

## Micotoxines



Estudi de dieta total a Catalunya 2008-2009



Aquesta publicació s'ha elaborat a partir de l'estudi de la ingesta dietètica de micotoxines per la població catalana, dirigit pel Dr. Vicente Sanchis, de la Universitat de Lleida i amb la col·laboració de l'Agència Catalana de Seguretat Alimentària.

**Autors:**

German Cano-Sancho  
Sonia Marín  
Antonio J. Ramos  
Vicente Sanchis

Unitat de Micologia Aplicada. Departament de Tecnologia d'Aliments. Universitat de Lleida.  
UTPV-XaRTA, AGROTECNIO  
Rovira Roure, 191. 25198 Lleida

© 2012-2014, **Generalitat de Catalunya**

---

**Document editat per:** Agència de Salut Pública de Catalunya



**Document revisat per:** Agència Catalana de Seguretat Alimentària

**Segona edició**

Barcelona, setembre de 2014

**Dipòsit legal:** B. 27368-2012



Els continguts d'aquesta obra estan subjectes a una llicència de Reconeixement-No comercial-Sense obres derivades 3.0 de Creative Commons. Se'n permet la reproducció, distribució i comunicació pública sempre que se'n citi l'autor i no se'n faci un ús comercial.

La llicència completa es pot consultar a:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es/legalcode.ca>

# Índex

Índex	,
1. Introducció i objectius	*
2. Metodologia de treball	-
2.1 Disseny de l'estudi	-
2.2 Estudi analític	1\$
2.3 Estudi nutricional	%
2.4 Avaluació de l'exposició	%
2.5 Caracterització del risc	2&
2.6 Comparació amb altres estudis d'exposició	2(
2.7 Marcadors biològics de l'exposició a les micotoxines	2(
3. Estimació de la ingesta d'aliments per grups de població	&
4. Aflatoxines dels grups B i G	' +
4.1 Vies d'exposició i toxicitat	' -
4.2 Valors de referència	4\$
4.3 Incidència i concentració d'aflatoxines en els aliments	4&
4.4 Ingesta diària estimada	4(
4.5 Contribució dels aliments a la ingesta	4)
4.6 Estimació de l'exposició a aflatoxines mitjançant el mètode probabilístic	(,
4.7 Avaluació del risc	5*
4.8 Altres estudis d'exposició	),
5. Aflatoxina M <sub>1</sub> (AFM <sub>1</sub> )	6%
5.1 Vies d'exposició i toxicitat	6&
5.2 Valors de referència	6&
5.3 Incidència i concentració d'aflatoxina M <sub>1</sub> en els aliments.	6'
5.4 Ingesta diària estimada	6(
5.5 Contribució dels aliments a la ingesta	6)
5.6 Estimació de l'exposició a aflatoxina M <sub>1</sub> mitjançant el mètode probabilístic	6)
5.7 Avaluació del risc	* -
5.8 Altres estudis d'exposició	7\$
6. Fumonisina B <sub>1</sub> i B <sub>2</sub>	7&
6.1 Vies d'exposició i toxicitat	7&
6.2 Valors de referència	7(
6.3 Incidència i concentració de fumonisina B <sub>1</sub> i B <sub>2</sub> en els aliments	7(
6.4 Ingesta diària estimada.	7+

6.5	Contribució dels aliments a la ingesta	+
6.6	Estimació de l'exposició a fumonisines mitjançant el mètode probabilístic	, \$
6.7	Avaluació del risc	8)
6.8	Altres estudis d'exposició	86
7.	Ocratoxina A	8,
7.1	Vies d'exposició i toxicitat	, ,
7.2	Valors de referència	, -
7.3	Incidència i concentració d'ocratoxina A en els aliments	9\$
7.4	Ingesta diària estimada	9(
7.5	Contribució dels aliments a la ingesta	95
7.6	Estimació de l'exposició a ocratoxina A mitjançant el mètode probabilístic	96
7.7	Avaluació del risc	101
7.8	Altres estudis d'exposició	102
8.	Patulina (PAT)	10)
8.1	Vies d'exposició i toxicitat	10*
8.2	Valors de referència	10+
8.3	Incidència i concentració de patulina en els aliments	10+
8.4	Ingesta diària estimada	1%\$
8.5	Contribució dels aliments a la ingesta	1%&
8.6	Estimació de l'exposició a patulina mitjançant el mètode probabilístic	11&
8.7	Avaluació del risc	11(
8.8	Altres estudis d'exposició	11)
9.	Tricotecens Tipus A. Toxina T-2 i HT-2	11,
9.1	Vies d'exposició i toxicitat	11-
9.2	Valors de referència	11-
9.3	Incidència i concentració de la toxina T-2 i HT-2 en els aliments	1&\$
9.4	Ingesta diària estimada	12(
9.5	Contribució dels aliments a la ingesta	12)
9.6	Estimació de l'exposició a la toxina T-1 i HT-2 mitjançant el mètode probabilístic	12*
9.7	Avaluació del risc	1' \$
9.8	Altres estudis d'exposició	1' %
10.	Tricotecens Tipus B. Deoxinivalenol (DON)	13(
10.1	Vies d'exposició i toxicitat	13(
10.2	Valors de referència	13)

10.3	Incidència i concentració de deoxinivalenol en els aliments	13*
10.4	Ingesta diària estimada	13,
10.5	Contribució dels aliments a la ingesta	13-
10.6	Estimació de l'exposició al deoxinivalenol mitjançant el mètode probabilístic	1(%
10.7	Avaluació del risc	14*
10.8	Altres estudis d'exposició	14+
11.	Zearalenona (ZEA)	1)\$
11.1	Vies d'exposició i toxicitat	15\$
11.2	Valors de referència	1)&
11.3	Incidència i concentració de zearalenona en els aliments	1)&
11.4	Ingesta diària estimada	15)
11.5	Contribució dels aliments a la ingesta	15*
11.6	Estimació de l'exposició a zearalenona mitjançant el mètode probabilístic	15+
11.7	Avaluació del risc	1**
11.8	Altres estudis d'exposició	1**
12.	Biomarcadors de l'exposició a l'ocratoxina A	16*
13.	Biomarcadors de l'exposició a les fumonisines	17*
14.	Presència i co-presència de micotoxines en aliments especials: aliments específics d'importació i aliments sense gluten	18+
15.	Resum i conclusions	19+
16.	5VfYj JUVc bg	&\$%

# 1

## Introducció i objectius

Les micotoxines són productes del metabolisme secundari d'alguns fongs, principalment dels gèneres *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium*, sintetitzats principalment després d'un temps de creixement actiu o com a resposta a condicions d'estrès. Aquests fongs creixen bàsicament en substrats d'origen vegetal, principalment cereals, tot i que també es poden trobar en fruites, fruits secs o farratges, sent aquests aliments i els seus derivats, els principals productes que poden ser potencialment contaminats amb micotoxines. Aquestes toxines poden produir-se al camp, durant el desenvolupament dels cultius, o posteriorment com a resultat d'una manipulació i/o emmagatzematge inadequats. També poden arribar a la cadena alimentària a través de productes d'origen animal, com la carn, els ous, la llet i els seus derivats; en aquest cas, l'origen s'ha de buscar en el consum de pinsos contaminats per part del bestiar.

S'han identificat més de 300 metabòlits secundaris fúngics tòxics, tanmateix només una trentena presenten propietats preocupants per als humans i per als animals. Les micotoxines poden provocar una àmplia varietat d'efectes adversos en funció de la seva naturalesa química: algunes afecten el sistema immunitari, mentre d'altres són teratogèniques, mutagèniques i/o carcinògenes en algunes espècies animals que en són susceptibles. També han estat associades amb algunes malalties cròniques i agudes en animals i humans en diferents parts del món. Tanmateix, en molts casos, els efectes de les micotoxines sobre la salut humana als nivells d'exposició habituals, encara no es coneixen amb precisió.

Les micotoxines es poden classificar per la seva estructura química i origen biològic en policetoàcids, terpens, ciclopèptids i metabòlits nitrogenats. Des d'un punt de vista agroalimentari i sanitari, els grups de micotoxines més importants són les aflatoxines (AFs), l'ocratoxina A (OTA), la patulina (PAT), les fumonisines (FBs), la zearalenona (ZEA) i els tricotecens (TRCs), principalment el deoxinivalenol (DON), la toxina T-2 (T2) i HT-2 (HT2).

Per tal de garantir la salut dels consumidors s'han desenvolupat polítiques per analitzar de forma integrada el risc derivat dels diferents contaminants d'origen químic o biològic. El procés d'anàlisi del risc s'estructura en tres etapes: avaluació del risc, gestió del risc i comunicació del risc. L'avaluació del risc va ser definida per la Comissió Europea com "Un procés d'avaluació, incloent la identificació de les incerteses que comporta, de la probabilitat i severitat d'un o més efectes adversos per a l'home o l'ambient, exposat en unes condicions definides, a una font de risc". L'avaluació del risc comprèn la identificació del perill, la caracterització del perill, l'avaluació de l'exposició i caracterització del risc. Tot i que la Comissió Europea ha endegat un programa d'harmonització en la implementació de les diferents etapes de l'avaluació del risc, encara no hi ha cap consens que permeti comparar convenientment les dades entre els diferents estudis.

L'any 2000 el Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya va iniciar el primer estudi de dieta total, per estimar la ingesta de diversos contaminants químics per part de la població catalana i avaluar-ne el risc per a la salut. Posteriorment, l'any 2005 es va realitzar el segon estudi de dieta total per conèixer l'evolució en el temps de la ingesta diària de contaminants químics a través dels aliments. Els contaminants químics seleccionats en ambdós estudis van ser l'arsènic, el cadmi, el mercuri, el plom, les dioxines i furans, els bifenils policlorats, els hidrocarburs aromàtics policíclics, l'hexaclorobenzè, èters difenílics polibromats, èters difenílics policlorats i naftalens policlorats. L'any 2008 l'Agència Catalana de Seguretat Alimentària juntament amb la Universitat de Lleida, van impulsar el present estudi, aquest cop per estudiar la presència de les principals micotoxines en el mercat català, avaluar l'exposició de la població i el risc derivat per a la salut.

La informació aportada per aquests estudis permet conèixer millor la realitat vinculada amb els principals contaminants químics que arriben al mercat català, així com l'exposició de la població. D'aquesta manera i si s'escau, es poden prendre decisions concretes per corregir situacions de risc per a la salut dels consumidors.

Per tant, els objectius del present treball són:

- Conèixer la presència puntual de les principals micotoxines en els aliments destinats a consum humà presents al mercat català.
- Conèixer la ingesta dels aliments vinculats amb la contaminació amb micotoxines per part de la població resident a Catalunya.
- Estimar l'exposició actual de la població catalana a les principals micotoxines.
- Avaluar el risc per a la salut derivat de l'exposició alimentària a les micotoxines.



# 2 Metodologia de Treball

## 2.1 Disseny de l'estudi

El disseny de l'estudi es basa en la combinació de les dades de consum d'aliments amb les dades de contaminació dels aliments. Les dades de consum d'aliments es van obtenir d'un estudi de consum dissenyat i desenvolupat específicament per avaluar la ingesta dels principals aliments relacionats amb les micotoxines per part de la població resident a Catalunya. Les dades de contaminació es van obtenir d'un ampli estudi en el qual es van determinar els nivells de les micotoxines en els principals aliments que podien estar contaminats (Figura 2.1).



Fig. 2.1 Representació esquemàtica del disseny de l'estudi

## 2.2 Estudi analític

### 2.2.1 Selecció d'aliments

Es van seleccionar aquells aliments consumits per la població catalana en els quals la presència de micotoxines pot ser significativa, segons han demostrat els estudis d'incidència publicats fins ara.

Els principals aliments que poden contenir patulina (PAT) són aquells elaborats a base de poma. A Catalunya, els principals aliments derivats de poma consumits són els suc de poma, els aliments sòlids a base de poma (melmelades i compotes) i els aliments infantils a base de poma.

Per determinar les aflatoxines totals (AFs: AFB<sub>1</sub>+AFB<sub>2</sub>+AFG<sub>1</sub>+AFG<sub>2</sub>) es van analitzar cereals d'esmorzar, aliments infantils a base de cereals, aperitius de panís, panís dolç en conserva, figues seques, cacauets, festucs i pebre vermell.

L'aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) és un metabòlit produït per animals que han estat exposats a l'AFB<sub>1</sub> a través de la seva dieta, sent aquesta toxina metabolitzada i finalment pot ser excretada com AFM<sub>1</sub> en la llet. Per tant, es van determinar els nivells d'AFM<sub>1</sub> en llet, iogurt natural i formatge.

Les fumonisines (FBs: FB<sub>1</sub>+FB<sub>2</sub>) són produïdes bàsicament en panís, per tant, es va determinar el seu contingut en panís dolç en conserva, aperitius de panís, cereals d'esmorzar a base de panís, cervesa i cereals infantils elaborats amb fórmules de 3 a 5 cereals, la majoria amb panís en la seva composició. Com que el xarop de panís utilitzat en la fabricació industrial de cervesa s'ha mostrat que pot ser una font important d'aquestes micotoxines, es va incloure aquesta beguda.

Quant als tricotecens (TRCs), es van determinar els nivells en pa, pa de motlle, cereals d'esmorzar, aperitius de panís, panís dolç en conserva, cervesa i pasta.

L'ocratoxina A (OTA), caracteritzada per la seva ubiqüitat, es va determinar en tots els aliments citats anteriorment i addicionalment en vi, cafè i panses.

A banda, es van incorporar una selecció d'aliments consumits majoritàriament per col·lectius amb requeriments nutricionals o hàbits alimentaris especials, com és el cas dels aliments sense gluten destinats a celíacs (principalment pa, pasta i rebosteria) i els

aliments d'importació o ètnics, consumits majoritàriament per col·lectius nouvinguts que mantenen el consum d'alguns productes propis de la regió d'origen (cuscús, farina i sèmols de panís).

En la taula 2.1, es mostra la relació d'aliments mostrejats i les micotoxines analitzades en cada classe:

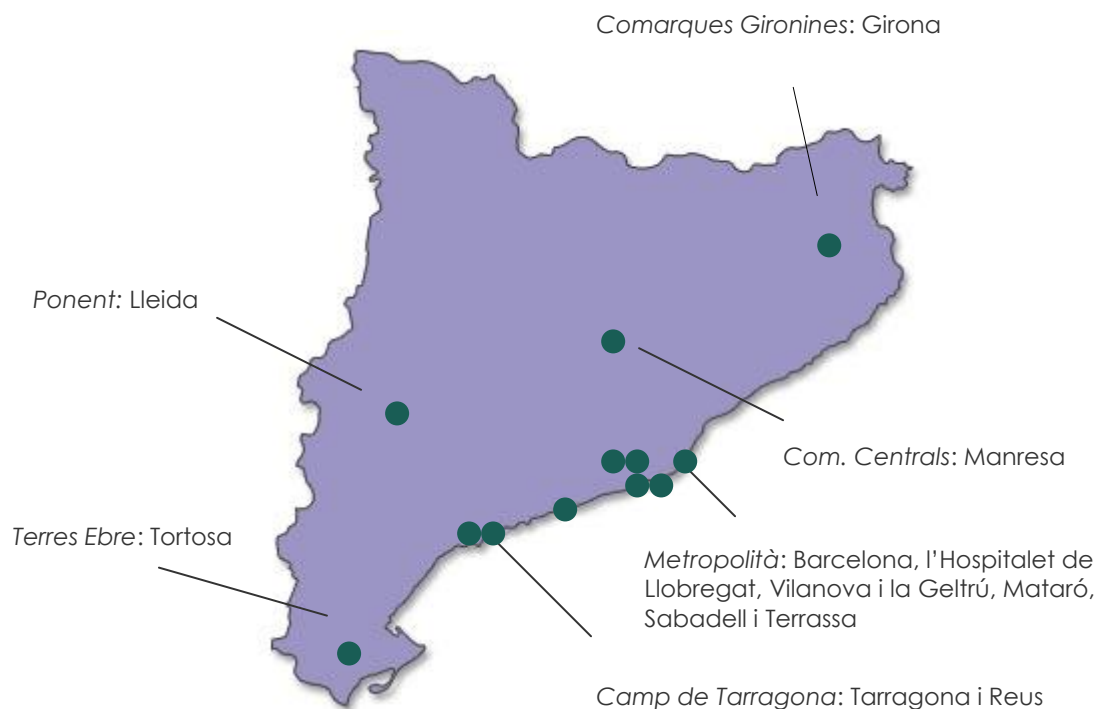
**Taula 2.1 Relació de les micotoxines analitzades en cada tipus d'aliment**

Aliment	AFs	AFM <sub>1</sub>	PAT	FBs	TRCs	OTA	ZEA
Llet		X					
Formatge		X					
logurt		X					
Cacauets	X					X	
Festucs	X					X	
Figues seques	X					X	
Panses						X	
Panís dolç	X			X	X	X	X
Flocs panís	X			X	X	X	X
Flocs blat	X				X	X	X
Aperitiu panís	X			X	X	X	X
Cervesa				X	X	X	X
Vi						X	
Cafè						X	
Pebre vermell	X					X	
Aliments infantils de cereals	X			X	X	X	X
Pa					X		
Pa de motlle					X		X
Pasta					X	X	X
Suc de poma			X				
Melmelades i compotes de poma			X				
Aliments infantils de poma			X				
Aliments ètnics	X			X	X*	X	X
Aliments per celíacs	X			X	X*	X	X

\* En aquests aliments només es va determinar els nivells de deoxinivalenol

## 2.2.2 Presa de mostres i anàlisi

Per tal d'obtenir una mostra representativa dels aliments consumits per la població catalana, es van adquirir els aliments seleccionats en superfícies comercials de 12 poblacions catalanes entre 2008 i 2009, considerant el conjunt representatiu d'aproximadament el 72 % de la població catalana, és a dir, aquella que viu en poblacions de més de 20.000 habitants.



**Fig. 2.2 Situació geogràfica de les ciutats en les quals es va dur a terme el mostreig, agrupades per àmbits territorials**

En cada població, es van adquirir els aliments de 6 superfícies comercials diferents: 2 hipermercats i 4 superfícies mitjanes i/o petites de totes les categories, incloent supermercats de barri, cadenes de supermercats, supermercats de descompte... En total, 72 superfícies comercials de 25 grups distribuïdors diferents.

En la selecció dels establiments minoristes es va prioritzar la importància quant a presència en la zona, la qual cosa pot ser un bon indicador de la quota de mercat que tenen sobre els consumidors. Pel que fa al nombre de mostres, es van agafar 3 mostres de cada aliment en cada superfície comercial, si estaven disponibles. Es va prendre la marca del distribuïdor i aleatòriament 2 de marques comercials diferents.

Les mostres d'aliments d'importació es van agafar en botigues de barri especialitzades en importació de productes hispanoamericans, magrebins o de països de l'est d'Europa, o en supermercats o hipermercats amb secció d'aliments d'importació. Es van prendre 35 mostres d'aliments: cuscús, farina de panís, farina de blat, crema de panís i sèmola de panís.

Els aliments sense gluten es van agafar de botigues especialitzades en dietètica i nutrició o en supermercats i hipermercats amb secció de productes dietètics. Es van agafar 18 mostres: pa, pasta i rebosteria sense gluten.

A partir de les 3 mostres individuals, mitjançant un procés estandarditzat de trituració i homogeneïtzació, es van preparar “composites” o mostres analítiques. En el cas d'aliments amb escassa presència en el mercat com és el cas de les figues seques o els aliments sòlids a base de poma, es van analitzar de forma individualitzada. En els casos d'aliments amb closca, només es va analitzar la porció comestible descartant la resta. En el cas d'alguns aliments de baix consum o consum estacional, el mostreig es va veure reduït i les mostres també van ser analitzades individualment. En la taula 2.2 es resumeixen les mostres obtingudes per cada aliment:

**Taula 2.2 Inventari de mostres individuals, mostres analítiques i marques comercials recollides de cada categoria d'aliments**

Aliment	Mostres individuals	Mostres analitzades	Marques comercials
Llet	211	72	36
Formatge	216	72	70
logurt	202	72	21
Cacauets	215	72	47
Festucs	170	70	23
Figues seques	26	26	14
Panses	37	37	17
Panís dolç	182	71	30
Cereals d'esmorzar de panís	168	72	14
Cereals d'esmorzar de blat	30	30	30
Aperitius panís	216	72	74
Cervesa	216	72	64
Vi	241	241	*
Cafè	204	72	45
Pebre vermell	168	72	22
Aliments infantils de cereals	154	71	21
Pa	30	30	30
Pa de motlle	145	71	43
Pasta	201	70	105
Suc de poma	161	71	29
Melmelades i compotes de poma	77	77	18
Aliments infantils de poma	124	124	26

<b>Aliments ètnics</b>	35	35	35
<b>Aliments per celíacs</b>	18	18	18
<b>Total</b>	<b>3.447</b>	<b>1.690</b>	<b>832</b>

\* Dades no disponibles

### 2.2.3 Tècniques d'anàlisi químic

A continuació es detalla el mètode d'extracció, purificació i determinació de cada una de les micotoxines en les diferents matrius alimentàries. Els mètodes es van validar d'acord amb els criteris del Reglament (CE) N° 401/2006 de la Comissió del 23 de febrer de 2006, en el qual s'estableixen els mètodes de mostreig i d'anàlisi per al control oficial del contingut de micotoxines en els productes alimentaris.

#### 2.2.3.1 Aflatoxines del grup B i G

El procés per determinar les AFs, consistia en una extracció, mesclant i agitant 10 g de "composite" amb 15 mL de solució d'acetonitril i aigua (60:40), durant 20 minuts. La mescla agitada es filtrava i es purificava mitjançant columnes d'immunoafinitat AFLAPREP® (R-Biopharm, Alemanya). Les columnes d'immunoafinitat es basen en una unió altament selectiva entre la micotoxina i l'anticòs monoclonal específic que es troba en la columna.

El contingut en AFs de l'extracte final es determinava per HPLC amb detector de fluorescència, fent ús d'un derivatitzador fotoquímic post-columna, tipus UVETM Derivatizer LC Tech, per intensificar el senyal. La longitud d'ona d'excitació era de 365 nm, i la d'emissió a 0-13 min i 13-25 min era de 455 i 425 nm, respectivament. La fase mòbil consistia en una solució d'aigua, metanol i acetonitril (70:17:17).

El límit de quantificació (LQ) del mètode per a la determinació de l'AFB<sub>1</sub> i l'AFG<sub>1</sub> era de 0,1 µg kg<sup>-1</sup> i per a l'AFB<sub>2</sub> i l'AG<sub>2</sub>, 0,025 µg kg<sup>-1</sup>.

#### 2.2.3.2 Aflatoxina M<sub>1</sub>

Per a la determinació de l'AFM<sub>1</sub>, es va utilitzar un kit comercial tipus ELISA Ridascreen AFM<sub>1</sub>® (R-Biopharm, Alemanya). Seguint el procediment d'extracció recomanat pel fabricant, es van preparar les mostres de llet per centrifugació a 3,500 rpm, durant 10 min. En retirar el sobrenedant, la fracció restant s'utilitzava directament en el test.

D'altra banda, 10 g de formatge o de iogurt s'agitaven durant 15 minuts amb 40 mL de diclormetà i s'evaporava. La fracció oliosa es resuspenia en 0,5 mL de metanol, 0,5 mL de tampó fosfat i 1 mL d'heptà, i s'agitava intensament. Després es centrifugava durant 15 min a 2.700 rpm, i es recuperaven 100 µL de la fracció metanòlica per a utilitzar en el test.

El principi d'aquest test ELISA es basa en la reacció antígen-anticòs. El fons dels pouets està recobert d'anticòssos específics contra la toxina. L'AFM<sub>1</sub> i l'aflatoxina conjugada a l'enzim competeixen pels llocs d'unió de l'anticòs (immunoassaig enzimàtic competitiu). Després d'una neteja per eliminar el conjugat sense unir, s'afegeix el substrat cromogen. L'enzim conjugat catalitza la conversió del cromogen en un producte blau. Finalment, s'afegeix la solució d'aturada, que canvia el color de blau a groc. La mesura es realitza fotomètricament a 450 nm, essent l'absorbància inversament proporcional a la concentració de la micotoxina a la mostra.

