Bromophos-ethyl, Cadusafos, Chlorfenvinphos ,Chlorpyrifos, Chlorpyrifos-methyl, Chlortiophos, Demeton-S-methyl, Demeton-S-methylsulfone, Diazinon, Dichlorvos, Dicrotophos, Dimethoate, Ethion, Ethoprophos, Etrimphos, Fenamiphos, Fenchlorphos, Fenitrothion, Phenthion-sulfoxide, Fensulfothion, Fosthiazate, Isocarbophos ,Isofenphos-methyl, Malathion, Mecarbam ,Malaoxon, Metamidiphos, Methacrifos, Methidathion, Mevinphos, Monocrotophos, Omethoate, Paraoxon-methyl, Parathion, Parathion-methyl, Phention, Phenthoate, Phorate ,Phosalon, Phosmet, Pyrazophos, Pyridaphenthion, Pyrimiphos-methyl, Prophenophos, Prothiophos, Quinalphos, Terbufos, Tolclophos-methyl, Triazophos, Trichlorphon.

CBs: Aldicarb, Benfuracarb, Carbaryl, Carbendazim, Carbetamide, Carbofuran, Carbosulfan ,Chlorpropham, Diethonfencarb, Ethiofencarb, Fenobucarb Fenoxycarb, Formethanate, Iprovalicarb,Isoproc carb, Methiocarb, Methomyl, Oxamyl, Pirimicarb, Promecarb, Propoxur, Thiodicarb, Thiophanate-methyl.

PPs: Bifentrin, Ciflutrin, Cypermetrin, Deltametrin, Esfenvalerate, Fenpropatrin, Fluvanilate, Lambda-Cyhalothrin, Permetrin.

LB: lower-bound scenario.

UB: upper- bound scenario.

To minimize consumer risk, point-estimated daily intakes of pesticides via fruits and vegetables were determined by multiplying the mean pesticide concentration in a food commodity by the mean or the 95th percentile (P95) of the food consumption. The mean-estimated residue levels obtained in the LB and UB scenarios were used to estimate the dietary exposure.

Secondly, for chronic cumulative risk assessment, the relative potency factors (RPF) approach was used. RPFs reported by the US Environmental Protection Agency (USEPA) were employed and acephate, oxamyl and deltamethrin were selected as index compounds for OPs (USEPA, 2006), CBs (USEPA, 2007) and PPs (USEPA, 2011), respectively. These RPFs can be found in the supplementary data associated to this article (see Appendix). As can be seen, the RPFs of 12 OPs, 7 CBs and 7 PPs were found in the literature and therefore only these pesticides



have been taken into account for the chronic cumulative exposure calculation.

The chronic cumulative exposure was expressed as acephate, oxamyl or deltamethrin equivalents by multiplying the iEDI of each pair pesticide-commodity by its RPF and adding up the different equivalents to one cumulative intake. Finally, the total chronic cumulative intake for each group of pesticides (OPs, CBs, PPs) was calculated adding up the cumulative intakes in each commodity. This methodology makes possible to calculate the commodities that contributed the most to the chronic cumulative exposure.

On the other hand, to assess which pesticides contributed the most to the chronic exposure in the three groups of pesticides, EDI for the different pesticides was calculated by adding up the corresponding iEDI in the different commodities. Multiplying the individual exposure of each pesticide by its RPF and comparing them with the total chronic cumulative intake (calculated adding up the different equivalents), the contribution of the different pesticides to the exposure can be obtained.

The P95 or high level of chronic cumulative exposure was estimated by including the two commodities contributing most to the mean exposure at the P95 level of exposure (for adults, citrus and tomatoes for OPs and CBs and pears and tomatoes for PPs; for children, citrus and banana for OPs, citrus and potatoes for CBs and banana and tomatoes for PPs) and the remaining foods at the mean level of exposure.

To assess whether there was a risk of chronic cumulative exposure, the mean and the P95 of the cumulative EDIs of OPs, CBs and PPs were compared to the ADI of the corresponding index compound.

### *2.5. Uncertainty analysis*

Unquantifiable uncertainties associated with exposure assessment have been considered for the interpretation of the results.

## **3. Results and discussion**

### *3.1. Food consumption and pesticide residues*

Table 2 shows a summary of the food consumption data from the regional survey for both young people and adults. Data are shown for both young people and adults.

The average concentrations (mean) of the pesticides found in the different commodities acquired in the Region of Valencia during 2007-2011 are shown in Table 1, corresponding to 13 OPs, 13 CBs and 7 PPs. Residue levels were compared to the corresponding raw commodities maximum residue limits (MRLs) derived from the European Commission Regulation No 396/2005. Of the 752 samples analyzed, 336 samples (45%) had levels above the limit of quantification for any of the pesticides analyzed. Of these, only 13 (3%) exceeded the MRLs established by law, corresponding to 2 tomatoe (for chlorpropham and parathion-methyl, respectively), 2 peach (for carbendazim and phosmet, respectively), 2 pear (for carbendazim and phosmet, respectively), 2 cumumber (both for chlorpyrifos), 1 apple (for carbendazim), 1 banana (for carbendazim), 1 spinach (for methyocarb) and

1 green bean (for oxamyl) samples. Pears, tomatoes and apples were the commodities in which more different pesticide residues from different samples were quantified (18, 16 and 14 different residues, respectively) whereas all leek samples had residue concentrations below LOQ. The highest concentration of pesticide residue was 3.6 mg/kg of chlorpropham found in potatoes.

**Table 2:** Average consumption data from the dietary survey conducted by the Valencia Public Health Directorate

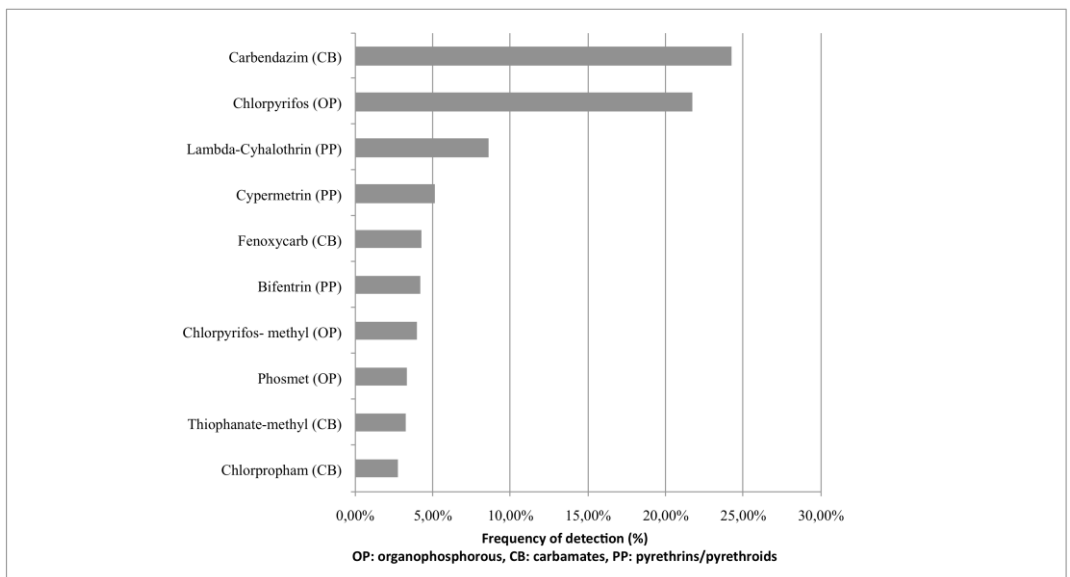
Commodity	Mean (g/kg bw/day)		P95 (g/kg bw/day)	
	Adults	Young People	Adults	Young People
Citrus fruits	0.69	0.84	5.27	8.38
Cabbages	0.04	0.05	0.00	0.00
Spinach	0.03	0.07	0.00	0.00
Strawberries	0.01	0.02	0.00	0.00
Peas	0.03	0.04	0.28	0.41
Beans	0.11	0.13	0.59	1.02
Lettuce	0.17	0.19	0.95	1.07
Apples	0.40	0.41	2.69	3.28
Peaches	0.31	0.24	2.51	1.96
Potatoes	0.16	0.49	1.01	2.72
Cucumbers	0.09	0.06	0.64	0.28
Pears	0.19	0.24	1.80	2.38
Peppers	0.13	0.07	0.80	0.82
Bananas	0.34	0.95	2.35	5.60
Leeks	0.02	0.03	0.00	0.00
Tomatoes	0.87	1.09	3.55	5.00
Grapes	0.06	0.06	0.00	0.00
Carrots	0.19	0.33	1.14	2.03
Citrus juice	0.28	0.42	0.00	2.40

Citrus fruits including oranges, mandarins and lemons. P95: 95th percentile, Bw: body weight.

In a previous study carried out in the Valencia Region (Berrada et al., 2010), researchers reported chlorpyrifos, chlorothalonil, dithiocarbamates and phention in peach samples. Two of them (chlorpyrifos and phention) had also been found in the present study; the average levels of these pesticide residues were 0.09 mg/kg and 0.01 mg/kg in the Berrada study, and 0.025 mg/kg and 0.012 mg/kg respectively, in the present study (UB scenario). The EFSA report on the results of the EU Member States monitoring of pesticide residues in food commodities (EFSA, 2014), also reported levels of pesticides in beans, carrots, cucumbers, pears, potatoes and spinach among others, with similar results to those in the present study. In the European report, carbendazim and cypermethrin were the most frequently detected pesticides in beans both with a percentage lower than 5% while in our study were oxamyl and methiocarb with a frequency around 10%. Regarding carrots, the most frequently detected pesticide was chlorpyrifos (5%) in the EFSA report, while in our study it was carbendazim (6%). On the other hand, in cucumbers carbendazim and chlorpyrifos were detected in Europe (5%) whereas only chlorpyrifos was found in Valencia (8%). In pears and spinachs the most frequently detected pesticide was chlorpyrifos in both studies, with similar frequencies of detection (15 and 8 % in the EU and 19 and 25% in the present study, for pears and spinach, respectively). Finally, chlorpropham was the most frequently detected pesticide reported in potatoes in both works, with similar frequencies of detection (between 23% and 27%). In conclusion, the results of the pesticides found in the current study for peaches suggest that pesticide use has declined in the Region of Valencia in recent years in this type of crops

due to the decrease in number of pesticides found as well as in levels. Moreover, the results show that pesticides applied in Spain are often not the same as those applied in Europe in beans, carrots, cucumbers, pears, potatoes and spinach, although it seems that chlorpyrifos is used frequently in cucumbers, pears and spinach in both studies. However, it seems that chlorpropham is the quintessential pesticide used on potatoes in Spain and in Europe.

The frequency of detection of the ten most frequently-detected pesticides found in all fruit and vegetable samples considered in this study is shown in Figure 1.



**Figure 1.** Ten most frequently detected pesticides in the fruits and vegetables analyzed.

Carbendazim was the most frequently detected pesticide (24% of the overall samples). It was found in 13 commodities, mainly grapes and

peppers. Chlorpyrifos was detected in 22% of the samples, especially in bananas and citrus fruits and finally lambda-cyhalothrin was reported in 9% of the samples analyzed, particularly in spinach and peaches. These results are in accordance with the reports of the EU (EFSA, 2014) in which chlorpyrifos was informed to be the most frequently detected OP pesticide. On the other hand, chlorpropham and cypermetrin were the CBs and PP respectively more frequently detected in the European report, while carbendazim and lambda-cyhalothrin were the CB and PP more frequently found in our study. Nevertheless, chlorpropham and cypermetrin appeared also in the Figure 1 representing the ten most frequently detected pesticides.

### *3.2. Evaluation of cumulative dietary exposure and risk characterization*

Table 3 presents the chronic cumulative EDI of OPs, CBs and PPs pesticides in the LB and UB scenarios. Long-term exposure of the Valencia consumers to pesticide residues through fruit and vegetable consumption was low for OPs, CBs and PPs (less than 40% of the index compound ADI). The highest exposure values were observed in OPs in the two subpopulations studied: 0.33-0.79 for adults and 0.45-1.40  $\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{day}$  for young people, mean and P95 values, respectively under the UB scenario Figure 2 shows the contribution of each commodity to chronic cumulative exposure per group of pesticides. For OPs and PPs, tomato was the main contributor for both populations, followed by citrus fruits and banana in the case of OPs and by pear and peach in the case of PPs. For CBs, spinach was the main contributor for adults, while potato was for young people.

**Table 3.** Chronic cumulative exposure to OPs, CBs and PPs through fruits and vegetables by the population of the region of Valencia

Pesticides	Adults								Young People								ADI <sup>b</sup>
	EDI <sup>a</sup> (µg/kg bw/day)				% ADI				EDI <sup>a</sup> (µg/kg bw/day)				% ADI				
	Mean		P95		Mean		P95		Mean		P95		Mean		P95		
	LB	UB	LB	UB	LB	UB	LB	UB	LB	UB	LB	UB	LB	UB	LB	UB	
<i>Organophosphorous</i>	0.12	0.33	0.42	0.79	0	1	1	2	0.2	0.45	1.17	1.40	0	1	3	4	0.03
<i>Carbamates</i>	0.00	0.03	0.00	0.23	0	3	0	23	0.00	0.04	0.01	0.35	0	4	1	35	0.001
<i>Pyrethrins/pyrethroids</i>	0.02	0.25	0.04	0.68	0	2	0	6	0.03	0.33	0.05	1.02	0	3	0	10	0.01

ADI: Acceptable daily intake (mg/kg bw/day)

EDI: Estimated cumulative daily intake

LB: Lower-bound scenario

UB: Upper-bound scenario

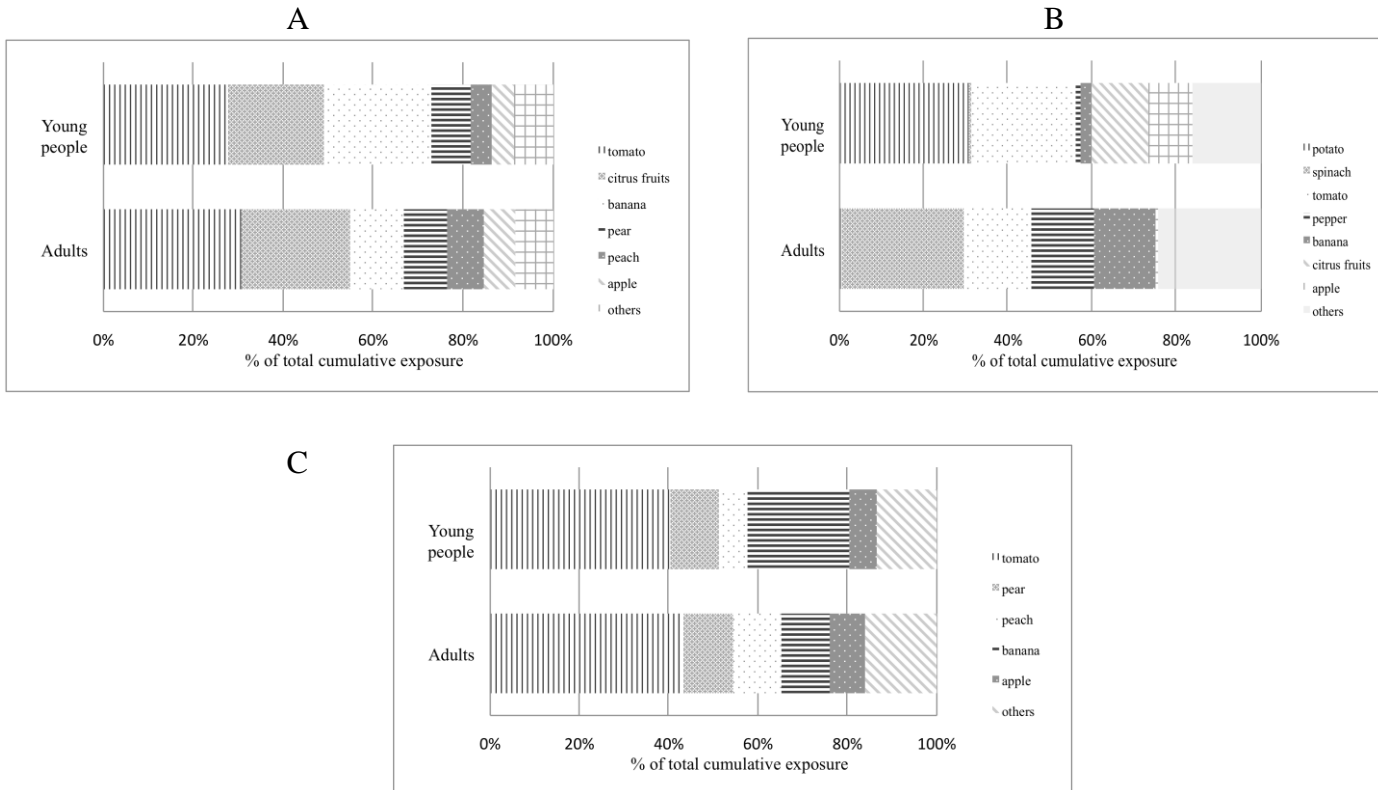
P95: 95th percentile

Bw: body weight

<sup>a</sup>Exposure relative to the ADI of the index compound

<sup>b</sup> Values reported in [http://ec.europa.eu/sanco\\_pesticides/public/index.cfm2011](http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm2011)

**Figure 2.** Mean contribution (UB) of the top five commodities that contributed most to the total cumulative intake of OPs (A), CBs (B) and PPs (C) pesticides, in adults and young people.





The pesticides that most contributed to the mean chronic exposure in the two exposure scenarios and for the two groups of population were: chlorpyrifos for OPs; carbofuran for CBs and lambda-cyhalothrin for PPs

To assess whether there was a risk of exposure, the cumulative chronic EDI of both exposure scenarios per each pesticide group, was compared with its corresponding ADI. The results (expressed as % ADI) are shown in Table 3. OPs, CBs and PPs chronic cumulative EDIs did not exceed the ADI values of the corresponding index compounds. The highest % ADI was estimated for CBs in the UB scenario: the P95 represented 23% in adults and 35% in young people. According to the results of the long-term exposure to the analyzed pesticides, long-term consumer health risk could be excluded.

The results obtained in this study could be compared with other study in which chronic cumulative exposures of pesticides have been reported under a deterministic approach in Denmark. The two studies present low values of chronic cumulative exposure. However, the Danish study presents higher values than the Valencia study, 0.03%-7% ADI and 0.07%-17% ADI in methamidophos equivalents for adults and young people, respectively.

In the present study we addressed OPs and CBs separately whereas the Danish study includes OPs and CBs in a single assessment group, using chlorpyrifos and methamidophos as index compounds and two possible exposures, replacing the values below the LOQ by zero or the value of the LOQ / 2 in the LB and medium bound (MB) scenarios, respectively. The use of different methodologies can lead to differences in the estimated

exposures and evidence the need to harmonize the methodologies used in risk assessment. However, as stated Boon et al. (2008), there is also a very valid reason to estimate the exposure to the OPs and CBs separately.

### *3.3. Uncertainty related to exposure assessment*

Dietary exposure assessments are affected by scientific uncertainties which need to be considered for the interpretation of results. Dietary consumption surveys as the 24-hour recall used in this study can under- or over-estimate the consumption and, as a consequence, the exposure (rarely eaten foods may be under- or –over-represented in the consumption survey). Surveys covering more than 2 days are recommended (EFSA, 2012) to estimate long-term exposure and therefore, in the future a consumption survey including more days will be employed. Several other parameters can also affect the uncertainty of the calculated exposure. The use of a Dutch conversion model to translate pesticide levels in raw foods to composite foods containing these raw products as an ingredient can under- or over-estimate the exposure, due to the use of different recipes and conversion factors between Holland and Spain. On the other hand, only 52 OPs, 23 CBs and 9 PPs were analysed in the laboratory and only some of them (see Supplementary data) had a RPF. These factors can cause an under-estimation of the real exposure. Processing factors (due to peeling, juicing...) have not been included in the present study. So, if a processing factor had been applied, the estimated exposure would have been lower. On the other hand, the high proportion of left-censored data may have introduced uncertainties to overall estimate. It has been reported that pessimistic-model runs (that replace values below the LOR with the LOQ)

use assumptions that are expected to lead to an over-estimation of the exposure (Nougadere, 2012), whereas optimistic-model runs (that replace values below the LOR with the zero) use assumptions that are expected to lead to lower estimates of the exposure (EFSA, 2012).

It should also be stated that we present the results of a monitoring study on the levels of pesticide residues from 2007 to 2011 in different fruits and vegetables, and not the results derived from total diet studies that seem to be more appropriate in risk assessment studies and that the purpose here is not to evaluate total diet exposure, but rather to study the intake of pesticide residues through fruit and vegetables. A more complete concentration database will lead to higher exposures.

Finally, the EFSA Scientific PPR considers that ideally, risk assessments for chemicals, whether individually or in combination, should consider all sources (e.g., plant protection products, veterinary drugs, human medicines), pathways (e.g., food, drinking water, residential, occupational) and routes (ingestion, dermal, inhalation) of exposure that could materially contribute to a person's total exposure (EFSA, 2010). Nevertheless, taking into account that the estimated exposure is very low and that diet is the main route of exposure for pesticides, this is not a priority.

As a conclusion, and considering that the estimated exposure is very low, the uncertainties will not have a big influence in the estimated exposure and therefore no long-term consumer risk is expected.

#### **4. Conclusions**

From a total of 752 fruits and vegetables analysed between 2007 and 2011, pesticide residues were detected in 63% of samples. Of these, only 3% exceeded the MRLs established by law, corresponding to 2 tomatoe, 2 peach, 2 pear, 2 cumumber, 1 apple, 1 banana, 1 spinach and 1 green bean samples. The most frequently detected pesticides were carbendazim, chlorpyrifos, and lambda- cyhalothrin.

Chronic cumulative intake of analysed pesticide residues appear to be relatively low compared to the ADI. Therefore, no long-term consumer risk is expected. The safety of the Valencia consumers therefore seems to be generally under control in terms of chronic cumulative pesticide intake through fruit and vegetable consumption. Nevertheless, as health risks regarding dietary exposure to pesticide residues deal mostly with acute exposure, it will be investigated in the future.

#### **Acknowledgements**

The authors are grateful to all inspectors of the Public Health Department of Valencia Regional Government who participated in the monitoring program. They also thank the technicians of the Laboratorio Agroalimentario de Valencia (Burjassot). This work has been supported by FISABIO, project UGP-14-157, and we thank all members for the constructive discussions.

#### **Disclaimer**

The findings and the conclusions in this report are those of the authors and do not necessarily represent the views of the Public Health Department.

## Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2016.01.004>

## References

- AEPLA, 2010. Memoria AEPLA 2009. <http://www.aepla.es/publicaciones> (accessed November 2015)
- Berrada, H., Fernández, M., Ruiz, M. J., Moltó, J. C., Mañes, J., & Font, G., 2003. Surveillance of pesticide residues in fruits from Valencia during twenty months (2004/05). *Food Control*, 21(1), 36-44.
- Boon, P. E., Van der Voet, H., Van Raaij, M. T., & Van Klaveren, J. D., 2008. Cumulative risk assessment of the exposure to organophosphorus and carbamate insecticides in the dutch diet. *Food Chem. Toxicol.*, 46(9), 3090-3098.
- Claeys, W. L., Schmit, J., Bragard, C., Maghuin-Rogister, G., Pussemier, L., & Schiffers, B., 2011. Exposure of several belgian consumer groups to pesticide residues through fresh fruit and vegetable consumption. *Food Control*, 22(3-4), 508-516.
- ECPA (European Crop Protection Association), 2010. Industry statistics 2010, <http://www.ecpa.eu/page/industry>. (accessed November 2015)
- EFSA, 2010. 2008 Annual report on pesticide residues. Retrieved from <http://www.efsa.europa.eu/en/datex/datexfooddb.htm>. (accessed November 2015)

EFSA, 2012. Guidance on the use of probabilistic methodology for modelling dietary exposure to pesticide residues. Retrieved from <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2839.htm> (accessed November 2015)

EFSA, 2014. The 2011 European Union report on pesticide residues in food. Retrieved from <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3694.htm> (accessed November 2015)

European Commission, 2002. Commission Directive 2002/63/EC of 11 July 2002 establishing community methods of sampling for the official control of pesticide residues in and on products of plant and animal origin and repealing Directive 79/700/EEC. Official Journal of the European Communities, L187, 30-43. Retrieved from <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=14OJ:L:2002:187:0030:0043:EN:PDF> (accessed November 2015)

Gallagher, S. S., Rice, G.E., Scarano, L.J., Teuschler, L.K., Bolleweg, G., Martin, L., 2015. Cumulative risk assessment lessons learned: A review of case studies and issue papers. *Chemosphere* 120, 697-705.

Jensen, A. F., Petersen, A., & Granby, K., 2003. Cumulative risk assessment of the intake of organophosphorus and carbamate pesticides in the danish diet. *Food Addit. Contam.*, 20(8), 776-785.

Jensen, B. H., Petersen, A., Christiansen, S., Boberg, J., Axelstad, M., Herrmann, S.S., et al., 2013. Probabilistic assessment of the cumulative dietary exposure of the population of Denmark to endocrine disrupting pesticides. *Food Chem. Toxicol.* 55, 113-120.

Juraske, R., Mutel, C. L., Stoessel, F., & Hellweg, S., 2009. Life cycle human toxicity assessment of pesticides: Comparing fruit and vegetable diets in switzerland and the united states. *Chemosphere*, 77(7), 939-945.