El LQ de la AFM<sub>1</sub> en llet era de 5 ng kg<sup>-1</sup> i de 25 ng kg<sup>-1</sup> per al iogurt i el formatge.

### 2.2.3.3 Fumonisines B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub>

Per a l'extracció i purificació de les FBs de la cervesa es van mesclar 5 mL de mostra desgasificada amb 15 mL de tampó fosfat, i posteriorment, la mescla es passava a través de columnes d'immunoafinitat FUMONIPREP® (R-Biopharm, Alemanya). Quant a les matrius sòlides, 10 g de mostra triturada es mesclava amb 1 g de NaCl i 50 mL de solució d'extracció (50% aigua, 25% metanol i 25 % d'acetonitril), agitant durant 20 minuts. 10 mL d'extracte filtrat es diluïa amb 40 mL de tampó fosfat i es passava per la columna d'immunoafinitat.

Les FBs de l'extracte purificat es determinaven per HPLC amb detector de fluorescència, realitzant una derivatització en pre-columna amb una solució d'ò-ftaldialdehid per augmentar la fluorescència. La longitud d'ona d'excitació i d'emissió era de 335 i 440 nm, respectivament. La fase mòbil estava formada per una solució de dihidrogen fosfat de sodi (0,1 M) i metanol.

**2.2.3.4** El LQ del mètode per la determinació de FBs en cervesa era de 11,7 µg kg<sup>-1</sup>, i per a la resta de matrius sòlides era de 15,6 µg kg<sup>-1</sup>.

## Ocratoxina A

L'extracció i purificació de l'OTA de la cervesa i el vi, es va realitzar passant 150 mL de mostra, prèviament desgasificada i ajustada a pH 7,2 amb NaOH, a través de la columna d'immunoafinitat OCHRAPREP® (R-Biopharm, Alemanya). En les matrius sòlides, com el pa de motlle, els aliments infantils o els cereals d'esmorzar, es mesclaven prèviament 5 g de mostra amb 25 mL de solució d'extracció d'acetonitril i aigua (60:40), portant a agitació durant 10 minuts. Posteriorment, es diluïa una fracció de la mescla filtrada amb tampó fosfat, i es passava per la columna d'immunoafinitat.

Quant a les mostres de cafè, 5 g de "composite" es mesclaven amb 100 mL de NaHCO<sub>3</sub> (1%) i la mescla s'agitava durant 10 min, i es filtrava. 5 mL de filtrat es mesclaven amb 5 mL de tampó fosfat i es passaven a través de la columna d'immunoafinitat. L'elució es realitzava invertint tres vegades el flux amb 1,5 mL de solució metanol i àcid acètic (98:2).

La determinació de l'extracte purificat d'OTA es realitzava per HPLC amb detector de fluorescència. La longitud d'ona d'excitació i emissió era 333 nm i 443 nm, respectivament. La fase mòbil consistia en una solució d'acetonitril, aigua milli-Q i àcid acètic (51:47:2).

El límit de detecció (LD) estava comprès entre 0,003 i 1,160 µg kg<sup>-1</sup>.

### 2.2.3.5 Patulina

El procediment analític de patulina consistia en una extracció i purificació líquid-líquid de la mostra amb acetat d'etil. Per a les mostres sòlides a base de poma, com la mermelada, el puré de poma o la compota, es diluïa en una proporció 1:1 pes/pes i es tractava enzimàticament amb pectinasa, que finalment es retirava per centrifugació a 6,000 rpm durant 5 min. El sobrenedant es tractava utilitzant la mateixa metodologia desenvolupada per al suc. Es a dir, seguint el mètode oficial 995.10 de la AOAC, s'extreia amb acetat d'etil i posteriorment es purificava amb una solució de carbonat de sodi. Els extractes s'evaporaven i finalment es resuspenien en aigua milli-Q ajustada a pH 4 amb àcid acètic glacial, per realitzar la determinació per cromatografia HPLC amb detector d'UV a una longitud d'ona de 276 nm.

Finalment el LQ del mètode era de 6,25 µg kg<sup>-1</sup> en totes les matrius analitzades.



### 2.2.3.6 Tricotecens

La determinació de tricotecens es va realitzar conjuntament per a DON, toxina T-2 i HT-2, variant el mètode en funció de la matriu per optimitzar-ne la precisió.

En tots els casos es va realitzar una extracció i una purificació (amb columnes d'immunoafinitat o tipus Mycosep®), derivatització i determinació per GC-ECD (pasta, cereals d'esmorzar i aperitius de panís) o per GC-MS (pa). La determinació dels tricotecens en pa de motlle, panís dolç i cervesa, es va realitzar mitjançant HPLC-DAD.

El LQ variava en funció de la matriu i la toxina de 12 a 66  $\mu\text{g kg}^{-1}$  per a DON, de 9 a 61  $\mu\text{g kg}^{-1}$  per a HT2 o de 42 a 153  $\mu\text{g kg}^{-1}$  per a T2.

### 2.2.3.7 Zearalenona

L'extracció i purificació de la ZEA de la cervesa, es realitzava mesclant 5 mL de cervesa desgasificada amb 15 mL de tampó fosfat, i es passava a través de la columna d'immunoafinitat EASI-EXTRACT® ZEARENONE (R-Biopharm, Alemanya). Les mostres sòlides, es mesclaven prèviament amb solució d'extracció d'acetonitril i aigua (75:25), i s'agitaven durant 10 minuts. Finalment es filtrava, i es mesclava amb solució fosfat per passar per la columna d'immunoafinitat. L'elució es realitzava invertint el flux tres vegades amb 1,5 mL d'acetonitril i passant lliurement 1,5 mL d'aigua milli-Q.

La determinació i quantificació de la ZEA en l'extracte es feia per HPLC amb detector de fluorescència. La longitud d'ona d'excitació i d'emissió era de 274 i 455 nm, respectivament. La fase mòbil consistia en una solució d'acetonitril i aigua milli-Q (60:40).

El LQ de la zearalenona oscil·lava de 0,070 a 1,95  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

## 2.2.4 Presentació dels resultats analítics

Els resultats analítics es presenten per a cada micotoxina en la taula corresponent, amb el nombre de mostres individuals, nombre de "composites" analitzats, el nombre de mostres positives, la concentració mitjana de les mostres positives i la concentració màxima detectada en cada grup d'aliments expressada en micrograms per quilogram d'aliment fresc. De cada grup d'aliments es mostra gràficament un histograma de

freqüències relatives de la contaminació de cada micotoxina. Les concentracions es comparen qualitativament amb els límits establerts per la Comissió Europea per a cada micotoxina inclosos en el Reglament (CE) N° 1881/2006 de la Comissió de 19 de desembre de 2006, Reglament (CE) N° 1126/2007 del 28 de setembre 2007, Reglament (CE) N° 105/2010 del 5 de febrer 2010 i Reglament (CE) N° 165/2010 del 26 de febrer 2010.

## 2.3 Estudi de consum

### 2.3.1 Grups de població estudiats

D'acord amb les recomanacions de l'Organització Mundial de la Salut (OMS), un estudi d'ingesta dietètica de contaminants químics ha de reflectir la significació de la seva ingesta en la població estàndard, així com en altres grups de població que tinguin o puguin tenir patrons de consum diferent. Per aquest motiu, tenint en compte les diferències quant a necessitats fisiològiques, hàbits nutricionals i activitat física, es van establir els diferents grups de població mostrats en la taula 2.3.

A banda dels grups d'edat sovint utilitzats en estudis d'ingesta, en el present treball s'han incorporat dos grups addicionals per tenir uns hàbits alimentaris clarament diferenciats de la resta: els celíacs i el grup de població nouvinguda.

**Taula 2.3 Grups de població que es van tenir en compte en l'estudi**

Grups de població	Rangs d'edat (anys)	Pes corporal (kg)*
Gent gran	>65	73.7
Nouvinguts	17-51	67.7
Celíacs	16-75	58.7
Homes adults	20-65	81.1
Dones adultes	20-65	66.6
Adolescents	10-19	54.4
Nens i nenes	4-9	25.7
Nadons i infants	0-3	11.6

\* Mitjana de pes corporal de la mostra de cada grup de població

La població celíaca ha de substituir els aliments a base de cereals que porten gluten, per un grup d'aliments especialment fabricats per obtenir un producte final lliure d'aquesta proteïna.

La població nouvinguda, tal i com mostren els estudis publicats per l'Observatori de la Immigració a Catalunya, ha mostrat un important increment durant els darrers anys, documentant que l'any 2009 representava el 15.9 % de tota la població resident a Catalunya. Aquest col·lectiu amb procedències diferents, tot i mostrar una certa adherència a la dieta catalana, encara mostren alguns lligams alimentaris amb la dieta d'origen (Migracat, 2010). Per tant, es va seleccionar una mostra poblacional nouvinguda i resident a Catalunya, principalment originària del Nord d'Àfrica (Marroc i Algèria), Amèrica Llatina i Europa de l'Est.

### **2.3.2 Estimació de la ingesta d'aliments**

La manca de dades existents sobre la ingesta d'aliments vinculats amb la contaminació de micotoxines ens ha conduït a dur a terme un estudi de consum específic dels aliments que poden contenir aquests contaminants. Es va dissenyar un qüestionari de freqüència de consum d'aliments (QFCA), consistent en 45 ítems en els quals es requeria la quantitat ingerida, amb mesures casolanes, prèviament estandarditzades i la freqüència de consum, des de mai, a diàriament, setmanalment o mensualment. Els QFCA eren administrats per entrevistadors/es prèviament entrenats/es ajudats/es de models fotogràfics.

Per augmentar la fiabilitat i la precisió, en el cas de la població nouvinguda procedent del Nord d'Àfrica, l'entrevistador dominava la parla àrab, i en el cas dels nens/es i infants, els qüestionaris es realitzaven directament als pares/mares. L'estudi realitzat amb població celíaca es va realitzar en col·laboració amb l'Associació de Celíacs de Catalunya.

## **2.4 Avaluació de l'exposició**

### **2.4.1 Tractament dels valors no detectats**

Per realitzar el càlcul de l'exposició de la població a les diferents micotoxines, seguint els corrents científics actuals per als estudis d'ingesta total, el valor adjudicat als no detectats ha estat la meitat del seu límit de detecció ( $ND = LD/2$ ), considerant el LQ

tres vegades el valor del LD. Tanmateix, en el cas d'algunes micotoxines on el nombre de no detectades era molt elevat, com és el cas de les aflatoxines i l'OTA, es va seguir el criteri establert en l'informe elaborat en el Workshop in the frame of GEMS/Food-EURO on Reliable Evaluation of Low-Level Contamination of Food (GEMS/Food-WHO, 1995), on s'aconsella que en els casos on es troba un percentatge de censurats superior al 60%, es realitzin dues estimacions, utilitzant 0 i el LD per tots els valors inferiors al LD, per tal d'obtenir una estimació senzilla de la mitjana.

En el cas de la toxina T2 i HT2, degut a l'elevat nombre de mostres que es van trobar entre el LD i el LQ i atenent a les recomanacions de la JECFA, es va considerar adient incorporar les mostres situades en aquest interval, en el tractament estadístic. A més, es van realitzar dues aproximacions addicionals per a tractar les mostres no detectades de contaminació. Per una banda es va realitzar l'aproximació clàssica, en la qual es substitueixen les mostres no detectades (ND) pel valor equivalent al LD/2. Per una altra banda es va realitzar l'estimació de la mitjana de contaminació del grup de dades corresponent a cada aliment ajustant els valors no detectats mitjançant el mètode de màxima versemblança (mètode paramètric). Finalment, es va fer la mateixa estimació però mitjançant el mètode no paramètric d'ajust, anomenat de Kaplan-Meier (EFSA, 2010).

#### 2.4.2 Metodologia directa per al càlcul de l'exposició

La principal limitació per estimar la distribució de l'exposició normalitzada de la població es deriva de l'equació:

$$E_{\pi} = \sum_{j=1}^p C_{\pi,j} T_j$$

On la variable aleatòria "exposició global normalitzada en una població  $\pi$ " ( $E_{\pi}$ ) és funció de les variables aleatòries: "consum normalitzat de l'aliment  $j$  en una població  $\pi$ " ( $C_{\pi,j}$ ) i "la concentració de micotoxina en l'aliment  $j$ " ( $T_j$ ). La dificultat deriva del desconeixement de la funció de densitat de probabilitat (*pdf*) d'aquestes variables, ja que normalment són diferents i independents.

Si s'assumeix independència entre el consum ( $C_{\pi,j}$ ) i la contaminació ( $T_j$ ), així com entre els seus productes, es pot fer una estimació de l'exposició mitjana de la població  $\pi$  amb la mostra de població  $\pi_0$ , tal i com es mostra:

$$\hat{E}_{\pi_0} = \sum_{j=1}^p \bar{C}_{\pi_0,j} \bar{T}_j$$

On  $\bar{C}_{\pi_0,j}$  és la mitjana del consum normalitzat de l'aliment  $j$  en un grup població  $\pi_0$ , i  $\bar{T}_j$  és la mitjana dels valors de contaminació disponibles d'aquest aliment. Considerant aquestes assumpcions, es pot calcular l'estimació de la mitjana i de la variància de la mostra, mitjançant el que anomenem en aquest treball com a "mètode directe". Aquesta aproximació a l'exposició s'hauria de considerar una aproximació teòrica, ja que degut a les esmentades assumpcions, esdevé una aproximació molt simplificada a l'estimació poblacional real. Per exemple, aquesta aproximació no permet el càlcul d'estadístics més complexos com els percentils alts, per tant es requereixen mètodes de simulació o probabilístics per obtenir estimacions més precises.

### 2.4.3 Metodologia probabilística per al càlcul de l'exposició

El mètode de simulació utilitzat és essencialment paramètric, i es basa en generar valors aleatòriament a partir de les funcions de distribució ajustades a la base de dades dels valors de consum i contaminació. Per tenir una descripció acurada del mètode, adreçem als lectors als treballs de Gauchi i Leblanc (2002) i Cano-Sancho et al., (2011).

Considerant que els histogrames de consum i contaminació són marcadament asimètrics, s'han ajustat les funcions de densitat de probabilitat (fdp), escollint la distribució gamma per ser la millor candidata. El model per a estimar el consum normalitzat  $k$  del rang de simulació  $S$  es va dissenyar de la següent manera:

$$\hat{E}_k^{[P-P]} = \sum_{j=1}^p \tilde{c}_{i(j)} \tilde{t}_j$$

On  $\hat{C}_j$  és el consum aleatori normalitzat  $i$  per a l'aliment  $j$ , generat des de  $\hat{C}_j$ , la fdp ajustada a gamma, i  $\tilde{t}_j$  és la contaminació aleatòria de l'aliment  $j$ , generada des de  $\hat{T}_j$ , la corresponent fdp ajustada a gamma.

L'exposició mitjana normalitzada del rang de simulació  $S$  era estimada utilitzant l'equació següent, on  $n$  era el nombre de valors aleatoris generats (en aquest estudi, 10.000):

$$\hat{E}_S^{[P-P]} = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n \hat{E}_k^{[P-P]}$$

Altres estadístics es van calcular directament de l'histograma construït amb el rang de simulació  $S$ , a més d'estimar-los des de la *fdp* ajustada a la lognormal i la gamma.

### **Intervals de Confiança "Bootstrap"**

Per avaluar la precisió i fiabilitat de les estimacions, es van calcular els intervals de confiança mitjançant el mètode pseudo-paramètric del "Bootstrapping". Els intervals de confiança (IC<sub>b</sub>) es van construir generant aleatòriament  $B$  mostres (normalment 10.000) de mida  $n_{\pi_0}$ , en un rang de simulació  $S$ . En cada cas, els límits dels intervals de confiança del 95 % es van calcular agafant els quantils empírics 0,025 i 0,975 de la distribució "bootstrap" final.

### **2.4.4 Presentació dels resultats**

Per una banda es presenta la ingesta diària mitjana de cada micotoxina i la seva desviació estàndard, estimats mitjançant el mètode directe.

D'altra banda es presenten els valors obtinguts a través del mètode probabilístic, considerant la mitjana, la desviació estàndard, la asimetria, la curtosi, la mediana o percentil 50, 90 i 95. També es mostra el histograma de freqüències relatives de l'estimació de l'exposició per a cada grup de població.

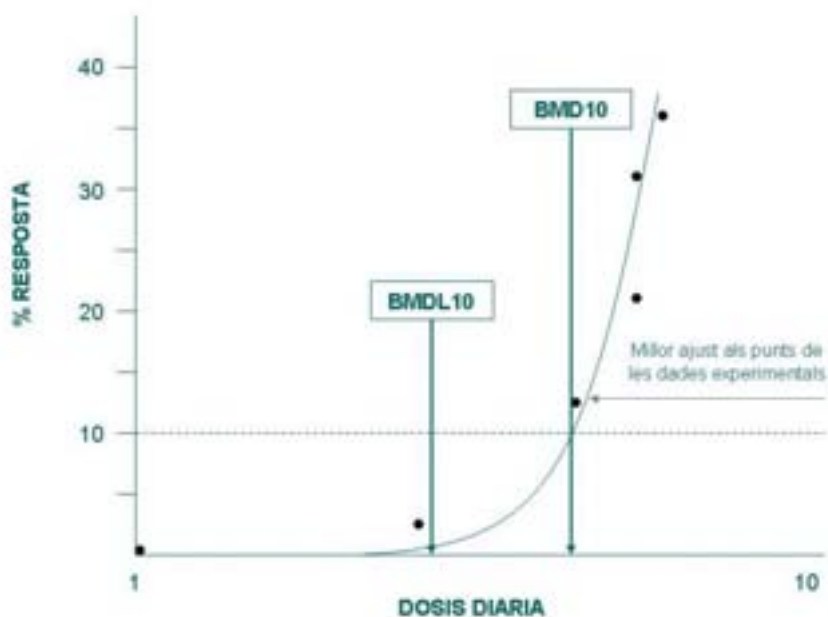
En un intent per identificar quins són els aliments que contribueixen en major proporció a la ingesta de cada micotoxina, també es representa gràficament per a cada grup de població la contribució relativa de cada aliment a la ingesta estimada global.

### **2.5 Caracterització del risc**

Per caracteritzar el risc derivat de l'exposició a les diferents micotoxines, les estimacions derivades de l'avaluació de l'exposició es van comparar amb els valors de seguretat establerts per l'EFSA (Autoritat Europea de Seguretat Alimentària) o la JECFA (Comitè Mixt FAO/OMS d'Experts en Additius Alimentaris).

El procés per determinar un valor de seguretat toxicològica, normalment anomenats IDT (ingesta diària tolerable) o IDTMP (ingesta diària tolerable màxima provisional), comporta la determinació de la dosi a la qual no s'observa cap efecte en animals (NOAEL) i es divideix per un factor de 100: un factor de 10 per tenir en compte la variabilitat entre individus, i un altre factor de 10, per tenir en compte la variabilitat entre espècies. Aquest procés de càlcul només és vàlid quan l'efecte tòxic presenta un llindar de concentració a partir del qual aquest deixa d'existir. Tanmateix, hi ha un grup de contaminants anomenats cancerígens genotòxics, el mecanisme d'acció dels quals no està determinat per un llindar de concentració. Aquest és el cas de l'aflatoxina B<sub>1</sub> que va ser identificada per la IARC com a cancerígena per als humans amb evidència suficient, i per tant classificada en el grup 1 (IARC, 2002).

Per realitzar una aproximació per caracteritzar el risc d'aquest grup de contaminants, la EFSA ha desenvolupat un mètode basat en la "dosis Benmarch" (BMD). La BMD s'obté per modelització, i representa una estimació de la dosi requerida per produir una resposta baixa vers el control (1-10%). El procediment es basa en dividir la "dosis Benmarch més baixa" (BMDL), entre la ingesta estimada d'aflatoxines, per tal d'obtenir l'indicador anomenat "marge d'exposició" (ME). La BMDL representa l'extrem més baix de l'estimació de la "dosis Benmarch" a un 95% de confiança. La BMDL<sub>10</sub> representa l'extrem més baix de la BMD que incrementa el risc de càncer un 10% sobre el control. La EFSA ha desenvolupat una BMDL<sub>10</sub> utilitzant dades de rates (170 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>) i utilitzant dades procedents d'estudis epidemiològics amb humans (870 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>) (EFSA, 2007).



**Fig. 2.3 Representació de la determinació gràfica de la BMDL10**

En el present estudi, la caracterització del risc es representa gràficament com el percentatge relatiu de la dosi de seguretat màxima per a la mitjana i per al percentil 95, representat per a cada grup de població.

En el cas de les aflatoxines es calculen els marges d'exposició (ME) per a cada grup de població i per cada escenari d'incertesa. Els MEs són el ràtio entre un punt de la corba de dosi-resposta definit pels efectes adversos (en aquest cas el BMDL<sub>10</sub>) i l'exposició humana estimada.

## 2.6 Comparació amb altres estudis d'exposició

Amb la intenció de tenir una visió general de la situació de la ingesta estimada de les diferents micotoxines per part de la població catalana, en aquest apartat es comparen els valors obtinguts amb altres resultats publicats prèviament en la literatura científica aportant informació relativa a l'exposició en altres regions amb condicions socioeconòmiques i geogràfiques similars.

## 2.7 Marcadors biològics de l'exposició a les micotoxines

Els marcadors biològics són molècules que es troben en l'organisme que mostren el grau d'exposició de l'individu a la micotoxina. Aquests marcadors biològics, també anomenats biomarcadors, poden ser metabòlits de la micotoxina ingerida, o



molècules que indiquen el grau d'alteració d'una via metabòlica produïda per la micotoxina. En el present estudi s'han avaluat en profunditat els biomarcadors de l'exposició a l'OTA i a les FBs en diferents fluids biològics.

- Biomarcadors de l'exposició a OTA.

Els biomarcadors de l'exposició a l'OTA estudiats van ser: 1) la concentració d'OTA en plasma i 2) la concentració d'OTA i el seu metabòlit ocratoxina  $\alpha$  (OT $\alpha$ ) en orina. Les mostres de sang per a la determinació d'OTA en plasma es van recollir en dues etapes. En primer lloc es va estudiar la presència de l'OTA en nou poblacions de la regió central de la província de Lleida i la seva relació amb les característiques del grup de població. Les mostres van ser recollides entre març i maig de 2008. En la segona etapa, i amb l'objectiu d'estudiar les diferències estacionals i regionals, les mostres es van recollir tant en la zona central (n=243) com en el nord (n=82) de la província de Lleida, així com en tres estacions diferents de l'any (tardor i hivern 2008, i estiu 2009 n=116, 98 i 111, respectivament). El plasma es va separar per centrifugació de les mostres de sang, i es va extraure l'OTA per un procés de separació líquid-líquid seguida d'una purificació en columna d'immunoafinitat.

Les mostres d'orina van ser donades per voluntaris residents a la ciutat de Lleida (n=72) entre octubre i novembre de 2009. Els participants van completar qüestionaris de freqüència de consum d'aliments possiblement contaminats amb OTA amb l'objecte d'estimar la seva ingesta. L'OTA i  $\alpha$ , es van separar de les mostres d'orina únicament per un procés d'extracció líquid-líquid.

La determinació i quantificació de l'OTA i OT $\alpha$ , es va realitzar per HPLC amb detecció de fluorescència.

- Biomarcadors de l'exposició a fumonisines.

Donada la baixa biodisponibilitat de les FBs en l'organisme, marcada per una baixa absorció i ràpida eliminació, la concentració de FBs i dels seus metabòlits en fluids biològics és un indicador bastant imprecís de l'exposició a aquests contaminants. En base al mecanisme d'acció de les FBs, que comporta una pertorbació en el metabolisme dels esfingolípidis, produint una inhibició de la biosíntesi de ceramida, i un increment de l'esfinganina (Sa) i l'esfingosina (So) lliure, s'ha proposat el increment del ràtio Sa/So en orina i en sang com un indicador

biològic de l'exposició a les FBs. Aquest biomarcador s'ha validat amb èxit "*in vitro*" i "*in vivo*" en animals, mentre que en humans, els resultats continuen essent contradictoris. En l'estudi present, s'ha avaluat l'ús d'aquest biomarcador en orina i sang de població catalana consumidora d'aliments a base de panís. Per aquest motiu es va recollir la sang i l'orina de 136 i 78 voluntaris, respectivament, als quals se'ls va administrar un QFCA per tal d'estimar la seva ingesta habitual d'aliments possiblement contaminats amb FBs. La Sa i So es van extreure i purificar de la sang i de l'orina per un procés d'extracció líquid-líquid amb acetat d'etil. Els esfingolípid es van determinar en els extractes, per HPLC amb detector de fluorescència. Addicionalment, es va dur a terme un estudi amb 36 voluntaris amb l'objecte d'avaluar l'evolució dels esfingolípid en el temps.

## Referències

Cano-Sancho G, Gauchi J-P, Sanchis V, Marín S, Ramos A J. 2011. Quantitative Dietary Exposure Assessment of the Catalanian Population (Spain) to the Mycotoxin Deoxynivalenol. *Food Addit Contam A* [doi: 10.1080/19440049.2011.576445].

Comissió Europea (CE). 2006. Reglament (CE) N° 401/2006 de 23/2/2006. *Official Journal of the European Union*, L70, 12-34.

Comissió Europea (CE). 2006. Reglament (CE) N° 1881/2006 de 19/12/2006. *Official Journal of the European Union*, L364, 5-24.

Comissió Europea (CE). 2007. Reglament (CE) N° 1126/2007 de 28/9/2007. *Official Journal of the European Union*, L255, 14-17.

EFSA. 2007. Autoritat Europea en Seguretat Alimentària. Opinion of the Scientific Panel of Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products. *EFSA J.* 446: 1-127.

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

Gauchi J-P, Leblanc J-C. 2002. Quantitative assessment of exposure to the mycotoxin ochratoxin A in food. *RiskAnal* 22:219-34.

Global Environment Monitoring System/Food- World Health Organization (GEMs/Food-WHO). 1995. Reliable evaluation of low-level contamination of food—workshop in the frame of GEMs/Food-EURO [Internet]. Kulmbach, Germany: GEMs/Food-WHO.

IARC (2002). Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans (Lyon: IARC), Vol. 82, p. 171.

Migracat (Observatori de la Immigració a Catalunya). 2010. [Internet] Disponible a: <http://www.gencat.cat/dasc/publica/butlletilMMI/xifres6/index.htm>.

# 3

## Caracterització de la població i

### estimació del consum d'aliments

En aquest apartat es presenta una part dels resultats obtinguts en l'estudi nutricional realitzat sobre una mostra de població catalana, considerant els diferents grups d'edats, així com aquells col·lectius amb requeriments nutricionals específics.

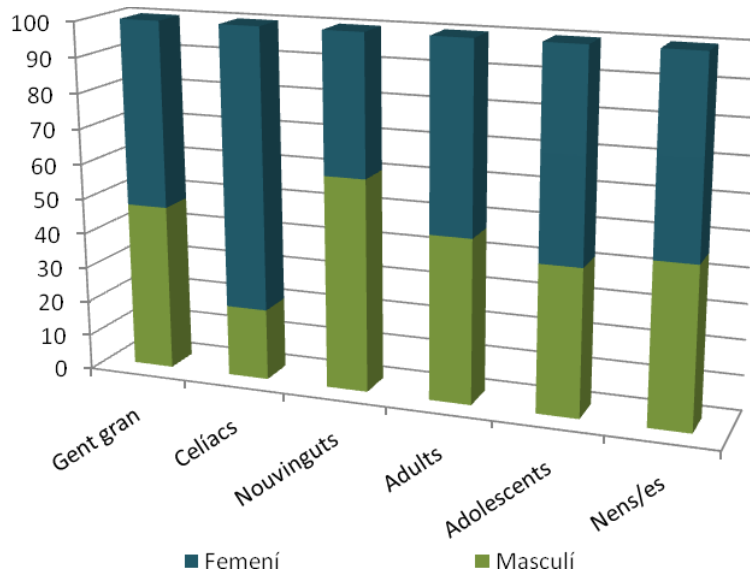
En la primera part del capítol es presenten gràficament alguns paràmetres físics com el percentatge de cada sexe, la mitjana d'edat, alçada, pes i índex de massa corporal (Fig. 3.1 – 3.5), així com la taula amb el resum del nombre, rangs d'edat i pes corporal de la població estudiada (Taula 3.1). En la segona part del capítol es mostren les característiques de consum d'alguns aliments que es van considerar en l'estudi nutricional (Figs. 3.6 - 3.16). El consum es presenta en percentatge de consumidors i amb la mitjana d'ingesta del grup de consumidors.

#### 3.1 Caracterització de la mostra de població

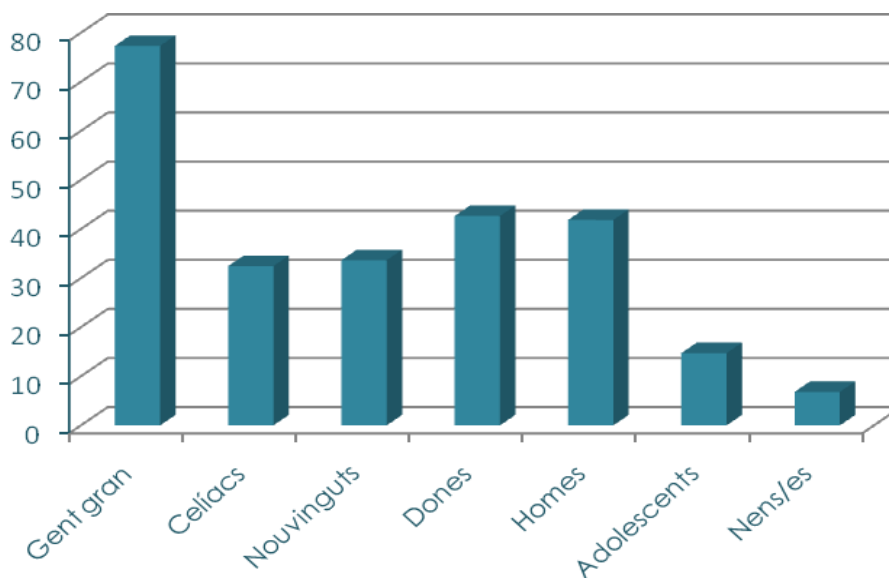
Taula 3.1 Resum del nombre, rangs d'edat i pes corporal de la mostra de població estudiada

Grups de població	N	Rangs d'edat (anys)	Pes corporal (kg)*
Gent gran	79	>65	73.7
Nouvinguts	56	17-51	67.7
Celíacs	70	16-75	58.7
Homes adults	336	20-65	81.1
Dones adultes	384	20-65	66.6
Adolescents	235	10-19	54.4
Nens i nenes	69	4-9	25.7
Infants	164	0-3	11.6

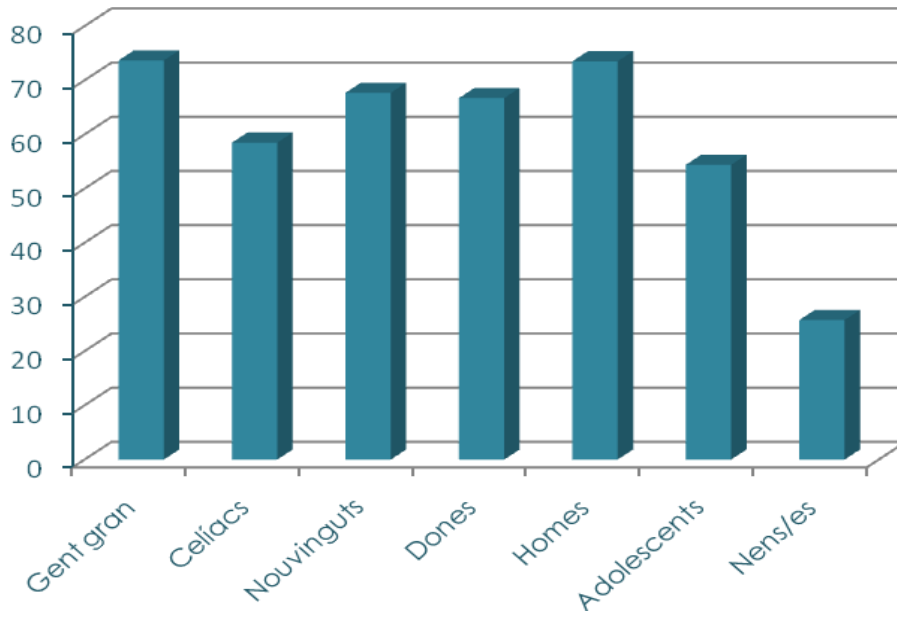
\* Mitjana de pes corporal de la mostra de cada grup de població



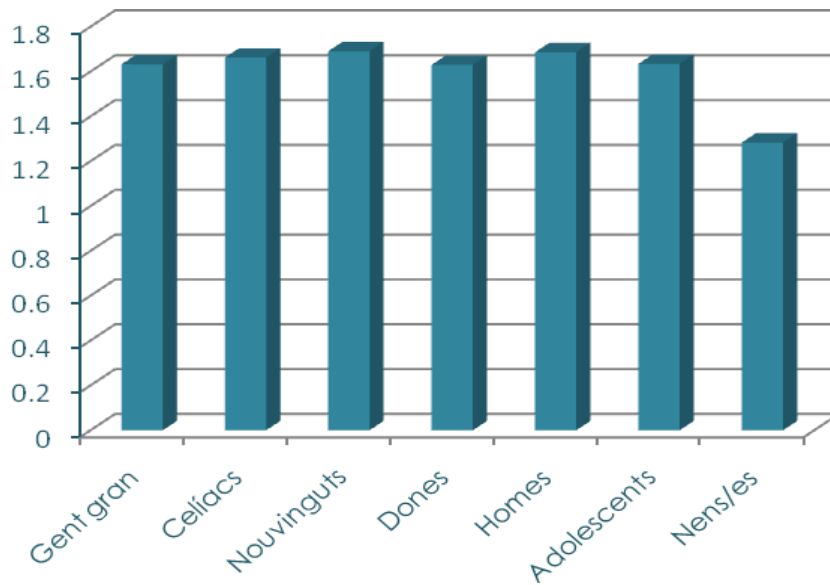
**Fig. 3.1 Agrupació dels diferents grups de població per sexes (%)**



**Fig. 3.2 Edat mitjana de cada grup de població (anys)**



**Fig. 3.3 Mitjana de pes per cada grup de població (kg)**



**Fig. 3.4 Alçada mitjana per cada grup de població (m)**

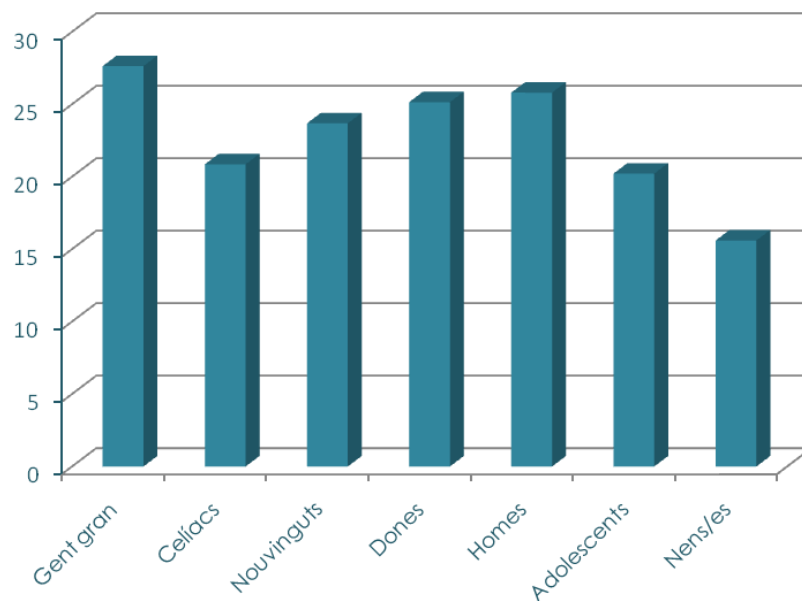


Fig. 3.5 Mitjana d'índex de massa corporal (IMC) per cada grup de població (kg m<sup>-2</sup>)

### 3.2 Ingesta estimada d'aliments

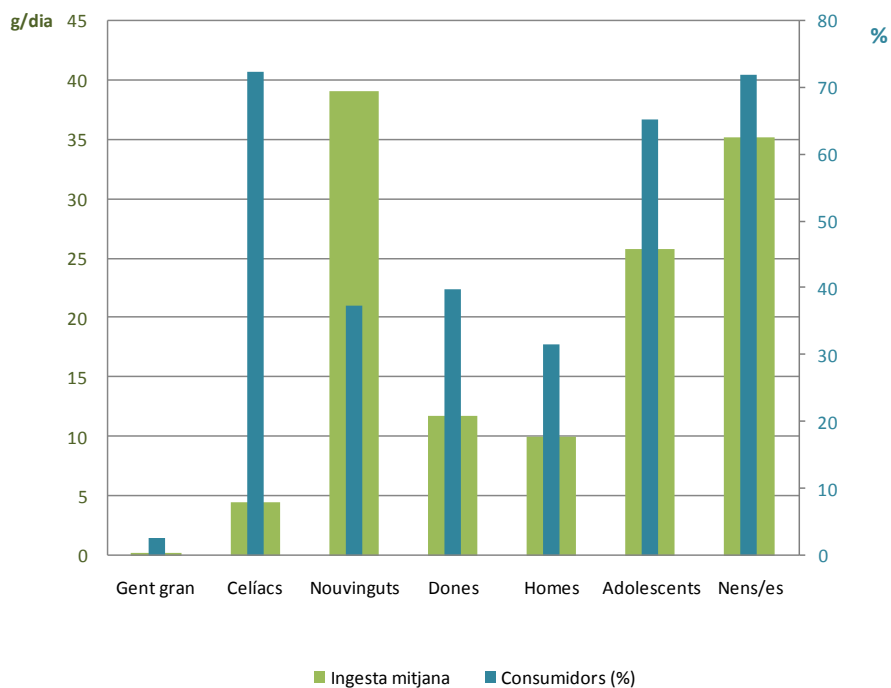


Fig. 3.6 Ingesta estimada de cereals d'esmorzar

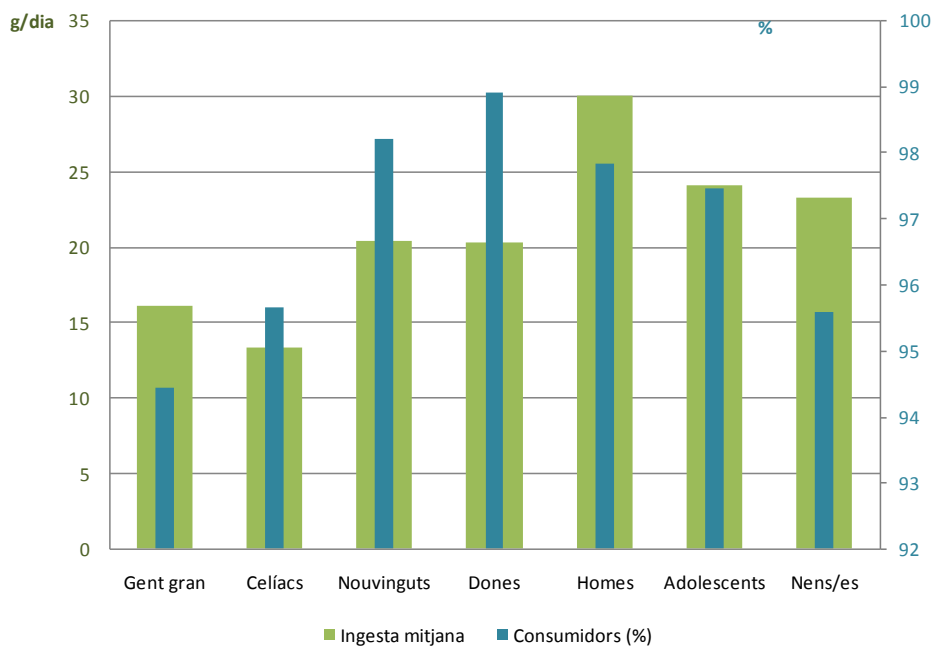


Fig. 3.7 Ingesta estimada de pasta

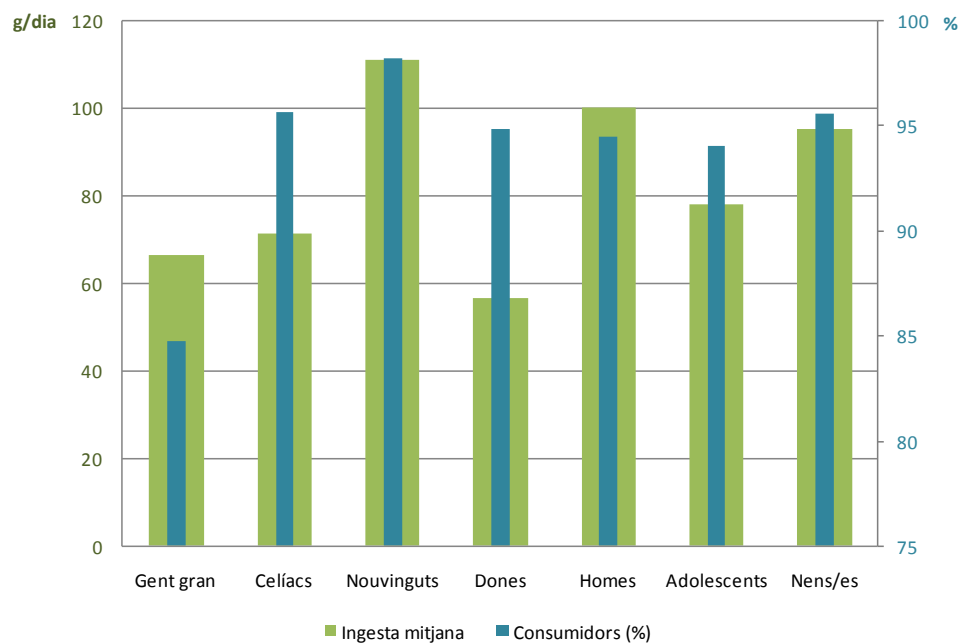
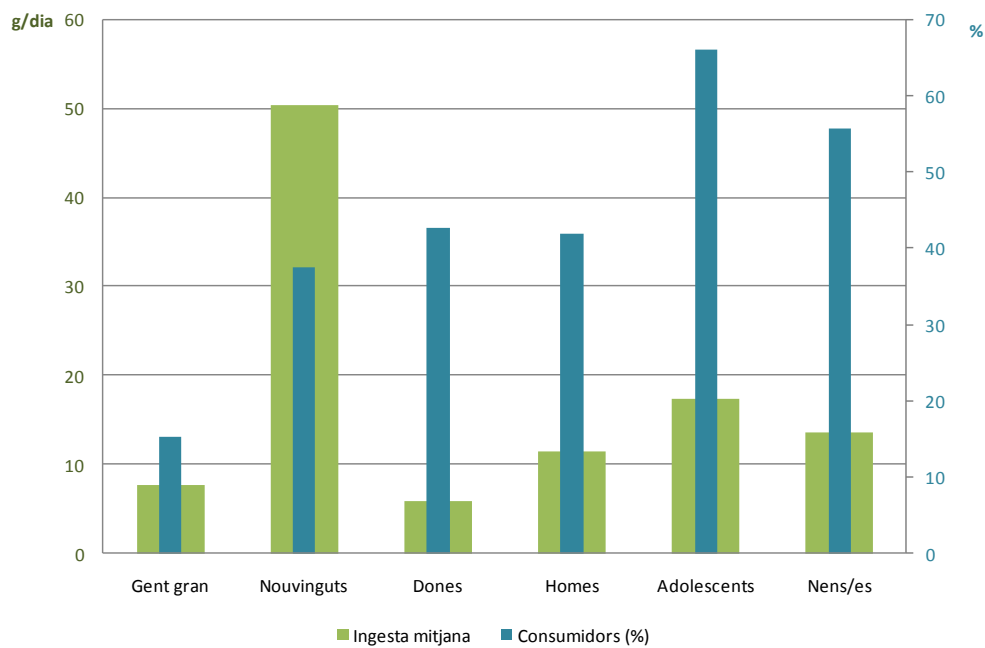
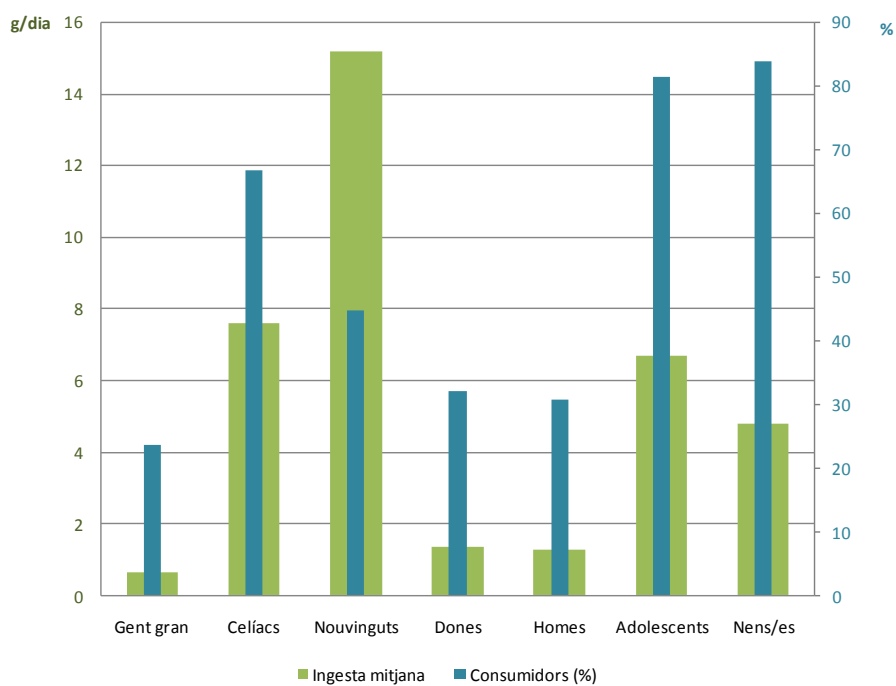