Kennedy, M.C. van der Voet, H, Roelofs, V.J., Roelofs, W., Glass, C.R., de Boer, W.J., Kruisselbrink, J.W., Hart, A.D.M., 2015. New approaches to uncertainty analysis for use in aggregate and cumulative risk assessment of pesticides.

Nougadere, A., Sirot, V., Kadar, A., Fastier, A., Truchot, E., Vergnet, C., Hommet, F., Baylé, J., Gros, P., Leblanc, J. C., 2012. Total diet study on pesticide residues in france: Levels in food as consumed and chronic dietary risk to consumers. *Environ.t Int.*, 45, 135-150.

USEPA, 2006. Organophosphorus cumulative risk assessment. Retrieved from [www.epa.gov/pesticides/cumulative](http://www.epa.gov/pesticides/cumulative). (accessed November 2015)

USEPA, 2007). Revised N-methyl carbamate cumulative risk assessment. Retrieved from [www.epa.gov/pesticides/cumulative](http://www.epa.gov/pesticides/cumulative) (accessed November 2015)

USEPA, 2011. Pyrethrins/ pyrethroid cumulative risk assessment. Retrieved from [www.epa.gov/pesticides/cumulative](http://www.epa.gov/pesticides/cumulative) (accessed November 2015)

WHO, 2003. GEMS/food regional diets (regional per capita consumption of raw and semi-processed agricultural commodities). Retrieved from [http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/regional\\_diets/en/](http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/regional_diets/en/). (accessed November 2015)





**3.2 Risk assessment and monitoring  
programme of nitrates through vegetables in  
the Region of Valencia**

---



*Food and Chemical Toxicology 100, (2017) 42-49*

**Risk assessment and monitoring programme of nitrates through  
vegetables in the Region of Valencia**

Leyre Quijano<sup>a</sup>, Vicent Yusà<sup>b,c</sup>, Guillermina Font<sup>a</sup>, Claudia McAllister<sup>b</sup>,  
Concepción Torres<sup>d</sup>, Olga Pardo<sup>b,c\*</sup>

<sup>a</sup> Preventive Medicine and Public Health, Food Sciences, Toxicology and Forensic Medicine Department, University of Valencia, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

<sup>b</sup> Food Safety Research Area, Center for Public Health Research (CSISP), FISABIO. Av. Catalunya, 21, 46020, Valencia, Spain

<sup>c</sup> Analytical Chemistry Department. University of Valencia, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

<sup>d</sup> Public Health Laboratory of Valencia, Av. Catalunya 21, 46020, Valencia, Spain

*Keywords:* Nitrate, Vegetables, Estimated intake, Dietary exposure, Risk assessment

\*Corresponding author: Olga Pardo.

e-mail: pardo\_olg@gva.es (O. Pardo)

Tel.: +34961925784

## Abstract

This study was carried out to determine current levels of nitrate in vegetables marketed in the Region of Valencia (Spain) and to estimate the toxicological risk associated with their intake. A total of 533 samples of seven vegetable species were studied. Nitrate levels were derived from the Valencia Region monitoring programme carried out from 2009 to 2013 and food consumption levels were taken from the first Valencia Food Consumption Survey, conducted in 2010. The exposure was estimated using a probabilistic approach and two scenarios were assumed for left-censored data: the lower-bound scenario, in which unquantified results (below the limit of quantification) were set to zero and the upper-bound scenario, in which unquantified results were set to the limit of quantification value. The exposure of the Valencia consumers to nitrate through the consumption of vegetable products appears to be relatively low. In the adult population (16 to 95 years) the P99.9 was  $3.13 \text{ mg kg}^{-1} \text{ body weight day}^{-1}$  and  $3.15 \text{ mg kg}^{-1} \text{ body weight day}^{-1}$  in the lower bound and upper bound scenario, respectively. On the other hand, for young people (6 to 15 years) the P99.9 of the exposure was  $4.20 \text{ mg kg}^{-1} \text{ body weight day}^{-1}$  and  $4.40 \text{ mg kg}^{-1} \text{ body weight day}^{-1}$  in the lower bound and upper bound scenario, respectively. The risk characterization indicates that, under the upper bound scenario, 0.79% of adults and 1.39% of young people can exceed the Acceptable Daily Intake of nitrate. This percentage could join the vegetable extreme consumers (such as vegetarians) of vegetables. Overall, the estimated exposures to nitrate from vegetables are unlikely to result in appreciable health risks.

## 1. Introduction

Nitrate is a common compound in nature that is part of the nitrogen cycle. It can be found in soil, surface and underground water as well as in biomass. In addition, nitrate is currently used as a fertilizer in agriculture, which has allowed a significant increase in world food production (Mosier et al., 2005). As a consequence, high levels of nitrate can be accumulated in plants-vegetables (European Food Safety Authority (EFSA), 2013). Furthermore, nitrates are also authorized as additives in the food industry identified by the European codes E-251 and E-252 (European Commission, 2011a).

Human exposure to nitrate is mainly exogenous through the consumption of vegetables, and to a lesser extent through water and authorized additives used in the preservation of meat products. For nitrates, the major part of the daily intake in foodstuffs is related to vegetable consumption (EFSA, 2008) due to the elevated nitrate accumulation capacity of these products. Higher levels of nitrate tend to be found in leaves whereas lower levels occur in seeds or tubers. As a consequence, leafy crops such as lettuce and spinach generally have higher nitrate concentrations (EFSA, 2013).

Although nitrate is relatively non-toxic below maximum levels (MLs), its metabolites such as nitrite, nitric oxide and N-nitroso compounds, make nitrate of regulatory importance because of their potentially adverse health implications such as methaemoglobinemia and carcinogenesis (EFSA, 2008). It has been widely reported that young infants (0-3 months) are the most sensitive group to methaemoglobinemia, probably due to the

consumption of high amounts of nitrates from vegetables (mainly spinach) and inappropriate storage of cooked vegetables (EFSA, 2010a).

Several studies have recently been carried out attempting to prove the association between consumption of nitrate and nitrite with different types of cancer, including brain, oesophagus, stomach or colorectal cancer. While the evidence obtained so far is inconclusive (Bryan et al., 2012; Milkowski et al., 2010; Gumanova et al., 2016), the International Agency for Research on Cancer (IARC, 2010) maintains the classification of nitrate within the group 2A, considering that “It is probably carcinogenic to humans” and a recent recommendation by IARC, has classified the consumption of red meat as probably carcinogenic to humans (group 2A) and processed meat as carcinogenic to humans (group 1) (IARC/ WHO, 2015).

In order to prevent potential adverse effects on human health, the European Commission has established maximum levels for nitrates in certain leafy vegetables (European Commission, 2011b).

The Region of Valencia is a vulnerable area to high nitrate concentrations as a consequence of an intensive agricultural activity. Furthermore, as nitrate concentrations can vary greatly among regions depending on factors such as farming practices, climate, soil quality, and manufacturing processes (EFSA, 2013), the evaluation of nitrate exposure through vegetables grown in this “local area” is therefore important in order to assess their safety for the local inhabitants of the Region of Valencia.

Regarding exposure assessment to contaminants through diet, the application of probabilistic techniques has been gaining increasing interest internationally. In contrast with the deterministic methodology, these techniques allow the estimation of the distribution of intakes amongst multiple individuals in a specified population, taking into consideration the variability in food consumption between and within individuals and in occurrence of residues in food commodities (EFSA, 2012).

The aim of this study is to present the results of the monitoring of nitrate in vegetables marketed in the region of Valencia during the years 2009-2013, to estimate exposure under a probabilistic approach and to characterise the resultant risk by comparing with the Acceptable Daily Intake (ADI) value established by the former Scientific Committee on Food (SCF) and reconfirmed by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) in 2002 (FAO/ WHO, 2003).

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Food sampling and nitrate data*

Nitrate data were obtained from monitoring programme of the Region of Valencia, carried out from 2009 to 2013. A total of 533 samples of seven vegetables species: Lettuce (*Lactuca sativa*), iceberg-type lettuce (*Lactuca sativa* var. *capitata*), spinach (*Spinacia oleracea*), potato (*Solanum tuberosum*), chard (*Beta vulgaris* var. *cicla*), artichoke (*Cybara scolymus*) and carrot (*Daucus carota*) were collected in different geographical areas and seasons to take into account potential variability. Furthermore, lettuces were collected grown both undercover or in the open air. These seven

vegetable species were selected either because the legislation establishes a maximum limit (European Commission, 2011b) (as is the case for lettuce and spinach) or because these vegetables are consumed in high proportion in the Region of Valencia (as is the case for potato, chard, artichoke and carrot).

Sampling was carried out randomly by inspectors from the Public Health Department, according to the European Commission Regulation (EC) No.1882/2006 (European Commission, 2006) in local markets, large supermarkets and grocery stores of the Region of Valencia. The vegetable samples were labelled and chilled at 4°C in plastic bags after collection. Just before analysis, inedible parts were removed and the rest were cut into small pieces and homogenized in a blender.

For intake estimates, left-censored results (data below the limit of quantification (LOQ), corresponding to 80mg kg<sup>-1</sup>) were processed using the substitution method, recommended by international organizations (EFSA, 2010b; GEMS/Food- Euro, 1995). For each vegetable, considering a censoring rate higher than 60%, two scenarios were assumed for left-censored results: a lower-bound (LB) scenario, in which unquantified results (below the LOQ) were set to zero and an upper-bound (UB) scenario, in which unquantified results were set to the LOQ value. Regarding vegetables for which more than 40% of results were quantified, the unquantified results, lower and upper bounds were replaced by an estimated “middle bound” assuming that undetected results are equal to half the detection limit. Although it has been widely recognised that the substitution method has some disadvantages (El-Shaarawi and Esterby, 1992; Helsel, 2005), it is still



widely used, mainly with the justification that it is easy to implement, it is widely understood and that the upper bound practice leads to conservative estimates for exposure assessment calculations, i.e. over-estimation of the mean and under-estimation of the variability (EFSA, 2010b). In addition, considering that the number of left-censored data of nitrates in vegetables is low and that it is described that the performance of the substitution-based method improves as the censoring percentage decreases (Shoari et al., 2015), the substitution method was considered appropriate for the intake estimates in a first attempt. If the intake estimated by the UB scenario, which could lead to an overestimation, indicates a possible health risk, the risk assessor could progress to a different methodology to manage left-censored data.

### *2.2. Analysis of nitrate*

Analyses were conducted by the Public Health Laboratory of Valencia, accredited following the ISO/IEC 17025 standard. The content of nitrate was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) using a Photo Diode Array detector. Reagent and standard solutions, sample treatment, instrumental, method validation and analytical quality assurance can be found in the supplementary data associated to this article (see Appendix).

### *2.3. Consumption data*

Intake estimates were based on the consumption data obtained from a questionnaire-based dietary survey that was conducted and validated in 2010-2011 by the Valencia Public Health Directorate. Dietary data were

collected through a 24-hour recall in which 1476 subjects (195 young people from 6 to 15 years of age and mean 43.5 kg body weight, and 1281 adults from 16 to 95 years of age and 71.2 kg mean body weight) were asked in a face-to-face interview to recall and describe the kinds and amounts of all foods and beverages ingested during the previous 24-hour period.

The initial sample of individuals was divided in three waves or groups in order to take into account variations in consumption patterns according to season; the first wave was conducted between the months of June and July 2010, the second between September and November, and the third between November and February of 2011. Self-reported body weight was also collected in the face-to-face interview and used in exposure calculations.

#### *2.4. Dietary exposure assessment*

Dietary exposure was estimated based on the consumption data from the dietary survey and the analytical data from the present study by a probabilistic approach.

The Estimated Daily Intake (EDI) was calculated according the following equation:

$$\text{EDI (mg kg}^{-1} \text{ body weight day}^{-1}) = \sum (C_i \times F_i)$$

Where  $C_i$  is the nitrate level in the vegetable species and  $F_i$  is the food consumption of the vegetable species.

Individual values for consumption and nitrate levels were employed for probabilistic analysis. Calculations were executed using the software Creme Food® (Creme Software Ltd., 2013), a Monte Carlo computational system for stochastic modeling of dietary exposure (McNamara et al., 2003). The exposure of randomly-selected person from the consumption database is the result of multiplying the consumption of each vegetable a person has eaten in one day by a randomly-selected nitrate concentration in the vegetable species from the concentration database. To model the intake as accurately as possible this calculation was repeated 100.000 times. The different possible outcomes generated iteratively were assembled to create a probabilistic statement about the range of results obtained.

### *2.5. Risk characterisation*

An Acceptable Daily Intake (ADI) for nitrate of  $3.7 \text{ mg kg}^{-1}$  body weight  $\text{day}^{-1}$ , equivalent to 222 of mg nitrate per day for a 60 kg adult, was established by the former Scientific Committee on Food (SCF) (FAO/WHO, 2003). To assess the risk, the EDI was compared with the ADI for the young people and adult populations.

### *2.6. Uncertainty analysis*

All estimates of possible intakes were adjusted for the individual body weights for each participant. The uncertainty due to sampling uncertainty of the input data (concentration and consumption) was estimated using the bootstrap approach (EFSA, 2012). This uncertainty was expressed per exposure percentile as a 95% confidence interval. Unquantifiable

uncertainties associated with exposure assessment have been considered for the interpretation of the results.

**Table 1.** Average consumption data from the dietary survey conducted by the Valencia Public Health Directorate

Vegetables	Mean (mg kg <sup>-1</sup> bw day <sup>-1</sup> )	
	Adults	Young people
Chard	40	10
Artichokes	40	10
Spinach	30	70
Lettuce	170	190
Potatoes	160	490
Carrots	190	330

bw: body weight

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Food consumption and nitrate residues

The average consumption data from the regional survey are shown in Table 1 for young people and adults.

The nitrate levels found in the various vegetable species acquired in the Region of Valencia during 2009-2013 are shown in Table 2. In Figure 1, a standard solution of nitrates (1 mg L<sup>-1</sup>) and a carrot sample with a measured nitrate concentration of 82 mg kg<sup>-1</sup> are shown.

Chard had the highest nitrate level (median 1502 mg kg<sup>-1</sup>), followed by fresh spinach (median 1266.5 mg kg<sup>-1</sup>) and lettuce, (median ranged between 610 and 949 mg kg<sup>-1</sup>) whereas carrot presented the lower nitrate median value (40 mg kg<sup>-1</sup>). In a previous study carried out in the Region of Valencia (Pardo-Marin et al., 2010), researchers reported lettuce, iceberg-

type lettuce, spinach, potato, carrot, chard and artichoke in different vegetable samples. The nitrate contents in the present study were significantly lower than those detected in the previous study (T-Student  $p=0.05$ ), this may mean a positive evolution regarding the application of good agricultural practices (GAP). On the other hand, the EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) reported nitrate concentrations in lettuce, iceberg-type lettuce, spinach, potato, carrot, chard and artichoke among others (EFSA, 2008). Some of these vegetables, presented higher nitrate levels than those reported in our study: lettuce (median value  $915 \text{ mg kg}^{-1}$ ), iceberg-type lettuce (median value  $844 \text{ mg kg}^{-1}$ ), carrot (median value  $125 \text{ mg kg}^{-1}$ ) and chard (median value  $1510 \text{ mg kg}^{-1}$ ). These differences can be explained by the different climatic conditions since a high sun intensity tends to reduce the nitrate content. A monitoring study carried out in Italy, (Iammarino et al., 2014) reported nitrate concentrations in spinach and lettuce. The results obtained in lettuce were higher than those reported in our study: iceberg-type lettuce (mean value  $928.1 \text{ mg kg}^{-1}$ ), other types of lettuce (mean concentrations ranged between  $155.5$  and  $2149.6 \text{ mg kg}^{-1}$ ); whereas, fresh spinach (mean value  $949.6 \text{ mg kg}^{-1}$ ) was lower. Despite similar cultivation conditions to our region, nitrate concentrations were higher in Italy.

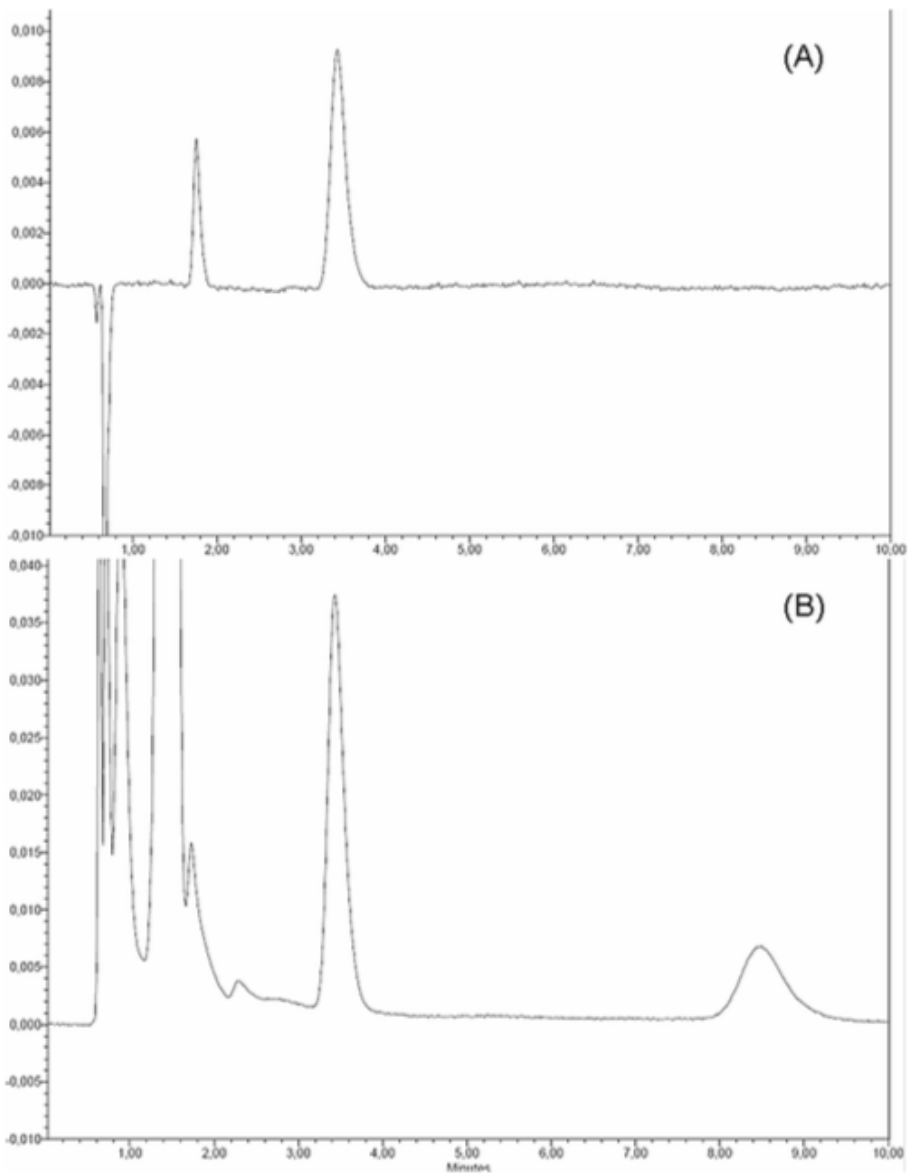
Nitrate contents in lettuce, iceberg-type lettuce and spinach, were compared with the maximum limits set out in the European legislation (European Commission, 2011b). Of the 533 samples analyzed, 9 samples (1.69 %) exceeded these limits. In all cases the product was fresh spinach harvested in summer. EFSA's Contaminants Panel (CONTAM), considers

**Table 2.** Nitrate concentrations in vegetable species analysed (mg kg<sup>-1</sup>)

Vegetable	Number of samples	Number of samples <LOQ	Minimum content	Maximum content	Median
Chard	67	3	<LOQ	3509	1502
Artichoke	16	10	<LOQ	193	80
Spinach ( <i>Spinacia oleracea</i> ) (n=104)					
Fresh spinach	94	2	<LOQ	4762	1266.5
Preserved spinach	10	0	301	1564	573
Lettuce ( <i>Lactuca sativa</i> ) (n=279)					
Different to iceberg lettuce	174	1	<LOQ	2096	840
Lettuce harvested april-sept.	125	1	<LOQ	2039	787
Lettuce grown in open air	106	1	<LOQ	1908	784
Lettuce grown undercover	19	0	344	2039	803
Lettuce harvested oct-march	49	0	225	2096	949
Lettuce grown in open air	47	0	225	2096	949
Lettuce grown undercover	2	0	233	989	611
Iceberg Lettuce ( <i>L. sativa</i> var. <i>capitata</i> )	105	2	<LOQ	1556	646
Iceberg Lettuce in open air	81	2	<LOQ	1556	610
Iceberg Lettuce undercover	24	0	318	1323	763
Carrots	57	31	<LOQ	640	40
Potatoes	10	1	<LOQ	244	173.5

n: number of samples, LOQ: Limit of quantification

that vegetables grown in summer, especially edible leaf, present lower amounts of nitrates, due to increased light radiation, a greater vegetative growth and higher temperatures (EFSA, 2008) but it must be taken into account that maximum levels set by legislation for this period are more restrictive than those established for winter crops. For preserved spinach, the data obtained in this study matches those results obtained by other authors and confirms that the bleaching process significantly reduces nitrate levels (Kmieciak et al., 2004)

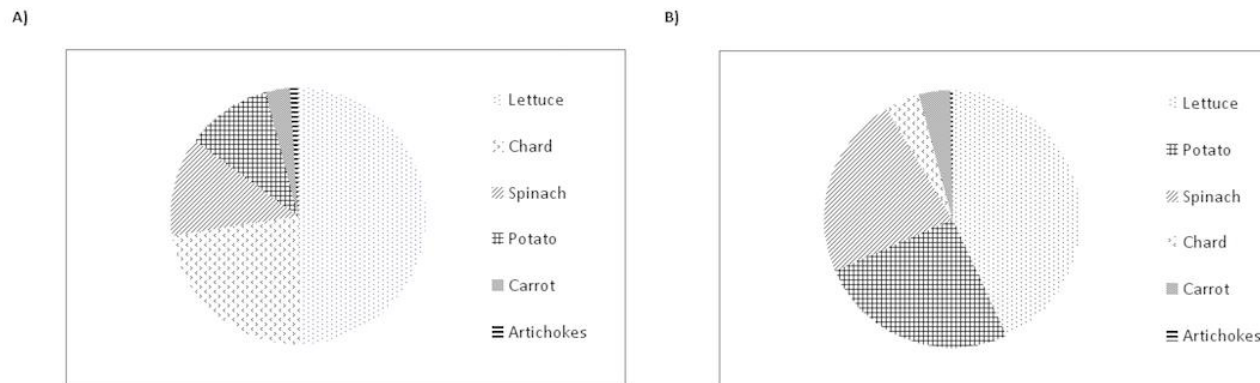


**Figure 1.** Chromatograms comparison: (A) Standard solution of nitrates ( $1 \text{ mgL}^{-1}$ ); (B) Carrot sample with a measured nitrate concentration of  $82 \text{ mg kg}^{-1}$ . Retention times:nitrite 1.95 min; nitrate 3.42 min.

**Table 3.** Estimated daily intake for adult and young people in the LB and UB scenarios

Population group	Scenario	Dietary Intake (mg kg <sup>-1</sup> bw day <sup>-1</sup> )						
		Mean	SD	P50	P75	P90	P95	P99
Adults	LB	0.27 (0.24-0.31)	0.77	0 (0-0.03) <sup>a</sup>	0.28 (0.25-0.32)	0.71 (0.65-0.78)	1.14 (1.02-1.28)	3.13 (2.37-4.33)
	UB	0.28 (0.25-0.32)	1.75	0.05 (0.03-0.07)	0.30 (0.27-0.33)	0.72 (0.66-0.80)	1.17 (1.05-1.30)	3.15 (2.43-4.21)
Young People	LB	0.36 (0.26-0.50)	1.05	0.03 (0-0.11)	0.36 (0.27-0.46)	0.87 (0.68-1.13)	1.49 (1.04-2.18)	4.20 (2.56-7.07)
	UB	0.38 (0.27-0.51)	1.01	0.09 (0.04-0.15)	0.38 (0.29-0.49)	0.90 (0.70-1.17)	1.53 (1.09-2.18)	4.40 (2.49-7.90)

SD: standard deviation, P: percentile, LB: lower bound, UB: upper bound, <sup>a</sup>In parentheses confidence interval 95%

**Figure 2:** Mean contribution (UB) of the different vegetable species to the nitrate intake in adults (A) and young people (B)



Nitrate levels in potato, carrot, and artichoke, products for which there are no maximum limits established in the legislation, were low as can be seen in Table 2.

### *3.2. Evaluation of dietary exposure*

Table 3 shows the estimated daily intake of nitrates for an adult and young people population, including the 95% uncertainty interval, evaluated by a probabilistic approach. The exposure of the Valencia consumers to nitrate through the consumption of vegetable products appears to be relatively low. In the adult population the P99.9 was 3.13 mg kg<sup>-1</sup> body weight day<sup>-1</sup> and 3.15 mg kg<sup>-1</sup> body weight day<sup>-1</sup> in the LB and UB scenario, respectively. On the other hand, for young people, the P99.9 of the exposure was 4.20 mg kg<sup>-1</sup> body weight day<sup>-1</sup> and 4.40 mg kg<sup>-1</sup> body weight day<sup>-1</sup> in the LB and UB scenario, respectively.

To identify what kind of vegetable contributes the most to the total exposure, the average contribution of each vegetable species to the overall exposure was determined and represented in Figure 2, for the two populations studied. Lettuce was the main contributor for both adults and young people, followed by chard in adults and potato in young people. Furthermore, the contribution of spinach, potato and carrot to the total intake of nitrates was higher in young people than in adults, due to the high consumption of these products by the young population.

### *3.3 Risk Characterisation*

A probabilistic methodology allows obtaining a distribution of exposure and therefore to calculate the percentage of population whose

nitrate intake could exceed the ADI value, for the two subpopulations studied considering the LB and UB scenarios.

The results are shown in table 4. Under the UB scenario, a total of 0.79% of adults and 1.39% of young people in the Region of Valencia exceed de ADI due to nitrate intake through the vegetables under study. That percentage could correspond to the group of extreme consumers (such as vegetarians) of vegetables, particularly leafy vegetables with high levels of nitrates. These results are in agreement with the EFSA previous evaluations that indicate that nitrate is not a health concern for adults (EFSA, 2008).

**Table 4.** Risk characterisation derived from the nitrate intake for different groups of population and scenarios

Population group	Scenario	% of population with intake>ADI
Adults	LB	0.78
	UB	0.79
Young People	LB	1.31
	UB	1.39

### *3.4 Uncertainty and variability in the exposure assessment*

Studies about exposure assessment through diet are affected by numerous sources of uncertainty. Each step in the exposure assessment is affected by uncertainties or scientific knowledge limitations, including factors related to the methodology used for calculating the exposure and the availability of data contributing to risk assessment of global uncertainty.

For uncertainty analyses, EFSA considers qualitative, deterministic or probabilistic strategies. Following the recommendations of the Scientific Committee of EFSA related to uncertainties in dietary exposure assessments (EFSA, 2006), an evaluation of uncertainties from a qualitative point of view was conducted.

Regarding the uncertainty associated with the consumption data, it must be considered that extrapolation of consumption data to the general population of the Region of Valencia can be a source of uncertainty. Dietary consumption surveys as the 24-h recall used in this study can under- or over-estimate the consumption and, as a consequence, the exposure (rarely eaten foods may be under- or over- represented in the consumption survey). Surveys covering more than 2 days are recommended (EFSA, 2012) to estimate long-term exposure and therefore, in the future a consumption survey including more days will be employed. Only spinach, lettuce, iceberg-type lettuce, potato, chard, artichoke and carrot were included in this study, a fact that can lead to an underestimation of the real exposure. In the future more vegetables can be included.

On the other hand, some vegetables (such as lettuce, spinach...) were taken for monitoring purposes, to assess compliance with legal limits and not with the purpose of conducting an exposure assessment. Including these vegetable species, for which it is well known that the level of nitrates is high, can suppose an overestimation of exposure. It should be stated that other sources of nitrates such as water or other food groups different from vegetables were not included in this study, which may suppose an underestimation of the intake. Nevertheless, it is well known that vegetables

are the main contributors to the nitrate intake and, taking into account that the resultant risk is very low, the inclusion of additional sources is not a priority.

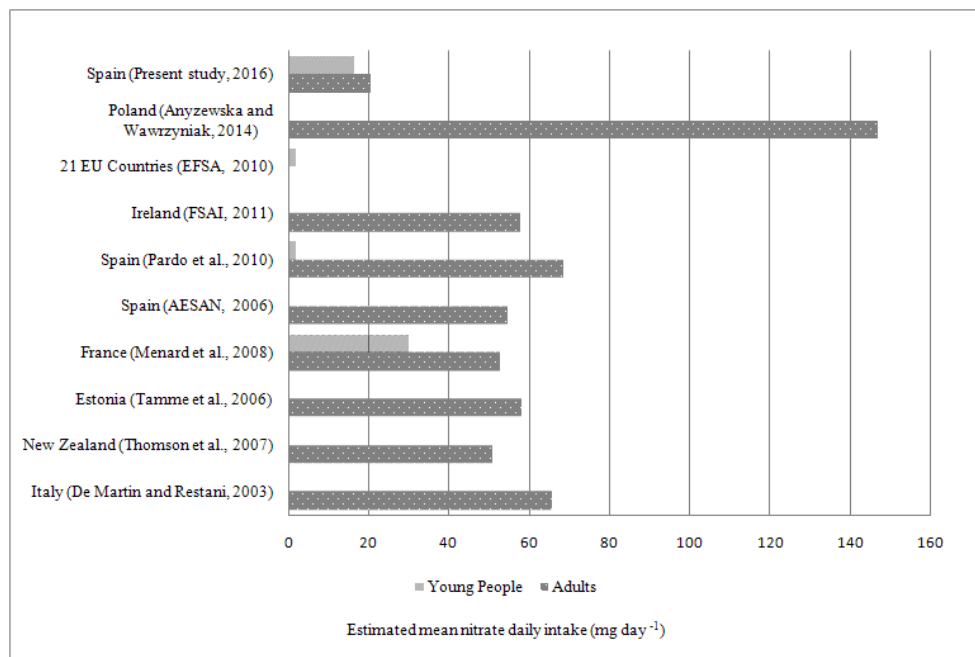
The effect of cooking or processing was not taken into account for the calculation of the levels of nitrates in the different products studied. These treatments can increase or decrease the levels of nitrates and nitrites (EFSA, 2008). To correct the observed values with respect to the processing effect further studies will be necessary to apply a correction that adjusts levels to the observed effects.

As a conclusion, and considering that the estimated exposure is very low, the uncertainties do not have a big influence in the estimated exposure and therefore no long-term risk is expected.

### *3.5 Comparison with other studies*

The results obtained in this study could be compared with other studies in which exposure of nitrates have been reported. Estimated intake data obtained in other studies are shown in Figure 3.

It is noted that data obtained in this study were below intake nitrate values for adults obtained in other studies in Europe. In particular, these data represented about one third of the values found for Italy (De Martin and Restani, 2003). The results for adults and young people were also lower than those reported by the authors in previous years (Pardo-Marin et al., 2010; AESAN, 2006).



**Figure 3.** Estimated mean nitrate daily intake from other studies; 21 EU countries: Belgium, Cyprus, Czech Republic, Germany, Denmark, Estonia, Spain, Finland, France, United Kingdom, Greece, Hungary, Ireland, Lithuania, Latvia, Netherlands, Norway, Romania, Sweden, Slovenia, Slovakia; Age of young people: France (3-14 years), Spain 2010 (7-12 years), 21 EU countries (1-18 years), Spain 2016 (6-15 years)

The high exposure in countries such as Ireland (FSAI (Food Safety Authority of Ireland), 2011), France (Menard et al., 2008), New Zealand (Thomson et al., 2007) or Estonia (Tamme et al., 2006) could be explained by the larger variety of food included in their studies. The high exposure in Poland (Anyzewska and Wawrzyniak, 2014) may be due to different environmental conditions in this area, especially low light intensity and temperature, which tend to increase nitrate levels. The lowest values reported in young children in the EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) may be because only spinach and lettuce samples were considered for exposure calculations (EFSA, 2010a).

Comparison with data from the study conducted by (Pardo-Marin et al., 2010) was particularly interesting because the same geographical area and the same products were considered. The difference observed in this study could be related with the correct application of Good Agricultural Practices in this region over the last years.

In the same way, it was found that intake levels determined in this study were lower than the intake data reported by the European Food Safety Agency (EFSA, 2008). Considering the LB scenario, the intake obtained was four times higher than the data obtained in the present study. It may be due to the fact that vegetables consumed in the Region of Valencia (usually grown in this region), have low nitrate levels because they are mainly grown in the open air with high light intensity conditions.

#### **4. Conclusions**

From a total of 533 vegetable samples analysed in this study, 9 (1.68%) exceeded the MLs established by law (European Commission, 2011b) corresponding to fresh spinach harvested in summer. Regarding the intake and taking into account the vegetable samples analysed, only 0.79% of adults and 1.39% of young people exceed the ADI value due to the nitrate intake through the vegetable products under study. This percentage could join the vegetable extreme consumers of vegetables (such as vegetarians), mainly leafy, which have proven to be those who accumulate the highest levels of nitrate in the edible parts. Therefore, in view of these data it can be concluded that overall, the estimated exposures to nitrate from vegetables are unlikely to result in appreciable health risks.

As it is well known that the infant population is the most vulnerable to the nitrate toxicological effect, especially in babies and children between one and three years of age, our suggestion is future research should be focused on addressing this population.

### **Acknowledgements**

The authors are grateful to all inspectors of the Public Health Department of Valencia Regional Government who participated in the monitoring programme. They also thank the technicians of the Public Health Laboratory of Valencia, Spain.

### **Disclaimer**

The findings and the conclusions in this report are those of the authors and do not necessarily represent the views of the Public Health Department.

### **Appendix A. Supplementary data**

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2016.12.010>.

### **Transparency document**

Transparency document related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2016.12.010>.

## References

AESAN, 2006. Modelo de Dieta Española para la Determinación de la Exposición del Consumidor a Sustancias Químicas.

Anyzewska, A. and Wawrzyniak, A., 2014. Evaluating adult dietary intakes of nitrate and nitrite in Polish households during 2006-2012. *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.* 65, 107-111.

Bryan, N.S., Alexander, D.D., Coughlin, J.R., Milkowski, A.L. and Boffetta, P., 2012. Ingested nitrate and nitrite and stomach cancer risk: An updated review. *Food and Chemical Toxicology* 50, 3646-3665

Creme Software Ltd., 2013. Creme food version 3.6.9.

De Martin, S. and Restani, P., 2003. Determination of nitrates by a novel ion chromatographic method: occurrence in leafy vegetables (organic and conventional) and exposure assessment for Italian consumers. *Food Addit. Contam.* 20, 787-792.

El-Shaarawi, A.H. and Esterby, S.R., 1992. Replacement of censored observations by a constant: An evaluation. *Water Res.* 26, 835-844.

European Commission, 2011a. Commission Regulation (EU) No. 1129/2011 of 11 November amending annex II to Regulation (EC) No. 1333/2008 of European Parliament and of the Council by establishing a Union list of food additives.

European Commission, 2011b. Commission regulation (EC) No.1258/2011 of 2 December 2011 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for nitrates in foodstuffs.



European Commission, 2006. Commission Regulation (EC) No. 1882/2006 of 19 December 2006 laying down methods of sampling and analysis for the official control of the levels of nitrates in certain foodstuffs.

European Food Safety Authority (EFSA), 2013. Study on the influence of food processing on nitrate levels in vegetables. EFSA supporting publication. En-514.

European Food Safety Authority (EFSA), 2012. Guidance on the use of probabilistic methodology for modelling dietary exposure to pesticide residues. EFSA Journal 2012 10, 2839, 2839.

European Food Safety Authority (EFSA), 2010a. Statement on possible public health risks for infants and young children from the presence of nitrates in leafy vegetables. 8 (12): 1935.

European Food Safety Authority (EFSA), 2010b. Management of left-censored data in dietary exposure assessment of chemical substances. 8 (3): 1557.

European Food Safety Authority (EFSA), 2008. Nitrate in vegetables-Scientific Opinion on the Panel on Contaminants in the Food Chain. 689, 1-79.

European Food Safety Authority (EFSA), 2006. Guidance of the Scientific Committee on a request from EFSA related to Uncertainties in Dietary Exposure Assessment. 438, 1-54.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)/ World Health Organization (WHO), 2003. Nitrate (and potential endogenous

formation of N-nitroso compounds). In Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). WHO Food Additives Ser.50. Geneva.

FSAI (Food Safety Authority of Ireland), 2011. Report on a Total Diet Study carried out by the Food Safety Authority of Ireland in the period 2001 – 2005. Food Safety Authority of Ireland.

GEMS/Food- Euro, 1995. Second workshop on reliable evaluation of low-level contamination of food.

Gumanova, N.G., Deev, A.D., Klimushina, M.V., Kots, A.Y. and Shalnova, S.A., 2016. Serum nitrate and nitrite are associated with the prevalence of various chronic diseases except cancer. *Int. Angiol.*

Helsel, D.R., 2005. More than obvious: better methods for interpreting nondetect data. *Environ. Sci. Technol.* 39, 419A-423A.

Iammarino, M., Di Taranto, A. and Cristino, M., 2014. Monitoring of nitrites and nitrates levels in leafy vegetables (spinach and lettuce): a contribution to risk assessment. *J. Sci. Food Agric.* 94, 773-778.

IARC, 2010. Ingested nitrate and nitrite, and cyanobacterial peptide toxins.

IARC/ WHO, 2015. IARC Monographs evaluate consumption of red meat and processed meat.

Kmiecik, W., Lisiewska, Z. and Słupski, J., 2004. Effects of freezing and storing of frozen products on the content of nitrates, nitrites, and oxalates in dill (*Anethum graveolens* L.). *Food Chem.* 86, 105-111.

McNamara, C., Naddy, B., Rohan, D. and Sexton, J., 2003. Design, development and validation of software for modelling dietary exposure to food chemicals and nutrients. *Food Addit. Contam.* 20 Suppl 1, S8-26.

Menard, C., Heraud, F., Volatier, J.L. and Leblanc, J.C., 2008. Assessment of dietary exposure of nitrate and nitrite in France. *Food Addit Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 25, 971-988.

Milkowski, A., Garg, H.K., Coughlin, J.R. and Bryan, N.S., 2010. Nutritional epidemiology in the context of nitric oxide biology: A risk-benefit evaluation for dietary nitrite and nitrate. *Nitric Oxide* 22, 110-119.

Mosier, A.R., Syers, J.K. and Freney, J.R., 2005. Global assessment of nitrogen fertilizer: the SCOPE/IGBP nitrogen fertilizer rapid assessment project. *Sci. China C. Life. Sci.* 48 Spec No, 759-766.

Pardo-Marin, O., Yusa-Pelecha, V., Villalba-Martin, P. and Perez-Dasi, J.A., 2010. Monitoring programme on nitrates in vegetables and vegetable-based baby foods marketed in the Region of Valencia, Spain: levels and estimated daily intake. *Food Addit Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 27, 478-486.

Shoari, N., Dube, J.S. and Chenouri, S., 2015. Estimating the mean and standard deviation of environmental data with below detection limit observations: Considering highly skewed data and model misspecification. *Chemosphere* 138, 599-608.

Tamme, T., Reinik, M., Roasto, M., Juhkam, K., Tenno, T. and Kiis, A., 2006. Nitrates and nitrites in vegetables and vegetable-based products and their intakes by the Estonian population. *Food Addit. Contam.* 23, 355-361.

Thomson, B.M., Nokes, C.J. and Cressey, P.J., 2007. Intake and risk assessment of nitrate and nitrite from New Zealand foods and drinking water. *Food Addit. Contam.* 24, 113-121.

**3.3 Dietary exposure and risk assessment of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and dioxin-like polychlorinated biphenyls of the population in the Region of Valencia**

---



*Food Additives & Contaminants: Part A: 35 (4): 740-749 (2018)*

**Dietary exposure and risk assessment of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and dioxin-like polychlorinated biphenyls of the population in the Region of Valencia**

Leyre Quijano<sup>a</sup>, Silvia Marín<sup>b</sup>, Encarnación Millan<sup>c</sup>, Vicent Yusà<sup>b,c,d</sup>, Guillermina Font<sup>a</sup>, Olga Pardo<sup>b,c,d\*</sup>

<sup>a</sup>Preventive Medicine and Public Health, Food Sciences, Toxicology and Forensic Medicine Department, University of Valencia, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

<sup>b</sup>Food Safety Research Area, Center for Public Health Research (CSISP), FISABIO. Av. Catalunya, 21, 46020, Valencia, Spain

<sup>c</sup>Public Health Laboratory of Valencia, 21 Avenida Catalunya, 46020 Valencia, Spain

<sup>d</sup>Analytical Chemistry Department. University of Valencia, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

*Keywords:* Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs), dioxin-like PCBs, Total Diet Study, DR-CALUX<sup>®</sup> bioassay, dietary exposure assessment

\*Corresponding author: Olga Pardo.

e-mail: pardo\_olg@gva.es (O. Pardo)

Tel.:+34961925784

## Abstract

Dietary exposure of the Valencia Region population to polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) was assessed in the Region of Valencia in 2010–2011. A total of 7700 food samples were collected. Occurrence data were combined with consumption data to estimate dietary exposure in adults (> 15 years of age) and young people (6–15 years of age). The estimated intake was calculated by a probabilistic approach. Average intake levels (upper-bound scenario) were 1.58 and 2.76 pg toxic equivalent (TEQ) kg<sup>-1</sup> body weight (bw) day<sup>-1</sup> for adults and young people, respectively. These average intakes are within range of the Tolerable Daily Intake (TDI) of 1–4 pg WHO-TEQ kg<sup>-1</sup> bw day<sup>-1</sup> recommended by WHO (World Health Organization), and slightly above the Tolerable Weekly Intake (TWI) of 14 pg TEQ kg<sup>-1</sup> bw week<sup>-1</sup> and the Provisional Tolerable Monthly Intake (PTMI) of 70 pg TEQ kg<sup>-1</sup> bw month<sup>-1</sup> set by SCF (Scientific Committee on Food) and JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food), respectively. These results show that the contamination levels in food and therefore the exposure of the general population to PCDD/Fs and-PCBs have declined in this region and therefore show the efficiency of the European risk management measures. In terms of risk characterisation, the results showed that, under the upper-bound scenario, 22% of the adult and 58% of the young people population could exceed the TWI.



## 1. Introduction

Polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) are Persistent Organic Pollutants (POPs) of great concern because of their toxicity and tendency to bioaccumulate through the food chain. It has been found that chronic exposure of humans to PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCBs (dl-PCBs) causes serious adverse health effects including reproductive and developmental effects, neurological and behavioural effects, dermal toxicity, immunomodulatory and carcinogenic effects (Van den Berg et al., 1998; WHO, 1998; Birnbaum and Tuomisto, 2000; ATSDR, 2002; Bencko, 2003; Hays and Aylward, 2003; Steenland et al., 2004). Increased risk of diabetes owing to dioxin exposure has also been reported (Fujiyoshi et al., 2006).

Among the PCDD/Fs, 17 congeners tend to accumulate through the food chain, especially in animal fats and products. Regarding PCBs, 12 congeners are known as DL-PCBs because they share the same mechanism of action with the 17 toxic PCDD/Fs (Sirost et al., 2012): binding with and activating the aryl hydrocarbon cellular receptor (AhR) involved in the cellular response (EFSA, 2005). The other PCBs are known as non-dioxin-like PCBs (NDL-PCBs), as their toxicological mechanism is different from the Ah receptor mediated pathway of DL-PCBs. A toxic equivalence factor (TEF) has been assigned to these 17 PCDD/Fs and 12 DL-PCBs in order to compare their toxicity with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (2,3,7,8-TCDD), classified as probably carcinogenic to humans (group 2A), allowing the toxicity of a complex mixture to be expressed in the same unit, the toxic equivalent (TEQ).

Different methods are suitable to determine the levels of PCDD/Fs and DL-PCBs in environmental as well as in food and feed matrices (European Commission, 2017). A distinction is made between the confirmatory methods and the screening methods. For screening, bioassays can be used to determine a biological response towards PCDD/Fs and DL-PCBs such as enzyme activity, the expression of reporter genes, the binding between ligand and receptor or antigen and antibody. So far, only the cell-based assay Chemical-Activated Luciferase gene expression (CALUX), a widely used screening method, has been used successfully for feed and food. Bioassays provide information about toxicological effects and are potentially more efficient and economical in assessing environmental health risks than chemical methods. It measures the binding of the mixture of compounds present in the extracts from food samples to the AhR. These compounds may include PCDD/Fs and DL-PCBs but also other halogenated compounds that are present in the extract and have resisted the clean-up procedure. Results obtained from bioassay methods do not yield results at the congener level (BEQ) to acknowledge the fact that not all compounds present in a sample extract that produce a response in the test may meet all requirements of the TEQ principle.

Food represents the primary source of non-occupational exposure to PCDD/Fs and PCBs (more than 90% of exposure) (EFSA, 2005; Sirot et al., 2012). Therefore, dietary estimations are appropriate tools for the estimation of the exposure to such compounds and the evaluation of the potential risk in a population.

In 2011, the results of a monitoring programme on PCDD/Fs and DL-PCBs in foods carried out by the Department of Public Health of the Valencia government, Spain, were presented (Marín et al, 2011). The estimated dietary exposure of these pollutants was also reported. However, a representative dataset on food consumption is more appropriate to derive the dietary exposure. Consequently, a new study was carried out in the Region of Valencia in which a representative dataset on food consumption was combined with data on the concentration of the compounds of interest in foods to derive the exposure.

The aim of this article is to present the results of the chronic dietary exposures to PCDDs, PCDFs and DL-PCBs of the population in the Region of Valencia in order to assess the health risks derived from them. In addition, these results are very useful for temporal trend analysis in order to evaluate the effectiveness of the Dioxin Strategy implemented by the EU.

## **2. Material and Methods**

### *2.1. Consumption Data*

Intake estimates were based on consumption data obtained from a questionnaire-based dietary survey conducted and validated in 2010–2011 by the Valencia Public Health Directorate (Fullana et al, 2010). The survey used reflects the consumption of citizens older than 6 years of age living in Valencia, with an ordinary residency in a municipality of the region as recorded in the population information system (see <http://www.san.gva.es/web/dgoeicap/sistema-de-informacion-poblacional-sip> and Figure S1). Dietary data were collected through a 24-h recall in

which 1476 subjects (195 young people between 6 and 15 years of age and 43.5 kg mean body weight; and 1281 adults between 16 and 95 years of age and 71.2 kg mean body weight) were asked in a face-to-face interview to recall and describe the kinds and amounts of all foods and beverages ingested during the previous 24-h period. It was conducted from June 2010 to February 2011 in three consecutive periods or waves in order to take into account of variations in consumption patterns according to season; the first wave was conducted between the months of June and July 2010, the second between September and November, and the third between November and February of 2011. Self-reported body weight was also collected in the face-to-face interview and used in exposure calculations.

The food consumption data ( $\text{g kg}^{-1} \text{bw day}^{-1}$ ) for the two population groups considered are shown in Table S1 in the supplemental data online.

## *2.2 Sampling*

The first step involved establishing the list of foods to be analysed. Food items were selected on the basis of two criteria: the foods most consumed in terms of quantity (which a consumer rate of at least  $>2\text{g/kg bw}$  and day) and the main known or assumed contributors to the PCDD/Fs and DL-PCBs exposure. A total of 77 different foods grouped in 11 categories, were collected by food inspectors from the Public Health Department (see Table S2 in the supplemental data online). To minimize the variability, each food was composed of 100 samples, collected in different areas (covering rural and urban areas and different geographic location) and seasons, so the total number of samples purchased was 7700. In order to reduce the number of analyses, a single sample analysis or composite was obtained from 10

samples of the same food, so the total number of analysis samples was 770 (see Table S3 in the supplemental data online).

Two fundamental criteria were considered for the design of the sampling plan during 2010: the type of establishment and its geographical location. Design was established in two stages: (1) selection of a random cluster sample corresponding to different geographical regions or core regions of Valencia (the sample size assigned to each cluster was proportional to the population that it represented); and (2) a new selection using stratified random sampling based on the type of establishment. Two types of establishments were considered: three food chains in which an important part of the population of the Region of Valencia is supplied (30% each) and local markets (10%). Finally, the samples were taken in 11 cities of the Region of Valencia, with more than 25,000 inhabitants, in their respective markets and supply chains. Collection of samples was according to Commission Regulation 589/2014 (European Commission, 2014).

Although (Marín et al, 2011) showed that fish oil had the highest TEQ level among their study, none of the subjects interviewed in the present study reported the consumption of fish oil, and therefore it was not selected, assuming that this product is not consumed in this region.

Only edible parts of each food were included in the composites. For food handling own kitchen utensils were used. The homogenisation was carried out using a food processor, brand Thermomix, model TM-21. These composite samples were stored in high-density polyethylene bags and sent to the laboratories for analysis.

### 2.3 Analysis

Analyses were conducted by the Public Health Laboratory of Valencia, accredited following the ISO/IEC 17025 standard. A total of 770 food samples were analysed by DR CALUX<sup>®</sup> bioassay. CALUX is a fast and inexpensive tool for the determination of dioxin-like compounds in a large number of samples and requires only small volumes (Croes et al, 2013), so the use of this technique is a good alternative to GC-HRMs. This method, based on the mechanism of uptake of cellular receptor AhR for dioxins and dioxin-like compounds (such as dioxin-like PCBs), is a validated method for screening for PCDD/Fs and DL-PCBs in feed as well as food according to international standards established by Regulation (European Commission, 2012a, 2012b, 2017).

As the CALUX bioassay measures the response following ligand binding to the intracellular AhR, many other compounds including both natural and synthetic compounds can interfere with the assay. Superinduction of the AhR caused by other AhR active substances such as polybrominated compounds, or activation of protein Kinase C, resulted in an inaccurate overestimation of dioxins (Baston and Denison 2011). Moreover, natural AhR ligands from foods or supplements can yield positive results in the CALUX bioassay (Amakura et al, 2011). Furthermore, not only the presence of AhR agonists (Gizzi et al, 2005) but also the existence of AhR antagonists (Windal et al, 2005) can, in theory, affect the accuracy and precision of the CALUX bioassay. Whether such effects are relevant depends on both the co-occurrence of such compounds and their fate during the clean-up step (Chobtang et al, 2011).