Fig. 3.8 Ingesta estimada de pa





**Fig. 3.9 Ingesta estimada de pa de motlle**



**Fig. 3.10 Ingesta estimada d'aperitius a base de panís**

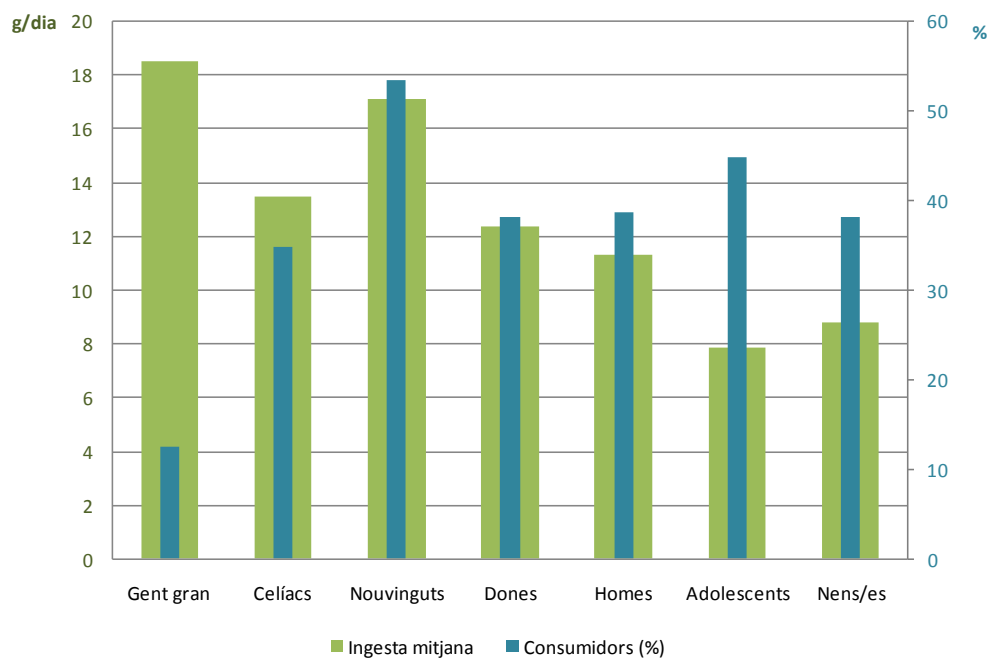


Fig. 3.11 Ingesta estimada de panís dolç

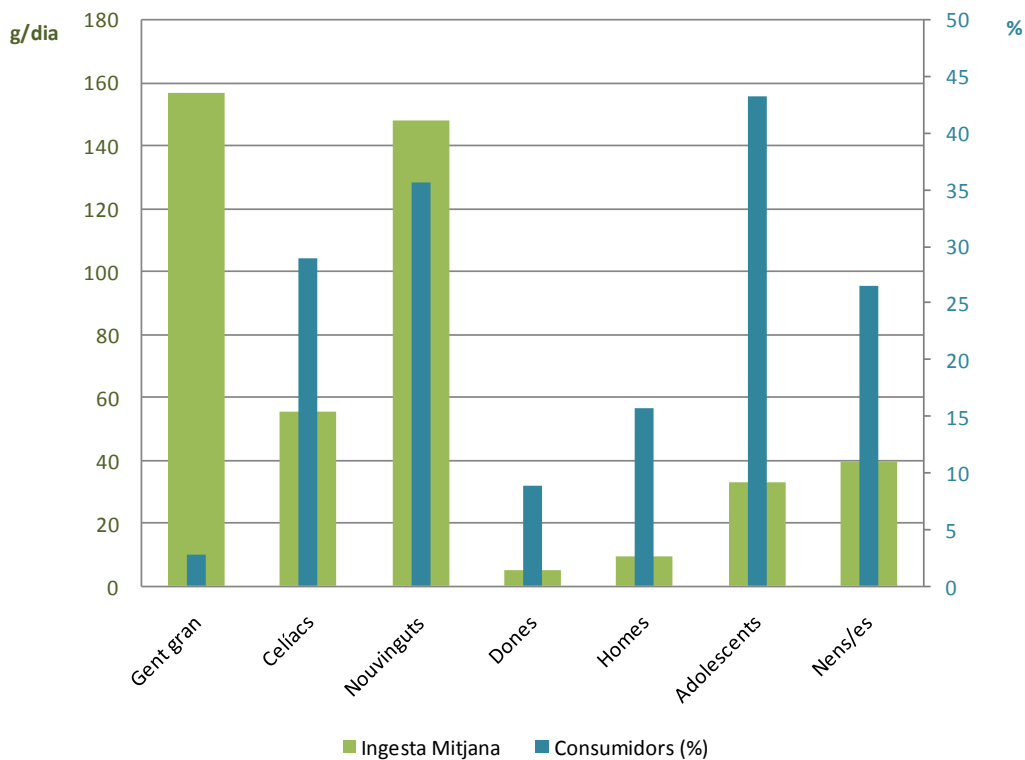
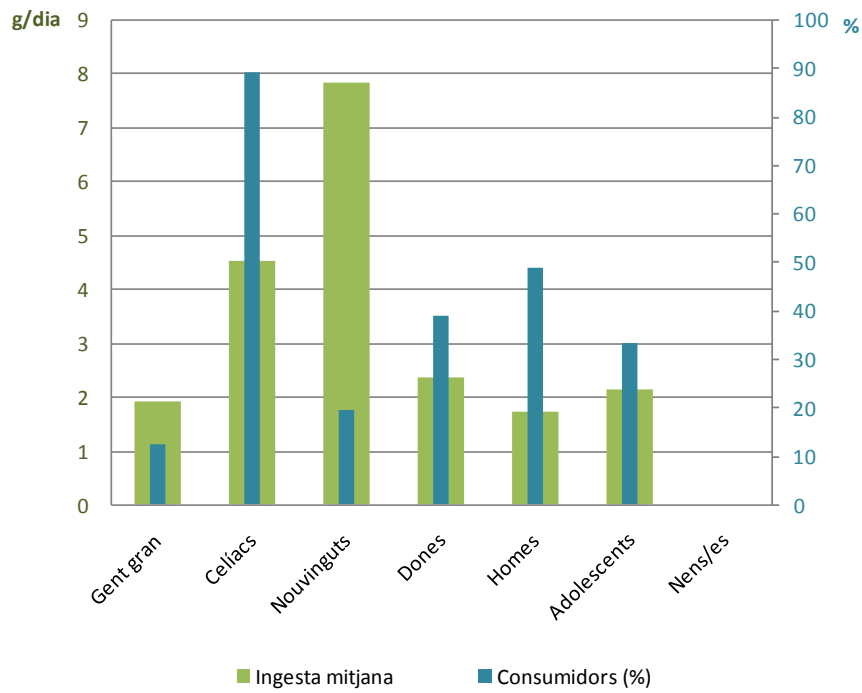
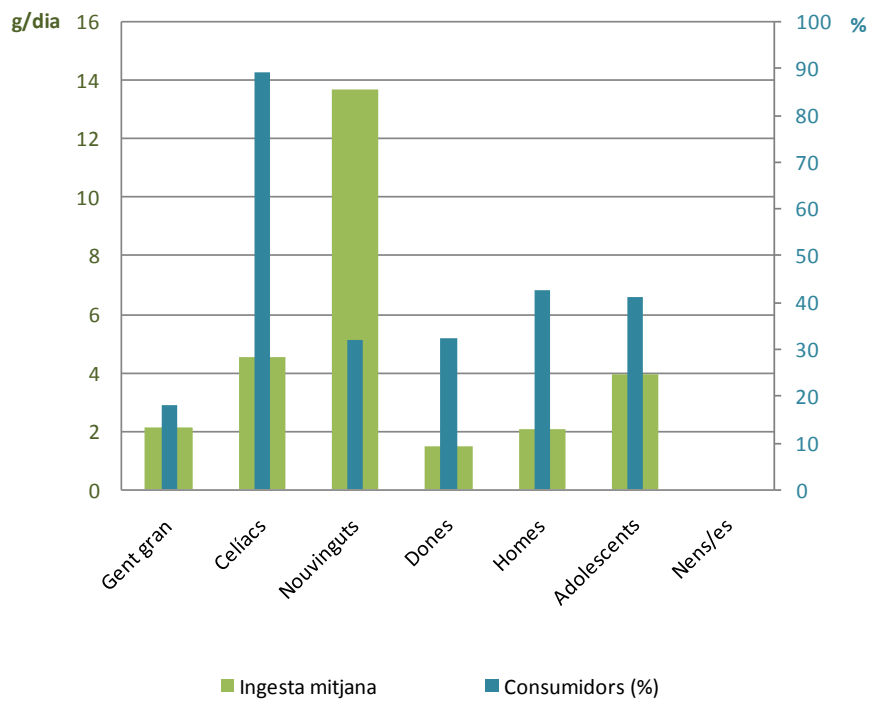


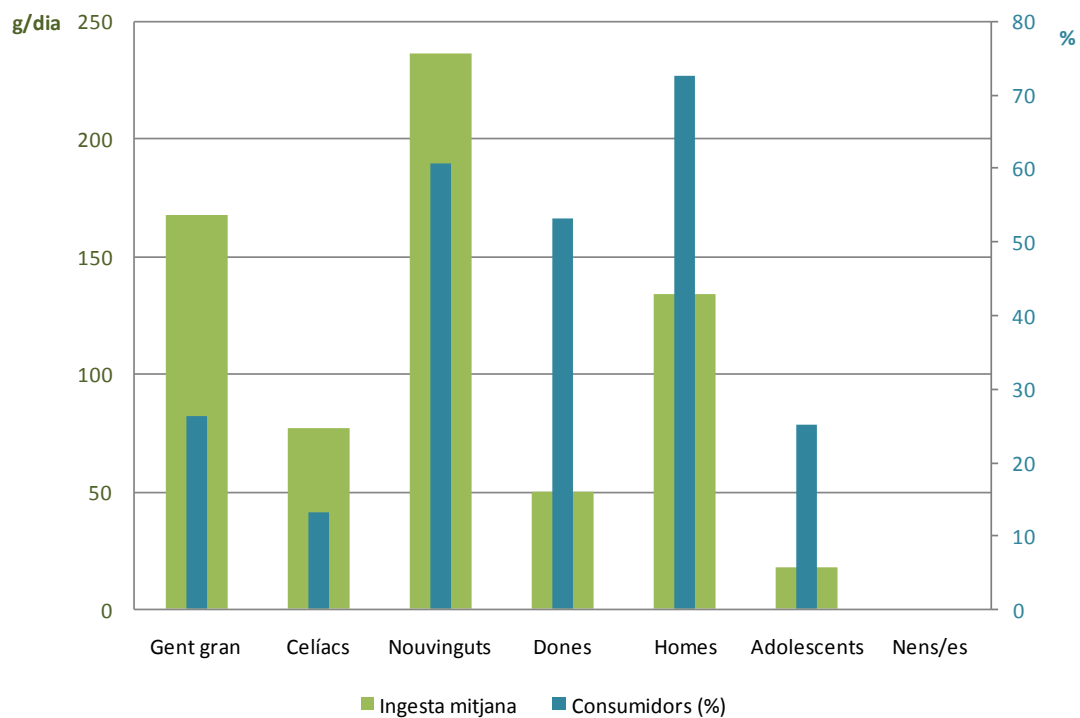
Fig. 3.12 Ingesta estimada de suc de poma



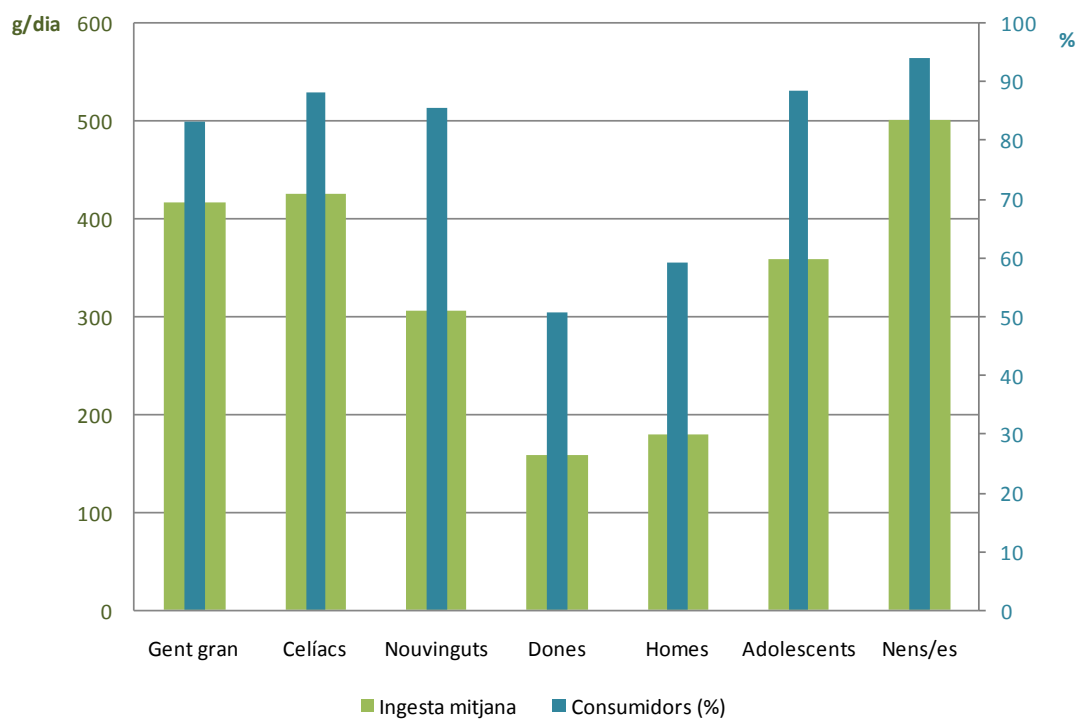
**Fig. 3.13 Ingesta estimada de festucs**



**Fig. 3.14 Ingesta estimada de cacauets**



**Fig. 3.15 Ingesta estimada de cervesa**



**Fig. 3.16 Ingesta estimada de llet**

# 4 Aflatoxines del grup B i G

El terme aflatoxina va ser proposat l'any 1962 per un dels seus descobridors per fer referència al fong que les produeix, *Aspergillus flavus*. Químicament són cumarines substituïdes, contenint anells de bifurà i configuració tipus lactona, comuns a totes elles (Fig. 4.1 i Fig. 4.2). Totes elles són molts fluorescents, propietat que s'usa com a base dels procediments analítics. Els pesos moleculars varien entre 312 i 350 g mol<sup>-1</sup>, i la majoria són poc solubles en aigua, podent ser extretes amb dissolvents orgànics moderadament polars, tal com el cloroform o el metanol. Les aflatoxines purificades en forma cristal·lina són bastant termoresistents, estables en un rang de pH d'entre 3 i 10, i els seus punts de fusió són superiors als 250 °C.

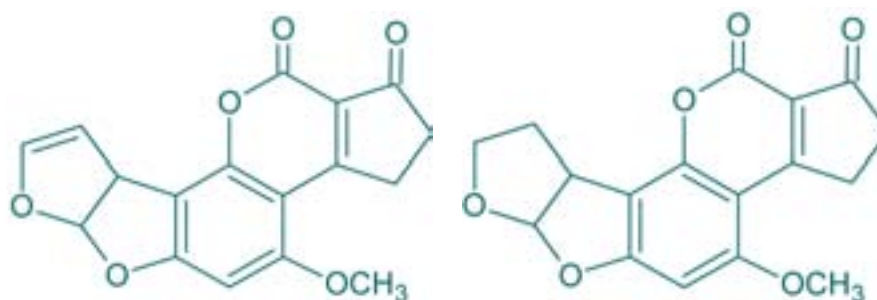


Fig. 4.1 Estructura molecular de les aflatoxines B<sub>1</sub> (esquerra) i B<sub>2</sub> (dreta)

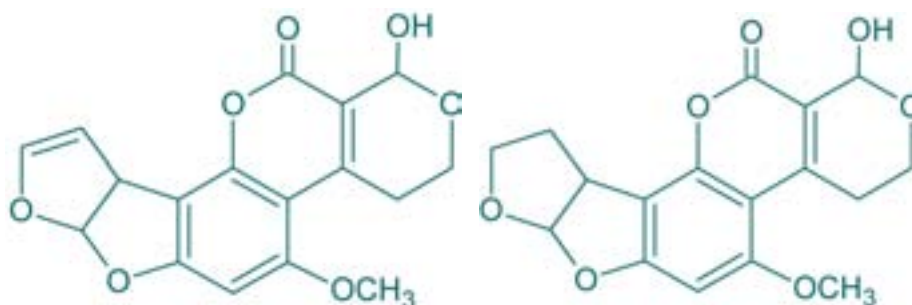


Fig. 4.2 Estructura molecular de les aflatoxines G<sub>1</sub>(esquerra) i G<sub>2</sub> (dreta)

Actualment s'han identificat 18 tipus d'aflatoxines, de les quals només 6 tenen significació com a contaminants dels aliments: les aflatoxines del grup B (B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub>), G (G<sub>1</sub> i G<sub>2</sub>) i M (M<sub>1</sub> i M<sub>2</sub>). La denominació 1 i 2 de cada grup fa referència a la seva mobilitat cromatogràfica relativa (Malone et al., 2000; Otta et al., 2000).

## Aflatoxines del grup B i G

La denominació de B i G ve donada per la capacitat d'emetre fluorescència sota la llum UV: B, color blau (Blue) i G, color verd (Green). L'aflatoxina B<sub>1</sub> al igual que la G<sub>1</sub>, són el resultat del metabolisme dels fongs micotoxigènics. Les aflatoxines B<sub>2</sub> i G<sub>2</sub> són obtingudes a partir de les B<sub>1</sub> i G<sub>1</sub>, respectivament, en medis fortament àcids. L'*aflatoxicol* s'obté directament del metabolisme *in vivo* i *in vitro* de la AFB<sub>1</sub> mitjançant les reductases NADPH dependents de les fraccions hepàtiques submitocondrials en humans i en alguns animals (aus, conills i truites).

Les aflatoxines del grup B i G són un grup de toxines produïdes per soques de diferents espècies del gènere *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* i *A. tamarii*). El creixement d'aquests fongs i la producció de toxines depèn de molts factors com el substrat, el grau d'acidesa, la temperatura o la humitat ambient així com la presència de microbiota competidora.

Les condicions òptimes de creixement d'*A. flavus* i *A. parasiticus*, són unes temperatures d'entre 25 i 35 °C, una humitat ambient d'entre 88 i 95 % i una activitat d'aigua alta. Tanmateix s'ha observat que *A. flavus*, pot proliferar a temperatures d'entre 10 i 43 °C, amb una activitat d'aigua entorn a 0,99 i la temperatura òptima per la producció de toxines oscil·la entre els 20 i 30 °C. Les pautes de comportament d'*A. parasiticus* són similars tot i que l'activitat d'aigua òptima de creixement és de 0.95-0.99 i per la producció de toxines és de 0.95-0.98, amb unes temperatures òptimes d'entre 30 i 28 °C.

El pH òptim per al creixement d'aquests fongs oscil·la entre 3,5 i 5,5. Un altre factor que influeix en el creixement dels fongs micotoxigènics i en la síntesi de micotoxines és la composició gasosa ambiental: una composició del 2% de CO<sub>2</sub> permet un bon creixement. Tanmateix, concentracions superiors al 10% aturen la producció d'aflatoxines (World Health Organization, 1998).

## 4.1 Vies d'exposició i toxicitat

Les condicions òptimes de creixement i producció de les micotoxines ocasionen una infecció fúngica i contaminació per aflatoxines generalitzada a totes les zones del món i en quasi la majoria d'aliments. Els aliments típicament més susceptibles a la contaminació amb aflatoxines són el blat, cacauets, festucs, nous del Brasil, llavors de cotó i la polpa de coco. També s'han trobat aflatoxines en altres llavors oleaginoses com el gira-sol i la soja, en olis vegetals sense refinar, en altres fruits secs com les ametlles, avellanes i nous, en espècies com el pebre roig, el pebre negre... en les fruites dessecades com les figues seques i les panses, al cafè i al cacau, a la resta de cereals i els seus productes derivats, i en pinsos.

L'aflatoxina B<sub>1</sub> és considerada la més important de totes, tant per la major concentració i freqüència d'aparició com per la seva potència tòxica. La toxina s'absorbeix en intestí prim i és transportada pels glòbuls vermells i les proteïnes plasmàtiques fins al fetge, entra a la cèl·lula i és metabolitzada en el reticle endoplasmàtic per a ser hidroxilada i transformada en altres metabòlits menys tòxics com les aflatoxines P<sub>1</sub>, M<sub>1</sub> i Q<sub>1</sub>.

El Comitè Científic de l'Alimentació Humana de la UE ha assenyalat que la AFB<sub>1</sub> és un agent cancerigen genotòxic que contribueix al risc de sofrir càncer hepàtic. La IARC ha classificat a la AFB<sub>1</sub> en el grup de substàncies tipus 1, degut a les evidències existents sobre el seu caràcter carcinogen. Les AFB<sub>2</sub> i AFG<sub>2</sub> tan sols s'han estudiat en animals, obtenint uns resultats insuficients per a ser classificades com a cancerígenes (IARC 2002).

La intoxicació aguda es dona quan s'ingereixen les aflatoxines en elevades concentracions. La presència de les aflatoxines en fetge provoca infiltració de lípids que ocasiona necrosis de les cèl·lules hepàtiques. Els metabòlits altament reactius que es formen per l'acció dels enzims amb activitat oxidasa del fetge, inhibeixen la síntesi de proteïnes cel·lulars, així com el metabolisme dels hidrats de carboni i dels lípids. S'observa anorèxia, depressió, icterícia, diarrea, fotosensibilització i en alguns casos la mort. També mostren efectes citotòxics degut a la inducció de la peroxidació lipídica al fetge provocant lesions oxidatives als hepatòcits. La AFB<sub>1</sub> pot inhibir l'activitat de la fosfodiesterasa nucleòtid cíclica del cervell, fetge, cor i teixits renals.

La intoxicació crònica és la més freqüent i és deguda al consum persistent d'aliments contaminats a baixes concentracions. En animals, els símptomes no són molt específics, observant una reducció en el increment de pes, un índex de conversió més baix, disminució de la producció d'ous i llet i major susceptibilitat a malalties infeccioses per la reactivitat amb les cèl·lules T i la disminució de l'activitat fagocítica dels macròfags. Les principals aflatoxicosis en humans s'han donat en països en vies de desenvolupament en els quals es donen les condicions òptimes per la producció de les toxines i els sistemes de gestió dels conreus/aliments no són els adequats.

## 4.2 Valors de referència

- Nivells de seguretat toxicològica  
Atès que les aflatoxines són genotòxiques i carcinogèniques, els comitès científics no han fixat un límit de seguretat (IDT) en base al nivell d'efecte advers no observable (NOAEL). En aquest cas, per realitzar una aproximació per caracteritzar el risc d'aquest grup de contaminants, l'EFSA (European Food Safety Authority) ha desenvolupat un mètode basat en la "dosis Benmarch" (BMD). La BMD s'obté per modelització, i representa una estimació de la dosi requerida per produir una resposta baixa vers el control (1-10%). El procediment es basa en dividir la "dosis Benmarch més baixa" (BMDL) entre la ingesta estimada d'aflatoxines, per tal d'obtenir l'indicador anomenat "marge d'exposició" (MOE).

La BMDL representa l'extrem més baix de l'estimació de la "dosis Benmarch" a un 95% de confiança. La BMDL<sub>10</sub> representa l'extrem més baix de la BMD que incrementa el risc de càncer un 10% sobre el control. La EFSA ha desenvolupat una BMDL<sub>10</sub> utilitzant dades de rates (170 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>) i utilitzant dades procedents d'estudis epidemiològics amb humans (870 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>). Tot seguit es calculen els marges d'exposició (MOEs), per a cada grup de població i per cada escenari d'incertesa, que són el ràtio entre un punt de la corba de dosi-resposta definit pels efectes adversos (en aquest cas el BMDL<sub>10</sub>) i l'exposició humana estimada (EFSA 2005, 2007).

- Límits màxims en aliments  
El Reglament (CE) N° 165/2010 de 26 de febrer de 2010 que modifica, en el que respecta a aflatoxines, el Reglament (CE) 1881/2006, el qual fixa



el contingut màxim de determinats contaminants en els productes alimentaris, estableix un valor màxim de  $2 \mu\text{g kg}^{-1}$  d'AFB<sub>1</sub> i  $4 \mu\text{g kg}^{-1}$  d'AF<sub>s</sub> (suma d'AFB<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> i G<sub>2</sub>) en cacauets i derivats de la seva transformació, destinats al consum humà directe o a ser emprats com ingredients en productes alimentaris; també per tots els cereals i tots els productes a base de cereals, inclosos els productes derivats de la transformació de cereals a excepció dels productes destinats a alimentació infantil, el límit dels quals es fixa en  $0.10 \mu\text{g kg}^{-1}$  d'AFB<sub>1</sub>. La concentració màxima d'AFB<sub>1</sub> i d'AFs en festuc i ametlles es fixa en 8 i  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivament. Quant a les espècies i els condiments, estableix un valor màxim de  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$  d'AFB<sub>1</sub> i  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  d'AF<sub>s</sub> (suma d'AFB<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> i G<sub>2</sub>) en els gèneres *Capsicum spp.*, *Piper spp.*, *Myristica fragrans*, *Zingiber officinale* i *Curcuma longa*.