Vromman et al., (2012) evaluated the use of results of PCDD/Fs and DL-PCBs in food matrices obtained using the screening CALUX. Factors affecting the discrepancy between the GC-HRMS method and CALUX may be the quantification limits, the difference between relative potency factors (RPF) and TEF values, and the potential of the bioassay to measure all compounds with AhR affinity. The authors mentioned that the use of the upper bound values will probably reduce the discrepancy between CALUX and GC-HRMS results. On the other hand, regarding RPF values, Carbonelle et al., (2004) observed that mean and median levels in PCDD/Fs are slightly higher than those obtained with WHO-TEF, whereas for DL-PCBs, CALUX results are significantly lower than the GC-HRMS results, which indicates an underestimation of the CALUX responses with respect to the chemo-analysis results. In view of these possible discrepancies between the results obtained by GC-HRMS and CALUX, the results obtained by both methods were compared after the analysis of 55 samples including the foods most consumed in terms of quantity of each food group in the present study. The 55 selected samples are shown (in bold) in Table S2.

#### *2.4 Analytical quality assurance*

The laboratory works under the quality assurance system established by ISO/IEC/EN 17025. Each set of samples was analysed under quality-assurance protocols, including procedural blanks, fortified samples and quality control test materials. The analytical performance of the method is shown in Table S4

## 2.5 Exposure Assessment

The estimated daily intake of PCDD/Fs and DL-PCBs from consumption data and concentration in food was carried out using a probabilistic approach. Intake calculations were performed using Crème Food® software, a Monte Carlo computational system for stochastic modelling of dietary exposure (McNamara et al, 2003).

The basic calculation that is iterated within the Monte Carlo system including bootstrapping is a simple calculation: [Food amount] × [Concentration]. The exposure of a randomly selected person from the consumption database is the result of multiplying the consumption of each relevant foodstuff the person has eaten in one day by a randomly selected concentration per commodity from the concentrations database. To model the intake as accurately as possible, this calculation was repeated 100,000 times. The different possible outcomes generated iteratively were assembled to create a probabilistic statement of the range of results obtained. A distribution of the daily intake is thus generated, including variability and uncertainties.

Left-censored results (data below the limit of quantification (LOQ)) were processed according to EFSA recommendations (EFSA, 2010). Results below the LOQ were treated as true zeros in the lower-bound (LB) scenario assessment and were set to LOQ in the upper-bound (UB) scenario assessment. The TDS did not cover all the foods consumed. Consequently, two scenarios were used to assess exposure. In the first scenario, LB, exposure was assessed considering only the foods sampled and analyzed in the study. In the UB scenario, foods that were not sampled were considered



to be contaminated at the mean level of the samples belonging to its food group.

### 3. Results and discussion

#### 3.1 Food consumption and levels of PCDD/Fs and dl-PCBs in food

Table 1. shows the mean, minimum and maximum values, pg BEQ g<sup>-1</sup> of the PCDD/Fs and DL-PCBs, in the different food groups analysed, with their frequencies of detection. As can be seen, results are above the LOQ in 100% of the samples (Table 1). The highest mean concentration of PCDD/Fs and DL-PCBs were found in fish and seafood (0.81 pg BEQ g<sup>-1</sup> wet weight (ww)), followed by oils and fats (0.37 pg BEQ g<sup>-1</sup> ww), and milk and dairy products (0.34 pg BEQ g<sup>-1</sup> ww). Comparing mean contamination levels from one study to another should be done with care because food groups do not necessarily contain the same food items.

**Table 1.** PCDD/Fs and DL-PCBs levels in food products analysed (pg BEQ g<sup>-1</sup> wet weight)

Food group	Number of samples	Frequency of detection (%)	Mean	Minimum content	Maximum content
Vegetable oils	20	100	0.37	0.13	0.63
Alcoholic beverages	20	100	0.03	0.01	0.03
Non-alcoholic beverages	30	100	0.01	0.01	0.04
Meat and meat products	120	100	0.03	0.01	0.18
Cereal, pulses, tubers and nuts	110	100	0.18	0.02	2.67
Prepared dishes	40	100	0.21	0.06	0.81
Sweeteners and condiments	40	100	0.31	0.01	0.9
Vegetables and fruits	200	100	0.06	0.01	1.9
Eggs	10	100	0.08	0.04	0.14
Milk and dairy products	60	100	0.34	0.01	1.75
Fish and seafood	120	100	0.81	0.01	2.59
Total	770	100	0.2	0.01	2.67

The levels of PCDD/Fs and DL-PCBs in the present study were lower than those reported by the European Food Safety Authority (EFSA, 2012a) coming from samples collected during 1995-2010 from 24 European Union Member States, Iceland and Norway. In a previous study carried out in the Region of Valencia (Marin et al, 2011) PCDD/Fs and DL-PCBs levels were higher than those detected in the present study. This may be due to a positive evolution regarding the application of European risk-management measures to reduce exposure in the European populations. For fish and seafood, lower levels have been reported by Greece (Costopoulou et al, 2016) (0.49 WHO-TEQ pg g<sup>-1</sup> wet weight) and France (Sirot et al., 2012) (0.65 WHO-TEQ pg g<sup>-1</sup> wet weight). Nevertheless, for milk products, higher levels were found in Belgium (Windal et al, 2010) (1.74 pg TEQ g fat<sup>-1</sup>) and Kuwait (Husain et al, 2014) (2.10 pg BEQ g<sup>-1</sup> ww).

PCDD/Fs and DL-PCBs BEQ g<sup>-1</sup> ww values observed ranged between 0.01 and 2.67 pg BEQ g<sup>-1</sup> ww. The maximum level reported corresponded to the food-group cereals, legumes, nuts and tubers. In the previous study carried out in our region (Marin et al, 2011), cereals values for PCDD/Fs and DL-PCBs ranged between 0.04 and 0.10 pg WHO-TEQ g<sup>-1</sup> ww. This high value could be due to the wide variety of foods included in the cereal group from our study (cereals with values from 0.01 to 0.15 pg WHO-TEQ g<sup>-1</sup> ww, legumes with values from 0.01 to 0.28 pg WHO-TEQ g<sup>-1</sup> ww, nuts with values from 0.12 to 2.67 pg WHO-TEQ g<sup>-1</sup> ww and tubers with values from 0.01 to 0.05 pg WHO-TEQ g<sup>-1</sup> ww), whereas in the previous study only wheat and rice were included. It is also known that nuts

have a lipophilic character, which permits concentration of PCDD/Fs and DL-PCBs in those food groups.

In view of the possible discrepancies between the results obtained by GC-HRMS and CALUX, described before, the results obtained by both methods were compared after the analysis of 55 samples including all food groups of the present study, showing a good agreement between both methodologies (see Figure S2 in the supplemental data online). Only two food items showed results away from the fitted line, corresponding to chocolate and sugar. As these food items present low PCDD/Fs and DL-PCBs levels, and consumption amounts, it was considered that they do not over-or-underestimate the estimated BEQ value. Therefore, the results obtained by CALUX were used for the exposure calculations.

### *3.2 Evaluation of dietary exposure and risk characterization*

The estimated daily intake of PCDD/Fs and DL-PCBs for adult and young people population, including the 95% uncertainty interval, evaluated by a probabilistic approach is shown in Table 2.

In the adult population, the mean value was 1.13 and 1.58 pg TEQ kg<sup>-1</sup> bw day<sup>-1</sup>, in the LB and UB scenario respectively. This mean value is similar to the value of 1.12 pg WHO-TEQ kg<sup>-1</sup> bw day<sup>-1</sup> estimated in previous studies carried out in Spain (Castell et al, 2008) but lower than the 2.63 pg WHO-TEQ kg<sup>-1</sup> bw day<sup>-1</sup> estimated by others (Bordajandi et al, 2004) and the 2.86 pg WHO-TEQ kg<sup>-1</sup> bw day<sup>-1</sup> (UB scenario) estimated in a previous study carried out in this region (Marin et al, 2011). It must be said that these Spanish studies used quite different approaches. Although

**Table 2.** Estimated daily intake of PCDD/Fs and DL-PCBs under a probabilistic approach for the two populations studied in the two possible scenarios of exposure

Population group	Scenario	Dietary Intake (pg TEQ kg <sup>-1</sup> bw day <sup>-1</sup> )					
		Mean	P50	P75	P90	P95	P99
Adults	LB	1.13 (1.08-1.18)	1.08 (1.02-1.10)	1.38 (1.31-1.44)	2.18 (2.04-2.34)	3.04 (2.76-3.36)	5.53 (4.88-6.08)
	UB	1.58 (1.51-1.64)	1.22 (1.67-1.26)	1.88 (1.8-1.97)	2.99 (2.8-3.18)	4.03 (3.76-4.33)	6.75 (6.14-7.31)
Young People	LB	2.04 (1.85-2.27)	1.98 (1.80-2.17)	2.55 (2.28-2.82)	3.77 (3.31-4.34)	4.96 (4.13-6.36)	8.89 (6.23-10.16)
	UB	2.76 (2.51-3)	2.26 (2.08-2.46)	3.43 (3.09-3.78)	4.95 (4.43-5.61)	6.43 (5.42-7.91)	10.31 (8.14-11.3)

In parentheses confidence interval 95%, SD: Standard Deviation; P: Percentile, bw: body weight

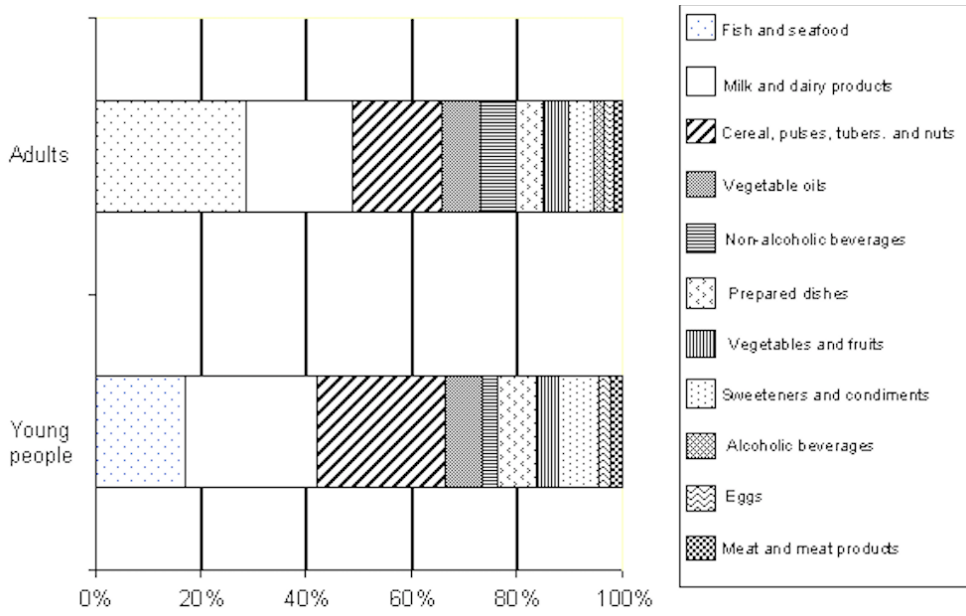
**Table 3.** Estimated daily intake of PCDD/Fs and DL-PCBs obtained from other studies (pg WHO-EQT kg bw<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>)

Country	Sampling year	Adults	Young People	Scenario	Reference
China	2008	1.36	ND	MB	Zhang et al., 2008
France	2012	0.57	0.89	MB	Sirost et al., 2012
Belgium	2010	0.61	ND	MB	Windal et al., 2010
Europe	2012	0.57-1.67	1.08-2.54	ND	EFSA, 2012
Finland	2003	1.5	ND	ND	Kirivanta et al., 2003
Japan	2008	1.06	ND	LB	Arisawa et al., 2008
New Zealand	1998	0.33-0.15	ND	MB-LB	Buckland et al., 1998
Australia	2011	0.12-0.52	ND	LB-UB	FSANZ, 2011
Spain	2008	1.12	2.9	ND	Castell et al., 2008
Present Study	2011	1.13-1.58	2.04-2.76	LB-UB	Present Study

ND: no data available in the study

LB: Lower bound; MB: Medium bound; UB: Upper bound

European countries included in EFSA, 2012: Iceland, Norway, Hungary, Latvia, Slovakia, Italy, Spain, Cyprus, Belgium, Ireland, Lithuania, Luxembourg, Romania, Bulgaria, Malta, Portugal, Germany, United Kingdom, Denmark, Italy, Norway, Estonia, Austria



**Figure 1.** Dietary exposure contribution of PCDD/Fs and DL-PCBs by food groups in the LB scenario (%)

all of them utilize a deterministic assessment, the consumption data are from different sources. Besides, (Bordajandi et al., 2004) analysed individual samples and used the UB approach for TEQ calculations based on TEFs from 1998, whereas (Castell et al., 2008) measured the contaminants in composite samples, using the middle bound approach and 2005 WHO-TEFs. Furthermore, the food products collected within each food group are not the same, and, in addition, in previous studies the samples were analysed by GC-HRMS, while the samples from this study were analysed by CALUX. For young people, the exposure was  $2.04 \text{ pg TEQ kg}^{-1} \text{ bw day}^{-1}$  and  $2.76 \text{ pg TEQ kg}^{-1} \text{ bw day}^{-1}$ , in the LB and UB scenario respectively. This high intake in young people is partly due to the difference in food intake, but mainly to their relative body weight. These mean value are lower

than the value of 2.9 pg WHO-TEQ kg<sup>-1</sup> bw day<sup>-1</sup> estimated by Castell et al. (2008) in Spain or the 4.58 pg WHO-TEQ kg<sup>-1</sup> bw day<sup>-1</sup> (UB scenario) estimated in another study carried out in this region (Marin et al, 2011). In summary, the results obtained in the present study show a slightly decreasing trend in the estimated intake of these pollutants, demonstrating the effectiveness of the Dioxin Strategy implemented by the EU. However, it is important to remark that the set of consumption data in the study conducted by Marin et al, 2011 included foodstuffs in the framework of an official monitoring programme grouped into eight categories including vegetables, cereals, oils and fat, eggs, milk and dairy products, fish, meat and meat products, and fish oils, and therefore this fact could be one possible source of different results.

On the other hand, it is a difficult task to compare intake estimations between studies from other countries because of the differences in the methodologies adopted, the food groups considered, the population groups studied and the way to express the results, although the main factor affecting variability is the dietary habit in the population. Table 3 shows the estimated daily intake reported in different studies from other countries and also points out some methodological differences between them. Regarding the adult population, the highest estimated daily intake results were reported in China (Zhang et al, 2008) and Finland (Kiviranta et al, 2003). In the study from China, four food samples were found to exceed the EU standard limit, and the PCDD/Fs and DL-PCBs estimated dietary weekly intake for local population exceeded the temporary weekly intake recommended by the Scientific Committee on Food (SCF, 2001). In Finland, only herring

samples were analysed in the study, this fish species being the major contributor in the Finnish dietary intake of PCDD/Fs and PCBs. The dietary exposure estimate in the present study was higher than those from other studies such as France (Sirot et al, 2012), Belgium (Windal et al, 2010), Japan (Arisawa et al, 2008), New Zealand (Buckland et al, 1990) and Australia (Food Standards Australia New Zealand (FSANZ), 2011) but similar to the values reported by EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) (EFSA, 2012a). Regarding young people, the estimated intake in the present study is also similar to the values reported by CONTAM (EFSA, 2012a) and slightly lower than the values obtained in a previous study in Spain (Castell et al., 2008).

The contribution of the foods products in the mean estimated daily intake of PCDD/Fs and DL-PCBs (LB scenario), for the two populations studied, is shown in Figure 1. Fish and fishery products are the food that most contribute to the PCDD/Fs and DL-PCBs intake for the adult population, followed by dairy products and cereals, legumes, tubers and nuts. This is in accordance with published studies suggesting that the most important contribution to the dietary intake of PCDD/Fs and PCBs for the European adult population is from fish and seafood (Domingo and Bocio et al, 2007; Malisch and Kotz 2014). However, dairy products and cereals, pulses, tubers and nuts are the foods that most contribute to the intake of PCCC/Fs and DL-PCBs in the case of young people, followed by fish and fish products. This directly related to the high consumption of these food groups by young people.

The toxicity of PCDD/Fs and DL-PCBs is related to the amount accumulated in the body during a lifetime, the so-called body burden. Therefore, some toxicological reference intakes are established to ensure that people are not exceeding a maximum body burden. A tolerable weekly intake (TWI) of 14 pg WHO-TEQ kg<sup>-1</sup> bw has been established by the Scientific Committee on Food (SCF, 2001). Likewise, the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA, 2002) set up a provisional tolerable monthly intake (PTMI) of 70 pg WHO-TEQ kg<sup>-1</sup> bw month<sup>-1</sup>, while WHO has stated a tolerable daily intake (TDI) of 1–4 pg WHO-TEQ kg<sup>-1</sup> bw day<sup>-1</sup> (WHO, 1998). In the present study, the average daily intake for adults (1.13-1.58 pg BEQ kg<sup>-1</sup> bw day<sup>-1</sup>) is within range of the TDI recommended by the WHO. On the other hand, the average weekly intake and the average monthly intake (7.91-11.06 pg BEQ kg<sup>-1</sup> bw day<sup>-1</sup> and 33.9-47.4 pg BEQ kg<sup>-1</sup> bw day<sup>-1</sup>, respectively) were below the TWI and PTMI adopted by SCF and JECFA respectively. Regarding young people, the average daily intake (2.04-2.76 pg TEQ kg<sup>-1</sup> bw day<sup>-1</sup>) is within range of the TDI recommended by the WHO, but the average weekly intake and the average monthly intake (14.38-19.32 pg BEQ kg<sup>-1</sup> bw day<sup>-1</sup> and 61.2-82.8 pg BEQ kg<sup>-1</sup> bw day<sup>-1</sup>, respectively) were slightly above the TWI and PTMI adopted by SCF and JECFA respectively. This fact can be due to their relative body weight.

To obtain a distribution of exposure and the percentage of population for which PCDD/Fs and DL-PCBs intake could exceed the TWI value, the estimated daily intakes for the two populations studied under the two exposure scenarios were compared with the TWI value by a probabilistic



approach. The results are shown in Table 4. Under the UB scenario, a total of 22 % of adults and 58 % of young people in the Region of Valencia may be at risk owing to PCDD/Fs and DL-PCBs through food consumption studied. These results of estimate intakes above some toxicological reference dose have to be interpreted cautiously when we are thinking in terms of the risk for the population. First of all, it should be stated that the UB scenario uses assumptions that are expected to lead to an over-estimation of the exposure. On the other hand, the potential of the CALUX assay to detect all compounds with AhR affinity in addition to the non-additive effects of some molecules could introduce an overestimation of the PCDD/Fs and DL-PCBs intake. And finally, there are the different safety limits proposed by authorities (TDI, TWI and PTMI).

**Table 4.** Risk characterisation derived from PCDD/Fs and DL-PCBs intake from different population groups and scenarios

<b>Population group</b>	<b>Scenario</b>	<b>% of population with intake&gt;TWI</b>
Adults	LB	12.4
	UB	22.4
Young People	LB	37.7
	UB	58.5

### *3.3 Uncertainty and variability in the exposure assessment*

Every dietary exposure assessment is affected by scientific uncertainties or scientific knowledge limitations, and it is important for assessors to characterise the extent of uncertainty, so that it can be taken into account by risk managers (EFSA, 2006). Unquantifiable uncertainties

associated with exposure assessment have been considered for the interpretation of the results. The Scientific Committee recommends a tiered approach to analysis uncertainties. Each uncertainty in an assessment may be analysed at one of three tiers: qualitative, deterministic or probabilistic. Initially, all significant uncertainties may be analysed qualitatively, this may be sufficient, but if the outcome is not clear enough for risk managers to reach decision, those uncertainties that appear critical to the outcome may be analysed deterministically or probabilistically (EFSA, 2006).

It is well known that the analysis of foods as consumed best represents the real dietary exposure of population. Nevertheless, the effect of cooking or processing was not taken into account for the calculation of the PCDD/Fs and DL-PCBs levels in the different products studied.

There are many uncertainties associated with the analytical methods, including uncertainties associated with intake calculations, consumption statistics, and sample representativeness (Zhou et al., 2012). All estimates of possible intakes were adjusted for the individual body weights for each participant. Regarding the uncertainty associated with the consumption data, it must be considered that extrapolation of consumption data for the population of the Region of Valencia in general can be a source of uncertainty. Dietary consumption surveys as the 24-h-recall used in this study can –under or over-estimate the consumption and, as a consequence, the exposure (rarely eaten foods may be under- or over-represented in the consumption survey). Surveys covering more than 2 days are recommended (EFSA, 2012b) to estimate long-term exposure, and therefore, in the future consumption survey including more days will be employed. The uncertainty

owing to sampling uncertainty of the input data (concentration and consumption) was estimated using the bootstrap approach (EFSA, 2012b). This uncertainty was expressed per exposure percentile as a 95% confidence interval. On the other hand, as has been described before, the potential of the CALUX assay to detect all compounds with AhR affinity in addition to the non-additive effects of some molecules could introduce an overestimation of the PCDD/Fs and DL-PCBs intake, and finally the left-censored data can also introduce uncertainty to overall estimate. It has been reported that UB-model runs use assumptions that are expected to lead to an over-estimation of the exposure, whereas LB-model runs use assumptions that are expected to lead to lower estimates of the exposure (EFSA, 2012).

### *3.4 Conclusions*

The present study reports for the first time in this region the estimated dietary exposure to PCDD/Fs and DL-PCBs of the population from the Region of Valencia, Spain, by a TDS approach. The average daily intake for adults (1.13-1.58 pg TEQ kg<sup>-1</sup> bw day<sup>-1</sup>) is within range of the TDI recommended by the WHO and below the TWI and PTMI adopted by SCF and JECFA respectively, but, regarding young people, the average daily intake (2.04-2.76 pg BEQ kg<sup>-1</sup> bw day<sup>-1</sup>), in spite of being within range of the TDI recommended by WHO, is slightly above the TWI and PTMI adopted by SCF and JECFA respectively. Although the exposure of the general population to PCDD/Fs and PCBs has declined in this region, and the levels of PCDD/Fs and DL-PCBs obtained were below the limits set by Regulation, the results show that a percentage of the population could be at risk, especially among young people. This highlights the difficulties

inherent in establishing maximum levels in Europe, taking into account the different dietary patterns in various countries, and the technological and market aspects involved, but also the need to maintain efforts to reduce dioxin emission and human exposure to protect the environment and human health in this region.

### **Acknowledgments**

This work is part of the Total Diet Study of the Valencia Community (Spain) (EDT-CV). The authors are grateful to all technicians from the Public Health Laboratory of Valencia who participated in the analytical work

### **Disclosure statement**

No potential conflict of interest was reported by the authors.

## References

- Amakura, Y., Tsutsumi, T., Nakamura, M., Handa, H., Yoshimura, M., Matsuda, R. and Yoshida, T., 2011. Aryl hydrocarbon receptor ligand activity of commercial health foods. *Food Chem.* 126, 1515-1520.
- Arisawa, K., Uemura, H., Hiyoshi, M., Satoh, H., Sumiyoshi, Y., Morinaga, K., Kodama, K., Suzuki, T., Nagai, M. and Suzuki, T., 2008. Dietary intake of PCDDs/PCDFs and coplanar PCBs among the Japanese population estimated by duplicate portion analysis: A low proportion of adults exceed the tolerable daily intake. *Environ. Res.* 108, 252-259.
- ATSDR, 2002. ATSDR Tox Profiles. Atlanta.GA: Department of Health & Human Services, Public Health Service.
- Baston, D.S, Denison, M.S., 2011. Considerations for potency equivalent calculations in the Ah receptor-based CALUX bioassay: normalization of superinduction results for improved sample potency estimation. *Talanta* 83, 1415-1421.
- Bencko, V., 2003. Risk assessment and human exposure to endocrine disrupters. In: Jedrychovsk, W.A., Petera, F.P., Maugeri, U. editors. *Molecular epidemiology in Preventive Medicine*. Luxembourg: International Center for studies and Research in Biomedicine in Luxembourg, pp. 315-327.
- Birnbaum, LS, Tuomisto, J., 2000. Non-carcinogenic effects of TCDD in animals. *Food Addit. Contam.* 17, 275-288.

Bordajandi, L.R., Gomez, G., Abad, E., Rivera, J., Del Mar Fernandez-Baston, M., Blasco, J. and Gonzalez, M.J., 2004. Survey of persistent organochlorine contaminants (PCBs, PCDD/Fs, and PAHs), heavy metals (Cu, Cd, Zn, Pb, and Hg), and arsenic in food samples from Huelva (Spain): levels and health implications. *J. Agric. Food Chem.* 52, 992-1001.

Buckland, S.J., Hannah, D.J., Taucher, J.A., Slooten, E. and Dawson, S., 1990. Proceedings of the Ninth International Symposium Polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in New Zealand's Hector's dolphin. *Chemosphere* 20, 1035-1042.

Buckland S. J. Scobie S, Heslop V. 1998. Concentrations of PCDDs, PCDFs and PCBs in retail foods and an assessment of dietary intake for New Zealanders. Wellington: Ministry for the Environment.