### 4.3 Incidència i concentració d'aflatoxines en els aliments

Els resultats van mostrar una baixa presència d'aflatoxines en tots els productes, excepte en pebre vermell, festucs i cacauets, els quals van mostrar els percentatges més elevats de mostres positives (57 %, 20 % i 11 %, respectivament). En la resta de categories es van detectar en un baix percentatge de mostres, i no es va trobar en cap mostra d'aliments sense gluten ni d'aliments infantils (Taula 4.1 i Figs. 4.3 i 4.4).

Una mostra de festucs i dues de cacauets, mostraven valors de concentració que excedien els nivells permesos per la UE (10 i 4  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivament), amb valors màxims de 108,3  $\mu\text{g kg}^{-1}$  per als festucs i 7,7  $\mu\text{g kg}^{-1}$  per als cacauets, confirmant l'heterogènia presència de les aflatoxines.

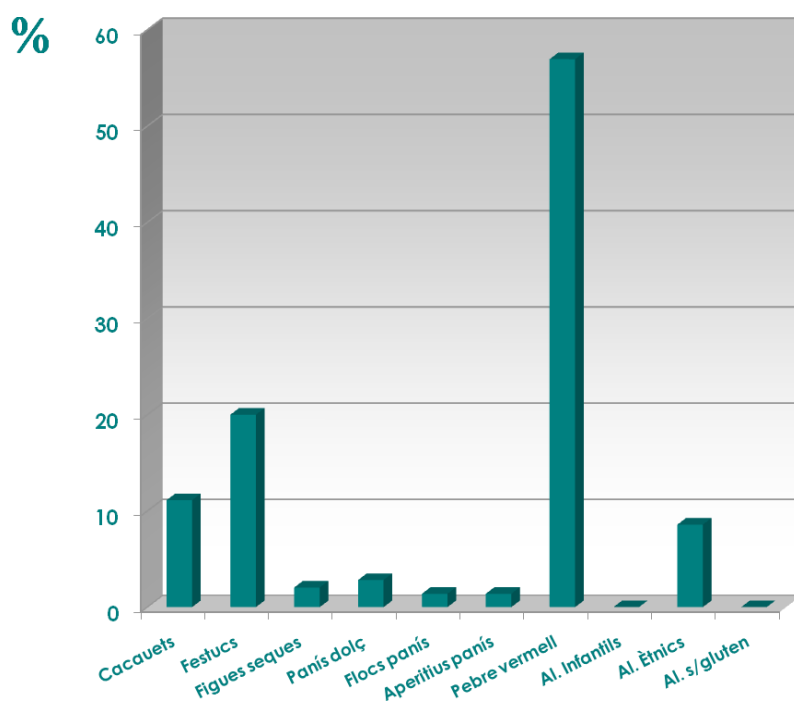
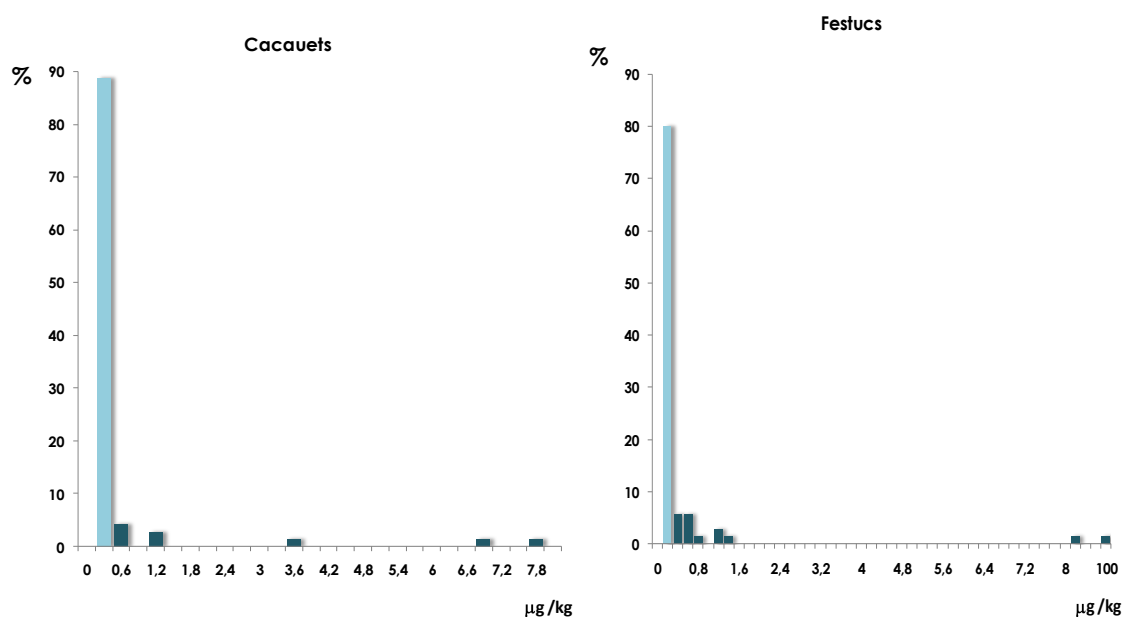


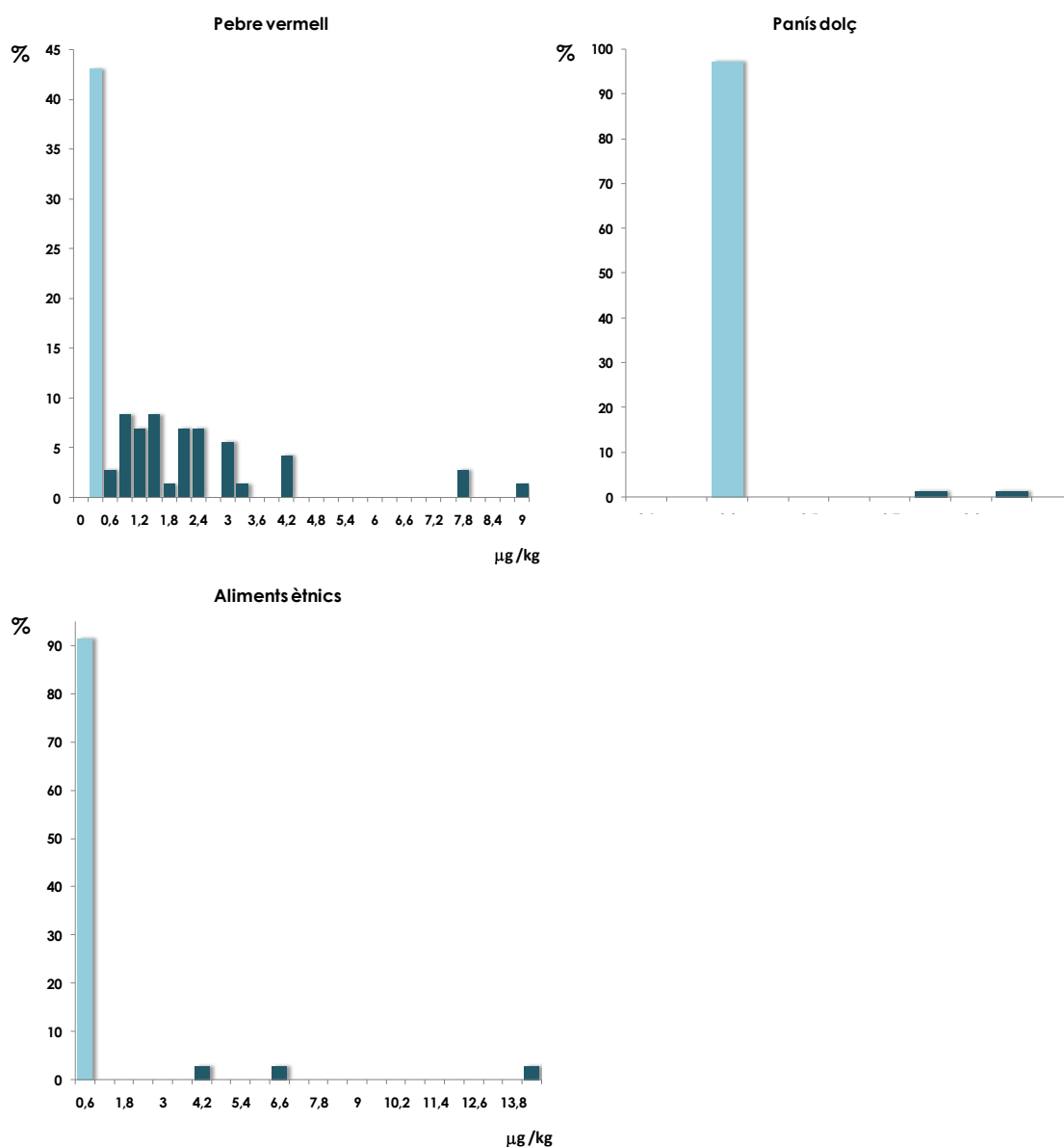
Fig. 4.3 Representació gràfica del percentatge de mostres per sobre del LQ d'aflatoxines totals

**Taula 4.1** Resum de les mostres analitzades, incidència i concentració mitjana i màxima de les mostres positives d'aflatoxines totals en cada categoria

Matrius	n individual	n "composite"	Positives*/total	Mitjana±DE $\mu\text{g kg}^{-1}$	Max $\mu\text{g kg}^{-1}$
Flocs de panís	167	72	1/72	0,50	0,50
Aperitiu panís	213	72	1/72	0,78	0,78
Panís dolç	181	71	2/71	0,87±0,14	0,97
Cacauets	212	72	8/72	2,66±3,02	7,68
Festucs	169	70	14/70	8,85±28,70	108,33
Figues seques	49	49	1/49	0,62	0,62
Pebre vermell	165	72	41/72	2,22±1,94	8,78
Aliments infantils	154	72	0/72	-	-
Aliments s/ gluten	28	28	0/28	-	-
Aliments ètnics	35	35	3/35	8,19±5,41	14,25

\* Positives: mostres per sobre del límit de quantificació (LQ)





Considerant l'escenari més conservador (ND=LD), els infants i els nens/es serien el grup de població més exposat, seguit de la població nouvinguda, mentre que la gent gran, en ambdós escenaris són el grup de població menys exposat a les aflatoxines.

**Taula 4.2 Ingesta diària estimada d'aflatoxines mitjançant el mètode directe**

Grup de població	Mitjana $\pm$ desviació estàndard (ng kg <sup>-1</sup> pc dia <sup>-1</sup> )	
	ND=0	ND=LOD
Gent gran	0,017 $\pm$ 0,042	0,044 $\pm$ 0,100
Celíacs	0,179 $\pm$ 0,232	0,534 $\pm$ 0,484
Nouvinguts	0,348 $\pm$ 0,435	0,714 $\pm$ 0,728
Dones adultes	0,057 $\pm$ 0,195	0,312 $\pm$ 0,521
Homes adults	0,058 $\pm$ 0,162	0,222 $\pm$ 0,311
Adolescents	0,140 $\pm$ 0,458	0,575 $\pm$ 0,761
Nens/es	0,020 $\pm$ 0,034	1,043 $\pm$ 1,185
Infants	0	1,265 $\pm$ 1,221

#### 4.5 Contribució dels aliments a la ingesta

La contribució dels diferents aliments a la ingesta d'AFs és força variable en funció de la substitució dels no detectats. En el cas dels nens/es són els flocs d'esmorzar el principal aliment que contribueix a la ingesta mentre que en els adults la fruita seca té un paper més important. En el cas dels nouvinguts, els aliments ètnics aporten un proporció majoritària d'aflatoxines en ambdós situacions estimades. La fruita seca, sobretot els festucs mostren una contribució important en la població adulta i adolescent, tanmateix el seu consum entre la població infantil és pràcticament nul (Figs. 4.5-4.10). S'ha de destacar que no s'han detectat aflatoxines en els aliments sense gluten i en els aliments infantils destinats als infants.

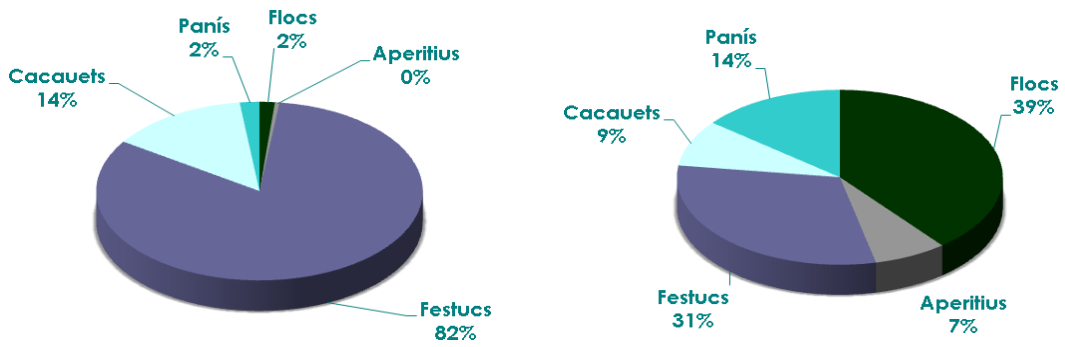


Fig. 4.5 Contribució dels diferents aliments analitzats a l'exposició global d'AFs per a la població celíaca (esquerra ND=0, dreta ND=LD)

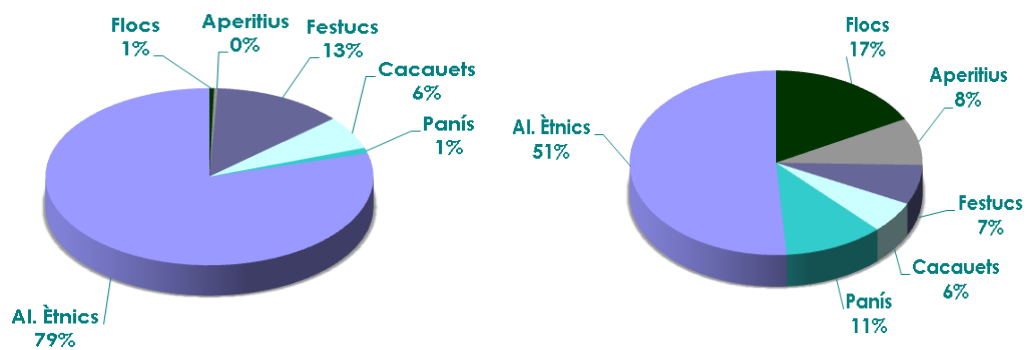


Fig. 4.6 Contribució dels diferents aliments analitzats a l'exposició global d'AFs per als nousvinguts (esquerra ND=0, dreta ND=LD)

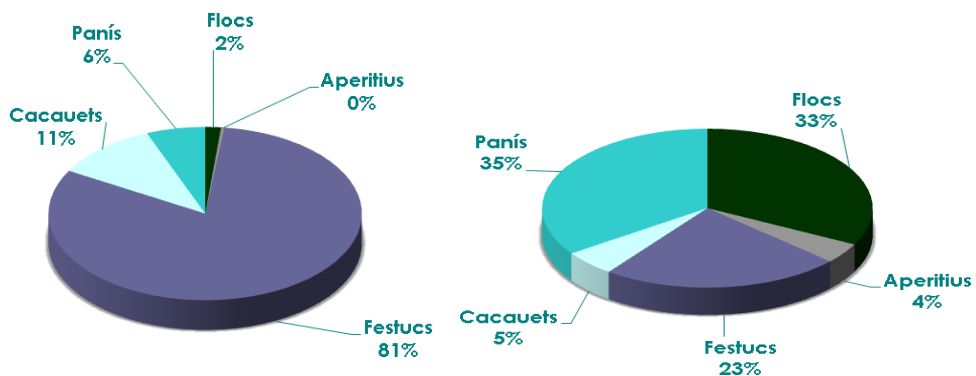


Fig. 4.7 Contribució dels diferents aliments analitzats a l'exposició global d'AFs per als homes adults (esquerra ND=0, dreta ND=LD)

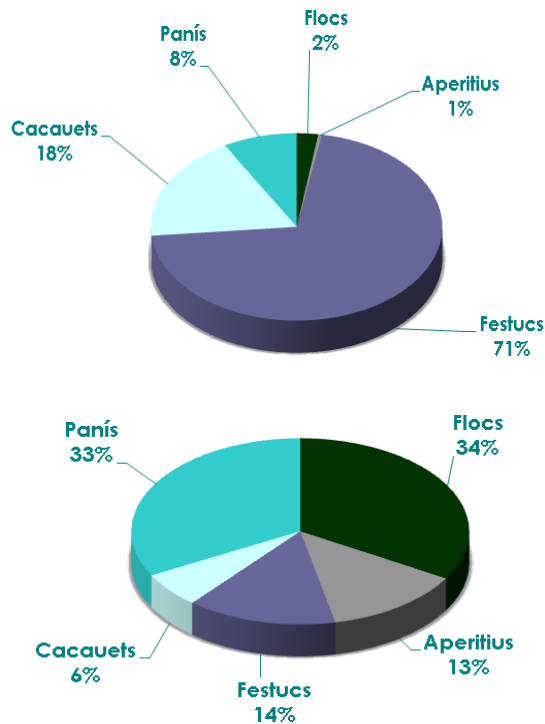


Fig. 4.8 Contribució dels diferents aliments analitzats a l'exposició global d'AFs per a les dones adultes (esquerra ND=0, dreta ND=LD)

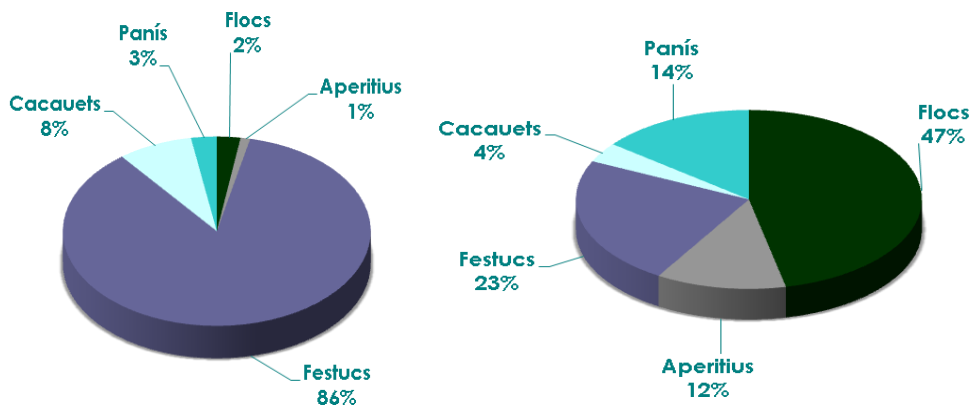


Fig. 4.9 Contribució dels diferents aliments analitzats a l'exposició global d'AFs per als adolescents (esquerra ND=0, dreta ND=LD)

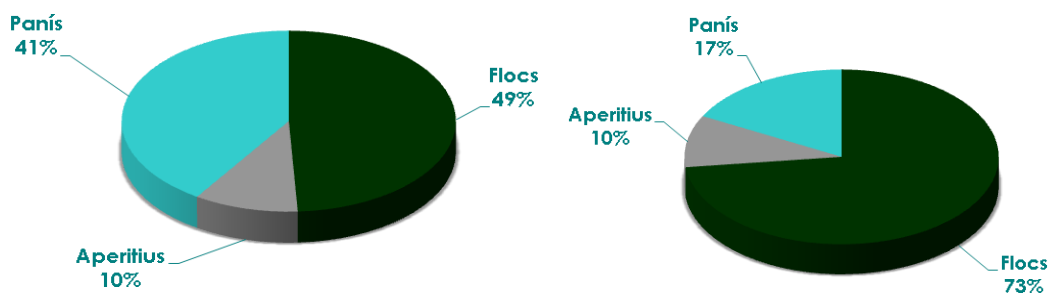


Fig. 4.10 Contribució dels diferents aliments analitzats a l'exposició global d'AFs per als nens/es (esquerra ND=0, dreta ND=LD)

#### 4.6 Estimació de l'exposició a les AFs mitjançant el mètode probabilístic

Degut el baix nombre de mostres contaminades, l'exposició estimada mitjançant el mètode probabilístic es va dur a terme combinant aleatòriament les distribucions d'ingesta dels diferents aliments amb la mitjana de contaminació estimada per a cada escenari d'incertesa, l'extrem baix substituint les mostres no detectades per zero i l'extrem alt, substituint les no detectades pel valor del límit de detecció.

Els resultats dels diferents estadístics es mostren en les taules 4.3-4.9 i les figures 4.11-4.17. Si comparem aquests resultats amb aquells estimats mitjançant el mètode directe, podem observar que no hi ha grans diferències. En alguns casos, com aquelles estimacions fetes substituint ND pel LD amb el mètode probabilístic, eren lleugerament inferiors que aquelles estimades amb el mètode directe. De forma similar al mètode directe, els infants, els nens/es i adolescents presentaven els valors més elevats, seguits per la població nouvinguda.