Carbonnelle, S., Loco, J.V., Overmeire, I.V., Windal, I., Wouwe, N.V., Leeuwen, S.V. and Goeyens, L., 2004. Importance of REP values when comparing the CALUX bioassay results with chemoanalyses results Example with spiked vegetable oils. *Talanta* 63, 1255-1259.

Castell V., Gosálbez P., Timoner I., Gómez J., Llobet JM., Domingo JL., Martí R., 2008. Contaminants químics. Estudi de dieta total a Catalunya 2005-2007. Agència Catalana de Seguretat Alimentaria.

Chobtang, J., de Boer, I.J., Hoogenboom, R.L., Haasnoot, W., Kijlstra, A. and Meerburg, B.G., 2011. The need and potential of biosensors to detect dioxins and dioxin-like polychlorinated biphenyls along the milk, eggs and meat food chain. *Sensors (Basel)* 11, 11692-11716.

Costopoulou, D., Vassiliadou, I. and Leondiadis, L., 2016. PCDDs, PCDFs and PCBs in farmed fish produced in Greece: Levels and human population exposure assessment. *Chemosphere* 146, 511-518.

Croes, K., Colles, A., Koppen, G., De Galan, S., Vandermarken, T., Govarts, E., Bruckers, L., Nelen, V., Schoeters, G., Van Larebeke, N., Denison, M.S., Mampaey, M. and Baeyens, W., 2013. Determination of PCDD/Fs, PBDD/Fs and dioxin-like PCBs in human milk from mothers residing in the rural areas in Flanders, using the CALUX bioassay and GC-HRMS. *Talanta* 113, 99-105.

Domingo, J.L. and Bocio, A., 2007. Levels of PCDD/PCDFs and PCBs in edible marine species and human intake: a literature review. *Environ. Int.* 33, 397-405.

European Commission, 2017. Commission regulation (EU) 2017/644 of 5 April 2017 laying down methods of samplings and analysis for the control of levels of dioxins, dioxin-like PCBs and non-dioxin-like PCBs in certain foodstuffs and repealing Regulation (EU) No 589/2014.

European Commission, 2014. Commission Regulation (EU) No 589/2014 of 2 June 2014 laying down methods of sampling and analysis for the control of levels of dioxins, dioxin-like PCBs and non-dioxin-like PCBs in certain foodstuffs and repealing Regulation (EU) No 252/2012 Text with EEA relevance.

European Commission, 2012b. Commission Regulation (EU) No 278/2012 of 28 March 2012 amending Regulation (EC) No 152/2009 as regards the determination of the levels of dioxins and polychlorinated biphenyls.

European Commission., 2012a. Commission Regulation 252/2012 of 21 March 2012 laying down methods of sampling and analysis for the official control of levels of dioxins, dioxin-like PCBs and non-dioxin-like PCBs in certain foodstuffs and repealing Regulation (EC) No 1883/2006. Official Journal of the European Communities.

European Food Safety Authority (EFSA), 2012b. Guidance on the use of probabilistic methodology for modelling dietary exposure to pesticide residues. EFSA Journal 2012 10, 2839, 2839.

European Food Safety Authority (EFSA), 2012a. Update of the monitoring of levels of dioxins and PCBs in food and feed. 10(7): 2832.

European Food Safety Authority (EFSA), 2010. Management of left-censored data in dietary exposure assessment of chemical substances. 8 (3):1557.

European Food Safety Authority (EFSA), 2006. Guidance of the Scientific Committee on a request from EFSA related to Uncertainties in Dietary Exposure Assessment. 438, 1-54.

European Food Safety Authority (EFSA), 2005. Opinion of the scientific on contaminants in the food chain on a request from the Commission related to the presence of non dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCB) in feed and food. 284, 1-137.

Food Standards Australia New Zealand (FSANZ), 2011. The 23<sup>rd</sup> Australian Total Study. Canberra: FSANZ.



Fujiyoshi, P.T., Michalek, J.E. and Matsumura, F., 2006. Molecular epidemiologic evidence for diabetogenic effects of dioxin exposure in U.S. Air force veterans of the Vietnam war. *Environ. Health Perspect.* 114, 1677-1683.

Fullana M., Jiménez R., Marín S., Ramón R., Quiles J., Rizk J., Zubeldía L., 2010. Encuesta de Salud de la Comunidad Valenciana 2010-2011. Subdirección General de Seguridad Alimentaria.

Gizzi, G., Hoogenboom, L.A., Von Holst, C., Rose, M. and Ankam, E., 2005. Determination of dioxins (PCDDs/PCDFs) and PCBs in food and feed using the DR CALUX bioassay: results of an international validation study. *Food Addit. Contam.* 22, 472-481.

Hays, S.M. and Aylward, L.L., 2003. Dioxin risks in perspective: past, present, and future. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 37, 202-217.

Husain, A., Gevao, B., Dashti, B., Brouwer, A., Behnisch, P.A., Al-Wadi, M. and Al-Foudari, M., 2014. Screening for PCDD/Fs and dl-PCBs in local and imported food and feed products available across the State of Kuwait and assessment of dietary intake. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 100, 27-31.

JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), 2002. Safety evaluation of certain food additives and contaminants: polychlorinated dibenzo-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and coplanar polychlorinated biphenyls. 64.

Kiviranta, H., Vartiainen, T., Parmanne, R., Hallikainen, A. and Koistinen, J., 2003. PCDD/Fs and PCBs in Baltic herring during the 1990s. *Chemosphere* 50, 1201-1216.

Malisch, R. and Kotz, A., 2014. Dioxins and PCBs in feed and food--review from European perspective. *Sci. Total Environ.* 491-492, 2-10.

Marin, S., Villalba, P., Diaz-Ferrero, J., Font, G. and Yusà, V., 2011. Congener profile, occurrence and estimated dietary intake of dioxins and dioxin-like PCBs in foods marketed in the Region of Valencia (Spain). *Chemosphere* 82, 1253-1261.

McNamara, C., Naddy, B., Rohan, D. and Sexton, J., 2003. Design, development and validation of software for modelling dietary exposure to food chemicals and nutrients. *Food Addit. Contam.* 20 Suppl 1, S8-26.

Scientific Committee on Food, 2001. Opinion of the Scientific Committee on Food on the risk assessment of dioxins and dioxin-like PCBs in food. Update based on new scientific information available since the adoption of the SCF Opinion of 22nd November 2000. Adopted on 30 May 2001. Brussels: European Commission, Health & Consumer Protection Directorate General.

Sirota, V., Tard, A., Venisseau, A., Brosseaud, A., Marchand, P., Le Bizec, B. and Leblanc, J., 2012. Dietary exposure to polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and polychlorinated biphenyls of the French population: Results of the second French Total Diet Study. *Chemosphere* 88, 492-500.

Steenland, K., Bertazzi, P., Baccarelli, A. and Kogevinas, M., 2004. Dioxin revisited: developments since the 1997 IARC classification of dioxin as a human carcinogen. *Environ. Health Perspect.* 112, 1265-1268.

Van den Berg, M., Birnbaum, L., Bosveld, A.T., Brunstrom, B., Cook, P., Feeley, M., Giesy, J.P., Hanberg, A., Hasegawa, R., Kennedy, S.W., Kubiak, T., Larsen, J.C., van Leeuwen, F.X., Liem, A.K., Nolt, C., Peterson, R.E., Poellinger, L., Safe, S., Schrenk, D., Tillitt, D., Tysklind, M., Younes, M., Waern, F. and Zacharewski, T., 1998. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ. Health Perspect.* 106, 775-792.

Vromman, V., Baert, K., Vanderperren, H., Goeyens, L., Huyghebaert, A., Maghuin-Rogister, G., Scippo, M., Moons, E., Vinkx, C., Saegerman, C. and Pussemier, L., 2012. Evaluation of the use of CALUX results for dioxins and dioxin-like PCBs analysis for quantitative human exposure assessments. *Food Control* 27, 314-321.

WHO (World Health Organization), 1998. Consultation on assessment of the health risk of dioxin; re-evaluation of the tolerable daily intake (TDI). *Food Addit. contam.* 17 (4), 223-240.

Windal, I., Vandevijvere, S., Maleki, M., Gosciny, S., Vinkx, C., Focant, J.F., Eppe, G., Hanot, V. and Van Loco, J., 2010. Dietary intake of PCDD/Fs and dioxin-like PCBs of the Belgian population. *Chemosphere* 79, 334-340.

Windal, I., Denison, M.S., Birnbaum, L.S., Van Wouwe, N., Baeyens, W. and Goeyens, L., 2005. Chemically activated luciferase gene expression (CALUX) cell bioassay analysis for the estimation of dioxin-like activity: critical parameters of the CALUX procedure that impact assay results. *Environ. Sci. Technol.* 39, 7357-7364.

Zhang, J., Jiang, Y., Zhou, J., Fang, D., Jiang, J., Liu, G., Zhang, H., Xie, J., Huang, W., Zhang, J., Li, H., Wang, Z. and Pan, L., 2008. Concentrations of PCDD/PCDFs and PCBs in retail foods and an assessment of dietary intake for local population of Shenzhen in China. *Environ. Int.* 34, 799-803.

Zhou, P., Zhao, Y., Li, J., Wu, G., Zhang, L., Liu, Q., Fan, S., Yang, X., Li, X. and Wu, Y., 2012. Dietary exposure to persistent organochlorine pesticides in 2007 Chinese total diet study. *Environ. Int.* 42, 152-159.

## 4. DISCUSIÓN GENERAL

---



## 4. DISCUSIÓN GENERAL

Acorde con los objetivos propuestos, en la presente tesis doctoral se han determinado las concentraciones de tres grupos de contaminantes químicos: plaguicidas, nitratos y dioxinas en alimentos consumidos por los habitantes de la Comunidad Valenciana.

Asimismo, se ha evaluado y caracterizado el riesgo de exposición a estos contaminantes a través de la dieta en dos subpoblaciones de la Comunidad Valenciana: adultos y niños; y se ha determinado cuáles son los grupos de alimentos que contribuyen más a esta exposición.

### 4.1. Plaguicidas

#### *4.1.1 Niveles de residuos de plaguicidas*

Los datos relativos a los niveles de residuos de plaguicidas en frutas y verduras, se han obtenido de los programas de control oficial llevados a cabo en el período 2007-2011, por el Área de Seguridad Alimentaria de la Consellería de Sanidad. Estos niveles de residuos de plaguicidas, se han comparado con los LMR establecidos en el Reglamento (CE) N° 396/2005 (Parlamento Europeo y Consejo UE, 2005). De las 752 muestras de frutas y verduras analizadas (cítricos, incluyendo naranjas, mandarinas y limones; coles y repollo, espinacas, fresas, guisantes, judías, lechugas, manzanas, melocotones, patatas, pepinos, peras, pimientos, plátanos, puerros, tomates, uvas, zanahorias, zumo de cítricos), sólo 13 (el 1,72%) excedieron los LMR establecidos reglamentariamente. Este porcentaje de muestras fue inferior al 3.72% obtenido en un anterior estudio llevado a cabo en la Comunidad

Valenciana (Berrada et al., 2010), en el que se evaluó durante veinte meses los datos de vigilancia a residuos de plaguicidas en cinco grupos de frutas entre los años 2004 y 2005. Inferior también, al 3.52% de muestras reportadas en el último Programa Nacional de Control de Residuos de Plaguicidas en España correspondiente al año 2016, (AECOSAN, 2018) y al 2.2% de muestras obtenidas en el año anterior (AECOSAN, 2017).

El último informe de la EFSA sobre residuos de plaguicidas en alimentos (frutas y verduras en su mayoría) publicado en el mes de junio del año pasado, resume las actividades del Programa Coordinado de Control de la UE (EUCP) y los resultados más relevantes sobre los Programas Nacionales de Control de los estados miembros, Islandia y Noruega. La combinación de los resultados de ambos programas, señalan que el 3.8% de las muestras de alimentos analizadas excedían los LMR (EFSA, 2018a) resultado superior al 2.8%, 2.9% y 2.6% obtenidos en los informes de los años 2017, 2016 y 2015 respectivamente (EFSA, 2015; EFSA, 2017; EFSA, 2016). Todos estos resultados reportados por la EFSA, son superiores al porcentaje de muestras determinado en este trabajo; como lo es también, el 2.72% de muestras obtenidas en una revisión publicada en Brasil, donde se recogieron los datos de vigilancia a residuos de plaguicidas en frutas y verduras, entre los años 2001-2010 (Jardim y Caldas, 2012).

Por su parte, los Programas Coordinados de Control proporcionan cada año una visión actualizada sobre los residuos de plaguicidas en productos alimenticios, disponibles para los consumidores de la UE. Los diferentes estados miembros reportan datos sobre distintos grupos de alimentos y plaguicidas seleccionados en dichos programas, obteniendo una



visión detallada de las actividades de control a nivel europeo. Los resultados obtenidos en el último programa, son del mismo orden que el obtenido en el trabajo desarrollado, 1.7% de muestras (EFSA, 2018a), duplicando estos resultados el valor del año anterior, 0.8% (EFSA, 2017), en el que se consiguió reducir el porcentaje de muestras a casi la mitad, respecto al anterior programa 1.5% (EFSA, 2016).

En estos programas se determinaron también, aquellos alimentos en los que más residuos de plaguicidas se cuantificaron en las diferentes muestras. Las fresas con 16 residuos diferentes, las uvas con 19 y los pepinos y peras con 14, fueron los alimentos en los que se cuantificaron más residuos de plaguicidas en los EUCP correspondientes a los años a, 2017 y 2016, respectivamente (EFSA, 2018a; EFSA, 2017; EFSA, 2016); mientras que en el estudio llevado a cabo, fueron las peras con 18 residuos diferentes.

La concentración más elevada de residuo de plaguicida fue de 3.6 mg kg<sup>-1</sup> para el carbamato, clorprofam, en las patatas. Del mismo orden fue la concentración más elevada de residuo de plaguicida reportada por Berrada et al., 2010 para el cloronitrilo, clorotalonil, con 3.50 mg kg<sup>-1</sup> en melocotones. Mientras que, valores inferiores fueron observados para el organofosforado clorpirifos en el brócoli, con 1.514 mg kg<sup>-1</sup> y 1.51 mg kg<sup>-1</sup> en Japón (Mojsak et al., 2018) y Polonia (Łozowicka et al., 2012) respectivamente, como concentración más elevada de residuo de plaguicida.

Respecto a la frecuencia de detección de los plaguicidas analizados, carbendazim (CB) seguido de clorpirifos (OP) y lambda-cihalotrin (PP), fueron los plaguicidas que presentaron la mayor frecuencia de detección en el trabajo de investigación, 24%, 22% y 9%, respectivamente. Es interesante

comparar estos resultados con un estudio publicado el año pasado (Jardim et al., 2018), en el que se investiga la exposición a los tres mismos grupos de plaguicidas que en esta tesis, concluyendo que los OPs, clorpirifos metil, acefato y metamidofos, son los plaguicidas que presentan mayor frecuencia de detección. Li et al., 2017 también evaluó el riesgo acumulado a plaguicidas a través de la ingesta de frutas y verduras, e igualmente observó que los plaguicidas OPs, clorpirifos, dimetoato y triazofos, eran los que presentaban una mayor frecuencia de detección. Estos resultados correspondientes a frecuencias de detección elevadas a plaguicidas OPs, pueden deberse a que este es el grupo de plaguicidas es más empleado en la agricultura (Kavvalakis y Tsatsakis, 2012).

#### *4.1.2 Evaluación de la exposición dietética a plaguicidas*

La EFSA ha calculado año tras año, empleando una metodología determinista, la exposición dietética crónica de los consumidores de la UE a plaguicidas, en alimentos cubiertos por el ciclo de tres años del programa EUCP. En el año 2016 por primera vez, se emplearon dos escenarios para el cálculo de dicha exposición, el enfoque ajustado de límite superior y enfoque de límite inferior. El primer enfoque se considera una evaluación conservadora, con probabilidad de sobreestimar la exposición real. Por el contrario, el escenario del límite inferior puede subestimar la exposición, y los cálculos son útiles para complementar las evaluaciones de exposición de límite superior, a fin de comprender mejor las incertidumbres resultantes, que son principalmente el alto porcentaje de muestras con residuos en o debajo del LOQ (EFSA, 2016).

La misma metodología empleada por la EFSA en los programas EUCP, se ha aplicado en el trabajo de investigación; para la evaluación de la exposición crónica a OPs, CBs y PPs, a través del consumo de frutas y verduras en las dos subpoblaciones, adultos y niños.

Todos los plaguicidas OPs, CBs y PPs estudiados, presentaron valores inferiores a sus respectivas IDAs en el nivel medio y percentil 95 de exposición, incluso en el escenario UB. Los valores más elevados de IDE en el escenario UB y en el nivel medio de exposición para adultos y niños fueron de 0.161-0.281  $\mu\text{g kg}^{-1} \text{pc día}^{-1}$  para el OP clorpirifos, 0.1014- 0.222  $\mu\text{g kg}^{-1} \text{pc día}^{-1}$  para el CB clorprofam, y 0.0856- 0.12  $\mu\text{g kg}^{-1} \text{pc día}^{-1}$  para el piretroide bifentrin, respectivamente.

Estos resultados son del mismo orden que los reportados por la EFSA en los últimos años, con resultados de exposición muy bajos y no superiores a los valores de IDA (EFSA, 2016), excepto para algunos plaguicidas que presentan diferencias significativas entre los dos escenarios de exposición, debido a la alta proporción de muestras con valores por debajo del límite de cuantificación; tal es el caso de los OPs diclorvos y dimetoato. La exposición media estimada a largo plazo para diclorvos expresada en el porcentaje de IDA por la EFSA fue de 143.28% UB - 4.99% LB (EFSA, 2017) y 145% UB - 2.8% LB (EFSA, 2018a) en los dos últimos años; mientras que la exposición media estimada a largo plazo para dimetoato en el informe emitido por la EFSA este año fue de 101% UB - 6.1% LB (EFSA, 2018a).

Otros estudios internacionales también han evaluado el riesgo de exposición a residuos de plaguicidas a través de la dieta en adultos y niños. En China, uno de los principales países consumidores de plaguicidas a nivel mundial (Ly et al., 2013), Li et al., 2018 evaluó el riesgo de exposición a residuos de OPs, CBs y PPs entre otros plaguicidas a través de la ingesta de melocotones por ser una de las frutas con mayor producción de este país. La IDE media más elevada para adultos y niños fue reportada para el carbendazim (CB),  $0.026 \mu\text{g kg}^{-1} \text{pc día}^{-1}$  y  $0.086 \mu\text{g kg}^{-1} \text{pc día}^{-1}$ , respectivamente. Xu et al., 2018 por su parte, evaluó el riesgo de exposición exclusivamente a este carbamato en vegetales, por su toxicidad y posible carcinogenicidad. El valor de IDE más elevado en el escenario UB para los grandes consumidores adultos fue de  $0.08 \mu\text{g kg}^{-1} \text{pc}$  en lechugas, siendo ésta y las obtenida por (Li et al., 2018) superiores a la obtenida para el carbamato en Valencia.

En Japón, Kawahara et al., 2017 evaluó el riesgo de exposición a OPs a través de la dieta en niños, y diazinon presentó la IDE más elevada ( $40 \text{mg kg}^{-1}\text{día}$ ), no cuantificándose residuos para este plaguicida en la población de los niños en Valencia. Como tampoco fueron cuantificados carbofurano (CB) y monocrotofos (OP), que llegaron a superar la IDA en la población infantil de Israel (Freeman et al., 2016).

En Korea, Park et al., 2016 evaluaron el riesgo a la ingesta de vegetales de hoja en adultos y la IDE más elevada fue  $0.89 \mu\text{g kg}^{-1} \text{pc}$  para dietofencarb (CB), superior también a la del trabajo.

El estudio de Iñigo-Nuñez et al., 2010 llevado a cabo en Madrid es de especial interés, puesto que incluye en la evaluación los tres grupos de plaguicidas estudiados en Valencia. Los valores más elevados de IDE en el grupo de las niñas (6-10 años) en el escenario UB fueron para fosalón ( $0.57 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ pc día}^{-1}$ ), carbendazim ( $0.43 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ pc día}^{-1}$ ) y cipermetrin ( $0.32 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ pc día}^{-1}$ ). Superiores a las reportadas en Valencia, incluso incluyendo este último un mayor número de frutas y verduras; así como, ambos sexos, para la evaluación de la exposición en la población infantil valenciana.

Los resultados de la evaluación del riesgo acumulado en alimentos no se han podido presentar aún en los informes emitidos por la EFSA, puesto que no se han establecido los grupos, ni adaptado las metodologías de evaluación acumulada a riesgos; disponibles para la implementación práctica a nivel de la UE (EFSA, 2018a).

Respecto a la exposición dietética crónica acumulada en las dos subpoblaciones estudiadas, los valores estimados fueron bajos para los tres grupos de plaguicidas. En el escenario UB, el valor más elevado de exposición se observó para los plaguicidas OPs,  $0.33\text{-}0.79 \text{ mg kg}^{-1} \text{ pc día}^{-1}$  para adultos y  $0.45\text{-}1.40 \text{ mg kg}^{-1} \text{ pc día}^{-1}$  para niños, en el nivel medio y percentil 95 de exposición, respectivamente. Lozowicka et al., 2016 evaluaron la exposición crónica a plaguicidas a través de la ingesta de frutas en Polonia, y los valores más elevados se reportaron para los OPs,  $0.00012 \text{ mg kg}^{-1} \text{ pc día}^{-1}$  y  $0.0004 \text{ mg kg}^{-1} \text{ pc día}^{-1}$  para adultos y niños, respectivamente. Estos valores tan bajos, son debidos a que, en el trabajo de Polonia, sólo se evalúa cuatro grupos de frutas; mientras que en el trabajo

llevado a cabo en Valencia son 19 diferentes grupos de frutas y verduras las que se estudian.

#### *4.1.3 Caracterización del riesgo a la exposición dietética a plaguicidas*

Para evaluar el riesgo de exposición, en primer lugar, se comparó la IDE de cada plaguicida con su respectivo valor de IDA. Ninguno de los plaguicidas estudiados presentó valores superiores a sus respectivas IDAs. Los valores más elevados en el escenario UB y nivel medio de exposición en cada grupo de plaguicida fueron para adultos y niños 1.61%-2.81% para clorpirifos (OP), 5.57%-6.79% carbofurano (CB) y 1.11%-1.49% lambda-cihalotrin (PP), respectivamente. El estudio llevado a cabo en Madrid (Iñigo-Nuñez et al., 2010), evaluó el riesgo de exposición a estos tres mismos grupos, aunque en un número inferior de plaguicidas, 18 frente a los 84 evaluados en Valencia. Sus %IDA más elevados en la población de niñas fueron obtenidos para deltametrin 2% y carbendazim 1%, ambos porcentajes superiores a los obtenidos en Valencia.

Las IDEs acumuladas de OPs, CBs y PPs no excedieron los valores de IDA de los compuestos índice correspondientes. El % IDA más elevado en el escenario UB y en el nivel medio de exposición se observó para los CBs: representó el 3% en adultos y el 4% en niños. De acuerdo con los resultados de la exposición a largo plazo a los plaguicidas analizados, incluso en el P95 de exposición, podría excluirse el riesgo para la salud del consumidor a largo plazo. Estos resultados se pueden comparar con otros estudios que, empleando una metodología determinista, han evaluado la exposición crónica acumulada a OPs, CBs y PPs entre otros plaguicidas, a través del consumo de frutas y verduras. Chen et al., 2011 en China y

Larsson et al., 2018 en Dinamarca, emplearon el método del HI basado en la adición de las dosis individuales de los compuestos de una mezcla. Los resultados de la caracterización del riesgo fueron de 8.12% IDA para la población general en China y del 44% y 16% de IDA en las poblaciones de adultos y niños, respectivamente. Estos valores más elevados pueden deberse a la metodología de HI empleada, considerada conservadora, sobre todo si los compuestos individuales no comparten el mismo efecto tóxico final (Kotenkamp, et al., 2012; Reffstrup et al., 2010).

Respecto a los alimentos que más contribuyeron a la exposición acumulada a plaguicidas en Valencia, el tomate fue el principal contribuyente para los OPs en ambas poblaciones. Para el grupo de los CBs, las patatas lo fueron para los niños y las espinacas para los adultos. Estas últimas también fueron los principales contribuyentes para la población adulta e infantil de Holanda (Boon et al., 2008), mientras que las manzanas lo fueron para los CBs en ambas poblaciones. En la población general de Brasil (Jardim et al., 2018), la naranja y el arroz fueron los principales contribuyentes para OPs y CBs, respectivamente; y para el grupo de los PPs, la pasta, mientras que el tomate lo fue para estos plaguicidas en Valencia.