Taula 4.3 Diferents estadístics obtinguts per a l'estimació de l'exposició de la població celíaca a les AFs obtinguts mitjançant el model probabilístic

Celíacs	ND=0	ND=LD
N	10000	10000
Mitjana	0,172 [0,142; 0,204]	0,440 [0,382; 0,501]
Desviació estàndard	0,216 [0,170; 0,265]	0,404 [0,335; 0,477]
Asimetria	2,321	1,681
Curtosis	7,386	3,898
Mediana	0,093 [0,066; 0,121]	0,326 [0,265; 0,392]
Percentil 90	0,453 [0,343; 0,556]	0,981 [0,818; 1,141]
Percentil 95	0,624 [0,473; 0,751]	1,238 [1,005; 1,473]





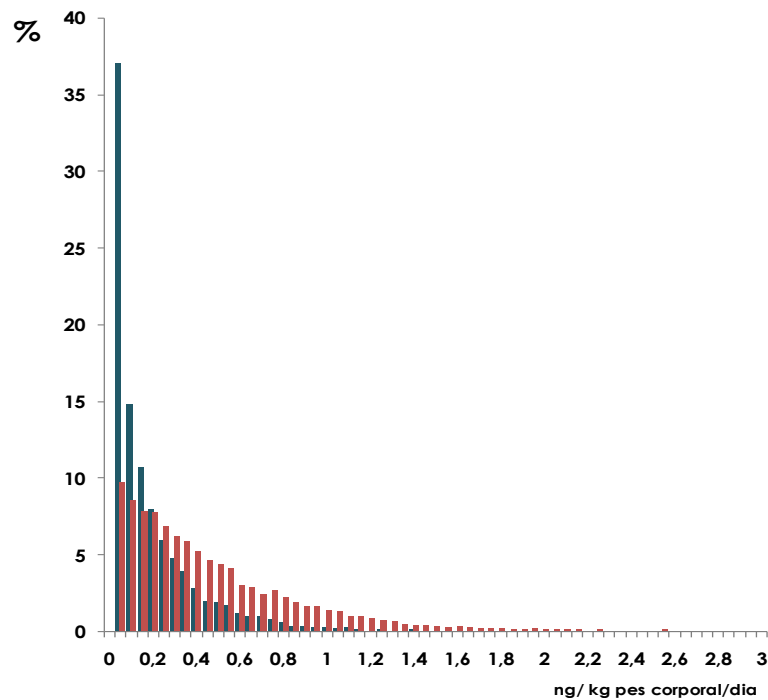
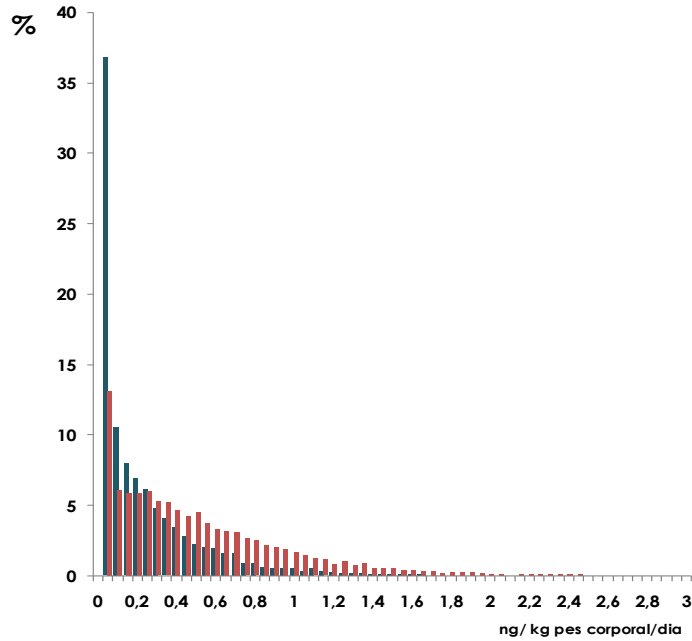


Fig 4.11 Histograma de freqüències relatives de l'estimació de l'exposició de la població celíaca a les AFs, obtingut a través del mètode probabilístic (en verd considerant ND=0, en vermell ND=LD)

Taula 4.4 Diferents estadístics obtinguts per a l'estimació de l'exposició de la població nouvinguda a les AFs obtinguts mitjançant el model probabilístic

Nouvinguts	ND=0	ND=LD
N	10000	10000
Mitjana	0,224 [0,183; 0,267]	0,495 [0,429; 0,564]
Desviació estàndard	0,287 [0,229; 0,350]	0,458 [0,382; 0,545]
Asimetria	2,202	1,615
Curtosis	6,639	4,032
Mediana	0,115 [0,755; 0,160]	0,374 [0,301; 0,457]
Percentil 90	0,601 [0,471; 0,723]	1,105 [0,925; 1,279]
Percentil 95	0,803 [0,625; 1,015]	1,382 [1,138; 1,636]



**Fig 4.12** Histograma de freqüències relatives de l'estimació de l'exposició de la població novinguda a les AFs, obtingut a través del mètode probabilístic (en verd considerant ND=0, en vermell ND=LD)

**Taula 4.5** Diferents estadístics obtinguts per a l'estimació de l'exposició de les dones adultes a les AFs obtinguts mitjançant el mètode probabilístic

Dones	ND=0	ND=LD
N	10000	10000
Mitjana	0,058 [0,043; 0,076]	0,182 [0,146; 0,221]
Desviació estàndard	0,113 [0,074; 0,156]	0,258 [0,201; 0,319]
Asimetria	4,167	2,452
Curtosis	24,310	8,121
Mediana	0,015 [0,010; 0,022]	0,076 [0,047; 0,109]
Percentil 90	0,161 [0,106; 0,223]	0,512 [0,386; 0,648]
Percentil 95	0,268 [0,169; 0,392]	0,717 [0,537; 0,899]

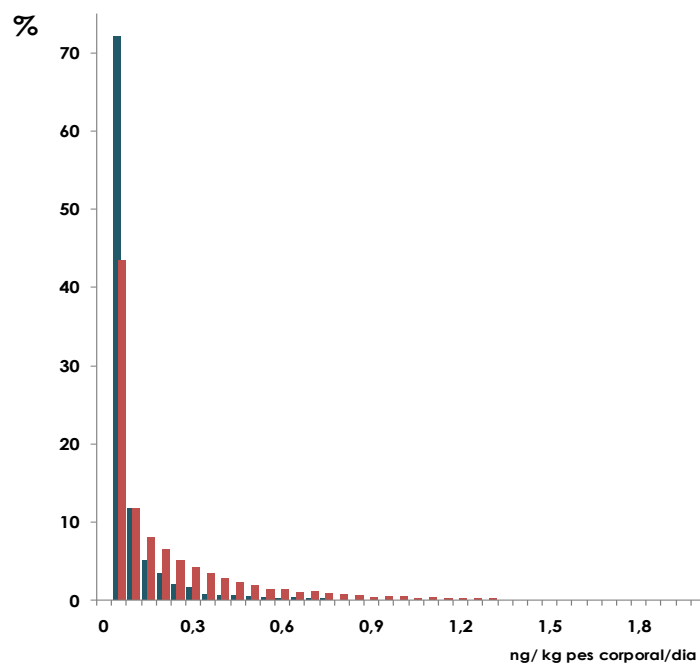
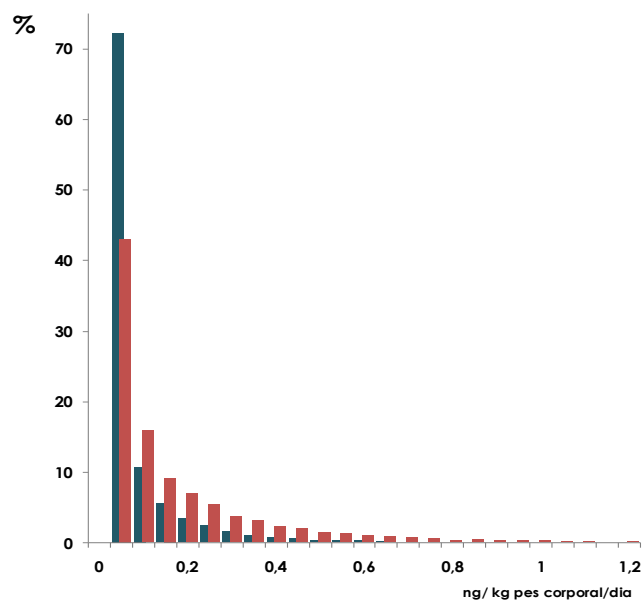


Fig 4.13 Histograma de freqüències relatives de l'estimació de l'exposició de les dones adultes a les AFs, obtingut a través del mètode probabilístic (en verd considerant ND=0, en vermell ND=LD)

Taula 4.6 Diferents estadístics obtinguts per a l'estimació de l'exposició dels homes adults a les AFs obtinguts mitjançant el mètode probabilístic

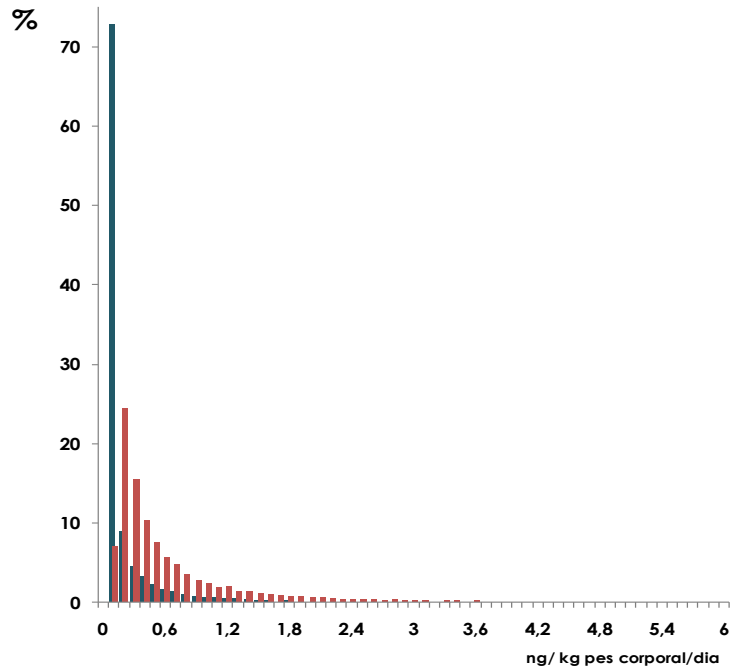
Homes	ND=0	ND=LD
N	10000	10000
Mitjana	0,058 [0,044; 0,074]	0,149 [0,121; 0,181]
Desviació estàndard	0,105 [0,073; 0,142]	0,205 [0,158; 0,254]
Asimetria	3,712	2,526
Curtosis	19,556	8,446
Mediana	0,017 [0,012; 0,024]	0,067 [0,048; 0,092]
Percentil 90	0,166 [0,112; 0,229]	0,409 [0,306; 0,511]
Percentil 95	0,263 [0,178; 0,359]	0,578 [0,428; 0,724]



**Fig 4.14** Histograma de freqüències relatives de l'estimació de l'exposició dels homes adults a les AFs, obtingut a través del mètode probabilístic (en verd considerant ND=0, en vermell ND=LD)

**Taula 4.7** Diferents estadístics obtinguts per a l'estimació de l'exposició dels adolescents a les AFs obtinguts mitjançant el model probabilístic

Adolescents	ND=0	ND=LD
N	10000	10000
Mitjana	0,144 [0,103; 0,191]	0,589 [0,490; 0,701]
Desviació estàndard	0,304 [0,198; 0,422]	0,726 [0,520; 0,951]
Asimetria	4,259	3,294
Curtosis	25,489	15,471
Mediana	0,028 [0,019; 0,039]	0,327 [0,266; 0,397]
Percentil 90	0,422 [0,258; 0,610]	1,387 [1,059; 1,750]
Percentil 95	0,730 [0,451; 1,029]	1,978 [1,448; 2,557]



**Fig 4.15** Histograma de freqüències relatives de l'estimació de l'exposició dels adolescents a les AFs, obtingut a través del mètode probabilístic (en verd considerant ND=0, en vermell ND=LD)

**Taula 4.8** Diferents estadístics obtinguts per a l'estimació de l'exposició dels nens/es a les AFs obtinguts mitjançant el model probabilístic

Nens/es	ND=0	ND=LD
N	10000	10000
Mitjana	0,020 [0,017; 0,024]	0,871 [0,732; 1,023]
Desviació estàndard	0,026 [0,019; 0,034]	0,998 [0,798; 1,223]
Asimetria	3,180	2,138
Curtosis	15,322	6,684
Mediana	0,012 [0,009; 0,015]	0,536 [0,387; 0,684]
Percentil 90	0,048 [0,037; 0,061]	2,165 [1,727; 2,624]
Percentil 95	0,070 [0,050; 0,093]	2,898 [2,233; 3,511]

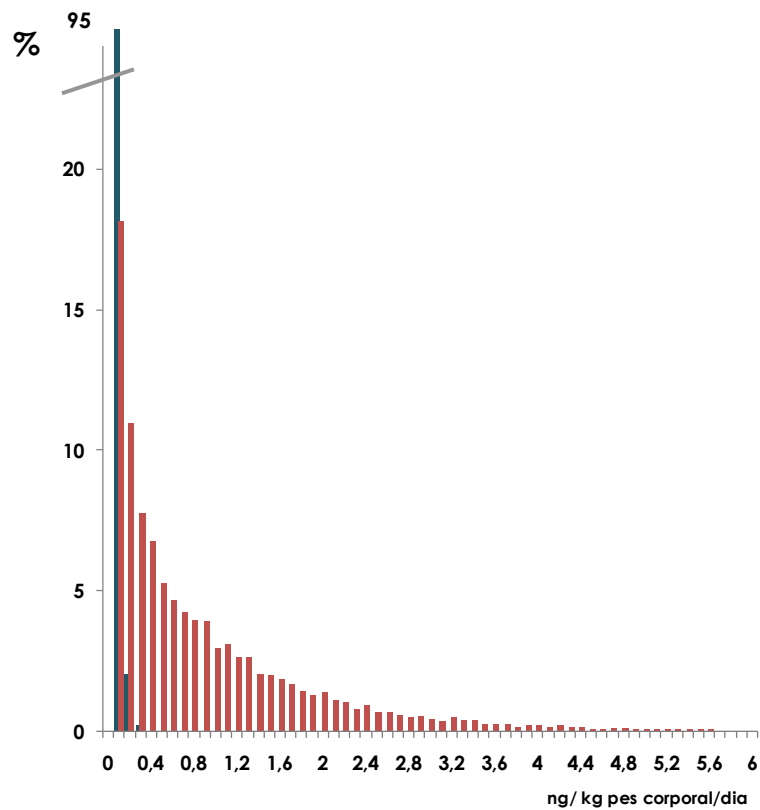
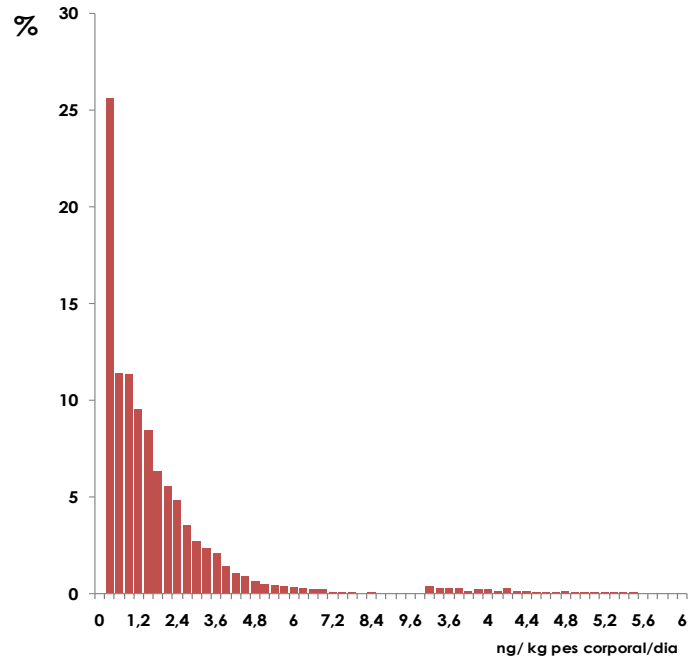


Fig 4.16 Histograma de freqüències relatives de l'estimació de l'exposició dels nens/es a les AFs, obtingut a través del mètode probabilístic (en verd considerant ND=0, en vermell ND=LD)

Taula 4.9 Diferents estadístics obtinguts per a l'estimació de l'exposició dels infants a les AFs obtinguts mitjançant el model probabilístic

Infants	ND=0	ND=LD
N	10000	10000
Mitjana	-	1,312 [1,092; 1,545]
Desviació estàndard	-	1,344 [1,080; 1,637]
Asimetria	-	1,693
Curtosis	-	4,150
Mediana	-	0,959 [0,712; 1,224]
Percentil 90	-	3,108 [2,487; 3,720]
Percentil 95	-	3,915 [3,161; 5,027]



**Fig 4.17 Histograma de freqüències relatives de l'estimació de l'exposició dels infants a les AFs, obtingut a través del mètode probabilístic (en vermell ND=LD)**

#### 4.7 Avaluació del risc

Els marges d'exposició (MOEs) es representen gràficament en la figura 4.18 i es mostren en detall en la taula 4.7 per la mitjana i el percentil 95, en dos escenaris hipotètics d'exposició, calculats dividint la BMDL<sub>10</sub> de 870 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup> per l'exposició de cada grup de població. Es pot observar una àmplia variabilitat en l'estimació dels MOEs en funció de la hipòtesi emprada. Considerant que les mostres no detectades tinguessin un valor igual a zero, els MOEs són superiors o pròxims a 10.000 per a la mitjana de la població, valor per al qual, l'EFSA va determinar que la AFB<sub>1</sub> no contribueix al mecanisme de carcinogènesi. Si es considera que les mostres no detectades tinguessin un valor igual la límit de detecció, els MOEs són superiors o pròxims a 1.000 per a la mitjana de la població. Tenint en compte que les aflatoxines es van detectar solament en un 14% de les mostres (composites) d'aliments destinats a població no infantil ni celíaca, i que no es van detectar cap dels aliments destinats al infants i celíacs, l'exposició real més probable per a tots els grups de població és el que s'acosta als valors obtinguts utilitzant la hipòtesi d'assignar el valor zero a les mostres no detectades (ND=0), especialment en el cas del infants, els quals només ingereixen aliments infantils..



**Taula 4.10 Valors dels MOEs calculats dividint la BMDL<sub>10</sub> de 870 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup> per l'exposició estimada per a cada grup de població en ambdós escenaris d'incertesa**

	Mitjana		p95	
	ND=0	ND=LD	ND=0	ND=LD
Celíacs	5058	1977	1394	703
Nouvinguts	3884	1758	1083	630
Dones	15000	4780	3246	1213
Homes	15000	5839	3308	1505
Adolescents	6042	1477	1192	440
Nens/es	43500	999	12429	300
Infants	>10 <sup>6</sup>	663	>10 <sup>6</sup>	222

La potència carcinògena mitjana de l'AFB<sub>1</sub> en regions europees amb baixa prevalença de portadors de virus de l'hepatitis B (VHB) va ser estimada per la WHO en 0,013 càncers/any per cada 100000 habitants per ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup> (potència mitjana = 0,01 x 0,99 + 0,3 x 0,01). En el present treball es va estimar el risc de cada grup de població multiplicant l'exposició mitjana per la potència carcinògena (Veure taula 4.8), mostrant valors molt baixos en la línia d'altres estimacions fetes en les regions europees. Aquestes estimacions confirmen la baixa contribució de les aflatoxines en la prevalença de càncer de fetge en aquesta regió (EFSA, 2007).

**Taula 4.11 Estimació de la prevalença de càncer entre els diferents grups de població, considerant una potència mitjana per AFB<sub>1</sub> de 0,013 càncers any<sup>-1</sup> per cada 100.000 habitants per ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup> (WHO, 1998) per a població de baixa prevalença de portadors de HBV i baixa presència de mostres contaminades per l'aflatoxina B<sub>1</sub>**

**Càncers any<sup>-1</sup> per cada  
100.000 habitants**

Celíacs	0,002-0,006
Nouvinguts	0,003-0,006
Dones	0,001-0,002
Homes	0,001-0,002
Adolescents	0,002-0,008
Nens/es	<0,000-0,011

#### 4.8 Altres estudis d'exposició

Aquests resultats estan en la línia dels que es van publicar en el Primer Estudi de Dieta Total Francès, els resultats del qual, per a la mitjana dels adults i dels nens/es, era de 0,117 i 0,323 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>, respectivament, mentre que el percentil 95 es va estimar en 0,345 i 0,888 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup> (Leblanc et al., 2005). El Segon Estudi de Dieta Total Francès va estimar una ingesta mitjana per als adults de 0,0019 i 0,89 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>, i per als nens, 0,0013 i 1,56 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>, mentre que el percentil 95 es va estimar en 0,012 i 1,54 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup> per als adults i 0,008 i 2,96 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup> per als nens (ANSES,2011).

Resultats similars es van estimar per als australians, 0,15 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup> i pels nord-americsans, 0,26 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup> (WHO, 1998). Els informes per als membres de la Unió Europea (SCOOP, 1996), estimaven l'exposició diària dels europeus a l'AFB<sub>1</sub>, entre 0,03 i 1,28 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>, també en la línia dels resultats aquí presentats. Thuvander et al., (2001) va estimar valors més alts que els nostres per a la població sueca, amb una exposició mitjana estimada de 0,8 i 2,1 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup> per al percentil 95. Valors marcadament més elevats s'han estimat per a la població xinesa, amb un rang entre 0 i 91 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup> (Chen, 1997) o per la coreana, amb un rang entre 1,19 i 5,79 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup> (Park et al., 2004).

#### 4.9 Referències

Comissió Europea (CE). 2006. Reglament (CE) N° 1881/2006 of 19/12/2006. Official Journal of the European Union, L364, 5-24.

Comissió Europea (CE). 2010. Reglament (CE) N° 165/2010 of 26/02/2010. Official Journal of the European Union, L50, 8-12.

EFSA (European Food Safety Authority). 2005. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to A Harmonised Approach for Risk Assessment of Substances Which are both Genotoxic and Carcinogenic. EFSA Journal 282, 1-31.

EFSA (European Food Safety Authority). 2007. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products. EFSA Journal 446, 1 - 127

IARC (International Agency for Research on Cancer). 2002. Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans (Lyon: IARC), Vol. 82, p. 171.

Leblanc J, Tard A, Volatier J, Verger P. 2005. Estimated dietary exposure to principal food mycotoxins from The First French Total Diet Study. Food Addit Contam. 22:652-72.

Malone BR, Humphrey CW, Romer TR, Richard JL. 2000. Determination of Aflatoxins in Grains and Raw Peanuts by a Rapid Procedure with Fluorometric Analysis. J AOAC Int. 83:95-98.

Otta KH, Papp E, Bagöcsi B. 2000. Determination of aflatoxins in food by overpressured-layer chromatography. J Chromatogr A. 882:11-16.

Park JW, Kim EK, Kim YB. 2004. Estimation of the daily exposure of Koreans to aflatoxin B<sub>1</sub> through food consumption. Food Addit Contam. 21:70-75.

Scientific Cooperation on Questions Relating to Food Projects (SCOOP). 1996 Working Document in Support of a SCF Risk Assessment of Aflatoxin Scientific Cooperation On Questions Relating to Food Projects, Task 3.2.1 (SCOOP/CNTM/1), Task Co-ordinator, UK.

Thuvander A, Möller T, Barbieri H, Jansson A, Salomonsson A, Olsen M. 2001. Dietary intake of some important mycotoxins by the Swedish population. Food Addit Contam. 18:696-706.

World Health Organization (WHO). 1998. Aflatoxins. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. WHO Food Additive Series N°. 40. Report of the 49th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Geneva: WHO. pp 359–468.

Étude de l'alimentation totale française 2 (EAT 2) Tome 1. Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, Environnement et Travail (ANSES),. Juin 2011.

# 5 Aflatoxina M<sub>1</sub>

L'any 1963 un grup d'investigadors va observar que vaques alimentades amb pinso contaminat amb AFB<sub>1</sub>, produïen una llet que contenia unes substàncies que produïen efectes tòxics en ànecs similars als que produïa l'AFB<sub>1</sub>. Posteriorment, l'any 1966, les van aïllar i anomenar com aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) i aflatoxina M<sub>2</sub> (AFM<sub>2</sub>), determinant les seves estructures i conclouent que eren la forma hidroxilada de l'AFB<sub>1</sub> i l'AFB<sub>2</sub> respectivament.

L'AFM<sub>1</sub> (Fig. 5.1) és el derivat metabòlic més important de l'AFB<sub>1</sub>, produït per l'activitat del citocrom P450, variant la seva concentració en els teixits i en la llet en funció de la quantitat d'AFB<sub>1</sub> ingerida, la durada del consum d'aliment contaminat i l'estat de salut de l'animal. L'AFM<sub>1</sub> es detecta en llet entre 12 i 24 hores després de la ingestió de l'AFB<sub>1</sub>. El sistema metabòlic dels animals poligàstrics provoca que les concentracions d'AFM<sub>1</sub> en llet varïïn entre animals, d'una dia a l'altre, i d'una producció de llet a l'altra. El nivell d'AFM<sub>1</sub> en llet és proporcional al nivell d'AFB<sub>1</sub> en el pinso consumit. També s'ha observat una variació estacional de la contaminació de la llet, amb un increment de la micotoxina durant el període hivernal vinculat directament amb l'increment de pinso en la dieta de l'animal (JECFA, 2001; Prandini et al., 2009; Yousef et al., 1989).

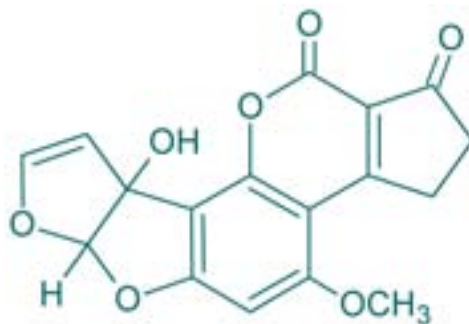


Fig. 5.1 Estructura molecular de l'aflatoxina M<sub>1</sub>

## 5.1 Vies d'exposició i toxicitat

Les principals vies d'exposició, segons el patró alimentari de la població d'estudi, són la llet i els derivats lactis, entre els quals destaquen el iogurt i el formatge. En molts estudis, sobretot en aquells realitzats en països en vies de desenvolupament, s'ha observat que la presència de la toxina està relacionada amb les condicions de temperatura i humitat que faciliten el creixement dels fongs en el pinso.

L'AFM<sub>1</sub> produeix efectes tòxics aguts similars a l'AFB<sub>1</sub> en ànecs i rates. En un estudi realitzat en ànecs, la DL<sub>50</sub> per a les dues micotoxines va ser de 12-16 µg kg<sup>-1</sup>. També es va observar que produeixen lesions hepàtiques i necrosis dels túbuls renals. Té una TD<sub>50</sub> (dosi de micotoxina amb la qual el 50% dels individus poden desenvolupar tumors malignes) de 10,38 µg kg<sup>-1</sup> pc/dia, és a dir, una potència carcinògena deu vegades inferior a la d'AFB<sub>1</sub>. L'any 1993 va ser classificada per la IARC com a possible carcinogen en humans (grup 2B) (IARC, 1993).