## 4.2 Nitratos

### 4.2.1 Niveles de nitratos

Los datos relativos a niveles de nitratos en vegetales, se obtuvieron de los programas de vigilancia llevados a cabo en la Comunidad Valenciana por el Área de Seguridad Alimentaria de la Consellería de Sanidad, entre los años 2009 y 2013. Estos niveles se compararon con los límites máximos

(LMs) establecidos en el Reglamento (CE) N° 1881/2006 (Comisión Europea, 2006). De las 533 muestras de verduras analizadas: lechuga (*Lactuca sativa*), lechuga tipo iceberg (*Lactuca sativa* var. *Capitata*), espinaca (*Spinacea oleracea*), patata (*Solanum tuberosum*), acelga (*Beta vulgaris* var. *Cicla*), alcachofa (*Cybara scolymus*) y zanahoria (*Daucus carota*); 9 muestras (1.68%) de espinacas frescas cultivadas en verano superaron los LMs establecidos. Este resultado es del mismo orden que las 13 muestras (1.13%) de espinacas frescas que superaron los LMs en un anterior estudio llevado a cabo en la Comunidad Valenciana (Pardo-Marin et al., 2010), en el que se evaluaron los niveles de nitratos en vegetales comercializados durante el período 2000-2008. De estas muestras de espinacas que superaron los LMs, 10 fueron cultivadas en verano y 3 en invierno. En el último estudio de la EFSA sobre el contenido de nitratos en vegetales (EFSA, 2013), 6 muestras (11%) de espinacas frescas también superaron los LMs, 5 fueron cultivadas en verano y 1 en invierno. Generalmente, la concentración de nitratos en vegetales es inferior en los meses de verano; ya que la radiación solar favorece el metabolismo de la planta, fijando el nitrógeno en compuestos orgánicos nitrogenados (aminoácidos, proteínas etc.), reduciendo así el contenido de nitratos en las hojas (EFSA, 2008; AECOSAN, 2011). Sin embargo, estos datos relativos a muestras que superan los límites máximos en los meses de verano, pueden ser debidos a otros factores que también influyen en las concentraciones de nitratos en los vegetales; como el tipo de suelo y su fertilización con nitrógeno, el tamaño y tipo de vegetal, el tiempo hasta su recolecta y la



duración de su almacenamiento, etc. (Tamme et al., 2006), además de que los niveles en esta estación son más restrictivos.

Al presentar los nitratos una mayor capacidad de almacenamiento en las hojas que en otras partes de la planta, como tallos y raíces; numerosos estudios han evaluado los niveles de nitratos en vegetales de hoja, como la lechuga y la espinaca. Los informes relacionados con los niveles de nitratos en vegetales publicados por la EFSA en los años 2008, 2010 y 2013, presentaron una concentración media en lechuga de  $1324 \text{ mg kg}^{-1}$ ,  $1570 \text{ mg kg}^{-1}$  y  $1862 \text{ mg kg}^{-1}$ , respectivamente (EFSA, 2008; EFSA, 2010; EFSA, 2013); superiores todas estas concentraciones a la obtenida en el trabajo ( $785 \text{ mg kg}^{-1}$ ). En Irán (Nowrouz et al., 2012), también obtuvo una concentración similar en lechugas ( $781 \text{ mg kg}^{-1}$ ), en Portugal (Correia et al., 2010) ligeramente superior; mientras que en Estonia (Tamme et al., 2010) y Bélgica (Temme et al., 2011) fueron muy superiores  $2348 \text{ mg kg}^{-1}$  y  $2351 \text{ mg kg}^{-1}$ , respectivamente. Estos elevados niveles de nitratos en vegetales, pueden ser debidos a la tendencia que presentan las zonas del norte de Europa a obtener niveles más elevados que las zonas del sur, puesto que estas regiones geográficas se caracterizan por una menor intensidad y horas de luz diurna (EFSA, 2008).

Respecto a las espinacas, las concentraciones medias obtenidas en los informes de la EFSA en el año 2008 y 2010, fueron  $1066 \text{ mg kg}^{-1}$  (EFSA, 2008) y  $1092 \text{ mg kg}^{-1}$ , (EFSA, 2010) respectivamente; ligeramente inferiores a la obtenida en Valencia ( $1346 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Mientras que el nivel en el último informe fue superior,  $1682 \text{ mg kg}^{-1}$  (EFSA, 2013).

El nivel medio de nitratos en espinacas fue similar a la obtenida en otros países como Croacia 1359 mg kg<sup>-1</sup> (Brkic et al., 2017) y Japón (Iqbal MA et al., 2007) 1460 mg kg<sup>-1</sup>. Sin embargo, al compararlo con estudios procedentes de países con características geográficas similares a las de la Comunidad Valenciana, como Portugal (Correia et al., 2010) e Italia (Iammarino et al., 2014), éstos obtuvieron niveles inferiores 1112 mg kg<sup>-1</sup> y 949 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente.

Es interesante comparar los resultados obtenidos en este trabajo con los del estudio llevado a cabo anteriormente en la Comunidad Valenciana (Pardo-Marin et al., 2010), en el que además se evaluaban los mismos vegetales que en el trabajo actual. Se apreció una disminución en las concentraciones medias de todos los niveles de vegetales estudiados; esta reducción se podría relacionar con la óptima aplicación de buenas prácticas agrícolas en la Comunidad Valenciana durante los últimos años. La disminución en los niveles de nitratos, se aprecia especialmente en las lechugas (de 1156 mg kg<sup>-1</sup> a 76 mg kg<sup>-1</sup>) y zanahorias (203 mg kg<sup>-1</sup> a 40 mg kg<sup>-1</sup>) (Pardo-Marin et al., 2010).

En relación al vegetal que presentó la concentración media más elevada de nitratos, fue la acelga con 1415 mg kg<sup>-1</sup>. En un estudio sobre el contenido de nitratos en vegetales comercializados en la región de Madrid (Matallana et al., 2010), también se obtuvo el nivel más elevado para este vegetal, pero en una concentración muy superior, 2630 mg kg<sup>-1</sup>; mientras que la obtenida en el informe de la EFSA fue ligeramente superior 1690 mg kg<sup>-1</sup> (EFSA, 2008) a la de Valencia. La acelga, al igual que la alcachofa, son vegetales que carecen de regulación a escala comunitaria, debido a su escaso

consumo en los países europeos; sin embargo, en España (AESAN, 2006) y la Comunidad Valenciana (Fullana et al., 2010), estos vegetales presentan un notable consumo. Debido a ésto, la AECOSAN ha establecido recomendaciones en relación al consumo de vegetales, con el objetivo de disminuir la exposición a nitratos en las poblaciones sensibles: bebés y niños de corta edad (AECOSAN, 2011).

Otros vegetales que también carecen de regulación, por no presentar una elevada capacidad para la acumulación de nitratos, son la patata y la zanahoria, a pesar de su significativo consumo. No obstante, estos vegetales presentaron niveles medios de nitratos no muy elevados: 87 mg kg<sup>-1</sup> las alcachofas, 153 mg kg<sup>-1</sup> las patatas y 119 mg kg<sup>-1</sup> las zanahorias.

#### *4.2.2 Evaluación de la exposición dietética a nitratos*

La ingesta media estimada de nitratos para la población de los adultos y niños en el escenario UB, fue de 0.28 mg kg<sup>-1</sup> p.c. día y 0.38 mg kg<sup>-1</sup> p.c. día, respectivamente. Estos valores de exposición son muy inferiores a la IDA establecida para los nitratos (3.7 mg kg<sup>-1</sup> p.c.); por lo tanto, la exposición de los consumidores valencianos a nitratos a través del consumo de vegetales parece ser relativamente baja. Incluso en el P99.9, la población adulta presentó 3.13 mg kg<sup>-1</sup> p.c. día y 3.15 mg kg<sup>-1</sup> p.c. día de exposición en el escenario LB y UB, respectivamente. Sin embargo; para los niños, los valores fueron superiores a la IDA, 4.20 mg kg<sup>-1</sup> p.c. día y 4.40 mg kg<sup>-1</sup> p.c. día, escenario LB y UB, respectivamente. Ante estos resultados elevados conviene tener en cuenta; por un lado, la menor masa corporal que presentan los niños generando una mayor exposición a cualquier contaminante, y por otro; la tendencia del escenario UB a sobreestimar la

exposición. Menard et al., 2008 en Francia en el escenario UB y nivel medio de exposición obtuvo valores de ingestas más altas,  $0.9 \text{ mg kg}^{-1} \text{ p.c. día}$  y  $1 \text{ mg kg}^{-1} \text{ p.c. día}$  para adultos y niños, respectivamente; probablemente por la evaluación de un mayor número de vegetales que el estudio llevado a cabo en Valencia. Thomson et al., 2007, en Nueva Zelanda, en el nivel medio de exposición presentó una ingesta de  $0.7 \text{ mg kg}^{-1} \text{ p.c. día}$  para la población adulta. Este resultado es superior al obtenido en Valencia, conviene tener en cuenta que, en Nueva Zelanda se incluyó alimentos procesados a parte de vegetales en la evaluación de la ingesta dietética a nitratos.

Chen et al., 2011 en Hong Kong, obtuvo una ingesta de  $4,4 \text{ mg kg}^{-1} \text{ p.c.}$  para los consumidores medios en la población adulta; es decir, una IDE muy elevada, que además supera el valor de  $3.7 \text{ mg kg}^{-1}$  de IDA. Es pertinente recordar en este punto, el elevado nivel de nitratos que contienen los vegetales de hoja en esta región y el alto consumo de los mismos por parte de la población. Sometiendo después (Chen et al., 2011) éstos vegetales a un proceso de cocinado, la IDE disminuyó a  $3.5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ p.c. día}$ , ya que el lavado y ebullición disminuye el contenido de nitratos en vegetales (EFSA, 2013).

La lechuga fue el principal contribuyente a la exposición de nitratos en ambas poblaciones, seguida de la acelga en los adultos y las patatas en los niños. Esta misma secuencia de vegetales que más contribuyen a la exposición, coincide con la del anterior estudio llevado a cabo en la Comunidad Valenciana (Pardo-Marin et al., 2010). Aun apreciándose una disminución general en los niveles de nitratos en vegetales, se puede apreciar por un lado, que debido a la capacidad de acumular nitratos las hojas de

acelgas y lechugas y por otro; el elevado consumo de ésta última por parte de los adultos y de las patatas en los niños, se sigue poniendo de manifiesto el papel destacado de estos vegetales en la ingesta dietética de la población de la Comunidad Valenciana.

Por otro lado, la contribución de las espinacas, patatas y zanahorias a la ingesta total de nitratos, fue mayor en los niños que en los adultos, debido al alto consumo de estos vegetales por la población infantil.

#### *4.2.3 Caracterización del riesgo a la ingesta dietética a nitratos*

El empleo de la metodología probabilística, permitió obtener una distribución de la exposición y determinar el porcentaje de la población cuya ingesta de nitratos podría exceder el valor de la IDA en las dos subpoblaciones estudiadas.

En el escenario UB, un total de 0.79% de adultos y 1.39% de niños de la Comunidad Valenciana, podrían superar la IDA debido a la ingesta de nitratos a través de los vegetales. Este porcentaje correspondería al grupo de consumidores extremos, como los vegetarianos; especialmente de vegetales de hoja (espinaca y lechuga), puesto que son los que más nitratos acumulan en sus hojas comestibles (EFSA, 2013). Por otra parte, estos resultados guardan concordancia con previas evaluaciones de la EFSA (EFSA, 2008) indicando que un consumo medio y variado de vegetales al día, no supone un riesgo para la población adulta.

Otros estudios que han evaluado la exposición dietética a nitratos para el consumidor medio han obtenido valores superiores a la del trabajo. En Polonia, (Anzewska y Wawrzyniak, 2014) y (Mitek et al., 2013),

evaluaron la ingesta dietética a nitratos en la población adulta, y los valores obtenidos fueron 41% y 35% de IDA, respectivamente. En Estonia (Tamme et al., 2010), obtuvo un 11% de IDA al evaluar la ingesta dietética a vegetales de hoja y hierbas comestibles. Estos porcentajes de IDA más elevados en regiones del norte y centro de Europa pueden ser debidos una vez más, a las diferencias medioambientales de estas regiones respecto a la Comunidad Valenciana, como la luz y la temperatura que tienden a disminuir la concentración de nitratos en vegetales.

En Hong Kong (Chen et al., 2011), se evaluó la ingesta a nitratos en vegetales crudos al igual que en el trabajo llevado a cabo. El valor de la IDA fue de 120%, reduciéndose a 95% después del cocinado. Estos resultados aún más altos a los obtenidos en Europa, pueden justificarse por el alto consumo de vegetales de hoja verde, en lugar de una variedad de los mismos, por parte de la población China; y la aplicación de prácticas agrícolas distintas a las de Europa.

### 4.3 Dioxinas

#### 4.3.1. Niveles de dioxinas

Los datos relativos a niveles de PCDD/Fs y dl-PCBs en alimentos, se obtuvieron de las muestras recogidas por el personal técnico de Ainia (Instituto Tecnológico de la Industria Agroalimentaria) en cadenas de supermercados y mercados locales de la Comunidad Valenciana. Un total de 77 alimentos agrupados en 11 categorías, se seleccionaron para su muestreo en base a dos criterios: aquellos alimentos que presentaban una tasa de consumo  $> 2 \text{ gr /kg p.c. día}$  por consumidor en el EDT de la Comunidad

Valenciana, y principales alimentos contribuyentes, conocidos o potenciales, a la exposición dietética a PCDD/Fs y dl-PCBs.

Los niveles de PCDD/Fs y dl-PCBs en alimentos se detectaron empleando el método bioensayo DR CALUX®. Ésta es una herramienta rápida, económica y que requiere pequeños volúmenes de muestra para la determinación de PCDD/Fs y dl-PCBs (Croes et al., 2013), por lo que el uso de esta técnica es una buena alternativa a la cromatografía de gases espectrofotometría de masas de alta resolución (GC-HRMS). Además, es un método validado por la Comisión Europea para la detección de PCDD/Fs y dl-PCBs en alimentos y piensos (Comisión Europea 2006; Comisión Europea, 2017). Este método de cribado no proporciona resultados por niveles de congéneres, sino que simplemente da una indicación del nivel de EQT, expresado en equivalentes bioanalíticos (BEQ), de los PCDD/Fs y dl-PCBs presentes en el extracto de una muestra. Dado que el ensayo biológico de CALUX mide la respuesta después de la unión del ligando al receptor de hidrocarburo Aro (AhR) intracelular, otros compuestos pueden interferir en el ensayo, no sólo la presencia de agonistas de AhR (Gizzi et al., 2005), sino también la existencia de antagonistas de AhR (Windal et al., 2010) pueden afectar a la precisión y dar una sobreestimación inexacta de los niveles de PCDD/Fs y dl-PCBs; reflejándose también en los resultados de la evaluación del riesgo de exposición.

Los valores obtenidos de PCDD/Fs y dl-PCBs en los 11 grupos de alimentos estudiados, oscilaron entre 0.01 y 2.67 pg BEQ g<sup>-1</sup> pf. El nivel máximo reportado correspondió al grupo de los cereales, leguminosas y frutos secos. En un anterior estudio llevado a cabo en la Comunidad

Valenciana (Marin et al., 2011), los valores de cereales para PCDD/Fs y dl-PCBs variaron entre 0,04 y 0,10 pg WHO-TEQ g<sup>-1</sup> grasa. Este elevado valor en el estudio actual podría deberse, por un lado, al carácter lipofílico de los frutos secos, favoreciendo la acumulación de PCDD/Fs y dl-PCBs en ellos; y, por otro lado, a la gran variedad de alimentos incluidos en el grupo de los cereales (34), mientras que en el anterior sólo se incluyeron trigo y arroz.

La concentración media más elevada de PCDD/Fs y dl-PCBs en alimentos se encontró en pescados y mariscos (0,81 pg BEQ g<sup>-1</sup> peso fresco (pf)), seguido de aceites y grasas (0,37 pg BEQ g<sup>-1</sup> grasa), leche y productos lácteos (0,34 pg BEQ g<sup>-1</sup> grasa). La comparación de los niveles medios de contaminación de un estudio con otro, debe ser efectuada con precaución; puesto que los grupos de alimentos no necesariamente contienen los mismos alimentos, ni emplean el mismo método para la detección de PCDD/Fs y dl-PCBs.

El año pasado la EFSA publicó un informe acerca de los riesgos para la salud humana debidos a la presencia de dioxinas en los alimentos (EFSA, 2018b). Se recogieron muestras de 20 grupos de alimentos procedentes de 23 países europeos, durante el período 2010–2016. Los niveles de PCDD/Fs y dl-PCBs para los distintos alimentos analizados, fueron muy superiores a los obtenidos en la Comunidad Valenciana. La concentración media (LB/UB) más elevada, también se obtuvo para pescados y mariscos (4.35 / 4.45 pg WHO<sub>05</sub> TEQ g<sup>-1</sup> pf) seguido de leche y productos lácteos (0.73 / 0.88 pg WHO<sub>05</sub> TEQ g<sup>-1</sup> grasa) y huevos (1.17 / 1.30 pg WHO<sub>05</sub> TEQ g<sup>-1</sup> grasa).



En el anterior estudio llevado a cabo en la Comunidad Valenciana (Marin et al., 2011), los niveles detectados de PCDD/Fs y dl-PCBs para todos los alimentos, fueron mayores a los del estudio actual. Esto puede deberse a una evolución positiva de las medidas europeas de gestión de riesgos, para reducir la exposición a estos compuestos en las poblaciones europeas (Comisión Europea, 2001; Comisión Europea, 2013). La concentración media más elevada se obtuvo para los aceites de pescado ( $6.55 \text{ pg WHO}_{98}\text{-TEQ g}^{-1}$ ).

La elevada lipofilia y estabilidad química que presentan los PCDD/Fs y dl-PCBs, favorece su acumulación en el tejido graso del pescado; por este motivo, en numerosas ocasiones su relación riesgo/beneficio ha sido planteada y distintos autores han llevado a cabo una vigilancia y evaluación de la exposición a estas sustancias en el pescado (Kiviranta et al., 2003; Paiano et al., 2013; Perelló et al., 2015; Costopoulou et al., 2016).

Comparando la concentración media obtenida para el pescado en la Comunidad Valenciana con las obtenidas en otros estudios internacionales, se observa una concentración media (UB) superior en Francia (Feinberg et al., 2011)  $2.5 \text{ pg WHO}_{05}\text{-TEQ g}^{-1}$  p.f. y Reino Unido (Rose et al., 2015)  $4.42 \text{ ng WHO}_{98}\text{-TEQ kg}^{-1}$  p.f. Este resultado tan elevado obtenido en Reino Unido, podría deberse a que las muestras de pescados evaluadas fueron capturadas a través de la pesca salvaje en los ríos de agua dulce, situados algunos de ellos, en zonas muy próximas a áreas contaminadas. Mientras que en Malasya (Leong et al., 2014) la concentración fue inferior  $0.557 \text{ pg WHO}_{05}\text{-TEQ g}^{-1}$  p.f., probablemente por incluir únicamente pescado en la

evaluación, mientras que el estudio de la Comunidad Valenciana se incluyó también mariscos.

Para los productos lácteos, se encontraron niveles más altos en Alemania (Schwarz et al., 2014) 1.17 pg WHO<sub>98</sub>-TEQ g<sup>-1</sup> y Francia (Feinberg et al., 2011) 1.4 pg WHO-TEQ g<sup>-1</sup> p.f., conviene recordar que el grupo de los productos lácteos es uno de los más consumidos en Francia.

#### 4.3.2. Evaluación de la exposición dietética a dioxinas

El último informe de la EFSA sobre los riesgos para la salud humana relacionados con la presencia de PCDD/Fs y dl-PCBs en alimentos publicado el pasado año (EFSA, 2018b), concluyó que la exposición alimentaria a estas sustancias es un problema de salud para la población europea; y por ello, estableció una nueva IST para estos compuestos en alimentos: 2 pg TEQ kg<sup>-1</sup> p.c. semana<sup>-1</sup>. Este valor de referencia toxicológico es 7 veces más bajo que la IST establecida por el antiguo SCF en 2001 (SCF, 2001), e intenta conseguir así una mayor protección contra los efectos observados en los distintos estudios realizados en humanos; tales como, una menor proporción sexual de hijos a hijas, niveles más altos de hormona estimulante del tiroides en recién nacidos y defectos del esmalte en el desarrollo de los dientes (EFSA, 2018b).

Este informe publica también los datos de exposición procedentes de los 23 países europeos incluidos en la evaluación, indicando una considerable superación del nuevo nivel tolerable en todos los grupos de edad. Los valores mínimo y máximo de ingesta media semanal en el escenario UB para niños, adolescentes y adultos fue de 4.8-18, 2.1-10.5 y

2.9-9.1 pg WHO<sub>05</sub>-TEQ kg p.c. semana<sup>-1</sup>, respectivamente. Estos valores de exposición son superiores a los obtenidos en el estudio de la Comunidad Valenciana en el escenario UB y empleando una metodología probabilística, 1.58- 2.76 pg TEQ kg<sup>-1</sup>p.c. día<sup>-1</sup> para adultos y niños, respectivamente. También fue superior la ingesta media estimada (UB) en el anterior estudio llevado a cabo en nuestra región (Marin et al., 2011), 2.86 -4.58 pg WHO<sub>98</sub>-TEQ kg<sup>-1</sup> p.c. día<sup>-1</sup> para adultos y niños, respectivamente.

Cuando se realiza una comparación de niveles de PCDD/Fs y dl-PCBs procedentes de distintos países, conviene tener en consideración que los distintos estudios de evaluación de la exposición pueden emplear distintas metodologías, fuentes de datos de consumo, límites de detección o EQT para expresar los resultados.

Para la población adulta, en Malasya (Leong et al., 2014) se obtuvo un valor medio de ingesta (UB) ligeramente inferior, 0.89 pg WHO<sub>05</sub>-TEQ p.c. día<sup>-1</sup>, probablemente por la evaluación de sólo 5 tipos de pecados en lugar de 77 alimentos tomados en la Comunidad Valenciana. Inferiores también fueron las IDE reportadas en Turquía (Kilic et al., 2011) y China (Shen et al., 2017), 0.509 pg WHO-TEQ<sub>98</sub> kg<sup>-1</sup> p.c. día<sup>-1</sup> y 0.73 pg WHO<sub>05</sub>-TEQ kg<sup>-1</sup> p.c. día, respectivamente. En este último estudio en China, para los consumidores de alimentos procedentes de regiones próximas a plantas de reciclaje de productos electrónicos, el valor de IDE fue superior, 8 pg WHO<sub>05</sub>-TEQ p.c. mes<sup>-1</sup>, se puede apreciar aquí el mayor riesgo potencial que presenta un grupo de consumidores, como consecuencia de las emisiones de estas sustancias al medio ambiente.

En Japón (Tsutsumi et al., 2001), la ingesta media estimada (LB/MB) fue superior a la obtenida en la Comunidad Valenciana 2.25/3.22 pg WHO-TEQ kg<sup>-1</sup> p.c. día<sup>-1</sup>, probablemente por el alto consumo de pescados y mariscos en esta región, siendo superior incluso a la de otros grupos de alimentos (MHLW, 1997). Aunque sea inferior al valor de referencia semanal establecido en Japón, 4 TEQ kg<sup>-1</sup> p.c. día<sup>-1</sup> (Environmental Agency and MHW of Japan, 1999) es superior al nuevo valor de referencia establecido por el panel de contaminantes de la EFSA.

Para la población de los niños, en el escenario UB, la ingesta media estimada en el estudio de la Comunidad Valenciana, fue de 2.76 (2.5-3) pg TEQ kg<sup>-1</sup> p.c. día<sup>-1</sup>. En Finlandia (Karjalainen et al., 2012), se alcanzaron valores superiores para el mismo escenario en el nivel máximo de IDE (mín-max) 0.1-12.8 pg WHO<sub>98</sub>-TEQ kg<sup>-1</sup> p.c. día<sup>-1</sup>. Hay que tener en cuenta que el rango de edad para la población de los niños en este estudio fue de 1 a 6 años mientras que en el de la Comunidad Valenciana fue de 9 a 15 años. En ambos estudios un grupo de la población de los niños superaría el nuevo valor de IST, un grado mayor en el caso de Finlandia.

Los principales contribuyentes a la exposición de PCDD/Fs y dl-PCBs a través de la dieta en la población adulta de la Comunidad Valenciana son el pescado y productos de la pesca. Al igual que en China (Shen et al., 2017), Francia, (Feinberg et al., 2011), Japón, (Tsutsumi et al., 2001) y el informe de la EFSA del pasado año (EFSA, 2018b).

Sin embargo, para la población de los niños, los principales contribuyentes fueron la leche y los productos lácteos, este resultado puede ser debido al elevado consumo que presenta este grupo de alimentos (9.94 g

kg<sup>-1</sup>p.c. día<sup>-1</sup>) en la población infantil, respecto a otros grupos de alimentos, como por ejemplo el pescado (0.81 g kg<sup>-1</sup>p.c. día<sup>-1</sup>).

#### *4.3.3 Caracterización del riesgo a la ingesta dietética a dioxinas*

Los valores de IDE obtenidas para los dos subgrupos de población en el estudio de la Comunidad Valenciana, fueron comparadas con el anterior valor de referencia semanal, empleando una metodología probabilística. De tal manera que, se pudo conocer la distribución de la exposición a PCDD/Fs y dl-PCBs en la población y el porcentaje de la misma, que podría estar en riesgo a la exposición dietética a PCDD/Fs y dl-PCBs.

En el escenario UB, un total de 22% de adultos y 58% de niños de la población de la Comunidad Valenciana, podrían estar en riesgo a la exposición de PCDD/Fs y dl-PCBs a través de la dieta. No obstante, cuando hablamos en términos de riesgo para estas dos subpoblaciones, estos resultados conviene interpretarlos con cautela. Hay que recordar, por un lado, que el escenario UB emplea supuestos que conducen a una sobrestimación de la exposición; y por otro, el potencial del bioensayo DR CALUX® para detectar todos los compuestos con afinidad AhR, además de otras moléculas, conduciendo todo ello también a una sobrestimación de la exposición. Por último, como ya es sabido en la caracterización del riesgo a dioxinas, según el valor de referencia toxicológico que se emplee, los resultados del riesgo también pueden aumentar o disminuir para la población.