## 5.2 Valors de referència

- Nivells de seguretat toxicològica

L'avaluació de la seguretat toxicològica que realitza la JECFA, es basa en l'estimació d'un nivell de seguretat anomenat nivell d'ingesta tolerable. Aquesta aproximació no és aplicable en contaminants en els quals la carcinogenicitat es la base de l'efecte tòxic, com és el cas de les aflatoxines. En la gestió del risc d'aquestes toxines no hi ha un llindar de risc conegut, per tant la JECFA recomana que el nivell sigui "tant baix com sigui possible tecnològicament" (ALARA). En el present estudi, es compara el nivell d'exposició dels diferents grups de població amb un valor de seguretat de 1 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>, emprat en altres estudis de dieta total per ser un nivell que no contribueix al risc de càncer de fetge (Leblanc et al., 2005).

- Límits màxims en aliments

El Reglament (CE) N° 1881/2006 de la Comissió de 19 de desembre de 2006 i posteriorment el Reglament (CE) N165/2010, estableixen un valor màxim de 50 ng kg<sup>-1</sup> en llet crua, llet tractada tèrmicament i llet destinada a la fabricació de productes lactis. Quant a preparats per a lactants i preparats de continuació, inclosos llet per aquestes edats, així com els aliments dietètics destinats a usos

mèdics especials dirigits específicament als lactants, els valors màxims són de 25 ng kg<sup>-1</sup> (Comissió Europea, 2006, 2010).

### 5.3 Incidència i concentració d'aflatoxina M<sub>1</sub> en els aliments

Els valors d'incidència es representen en les figures 5.2 i 5.3, mentre els valors de concentració es poden observar en la taula 5.1. L'AFM<sub>1</sub> es va detectar en el 94,4 % de les mostres analítiques de llet sencera UHT per sobre del nivell de detecció de 5 ng kg<sup>-1</sup>, mentre que no es va detectar en les mostres de formatge i només en 2 de les 72 mostres de iogurt (LD = 25 ng kg<sup>-1</sup>). Tot i els elevats valors d'incidència en llet, la concentració mitjana de les mostres positives va ser de 9,69±2,1 ng kg<sup>-1</sup>, lluny dels límits de la UE (50 ng kg<sup>-1</sup>). El valor màxim en llet va ser de 13,6 ng kg<sup>-1</sup>, mentre que en iogurt va assolir el nivell de 51,6 ng kg<sup>-1</sup>.

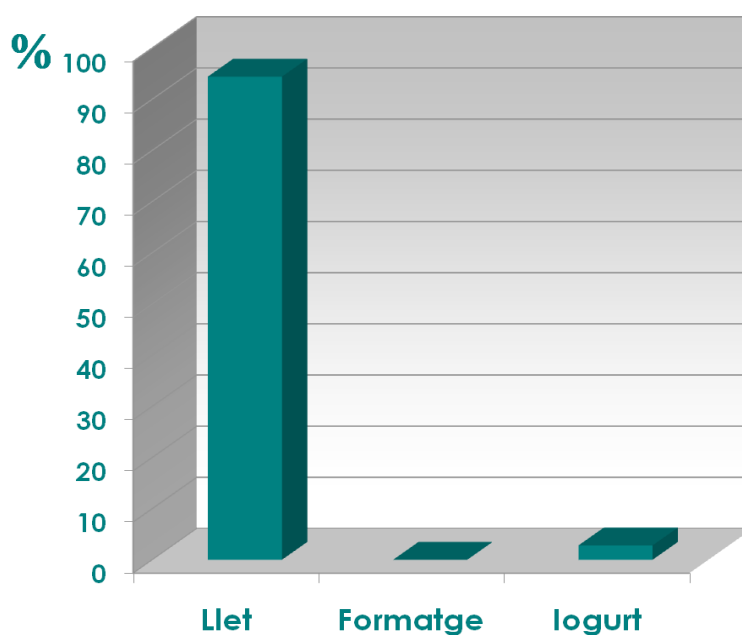
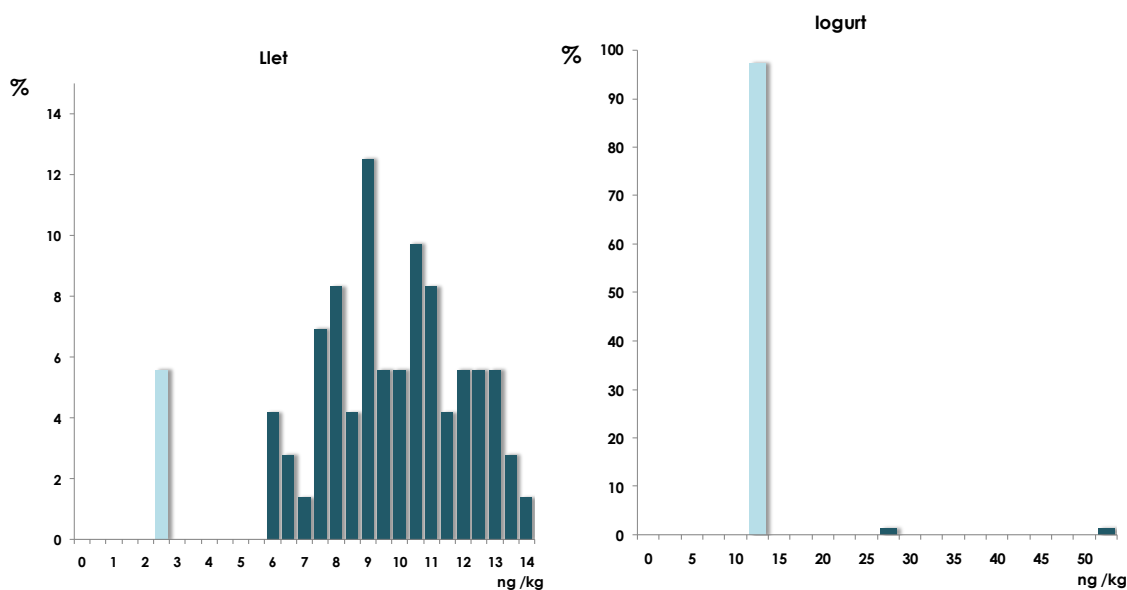


Fig. 5.2 Representació gràfica del percentatge de mostres per sobre del LD

Taula 5.1 Resum de les mostres analitzades, incidència, concentració mitjana i màxima de les mostres positives en cada categoria

Matris	n individual	n "composite"	Positives/total	Mitjana±DE ng kg <sup>-1</sup>	Max ng kg <sup>-1</sup>
Llet	211	72	68/72	9,7±2,1	13,6
Formatge	216	72	0/72	-	-
Iogurt	202	72	2/72	38,3±18,7	51,6

\* Positives: mostres per sobre del límit de detecció (LD)



**Fig. 5.3** Histogrames de freqüències relatives de la contaminació de AFM<sub>1</sub> en les diferents matrius alimentàries. (En blau cel, es representen aquelles mostres no detectades, amb el valor equivalent a LD/2)

#### 5.4 Ingesta diària estimada

La metodologia de càlcul es descriu en detall en l'apartat 2.5.2, i consisteix en calcular la mitjana i la desviació estàndard directament a partir de la distribució d'exposició estimada per als individus de cada grup de població. Els càlculs d'exposició s'han realitzat tenint en compte la població consumidora de llet. Mitjançant el mètode directe, podem observar que els nens/es són el grup de població amb una ingesta estimada d'AFM<sub>1</sub> més elevada. La resta de grups de població, mostren una exposició a AFM<sub>1</sub> significativament inferior (Taula 5.2).

**Taula 5.2** Ingesta diària estimada mitjançant el mètode directe (unitats en ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>)

Grup de població	Mitjana ± desviació estàndard
Gent Gran	0,053±0,027
Celíacs	0,070±0,044
Nouvinguts	0,042±0,026
Dones	0,043±0,029
Homes	0,036±0,027
Adolescents	0,074±0,068



## 5.5 Contribució dels aliments a la ingesta

Aquesta secció no s'ha dut a terme ja que, donada la baixa presència de d'AFM<sub>1</sub> en iogurt i formatge, només s'ha considerat la ingesta de llet com a possible font d'exposició a la micotoxina.

## 5.6 Estimació de l'exposició a aflatoxina M<sub>1</sub> mitjançant el mètode probabilístic

A continuació es mostren els diferents estadístics de l'exposició dels diferents grups de població a l'AFM<sub>1</sub>, calculats mitjançant simulació, amb l'interval de confiança (95%) corresponent (Taules 5.3-5.6 i Figs. 5.4-5.7). Es pot observar que els valors (mitjana) obtinguts mitjançant el mètode probabilístic són força propers a aquells obtinguts mitjançant el mètode directe, posant un altre cop de manifest que els nens/nenes són el principal grup de risc.

**Taula 5.3 Diferents estadístics obtinguts per a l'estimació de l'exposició de la gent a l'AFM<sub>1</sub> obtinguts mitjançant el model probabilístic (unitats en ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>)**

Gent gran	
N	10000
Mitjana	0,055 [0,051; 0,059]
Desviació estàndard	0,039 [0,033; 0,045]
Asimetria	1,961
Curtosis	7,269
Mediana	0,045 [0,042; 0,049]
Percentil 90	0,104 [0,093; 0,115]
Percentil 95	0,129 [0,113; 0,147]

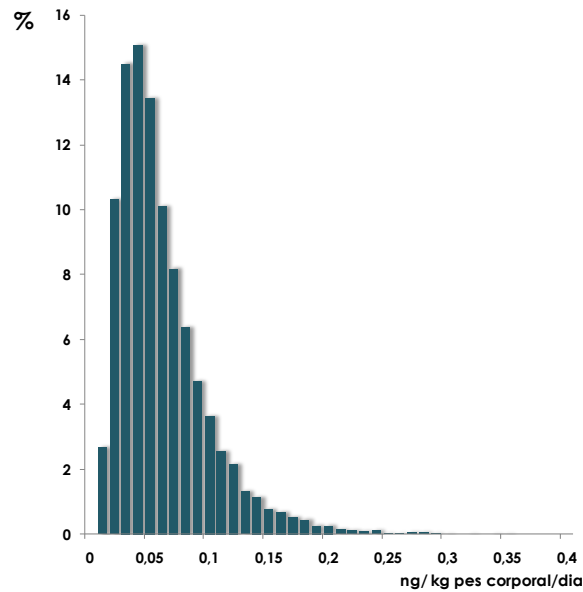
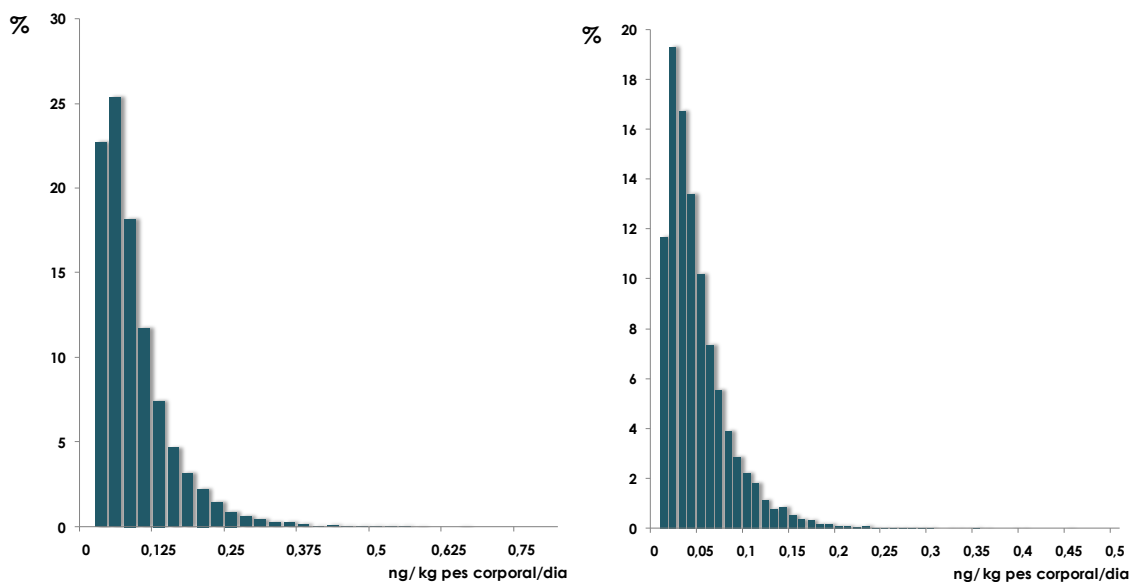


Fig. 5.4 Histograma de freqüències relatives de l'estimació de l'exposició de la gent gran a l'AFM<sub>1</sub>, obtingut a través del mètode probabilístic

Taula 5.4 Diferents estadístics obtinguts per a l'estimació de l'exposició de la població celíaca i immigrant a l'AFM<sub>1</sub> obtinguts mitjançant el model probabilístic (unitats en ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>).

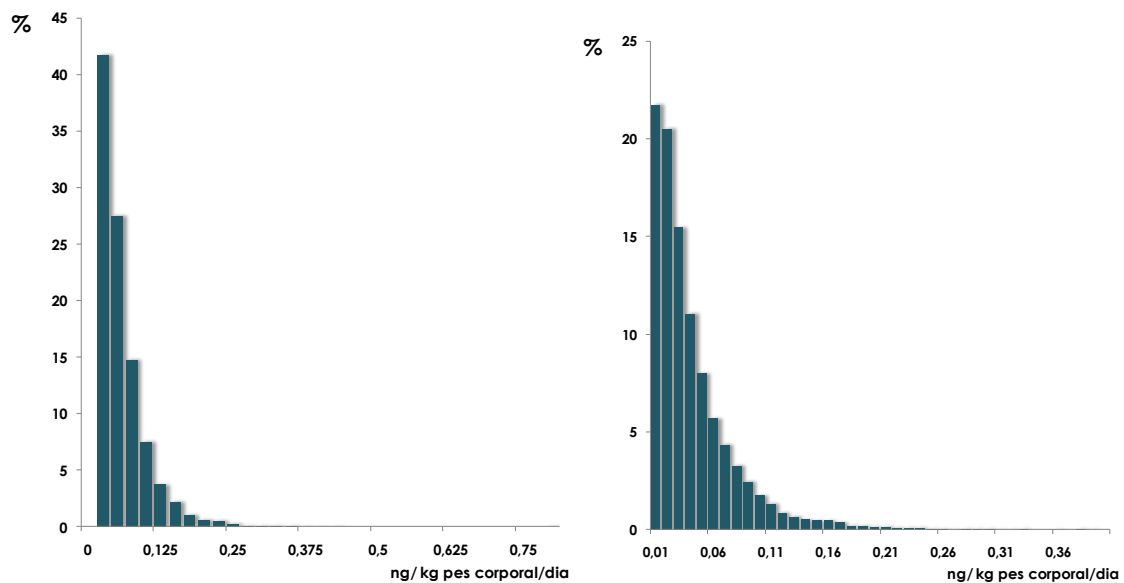
	Celíacs	Nouvinguts
N	10000	10000
Mitjana	0,071 [0,062; 0,080]	0,042 [0,037; 0,047]
Desviació estàndard	0,064 [0,051; 0,080]	0,037 [0,029; 0,047]
Asimetria	2,350	2,539
Curtosis	9,255	12,503
Mediana	0,052 [0,045; 0,061]	0,032 [0,027; 0,036]
Percentil 90	0,150 [0,124; 0,178]	0,086 [0,073; 0,102]
Percentil 95	0,195 [0,158; 0,236]	0,110 [0,091; 0,135]



**Fig. 5.5** Histograma de freqüències relatives de l'estimació de l'exposició de la població celíaca (esquerra) i immigrant (dreta) a l'AFM<sub>1</sub>, obtingut a través del mètode probabilístic

**Taula 5.5** Diferents estadístics obtinguts per a l'estimació de l'exposició de les dones i dels homes adults a l'AFM<sub>1</sub> obtinguts mitjançant el model probabilístic (unitats en ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>)

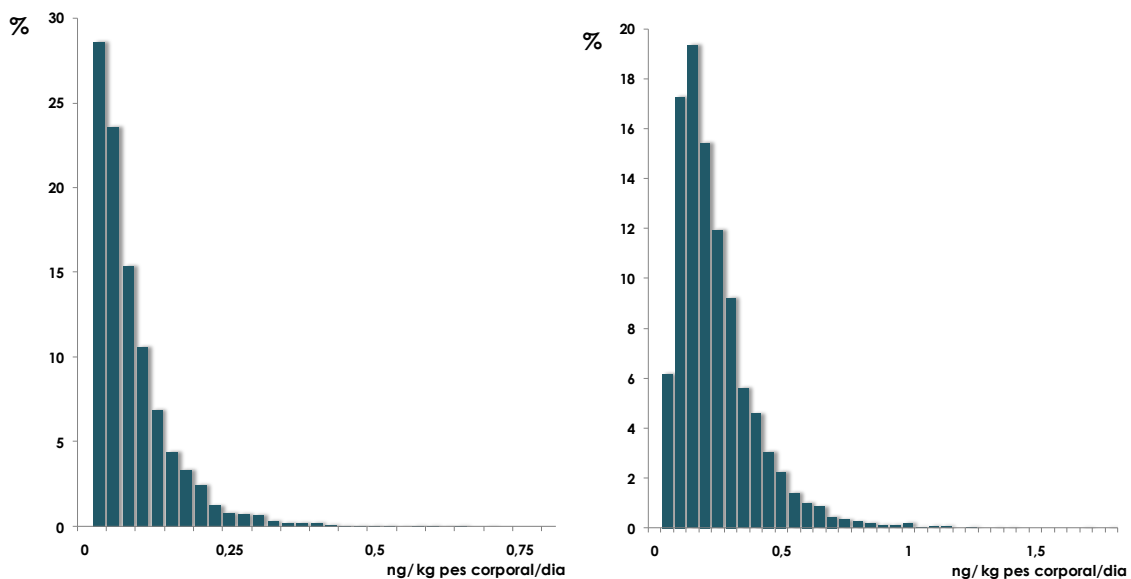
	Dones	Homes
N	10000	10000
Mitjana	0,043 [0,039; 0,048]	0,036 [0,032; 0,040]
Desviació estàndard	0,043 [0,035; 0,055]	0,037 [0,031; 0,044]
Asimetria	2,783	2,580
Curtosis	17,494	10,644
Mediana	0,031 [0,027; 0,035]	0,025 [0,022; 0,279]
Percentil 90	0,093 [0,082; 0,108]	0,080 [0,070; 0,092]
Percentil 95	0,124 [0,106; 0,144]	0,106 [0,090; 0,127]



**Fig. 5.6** Histograma de freqüències relatives de l'estimació de l'exposició de les dones (esquerra) i homes (dreta) a l'AFM<sub>1</sub>, obtingut a través del mètode probabilístic

**Taula 5.6** Diferents estadístics obtinguts per a l'estimació de l'exposició dels infants a l'AFM<sub>1</sub> obtinguts mitjançant el model probabilístic (unitats en ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>)

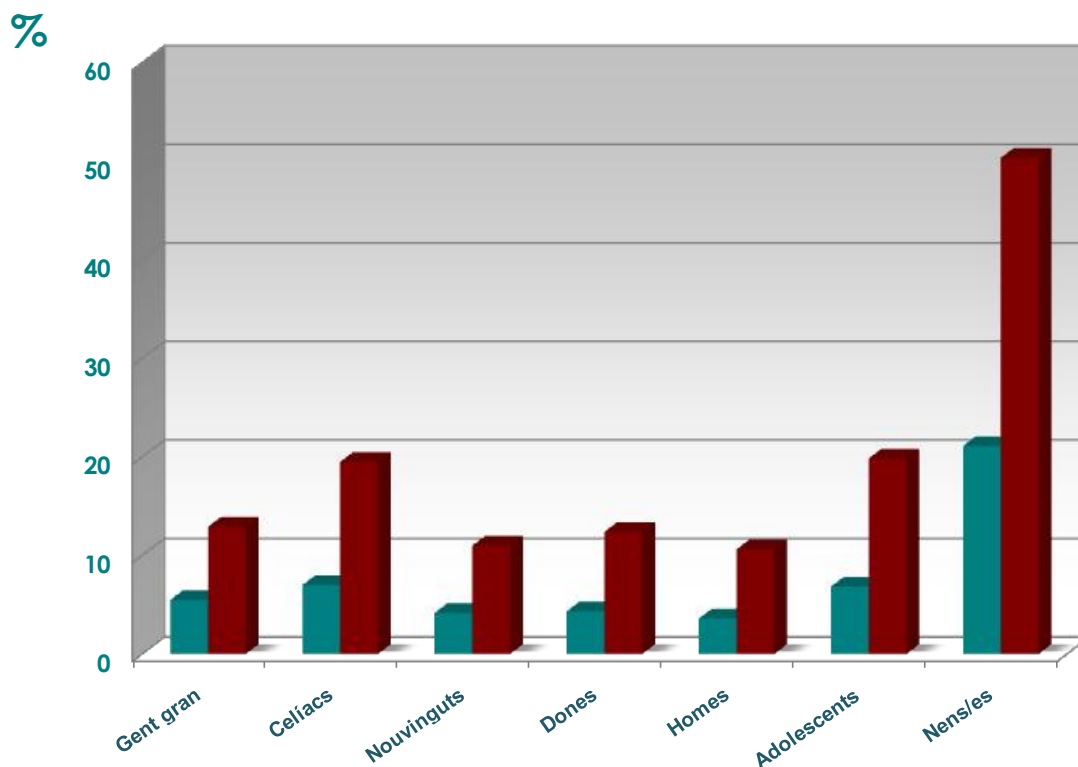
	Adolescents	Nens/nenes
N	10000	10000
Mitjana	0,068 [0,059; 0,078]	0,211 [0,191; 0,233]
Desviació estàndard	0,070 [0,055; 0,089]	0,155 [0,127; 0,188]
Asimetria	2,472	1,953
Curtosis	9,663	6,705
Mediana	0,047 [0,039; 0,057]	0,173 [0,151; 0,192]
Percentil 90	0,154 [0,126; 0,182]	0,406 [0,352; 0,469]
Percentil 95	0,198 [0,163; 0,253]	0,504 [0,424; 0,602]



**Fig. 5.7** Histograma de freqüències relatives de l'estimació de l'exposició dels adolescents (esquerra) i dels nens/es (dreta) a l'AFM<sub>1</sub>, obtingut a través del mètode probabilístic

### 5.7 Avaluació del risc

La ingesta estimada d'AFM<sub>1</sub> es troba, en tots els casos, lluny del valor de IDT de 1 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>. Fins i tot el pitjor dels casos (percentil 95, grup dels nens), es mostra lluny del màxim nivell valor tolerable (Fig. 5.8).



**Fig. 5.8 Representació gràfica del percentatge de la ingesta diària tolerable de AFM<sub>1</sub>, estimat per cada grup de població per a la mitjana (verd) i per al percentil 95 (vermell)**

## 5.8 Altres estudis d'exposició

L'exposició a l'AFM<sub>1</sub> va ser estudiada per la JECFA en cinc dietes regionals. La ingesta de llet i derivats en la dieta de la regió europea va ser estimada en 340 g/persona i dia i l'exposició a l'AFM<sub>1</sub>, en 6,8 ng dia<sup>-1</sup> (JECFA, 2001). El Primer Estudi Francès de Dieta Total va mostrar que la ingesta mitjana d'AFM<sub>1</sub> estimada en la població francesa era de 0,09 i 0,22 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>, per adults i nens, respectivament. Quan al percentil 95, es va estimar en 0,21 i 0,55 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>, per adults i nens, respectivament, tots els valors lluny del límit tolerable de 1 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>, i en la línia dels resultats presents (Leblanc et al., 2005). En el Segon Estudi Francès de Dieta Total (2006-2010), no es va detectar la micotoxina en cap aliment, per la qual cosa, l'estudi no va avaluar el risc d'aquesta micotoxina separatament de la resta d'aflatoxines.