La exposición a dioxinas a través de la dieta en distintos grupos de población de la Comunidad Valenciana, al igual que en el resto de países europeos que participaron en el último estudio de la EFSA, sigue siendo un problema de salud pública hoy en día. Es tarea de la Comisión Europea y los Estados miembros de la UE discutir las medidas de gestión de riesgos, siguiendo el asesoramiento científico de la EFSA, para garantizar un alto nivel de protección al consumidor (EFSA, 2018b).

#### 4.4 Referencias

AECOSAN, 2018. Informe Anual Programa de Control de Residuos de Plaguicidas. 2018.

AECOSAN, 2017. Informe Anual Programa de Control de Residuos de Plaguicidas. 2017.

AECOSAN, 2011. Recomendaciones de consumo por la presencia de nitratos en hortalizas. 2011.

AESAN, 2006. Modelo de dieta española para la determinación de la exposición del consumidor a sustancias químicas. 2006.

Anyzewska, A. and Wawrzyniak, A., 2014. Evaluating adult dietary intakes of nitrate and nitrite in Polish households during 2006-2012. *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.* 65, 107-111.

Berrada, H., Fernández, M., Ruiz, M.J., Moltó, J.C., Mañes, J. and Font, G., 2010. Surveillance of pesticide residues in fruits from Valencia during twenty months 2004-05. *Food Control* 21, 36-44.

Boon, P.E., Van der Voet, H., Van Raaij, M.T. and Van Klaveren, J.D., 2008. Cumulative risk assessment of the exposure to organophosphorus and carbamate insecticides in the Dutch diet. *Food Chem. Toxicol.* 46, 3090-3098.

Brkic, D., Bosnir, J., Bevardi, M., Boskovic, A.G., Milos, S., Lasic, D., Krivohlavek, A., Racz, A., Cuic, A.M. and Trstenjak, N.U., 2017. Nitrate in Leafy Green Vegetables and Estimated Intake. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* 14, 31-41.

Chen, M.Y., Chung, S.W., Tran, J.C., Tong, K.S., Ho, Y.Y., Chan, C.H. and Xiao, Y., 2011. Dietary exposure of Hong Kong adults to nitrate and nitrite from vegetable intake. *Food Addit Contam. Part B. Surveill.* 4, 94-98.

Comisión Europea, 2017. Reglamento (UE) 2017/644 de la Comisión de 5 de abril de 2017 por el que se establecen métodos de muestreo y de análisis para el control de los niveles de dioxinas, PCB similares a dioxinas y PCB no similares a dioxinas en determinados productos alimenticios y por el que se deroga el Reglamento (UE) N° 589/2014. *DOUE L* 92, 9-34.

Comisión Europea, 2013. Recomendación de la Comisión de 3 de diciembre de 2013 relativa a la reducción de los niveles de dioxinas, furanos y PCBs en los piensos y productos alimenticios. *DOUE L* 323, 37-39.

Comisión Europea, 2011. Reglamento (UE) N° 1258/2011 de la comisión de 2 de diciembre de 2011, que modifica el Reglamento (CE) n°1881/2006 por lo que respecta al contenido máximo de nitratos en los productos alimenticios. *DOUE L* 320, 15-17.

Comisión Europea, 2006. Reglamento (CE) N° 1881/2006, de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. *DOUE L*, 364;5-24.

Comisión Europea, 2001. Comunicación de la Comisión al Consejo, al Parlamento Europeo y el Comité Económico y Social. Estrategia Comunitaria sobre las dioxinas, los furanos y los policlorobifenilos. 322, 2-18.



Correia, M., Barroso, Â, Barroso, M.F., Soares, D., Oliveira, M.B.P.P. and Delerue-Matos, C., 2010. Contribution of different vegetable types to exogenous nitrate and nitrite exposure. *Food Chem.* 120, 960-966.

Costopoulou, D., Vassiliadou, I. and Leondiadis, L., 2016. PCDDs, PCDFs and PCBs in farmed fish produced in Greece: Levels and human population exposure assessment. *Chemosphere* 146, 511-518.

Croes, K., Colles, A., Koppen, G., De Galan, S., Vandermarken, T., Govarts, E., Bruckers, L., Nelen, V., Schoeters, G., Van Larebeke, N., Denison, M.S., Mampaey, M. and Baeyens, W., 2013. Determination of PCDD/Fs, PBDD/Fs and dioxin-like PCBs in human milk from mothers residing in the rural areas in Flanders, using the CALUX bioassay and GC-HRMS. *Talanta* 113, 99-105.

EFSA, 2018a. The 2016 European Union Report on Pesticides Residues in Food. 16 (7) 9: 5348.

EFSA, 2018b. Scientific Opinion on the risk for animal and human health related to the presence of dioxins and dioxin-like PCBs in feed and food. *EFSA Journal* 16 (11): 5333,331.

EFSA, 2017. The 2015 European Union report on pesticide residues in food. 15 (4): 4791.

EFSA, 2016. The 2014 European Union Report on Pesticides in Food. 14 (10): 4611.

EFSA, 2015. The 2013 European Union report on pesticide residues in food. 13 (3): 4038.

EFSA, 2013. Study on the influence of food processing on nitrate levels in vegetables. EFSA supporting publication. En-514.

EFSA, 2010. Statement on possible public health risks for infants and young children from the presence of nitrates in leafy vegetables. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). 8 (12): 1935.

EFSA, 2008. Nitrate in vegetables. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. 689, 1-79.

Environmental Agency and MHLW of Japan, 1999. Report on tolerable daily intake (TDI) of dioxin and related compounds. Japan.

Feinberg, M., Soler, L., Contenot, S. and Verger, P., 2011. Assessment of seasonality in exposure to dioxins, furans and dioxin-like PCBs by using long-term food-consumption data. Food Addit Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess. 28, 502-512.

Freeman, S., Kaufman-Shriqui, V., Berman, T., Varsano, R., Shahar, D.R. and Manor, O., 2016. Children's diets, pesticide uptake, and implications for risk assessment: An Israeli case study. Food Chem. Toxicol. 87, 88-96.

Fullana M., Jiménez R., Marín S., Ramón R., Quiles J., Rizk J., Zubeldía L., 2010. Encuesta de Salud de la Comunidad Valenciana 2010-2011. Subdirección General de Seguridad Alimentaria.

Gizzi, G., Hoogenboom, L.A., Von Holst, C., Rose, M. and Anklam, E., 2005. Determination of dioxins (PCDDs/PCDFs) and PCBs in food and feed using the DR CALUX bioassay: results of an international validation study. Food Addit. Contam. 22, 472-481.

Iammarino, M., Di Taranto, A. and Cristino, M., 2014. Monitoring of nitrites and nitrates levels in leafy vegetables (spinach and lettuce): a contribution to risk assessment. *J. Sci. Food Agric.* 94, 773-778.

Iñigo-Nuñez, S., Herreros, M.A., Encinas, T. and Gonzalez-Bulnes, A., 2010. Estimated daily intake of pesticides and xenoestrogenic exposure by fruit consumption in the female population from a Mediterranean country (Spain). *Food Control* 21, 471-477.

Iqbal MA, Ueno K, Horimoto S, Komai F, Tanaka K, Ono Y., 2007. Evaluation of the physio-chemical and microbial properties of green tea waste-rice bran compost and the effect of the compost on spinach production. *Plant Prod Sci.* 10(4):391–399.

Jardim, A.N.O., Brito, A.P., van Donkersgoed, G., Boon, P.E. and Caldas, E.D., 2018. Dietary cumulative acute risk assessment of organophosphorus, carbamates and pyrethroids insecticides for the Brazilian population. *Food Chem. Toxicol.* 112, 108-117.

Jardim, A.N.O. and Caldas, E.D., 2012. Brazilian monitoring programs for pesticide residues in food- Results from 2001 to 2010. *Food Control* 25, 607-616.

Karjalainen, A.K., Hirvonen, T., Kiviranta, H., Sinkko, H., Kronberg-Kippila, C., Virtanen, S.M., Hallikainen, A., Leino, O., Knip, M., Veijola, R., Simell, O. and Tuomisto, J.T., 2012. Long-term daily intake estimates of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and furans, polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenylethers from food in Finnish children: risk

assessment implications. *Food Addit Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 29, 1475-1488.

Kavvalakis, M.P. and Tsatsakis, A.M., 2012. The atlas of dialkylphosphates; assessment of cumulative human organophosphorus pesticide exposure. *Forensic Sci. Int.* 218, 111-122.

Kilic, D., Cakirogullari, G.C., Ucar, Y., Theelen, R. and Traag, W., 2011. Comparison of PCDD/F and dl-PCB levels in Turkish foodstuffs: industrial versus rural, local versus supermarket products, and assessment of dietary intake. *Food Addit Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 28, 913-924.

Kiviranta, H., Vartiainen, T., Parmanne, R., Hallikainen, A. and Koistinen, J., 2003. PCDD/Fs and PCBs in Baltic herring during the 1990s. *Chemosphere* 50, 1201-1216.

Kotenkamp, A., Evans, R., Faust, M., Kalberlah, F., Scholze, M., Shuhmacher-Wolz, U., 2012. Investigation of the state of the science on combined actions of chemicals in food through dissimilar modes of action and proposal for science-based approach for performing related cumulative risk assessment. *Publ.* 9 (1) EN 232.

Larsson, M.O., Sloth Nielsen, V., Bjerre, N., Laporte, F. and Cedergreen, N., 2018. Refined assessment and perspectives on the cumulative risk resulting from the dietary exposure to pesticide residues in the Danish population. *Food Chem. Toxicol.* 111, 207-267.

Leong, Y.H., Gan, C.Y. and Majid, M.I., 2014. Dioxin-like polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, and polychlorinated

dibenzofurans in seafood samples from Malaysia: estimated human intake and associated risks. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 67, 21-28.

Li, F., Yuan, Y., Meng, P., Wu, M., Li, S. and Chen, B., 2017. Probabilistic acute risk assessment of cumulative exposure to organophosphorus and carbamate pesticides from dietary vegetables and fruits in Shanghai populations. *Food Addit Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 34, 819-831.

Li, Z., Nie, J., Yan, Z., Cheng, Y., Lan, F., Huang, Y., Chen, Q., Zhao, X. and Li, A., 2018. A monitoring survey and dietary risk assessment for pesticide residues on peaches in China. *Regul Toxicol and Pharmacol* 97, 152-162.

Łozowicka, B., Mojsak, P., Jankowska, M., Kaczynski, P., Hrynko, I., Rutkowska, E., Szabunko, J. and Borusiewicz, A., 2016. Toxicological studies for adults and children of insecticide residues with common mode of action (MoA) in pome, stone, berries and other small fruit. *Sci. Total Environ.* 566-567, 144-156.

Łozowicka, B., Jankowska, M. and Kaczyński, P., 2012. Pesticide residues in Brassica vegetables and exposure assessment of consumers. *Food Control* 25, 561-575.

Ly, A., 2013. Infographic: pesticide planet. *Science* 341, 730-731.

Marin, S., Villalba, P., Diaz-Ferrero, J., Font, G. and Yusà, V., 2011. Congener profile, occurrence and estimated dietary intake of dioxins and dioxin-like PCBs in foods marketed in the Region of Valencia (Spain). *Chemosphere* 82, 1253-1261.

Matallana Gonzalez, M.C., Martinez-Tome, M.J. and Torija Isasa, M.E., 2010. Nitrate and nitrite content in organically cultivated vegetables. *Food Addit Contam. Part B. Surveill.* 3, 19-29.

Menard, C., Heraud, F., Volatier, J.L. and Leblanc, J.C., 2008. Assessment of dietary exposure of nitrate and nitrite in France. *Food Addit Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 25, 971-988.

MHLW of Japan., 1997. National nutrition survey in 1996 and 1997. Japan.

Mitek, M., Anzewska, A. and Wawrzyniak, A., 2013. Estimated dietary intakes of nitrates in vegetarians compared to a traditional diet in Poland and acceptable daily intakes: is there a risk? *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.* 64, 105-109.

Mojsak, P., Lozowicka, B. and Kaczynski, P., 2018. Estimating acute and chronic exposure of children and adults to chlorpyrifos in fruit and vegetables based on the new, lower toxicology data. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 159, 182-189.

Nowrouz, P., Taghipour, H., Dastgiri, S., Bafandeh, Y. and Hashemimajd, K., 2012. Nitrate Determination of Vegetables in Varzeghan City, North-western Iran. *Health. Promot. Perspect.* 2, 244-250.

Paiano, V., Generoso, C., Mandich, A., Traversi, I., Palmiotto, M., Bagnati, R., Colombo, A., Davoli, E., Fanelli, R. and Fattore, E., 2013. Persistent organic pollutants in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) in two fish farms in the Mediterranean Sea. *Chemosphere* 93, 338-343.

Pardo-Marin, O., Yusa-Pelecha, V., Villalba-Martin, P. and Perez-Dasi, J.A., 2010. Monitoring programme on nitrates in vegetables and vegetable-based baby foods marketed in the Region of Valencia, Spain: levels and estimated daily intake. *Food Addit Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 27, 478-486.

Parlamento y Consejo UE, 2005. Reglamento (CE) N° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de febrero de 2005, relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo. DOUE L 70.

Park, D.W., Kim, K.G., Choi, E.A., Kang, G.R., Kim, T.S., Yang, Y.S., Moon, S.J., Ha, D.R., Kim, E.S. and Cho, B.S., 2016. Pesticide residues in leafy vegetables, stalk and stem vegetables from South Korea: a long-term study on safety and health risk assessment. *Food Addit Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 33, 105-118.

Perelló, G., Díaz-Ferrero, J., Llobet, J.M., Castell, V., Vicente, E., Nadal, M. and Domingo, J.L., 2015. Human exposure to PCDD/Fs and PCBs through consumption of fish and seafood in Catalonia (Spain): Temporal trend. *Food and Chem. Toxicol.* 81, 28-33.

Reffstrup, T.K., Larsen, J.C. and Meyer, O., 2010. Risk assessment of mixtures of pesticides. Current approaches and future strategies. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 56, 174-192.

Rose, M., Fernandes, A., Mortimer, D. and Baskaran, C., 2015. Contamination of fish in UK fresh water systems: Risk assessment for human consumption. *Chemosphere* 122, 183-189.

Schwarz, M.A., Lindtner, O., Blume, K., Heinemeyer, G. and Schneider, K., 2014. Dioxin and dl-PCB exposure from food: the German LExUKon project. *Food Addit Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 31, 688-702.

SCF, 2001. Opinion of the Scientific Committee on Food on the risk assessment of dioxins and dioxin-like PCBs in food. Update based on new scientific information available since the adoption of the SCF Opinion of 22nd November 2000. Adopted on 30 May 2001. Brussels: European Commission, Health & Consumer Protection Directorate General.

Shen, H., Guan, R., Ding, G., Chen, Q., Lou, X., Chen, Z., Zhang, L., Xing, M., Han, J. and Wu, Y., 2017. Polychlorinated dibenzo-p-dioxins/furans (PCDD/Fs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in Zhejiang foods (2006-2015): Market basket and polluted areas. *Science of The Total Environment* 574, 120-127.

Tamme, T., Reinik, M., Roasto, M., Meremae, K. and Kiis, A., 2010. Nitrate in leafy vegetables, culinary herbs, and cucumber grown under cover in Estonia: content and intake. *Food Addit Contam. Part B. Surveill.* 3, 108-113.

Tamme, T., Reinik, M., Roasto, M., Juhkam, K., Tenno, T. and Kiis, A., 2006. Nitrates and nitrites in vegetables and vegetable-based products and their intakes by the Estonian population. *Food Addit. Contam.* 23, 355-361.



Temme, E.H., Vandevijvere, S., Vinkx, C., Huybrechts, I., Goeyens, L. and Van Oyen, H., 2011. Average daily nitrate and nitrite intake in the Belgian population older than 15 years. *Food Addit Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 28, 1193-1204.

Thomson, B.M., Nokes, C.J. and Cressey, P.J., 2007. Intake and risk assessment of nitrate and nitrite from New Zealand foods and drinking water. *Food Addit. Contam.* 24, 113-121.

Tsutsumi, T., Yanagi, T., Nakamura, M., Kono, Y., Uchibe, H., Iida, T., Hori, T., Nakagawa, R., Tobiishi, K., Matsuda, R., Sasaki, K. and Toyoda, M., 2001. Update of daily intake of PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs from food in Japan. *Chemosphere* 45, 1129-1137.

Windal, I., Vandevijvere, S., Maleki, M., Gosciny, S., Vinkx, C., Focant, J.F., Eppe, G., Hanot, V. and Van Loco, J., 2010. Dietary intake of PCDD/Fs and dioxin-like PCBs of the Belgian population. *Chemosphere* 79, 334-340.

Xu, X., Chen, J., Li, B. and Tang, L., 2018. Carbendazim residues in vegetables in China between 2014 and 2016 and a chronic carbendazim exposure risk assessment. *Food Control* 91, 20-25.



## **5. CONCLUSIONES**

---



## CONCLUSIONES

1. En la evaluación de la exposición en la población de la Comunidad Valenciana a residuos de plaguicidas organofosforados, carbamatos y piretroides a través del consumo de frutas y verduras, se obtuvieron valores de ingestas diarias estimadas (IDEs), en el escenario pesimista, entre  $0.03 - 0.45 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ p.c. día}^{-1}$ ; siendo el tomate el alimento que más contribuyó a la exposición a residuos de plaguicidas. Estos valores son inferiores a las ingestas diarias admisibles (IDAs) para estos compuestos, que se encuentran entre  $1 - 30 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ p.c. día}^{-1}$ .

2. La evaluación de la exposición de los habitantes de la Comunidad Valenciana a nitratos a través del consumo de vegetales, reveló valores de IDEs, en el escenario pesimista, entre  $0.3 - 0.4 \text{ mg kg}^{-1} \text{ p.c. día}^{-1}$ ; siendo la lechuga el alimento que más contribuyó a la exposición a nitratos. Estos valores son muy inferiores a la IDA establecida para nitratos que se sitúa en  $3.7 \text{ mg kg}^{-1} \text{ p.c. día}^{-1}$ .

Hasta el 0.8% de adultos y 1.4% de niños, podrían estar en riesgo a la exposición a nitratos a través de la ingesta de vegetales, en el escenario pesimista según el método probabilístico, en el que estarían incluidos los consumidores extremos de productos vegetales.

3. En la evaluación de la exposición en la población de la Comunidad Valenciana a dioxinas, furanos y policlorobifenilos similares a dioxinas (dl-PCBs) a través de la dieta, se obtuvieron valores de IDEs, en el escenario pesimista, entre  $1.6-2.8 \text{ pg EQT (equivalentes tóxicos) kg}^{-1} \text{ p.c. día}^{-1}$ . Los valores que superaron la Ingesta Semanal Tolerable (IST)

establecida en 14 pg EQT kg<sup>-1</sup> p.c. semana<sup>-1</sup>, correspondieron al grupo de población de menor edad. La población adulta, también superó este valor en el mismo escenario y percentil 90 de exposición, con 3 pg EQT kg<sup>-1</sup> pc día<sup>-1</sup>.

Los pescados y productos de la pesca fueron los alimentos que más contribuyeron a la exposición a dioxinas, furanos y dl-PCBs en la población de los adultos; y la leche y los productos lácteos, en la población de los niños.

Hasta el 22.4% de adultos y 58.5% de niños, podrían estar en riesgo a la exposición a dioxinas, furanos y dl-PCBs a través de la dieta, en el escenario pesimista según el método probabilístico.

4. Se debe continuar con los programas de vigilancia a contaminantes químicos en alimentos, y proponer recomendaciones dietéticas a las poblaciones que presentan un riesgo potencial de exposición a nitratos, dioxinas, furanos y dl-PCBs a través de la dieta.

**ANEXO I.  
DIFUSIÓN DE LA  
INVESTIGACIÓN**

---







## Chronic cumulative risk assessment of the exposure to organophosphorus, carbamate and pyrethroid and pyrethrin pesticides through fruit and vegetables consumption in the region of Valencia (Spain)



Leyre Quijano<sup>a</sup>, Vicent Yusà<sup>b,c</sup>, Guillermina Font<sup>a</sup>, Olga Pardo<sup>b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Preventive Medicine and Public Health, Food Sciences, Toxicology and Forensic Medicine Department, University of Valencia, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

<sup>b</sup> Food Safety Research Area, Center for Public Health Research (CSISP), FISABIO, Av. Catalunya, 21, 46020, Valencia, Spain

<sup>c</sup> Analytical Chemistry Department, University of Valencia, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 4 September 2015  
Received in revised form  
10 January 2016  
Accepted 11 January 2016  
Available online 13 January 2016

#### Keywords:

Chronic cumulative dietary exposure  
Deterministic risk assessment  
Pesticides  
RPF approach  
Vegetables  
Fruits

### ABSTRACT

In the present study, the chronic cumulative exposure to organophosphorus (OPs), carbamates (CBs) and pyrethroid and pyrethrin (PPs) pesticides in the region of Valencia through fruit and vegetables consumption is presented. A total of 752 samples and 84 pesticides were studied of which, 52 were OPs, 23 CBs and 9 PPs. Residue data were derived from the Valencia Region monitoring program 2007–2011 and food consumption levels from a questionnaire-based dietary survey conducted in 2010 in the same area. The relative potency factor (RPFs) approach was used to estimate chronic cumulative dietary exposure to OPs, CBs and PPs using acephate, oxamyl and deltamethrin as index compounds, respectively. The exposure was estimated using a deterministic approach and two scenarios were assumed for left-censored results: the lower-bound (LB) scenario, in which unquantified results (below the limit of quantification (LOQ)) were set to zero and the upper-bound (UB) scenario, in which unquantified results were set to the LOQ. Results demonstrate that the chronic exposure of the young (<16 years) and adult (≥16 years) population to pesticides through fruits and vegetables is under control (even at high or frequent consumption of fruits and vegetables), for the three groups of pesticides.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Pesticides are used before and after harvest to protect crops from infestation by pest and plant diseases. The use of pesticides in the European Union (EU) is intensive. Only in 2010, pesticide-active ingredient consumption in the EU was about 208,000 tons (including insecticides, fungicides and herbicides), of which 19% (about 39,000 tones) had their origin in Spain (AEPLA, 2009). Valencia is the second most important agricultural area in Spain and one of the regions with the highest pesticide use, 12.1% of the national total in 2009 (ECPA, 2010). One possible consequence of pesticide use is the presence of their residues in treated commodities and eventually in the food chain. It is therefore necessary

to ensure that such residues in food do not present an unacceptable risk for consumers, due to the fact that pesticides are biologically active compounds with a component-specific inherent toxicity. Although pesticide exposure can occur through different routes, such as inhalation, dermal exposure and dietary and non-dietary intake, food has been recognized as the main exposure route to pesticide residues for consumers not working with pesticides (Juraska et al., 2009). According to the World Health Organization (WHO), food consumption consists on average of 30% of fruits and vegetables (WHO, 2003) and it is well known that fruits and vegetables are more contaminated by pesticides than products of animal origin (Claeys et al., 2011). In addition, fruits and vegetables are frequently consumed raw or semi-processed and as a consequence it is expected that they contain higher pesticide-residue levels than other food groups of plant origin such as cereals.

To evaluate food safety, exposure needs to be assessed and compared to health safety limits or toxicological endpoint values.

\* Corresponding author. Food Safety Research Area, Center for Public Health Research (CSISP), FISABIO, Av. Catalunya, 21, 46020, Valencia, Spain.  
E-mail address: [pardo\\_olg@vales.com](mailto:pardo_olg@vales.com) (O. Pardo).



## Risk assessment and monitoring programme of nitrates through vegetables in the Region of Valencia (Spain)



Leyre Quijano<sup>a</sup>, Vicent Yusà<sup>b,c</sup>, Guillermina Font<sup>a</sup>, Claudia McAllister<sup>b</sup>, Concepción Torres<sup>d</sup>, Olga Pardo<sup>b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Preventive Medicine and Public Health, Food Sciences, Toxicology and Forensic Medicine Department, University of Valencia, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

<sup>b</sup> Food Safety Research Area, Center for Public Health Research (CSISP), FISABIO, Av. Catalunya, 21, 46020, Valencia, Spain

<sup>c</sup> Analytical Chemistry Department, University of Valencia, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

<sup>d</sup> Public Health Laboratory of Valencia, Av. Catalunya, 21, 46020, Valencia, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 23 May 2016

Received in revised form

26 October 2016

Accepted 10 December 2016

Available online 12 December 2016

#### Keywords:

Nitrate

Vegetables

Estimated intake

Dietary exposure

Risk assessment

### ABSTRACT

This study was carried out to determine current levels of nitrate in vegetables marketed in the Region of Valencia (Spain) and to estimate the toxicological risk associated with their intake. A total of 533 samples of seven vegetable species were studied. Nitrate levels were derived from the Valencia Region monitoring programme carried out from 2009 to 2013 and food consumption levels were taken from the first Valencia Food Consumption Survey, conducted in 2010. The exposure was estimated using a probabilistic approach and two scenarios were assumed for left-censored data: the lower-bound scenario, in which unquantified results (below the limit of quantification) were set to zero and the upper-bound scenario, in which unquantified results were set to the limit of quantification value. The exposure of the Valencia consumers to nitrate through the consumption of vegetable products appears to be relatively low. In the adult population (16–95 years) the P99.9 was 3.13 mg kg<sup>-1</sup> body weight day<sup>-1</sup> and 3.15 mg kg<sup>-1</sup> body weight day<sup>-1</sup> in the lower bound and upper bound scenario, respectively. On the other hand, for young people (6–15 years) the P99.9 of the exposure was 4.20 mg kg<sup>-1</sup> body weight day<sup>-1</sup> and 4.40 mg kg<sup>-1</sup> body weight day<sup>-1</sup> in the lower bound and upper bound scenario, respectively. The risk characterisation indicates that, under the upper bound scenario, 0.79% of adults and 1.39% of young people can exceed the Acceptable Daily Intake of nitrate. This percentage could join the vegetable extreme consumers (such as vegetarians) of vegetables. Overall, the estimated exposures to nitrate from vegetables are unlikely to result in appreciable health risks.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

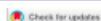
Nitrate is a common compound in nature that is part of the nitrogen cycle. It can be found in soil, surface and underground water as well as in biomass. In addition, nitrate is currently used as a fertilizer in agriculture, which has allowed a significant increase in world food production (Mosier et al., 2005). As a consequence, high levels of nitrate can be accumulated in plants-vegetables (European Food Safety Authority (EFSA), 2013). Furthermore, nitrates are also authorised as additives in the food industry

identified by the European codes E-251 and E-252 (European Commission, 2011a).

Human exposure to nitrate is mainly exogenous through the consumption of vegetables, and to a lesser extent through water and authorised additives used in the preservation of meat products. For nitrates, the major part of the daily intake in foodstuffs is related to vegetable consumption (EFSA, 2008) due to the elevated nitrate accumulation capacity of these products. Higher levels of nitrate tend to be found in leaves whereas lower levels occur in seeds or tubers. As a consequence, leafy crops such as lettuce and spinach generally have higher nitrate concentrations (EFSA, 2013).

Although nitrate is relatively non-toxic below maximum levels (MLs), its metabolites such as nitrite, nitric oxide and N-nitroso compounds, make nitrate of regulatory importance because of their potentially adverse health implications such as

\* Corresponding author. Food Safety Research Area, Center for Public Health Research (CSISP), FISABIO, Av. Catalunya, 21, 46020, Valencia, Spain.  
E-mail address: [olga.pardo@uv.es](mailto:olga.pardo@uv.es) (O. Pardo).



## Dietary exposure and risk assessment of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and dioxin-like polychlorinated biphenyls of the population in the Region of Valencia (Spain)

Leyre Quijano<sup>a</sup>, Sílvia Marín<sup>a</sup>, Encarnación Millán<sup>c</sup>, Vicent Yusa<sup>b,c,d</sup>, Guillermina Font<sup>a</sup> and Olga Pardo<sup>b,c,d</sup>

<sup>a</sup>Preventive Medicine and Public Health, Food Sciences, Toxicology and Forensic Medicine Department, University of Valencia, Valencia, Spain; <sup>b</sup>Food Safety Research Area, Center for Public Health Research (CSISP), Valencia, Spain; <sup>c</sup>Public Health Laboratory of Valencia, Valencia, Spain; <sup>d</sup>Analytical Chemistry Department, University of Valencia, Valencia, Spain

### ABSTRACT

Dietary exposure of the Valencia Region population to polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and PCBs was assessed in the Region of Valencia in 2010–2011. A total of 7700 food samples were collected. Occurrence data were combined with consumption data to estimate dietary exposure in adults (>15 years of age) and young people (6–15 years of age). The estimated intake was calculated by a probabilistic approach. Average intake levels (upper-bound scenario) were 1.58 and 2.76 pg toxic equivalent (TEQ) kg<sup>-1</sup> body weight (bw) day<sup>-1</sup> for adults and young people, respectively. These average intakes are within range of the tolerable daily intake of 1–4 pg WHO-TEQ kg<sup>-1</sup> bw day<sup>-1</sup> recommended by WHO, and slightly above the tolerable weekly intake (TWI) of 14 pg TEQ kg<sup>-1</sup> bw week<sup>-1</sup> and the Provisional tolerable monthly intake of 70 pg TEQ kg<sup>-1</sup> bw month<sup>-1</sup> set by the Scientific Committee on Food and the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food, respectively. These results show that the contamination levels in food and therefore the exposure of the general population to PCDD/Fs and PCBs have declined in this region and therefore show the efficiency of the European risk-management measures. In terms of risk characterisation, the results showed that, under the upper-bound scenario, 22% of the adult and 58% of the young people population could exceed the TWI.

### ARTICLE HISTORY

Received 18 September 2017  
Accepted 21 November 2017

### KEYWORDS

Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs); polychlorinated dibenzofurans (PCDFs); dioxin-like PCBs; Total Diet Study; DR-CALUX<sup>®</sup> bioassay; dietary exposure assessment

### Introduction

Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and PCBs are Persistent Organic Pollutants (POPs) of great concern because of their toxicity and tendency to bioaccumulate through the food chain. It has been found that chronic exposure of humans to PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCBs (DL-PCBs) causes serious adverse health effects including reproductive and developmental effects, neurological and behavioural effects, dermal toxicity, immunomodulatory and carcinogenic effects (Van den Berg et al. 1998; WHO 1998; Birnbaum and Tuomisto 2000; ATSDR 2002; Bencko 2003; Hays and Aylward 2003; Steenland et al. 2004). Increased risk of diabetes owing to dioxin exposure has also been reported (Fujiyoshi et al. 2006).

Among the PCDD/Fs, 17 congeners tend to accumulate through the food chain, especially in animal fats and products. Regarding PCBs, 12 congeners are known as DL-PCBs because they share the same mechanism of action with the 17 toxic PCDD/Fs (Sirost et al. 2012): binding with and activating the aryl hydrocarbon cellular receptor (AhR) involved in the cellular response (EFSA 2005). The other PCBs are known as non-dioxin-like PCBs (NDL-PCBs), as their toxicological mechanism is different from the Ah receptor-mediated pathway of DL-PCBs. A toxic equivalence factor (TEF) has been assigned to these 17 PCDD/Fs and 12 DL-PCBs in order to compare their toxicity with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (2,3,7,8-TCDD), classified as probably carcinogenic to humans (group 2A), allowing the toxicity of a complex mixture to be expressed in the same unit, the toxic equivalent (TEQ).

**CONTACT** Olga Pardo polgueta@gmail.com Food Safety Research Area, Center for Public Health Research (CSISP), FISABIO. Av. Catalunya, 21, Valencia 46020, Spain

Supplemental data for this article can be accessed here.

© 2018 Taylor & Francis Group, LLC



# APÉNDICE

---



## APÉNDICE 1

### Cumulative risk assessment of the exposure to organophosphorus, carbamate and pyrethroid and pyrethrin pesticides through fruits and vegetables consumption in the region of Valencia (Spain)

Leyre Quijano<sup>a</sup>, Vicent Yusà<sup>b,c</sup>, Guillermina Font<sup>a</sup>, Olga Pardo<sup>b,c\*</sup>

<sup>a</sup>*Preventive Medicine and Public Health, Food Sciences, Toxicology and Forensic Medicine Department, University of Valencia, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain*

<sup>b</sup>*Food Safety Research Area, Center for Public Health Research (CSISP), FISABIO. Av. Catalunya, 21, 46020, Valencia, Spain*

<sup>c</sup>*Analytical Chemistry Department. University of Valencia, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain*

### Relative potency factor (RPFs) used for the cumulative exposure calculations

The RPFs used in this study are shown in Table 1.

**Table 1.** Relative potency factors (RPFs) for the pesticides studied

	NOAEL (mg/kg)	BMD <sup>a</sup> (mg/kg)	Specie and type of AChE	Source	RPF
<i>Organophosphorus</i>					
Azinphos-methyl		0.86	Rat/brain	EPA 2006	1.15
Cadusafos					
Chlorpyrifos		1.48	Rat/brain	EPA 2006	0.67

	<b>NOAEL (mg/kg)</b>	<b>BMD<sup>a</sup> (mg/kg)</b>	<b>Specie and type of AChE</b>	<b>Source</b>	<b>RPF</b>
Chlorpyrifos-methyl		16.2	Rat/brain	EPA 2006	0.06
Dimethoate		0.25	Rat/brain	EPA 2006	3.96
Malathion		313.91	Rat/brain	EPA 2006	0.00
Parathion-methyl		0.67	Rat/brain	EPA 2006	1.48
Phenthion		0.24	Rat/brain	EPA 2006	4.13
Phosalon		6.93	Rat/brain	EPA 2006	0.14
Phosmet		3.56	Rat/brain	EPA 2006	0.28
Pyrazophos	2.1		Rat/brain	JMPR92 <sup>b</sup>	1.19
Pyrimiphos-methyl		2.25	Rat/brain	EPA 2006	0.44
Trichlorphon		31.74	Rat/brain	EPA 2006	0.03
<b><i>Carbamates</i></b>					
Carbaryl		1.58	Rat/brain	EPA 2007	0.12
Carbendazim					
Carbofuran		0.1	Rat/brain	EPA 2007	1.19
Chlorpropham					
Diethofencarb					
Fenoxycarb					
Formethanate		0.11	Rat/brain	EPA 2007	1.64
Iprovalicarb					
Methiocarb		1.31	Rat/brain	EPA 2007	0.14
Methomyl		0.36	Rat/brain	EPA 2007	0.38



	<b>NOAEL (mg/kg)</b>	<b>BMD<sup>a</sup> (mg/kg)</b>	<b>Specie and type of AChE</b>	<b>Source</b>	<b>RPF</b>
Oxamyl		0.18	Rat/brain	EPA 2007	1
Pirimicarb		11.96	Rat/brain	EPA 2007	0.02
Thiophanate-methyl					
<b><i>Pyrethrins/ pyrethroids</i></b>					
Bifentrin		14.3	Rat/brain	EPA 2011	1.01
Ciflutrin		12.6	Rat/brain	EPA 2011	1.15
Cipermetrin		76.3	Rat/brain	EPA 2011	0.19
Deltametrin		14.5	Rat/brain	EPA 2011	1
Esfenvalerate		40.5	Rat/brain	EPA 2011	0.36
Fluvalinate		14.5	Rat/brain	EPA 2011	1
Lambda-Cyhalothrin		8.9	Rat/brain	EPA 2011	1.63

NOAEL: No-observed adverse effect levels for AChE inhibition based on the consideration that more than 20% AChE inhibition is adverse.

BMD: benchmark dose.

<sup>a</sup>To calculate the RPFs a benchmark dose at which acetylcholinesterase activity was reduced by 10% has been used for OP and CBs; a benchmark dose at which acetylcholinesterase activity was reduced by 20% for PPs.

<sup>b</sup>The JMPR references refer to the "Pesticide Residues in Food" reports of the respective year available at [www.fao.org/ag/agp/AGPP/Pesticid/a.htm](http://www.fao.org/ag/agp/AGPP/Pesticid/a.htm)

## APÉNDICE 2

### **Risk assessment and monitoring programme of nitrates through vegetables in the Region of Valencia**

**Leyre Quijano<sup>a</sup>, Vicent Yusà<sup>b,c</sup>, Guillermina Font<sup>a</sup>, Claudia McAllister<sup>b</sup>, Concepción Torres<sup>d</sup>, Olga Pardo<sup>b,c\*</sup>**

*<sup>a</sup>Preventive Medicine and Public Health, Food Sciences, Toxicology and Forensic Medicine Department, University of Valencia, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain*

*<sup>b</sup>Food Safety Research Area, Center for Public Health Research (CSISP), FISABIO. Av. Catalunya, 21, 46020, Valencia, Spain*

*<sup>c</sup>Analytical Chemistry Department. University of Valencia, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain*

*<sup>d</sup>Public Health Laboratory of Valencia. Av. Catalunya, 21, 46020, Valencia, Spain*

### **Reagent and standard solutions**

Nitrate calibration standard solutions were prepared from certified commercial standard solutions (Merck, Darmstadt, Germany) by dilution in water and stored in capped amber vials at 4 °C. Concentrations of the calibration standards ranged between 0.5-100 µg mL<sup>-1</sup>. Water was Milli-Q water from a Millipore purification system (Millipore, Bedford, MA, USA). Borax was supplied by Panreac (Barcelona, Spain). Carrez I and II were purchased from Scharlau (Barcelona, Spain). Methanol, monopotassium phosphate and dipotassium phosphate were of high analytical grade (Merck,

Darmstadt, Germany). Nitrate reference test materials were provided by CSL (Central Science Laboratory, York, UK)

### **Sample treatment**

Before testing, any inedible parts were removed. The whole samples were quartered, grinded and homogenized (Ultra-Turrax TR-50, Germany). An analytical aliquot of approximately 5 g was weighed. The subsample was transfer into a 200 mL volumetric flask and about 150 mL of water and 5 mL of borax solution were added. The whole content was shaken and after 15 minutes in warm water, 2 mL of Carrez I and 2 mL of Carrez II were added. The mixture was then brought to volume and filtered into a 250 mL Erlenmeyer flask through a 0.45  $\mu\text{m}$  pleated filter.

An SPE column (C18/1g, Sep-Pak<sup>®</sup>, Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA) was activated with 5 mL methanol and 5 mL Milli-Q water. A total of 4 mL of the filtered sample was loaded onto the column to saturate it and the eluate was discarded; another 4 mL of the sample were then passed through. Final extract was collected and filtered through 0.45  $\mu\text{m}$  prior to the LC analysis.

### **Instrumental**

The liquid chromatograph was an isocratic system equipped with an ultraviolet (UV) diode array detector. Chromatographic separations were performed at 30 °C on a Waters IC-PAK HC anion exchanger column (150 mm x 4.6 mm i.d., particle size: 10  $\mu\text{m}$ ) using a 4.6 x 50 guard column of the same phase (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA). Mobile

phase was a 5 mM phosphate buffer, pH 6.5 (prepared from monopotassium phosphate monohydrate, 0.0482%, and dipotassium phosphate heptahydrate, 0.0404%, in water) at a flow rate of 1.2 mL min<sup>-1</sup>. The injection volume was 20 µL and the total run time of the chromatograms was 20 min. The UV detector operated at 214 nm and a 200 to 400 nm spectrum was registered.

### **Method validation and analytical quality assurance (AQA)**

The analytical method was validated in accordance with the Regulation 882/2004/EC. Matrices such as leafy vegetables (lettuce and spinach), roots (carrot), stem (potato) and inflorescence vegetables (artichoke) were studied during the method validation. The presence of nitrates in these matrices made difficult the study of blank samples, therefore, specificity was assessed by spiking the samples at different levels of concentrations and checking the peak symmetry parameter at the retention time of the analyte. The calibration standard curves were constructed with peak areas of five different levels versus the nitrate concentration in a range of 80-4000 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.kg<sup>-1</sup>. Mandel's test was applied to check linearity. Accuracy (as recovery) and precision (repeatability and within-laboratory reproducibility as RSD<sub>r</sub> and RSD<sub>R</sub>, respectively) were determined by spiking each matrix at 80 mg.kg<sup>-1</sup>, 2000 mg.kg<sup>-1</sup> and 4000 mg.kg<sup>-1</sup> (two replicates daily in five different days). Limit of quantification was established as the lowest spiked level that fulfilled the quantitative performance acceptability criteria of the method. Results are shown in Supplementary Table 1.

All test batches were analysed under quality-assurance protocols, including duplicate samples, reagent blanks, spiked samples, and certified

reference materials from FAPAS (Central Science Laboratory, Sand Hutton, York, United Kingdom). The results of analyses of certified reference materials were in good agreement with the reference values. The laboratory participates regularly in laboratory proficiency testing provided by the Central Science Laboratory (York, UK), with satisfactory z-scores.

Supplementary Table 1

Validation parameters of the analytical method

Parameter	Nitrate
Specificity	lettuce: no interferences spinach: no interferences potato: no interferences carrot: no interferences artichoke: no interferences
Linearity (r)	0.999
Limit of quantification (mg kg <sup>-1</sup> )	80 mg kg <sup>-1</sup>
CV% (n=10) (intermediate precision)	Repeatability: 80 mg kg <sup>-1</sup> (LOQ) = 8.9 2000 mg kg <sup>-1</sup> = 1.3 4000 mg kg <sup>-1</sup> = 1.7 Reproducibility: 80 mg kg <sup>-1</sup> (LOQ) = 1.9 2000 mg kg <sup>-1</sup> = 0.4 4000 mg kg <sup>-1</sup> = 0.3
Mean recovery (%)	80 mg kg <sup>-1</sup> (LOQ) = 92.4 2000 mg kg <sup>-1</sup> = 96 4000 mg kg <sup>-1</sup> = 96.8
Measurement uncertainty (%)	80 mg kg <sup>-1</sup> (LOQ) = 19.4 2000 mg kg <sup>-1</sup> = 5.8 4000 mg kg <sup>-1</sup> = 7.8

n: number of samples

## APÉNDICE 3

**Dietary exposure and risk assessment of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and dioxin-like polychlorinated biphenyls of the population in the Region of Valencia (Spain).**

**Leyre Quijano<sup>a</sup>, Silvia Marín<sup>b</sup>, Encarnación Millan<sup>c</sup>, Vicent Yusà<sup>b,c,d</sup>,  
Guillermina Font<sup>a</sup>, Olga Pardo<sup>b,c,d\*</sup>**

*<sup>a</sup>Preventive Medicine and Public Health, Food Sciences, Toxicology and Forensic Medicine Department, University of Valencia, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain*

*<sup>b</sup>Food Safety Research Area, Center for Public Health Research (CSISP), FISABIO. Av. Catalunya, 21, 46020, Valencia, Spain*

*<sup>c</sup>Analytical Chemistry Department. University of Valencia, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain*

### Table of Contents

Type	Captions
Table S1	Consumption (g kg <sup>-1</sup> bw day <sup>-1</sup> ) per food groups in the Region of Valencia
Table S2	Foods included in the total diet study, by food group
Table S3	Data sampling design
Table S4	Analytical performance of the method
Figure S1	Geographic location and number of samples taken

Table S1. Consumption (g kg<sup>-1</sup> bw day<sup>-1</sup>) per food groups in the Region of Valencia

Food group	Adults >15				Young people (6-15 years)			
	Mean	%	P95	%	Mean	%	P95	%
Vegetable oils	0.30	0.97	0.86	0.65	0.49	0.94	1.50	0.68
Alcoholic beverages	1.28	4.22	8.49	6.47	0.01	0.01	0.01	0.00
Non-alcoholic beverage	2.73	8.98	15.21	11.59	4.10	7.87	25.42	11.42
Meat and meat products	1.99	6.56	9.49	7.23	4.50	8.64	22.45	10.09
Cereal, pulses, tubers. and nuts	2.63	8.64	11.56	8.81	5.99	11.50	26.61	11.96
Prepared dishes	0.62	2.03	3.17	2.42	1.79	3.43	10.65	4.79
Sweeteners and condiments	0.34	1.11	0.91	0.69	0.87	1.68	4.85	2.18
Vegetables and fruits	5.58	18.36	30.85	23.51	6.96	13.37	39.26	17.65
Eggs	0.35	1.15	1.63	1.25	0.63	1.21	3.46	1.55
Milk and dairy products	3.69	12.14	18.73	14.28	9.72	18.67	44.72	20.10
Fish and seafood	0.77	2.53	2.38	1.81	0.84	1.60	3.11	1.40
Total	30.38	100	131.21	100	52.07	100	222.50	100

Table S2. Foods included in the total diet study, by food group

Food group	Foodstuffs
Vegetable oils (Vo)	<b>Olive oil</b> and sunflower oil
Alcoholic beverages (Ab)	Wine and <b>beer</b> .
Non-alcoholic beverages (nAb)	<b>Soda and soft drinks, orange juice</b> , multi-fruits juice
Meat and meat products (Meat)	<b>Chicken, pork, beef, lamb</b> , rabbit, <b>minced meat, sausages, cured ham</b> , cooked ham, cured sausage, foie-grass and offal.
Cereals, pulses, tuber and dried fruits (Cereal)	<b>Rice, industrial bakery, cornflakes, cookies</b> , beans, <b>white bread, sliced bread</b> , wholemeal bread, <b>pasta, potatoes</b> , dried fruits.
Prepared dishes (Pd)	<b>Pizzas</b> , snacks, <b>frozen prepared dishes</b> and canned meals
Sweeteners and condiments (Sc)	<b>Chocolate and cacao, sugar</b> , salt and <b>sausages and mayonnaise</b>
Vegetables and fruits (Vf)	Spinaches and Swiss chard; <b>lettuces</b> ; green beans; <b>onions; peppers; aubergine, zucchini and cucumber; carrots and pumpkin; tomatoes</b> ; olives and pickles; cauliflower, <b>cabbage and broccoli</b> ; artichokes, celery and leek; <b>mushrooms; coffee and soluble coffee; oranges; apples and pears</b> ; sherry and plum; <b>melon and watermelon; banana; peach and apricot; grapes</b> .
Eggs (Egg)	<b>Chicken eggs</b>
Milk and dairy products (Milk)	<b>Milk, cheese, yogurt, custards and smoothies</b> , butter and <b>soybean products</b>
Fish and seafood (Fish)	<b>Canned fish</b> , tuna, <b>squid and cuttlefish, sea bream and sea bass, swordfish</b> , shellfish, <b>mussels, whitefish, salmon and trout, sardine and anchovy, salting fish</b> and smoked fish.

In black: Selected samples from CG-HRMS and CALUX comparison study

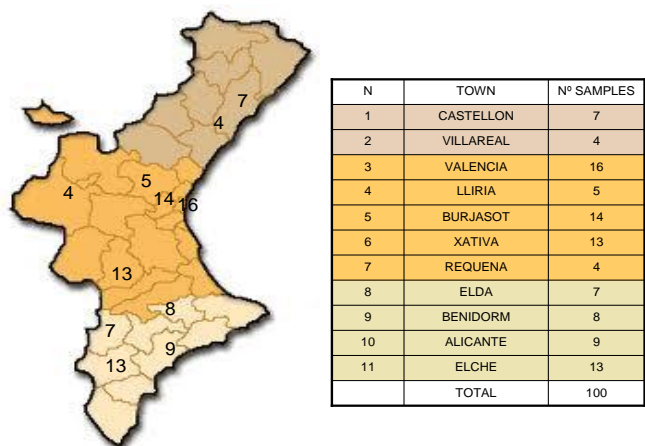


Table S3. Data sampling design

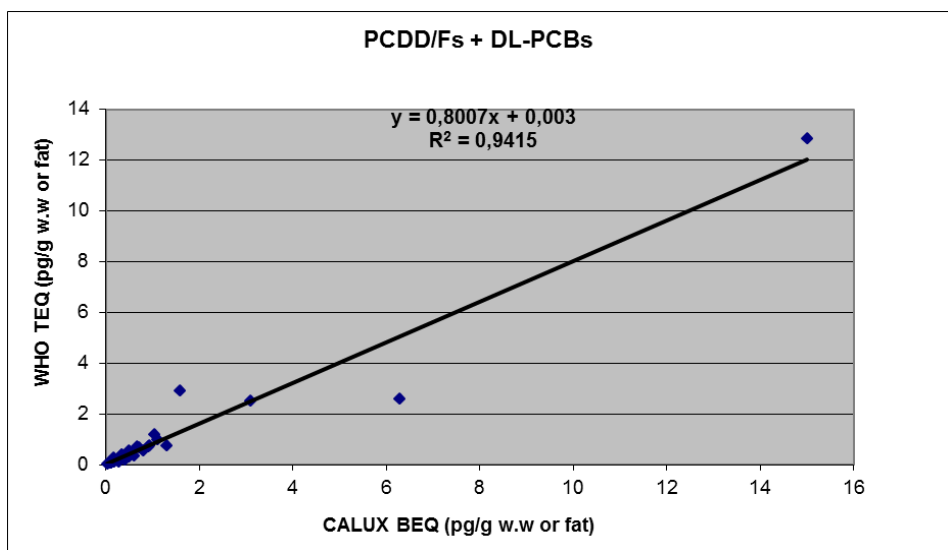
Food group	N° Food items	N° total samples	N° total of composites (or analysis)
Vegetable oils	2	200	20
Alcoholic beverages	2	200	20
Non-alcoholic beverages	3	300	30
Meat and meat products	12	1200	120
Cereals, pulses, tuber and nuts and dried fruits	11	1100	110
Prepared dishes	4	400	40
Sweeteners and condiments	4	400	40
Vegetables and fruits	20	2000	200
Eggs	1	100	10
Milk and dairy products	6	600	60
Fish and seafood	12	1200	120
<b>Total</b>	<b>77</b>	<b>7700</b>	<b>770</b>
N° samples/food item =100			
N° samples/composite =10			

Table S4. Analytical performance of the method

<b>Requirements</b>	<b>Internal validation</b>
Procedural blank (<1pM)	0,32 pM
Recovery certified reference material / fortified sample	91,45 % / 83,42 %
IRM certified (1,52±0,24 pM DR CALUX® TEQ/well)	1,58 pM
Apparent bioassay recovery (30-130%)	95,91 %
Supression signal test (>75%)	118,81 %
Reproducibility RSDR (<25%)	12,6 %
Repeatability RSDr (<20%)	10,33 %
False compliant rate (<5%)	0 %



**Figure S1** Geographic location and number of samples taken



**Figure S2** Comparison of the results of 55 samples including all food groups of the present study obtained by CG-HRMS and