## 5.9 Referències

Comissió Europea (CE). 2006. Reglament (CE) N° 1881/2006 of 19/12/2006. Official Journal of the European Union, L364, 5-24.

Comissió Europea (CE). 2010. Reglament (CE) N° 165/2010 of 26/02/2010. Official Journal of the European Union, L50, 8-12.

International Agency for Research on Cancer (IARC). 1993. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans Lyon: IARC Scientific Publication; 56: 19-23.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). 2001. Fifty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food; WHO Food Additives Series 47; FAO Food and Nutrition Paper 74. Geneva: WHO.

Leblanc J, Tard A, Volatier J, Verger P. 2005. Estimated dietary exposure to principal food mycotoxins from The First French Total Diet Study. Food Addit Contam. 22:652-72.

Prandini A, Tansini G, Sigolo S, Filippi L, Laporta M, Piva G. 2009. On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food Chem Toxicol.* 47:984-991.

Yousef AE, Marth EH. Stability and degradation of aflatoxin M<sub>1</sub>. 1989. In: Van Egmond HP, editor. *Mycotoxins in dairy products*. London and New York, Elsevier Applied Science 127-161.

Étude de l'alimentation totale française 2 (EAT 2) Tome 1. Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, Environnement et Travail (ANSES), Juin 2011.

# 6 Fumonisina B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub>

L'estructura química de les fumonisines (FBs) va ser descrita per primera vegada l'any 1988, i des de llavors s'han trobat més de 28 homòlegs, essent la FB<sub>1</sub> l'estructura més comuna i alhora, la més estudiada del grup (Fig. 6.1). Les FBs són compostos polars i solubles en aigua i solucions aquoses com el metanol i l'acetonitril, però insolubles en compostos apolars. No presenten una estructura cíclica com es pot trobar en la majoria de micotoxines. Sota condicions alcalines, els grups de l'àcid tricarbàlic es trenquen, esdevenint la forma hidrolitzada corresponent.

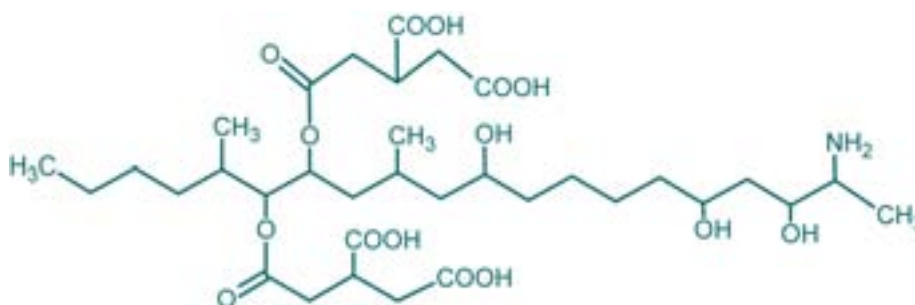


Fig. 6.1 Estructura molecular de la fumonisina B<sub>1</sub>

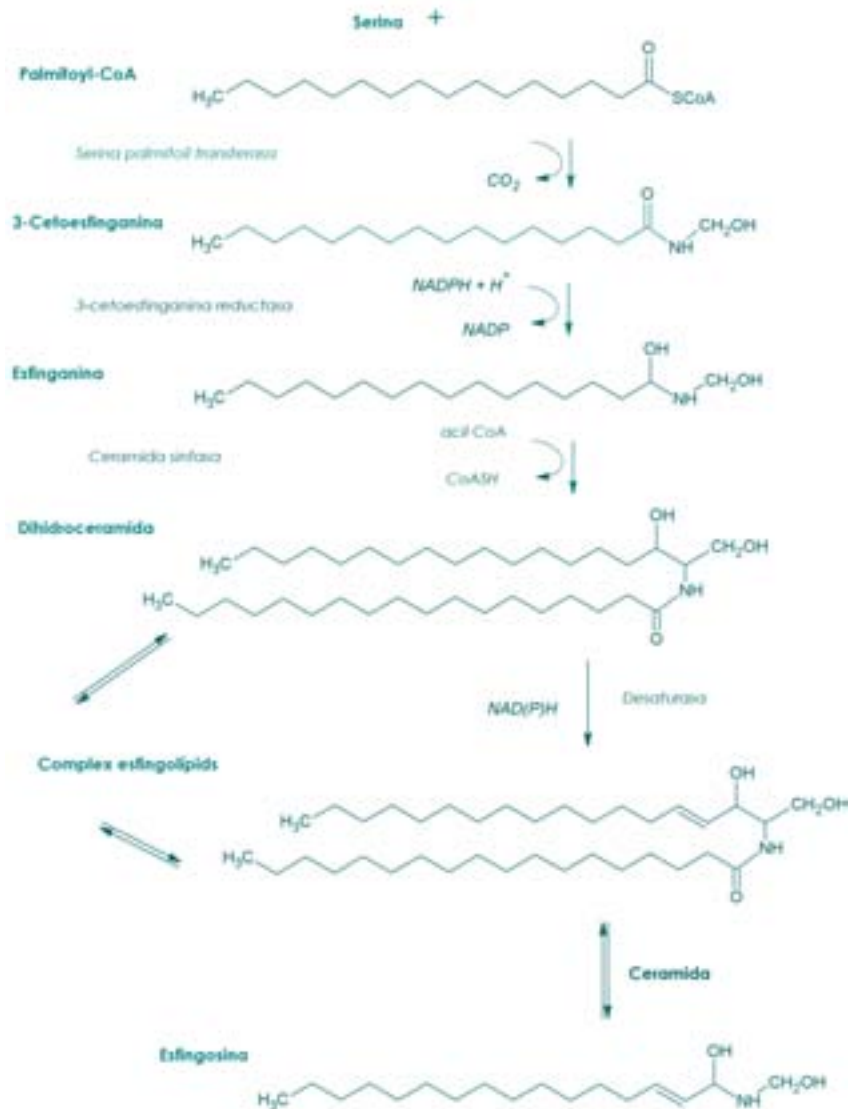
Les FBs són produïdes per *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* i altres espècies del gènere *Fusarium*, que es poden trobar com a contaminants naturals en cereals de tot el món, especialment el panís (Marasas, 1996; Shephard et al., 1996; Visconti et al., 1996).

## 6.1 Vies d'exposició i toxicitat

La incidència de les FBs en panís i aliments a base de panís ha estat àmpliament estudiada i documentada. Més concretament, alguns estudis previs realitzats a Espanya, han confirmat la presència d'aquests contaminants en aliments a base de panís destinats al consum humà com són els cereals d'esmorzar de panís, tipus "corn-flakes", aperitius de panís, panís dolç en conserva o cervesa.



La FB<sub>1</sub> i la FB<sub>2</sub> s'absorbeixen pobrament en rosegadors i simis, i són ràpidament eliminades de la sang, mentre que una petita concentració s'acumula en els teixits com el fetge i els ronyons.



**Fig. 6.2 Biosíntesi de novo d'esfingosina a partir de palmitoyl-CoA i serina. Les fumonisines bloquegen la ceramida sintasa, inhibint la conversió d'esfingosina a dihidroceramida**

La gran homologia de les FBs amb els esfingolípids determina que el mecanisme d'acció es basi en la inhibició competitiva de l'enzim ceramida sintasa. Aquesta disrupció provoca la pertorbació del metabolisme de la ceramida i dels esfingolípids. La conseqüència immediata de la inhibició de la ceramida sintasa és l'acumulació de la base esfingoidea que funciona de substrat, l'esfingonina (Sa) i en menor grau

d'esfingosina (So) (Fig. 6.2). L'increment en el ràtio Sa/So en orina s'ha proposat com a indicador específic de l'exposició a FBs, validat amb èxit *in vitro* i *in vivo* en rates, i en procés de validació en humans. L'acumulació de Sa i So s'ha mostrat que produeix toxicitat cel·lular i inhibició del creixement (Wang et al., 1999). El fetge i els ronyons són els principals òrgans diana, tot i que s'ha observat variacions en funció de l'espècie, de la dosi i del sexe. S'ha mostrat que la FB<sub>1</sub> és un potent promotor del càncer en rates després de la iniciació amb dietilnitrosamina i AFB<sub>1</sub>.

L'exposició humana a fumonisines s'ha relacionat amb càncer d'esòfag i de fetge a Sud-Àfrica i Xina, i recentment amb defectes del tub neuronal a la regió confrontant de Mèxic amb Texas (Sydenham et al., 1990; Yoshizawa et al., 1994). L'Agència Internacional de Recerca del Càncer (IARC) ha classificat a la FB<sub>1</sub> com a possible carcinogen humà (grup 2B) (IARC, 2006).

## 6.2 Valors de referència

- Nivells de seguretat toxicològica.

La JECFA va avaluar les FBs establint un nivell d'ingesta provisional màxim tolerable de 2.000 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>, en base al NOEL de 0,2 mg kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup> observat en rates, essent la toxicitat renal l'efecte sever amb un factor de seguretat de 100 (SCF, 2003).

- Límits màxims en aliments.

La Comissió Europea, ha establert el nivell màxim de fumonisines en 1.000 µg kg<sup>-1</sup> en aliments a base de panís per a consum humà directe, excepte per als cereals d'esmorzar a base de panís i els aperitius de panís on el nivell màxim està en 800 µg kg<sup>-1</sup>. Per als aliments infantils a base de panís per a lactants i nens petits, el nivell dels quals ha de ser inferior a 200 µg kg<sup>-1</sup> (Comissió Europea 2006, 2007).

## 6.3 Incidència i concentració de fumonisines en els aliments

En el present estudi, es van trobar FBs en totes les matrius analitzades a base de cereals amb l'excepció del panís dolç. El percentatge més elevat es va trobar en la cervesa (90 %) i en els aperitius de panís (61 %). Quant als aliments especials, es van trobar FBs

en més de la meitat de mostres d'aliments ètnics i en un baix percentatge d'aliments infantils i sense gluten. Els nivells més alts de contaminació es van trobar en farina de panís (682,2 µg kg<sup>-1</sup>) i aperitius de panís (475,5 µg kg<sup>-1</sup>) (Figs. 6.3-6.4 i Taula 6.1).

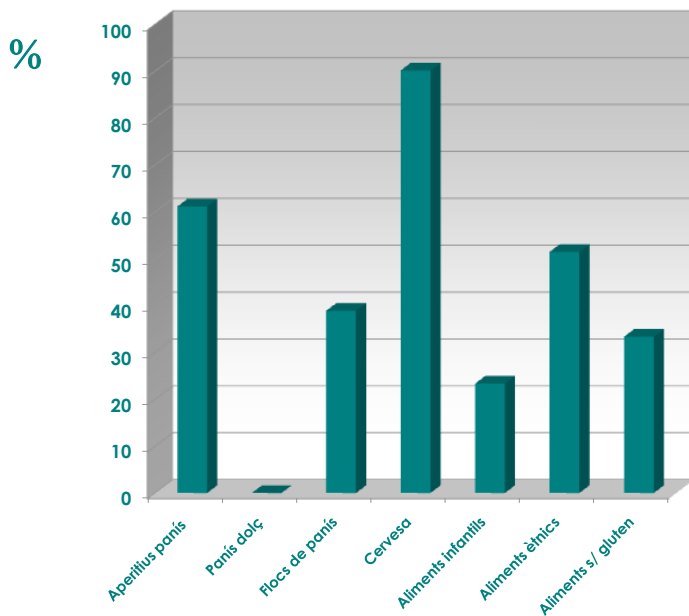


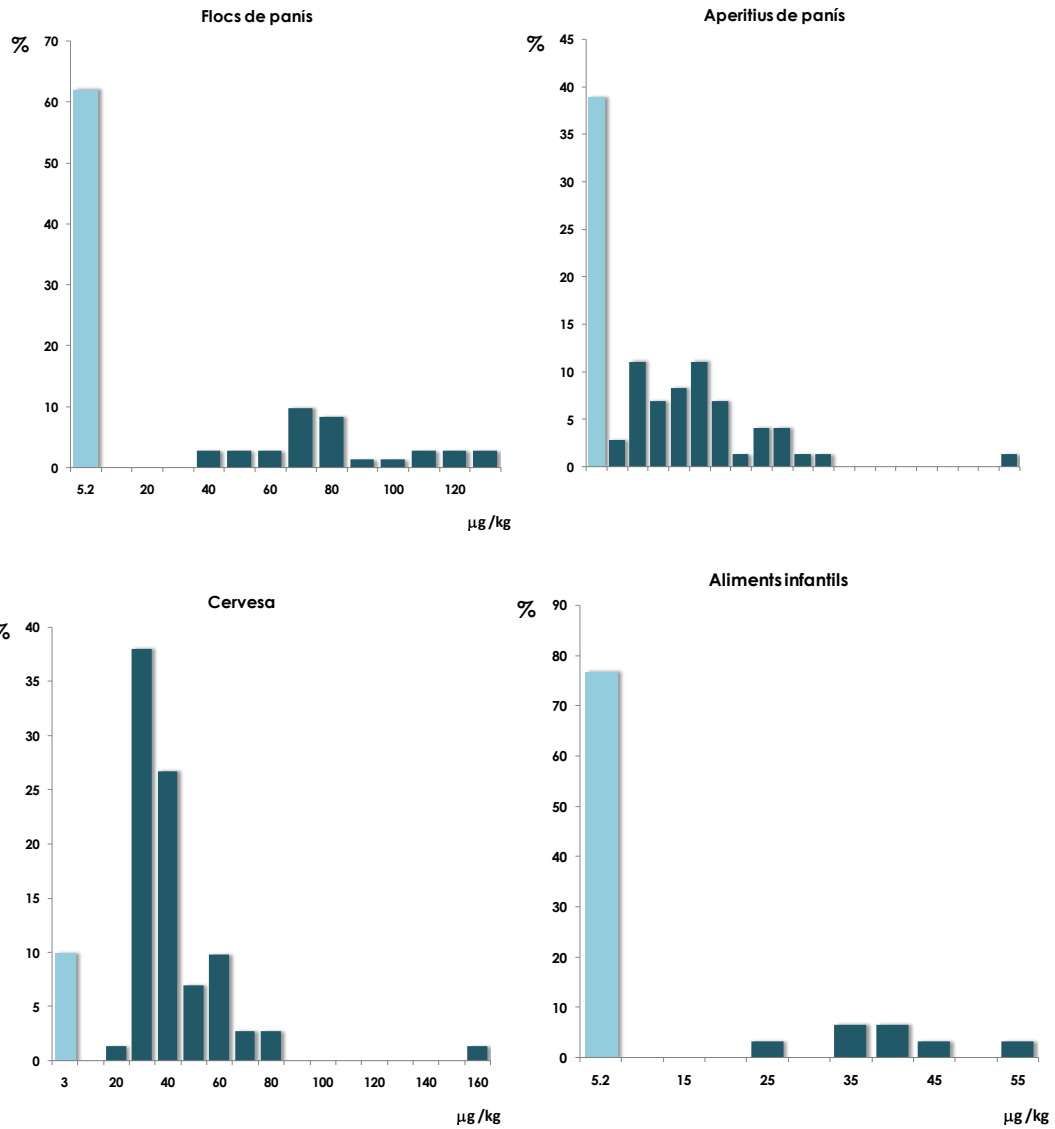
Fig. 6.3 Representació gràfica del percentatge de mostres per sobre del LQ

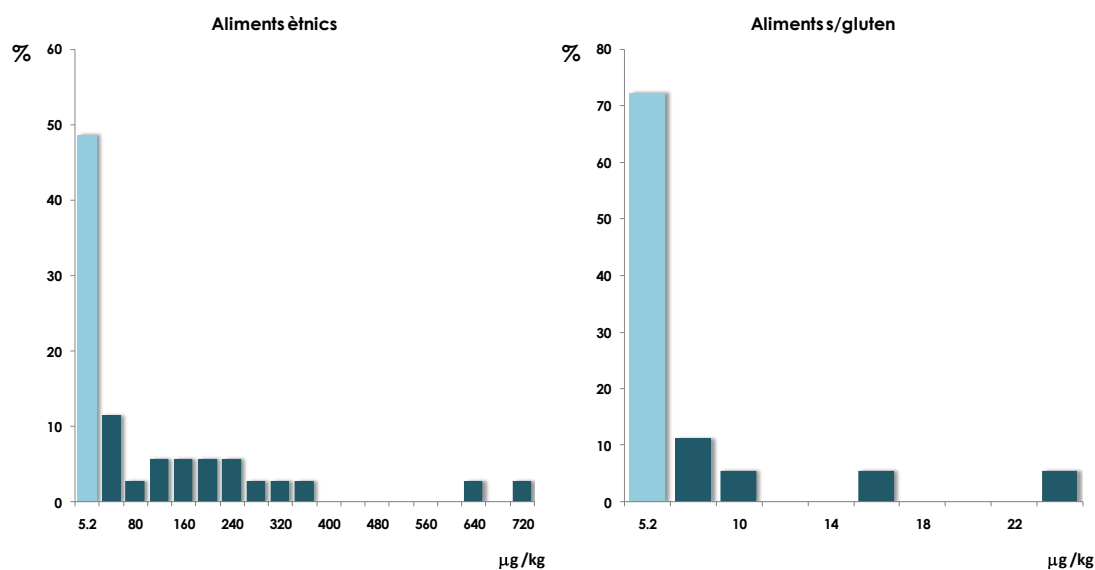
Taula 6.1 Resum de les mostres analitzades, incidència i concentració mitjana i màxima de les mostres positives en cada categoria.

Matrius	n individual	n "composite"	Positives*/total	Mitjana±DE µg kg <sup>-1</sup>	Max µg kg <sup>-1</sup>
Flocs de panís	168	72	28/72	78,9±27,9	139,5
Aperitius panís	216	72	44/72	119,1±83,1	475,5
Panís dolç	185	72	0/72	-	-
Cervesa	216	71	64/71	36,9±20,1	157,2
Aliments infantils	90	30	7/30	36,4±8,5	50,7

Aliments s/ gluten	18	18	6/18	10,4±7,1	22,5
Aliments ètnics	35	35	18/35	202,9±200,4	682,2

\* Positives: mostres per sobre del límit de quantificació (LQ)





**Fig. 6.4** Histogrames de freqüències relatives de la contaminació de FBs en les diferents matrius alimentàries. (En blau cel, es representen aquelles mostres no quantificades, amb el valor equivalent a LD/2)

## 6.4 Ingesta diària estimada

La metodologia de càlcul es descriu en detall en l'apartat 2.5.2, i consisteix en calcular la mitjana i la desviació estàndard directament a partir de la distribució d'exposició estimada per als individus de cada grup de població. Mitjançant el mètode directe d'avaluació de la ingesta, podem identificar quins són els grups de població més exposats a les FBs, que s'espera que siguin els nadons, i els nouvinguts seguits dels nens/es (Taula 6.2).

**Taula 6.2** Ingesta diària estimada mitjançant el mètode directe

Grup de població	Mitjana $\pm$ desviació estàndard (ng kg <sup>-1</sup> pc dia <sup>-1</sup> )
Gent gran <sup>1</sup>	-
Celíacs	40,9 $\pm$ 35,0
Nouvinguts	65,1 $\pm$ 69,0
Dones adultes	34,5 $\pm$ 55,5
Homes adults	63,2 $\pm$ 90,3
Adolescents	36,7 $\pm$ 44,3
Nens/es	63,0 $\pm$ 64,0
Infants	156,0 $\pm$ 152,4

<sup>1</sup> El nombre de consumidors en el grup de gent gran és massa baix per a fer els càlculs d'exposició

## 6.5 Contribució dels aliments a la ingesta

La principal font d'exposició a les FBs varia considerablement en funció dels grups de població i els hàbits alimentaris de cada un d'ells. La cervesa representa la principal font d'exposició entre els adults d'ambdós sexes, mentre que per als nens/es i els adolescents ho són els flocs d'esmorzar a base de panís i els aperitius de panís. Els aliments ètnics com la farina de panís, són la principal via d'exposició a les FBs per part del grup de nouvinguts. S'espera que els flocs de panís, el pa sense gluten i la cervesa siguin els aliments que aportin la major part de la micotoxina a la dieta de les persones celíacques, amb percentatges de contribució similars (Figs. 6.5-6.7).

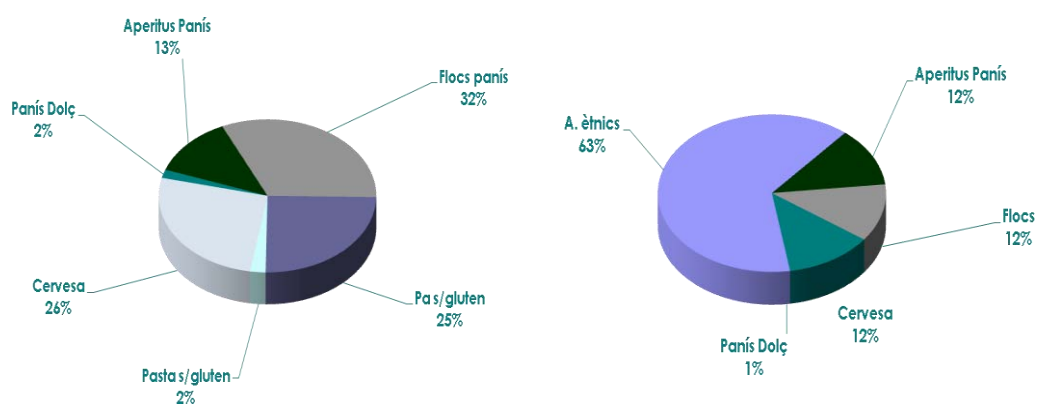
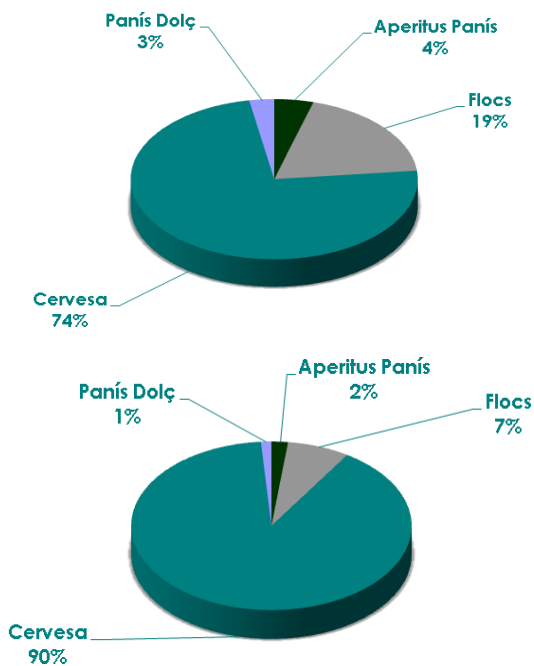
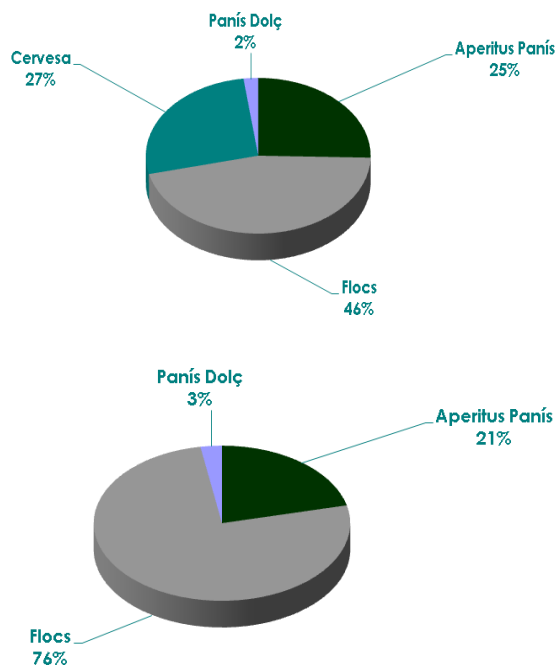


Fig 6.5 Contribució dels diferents aliments analitzats a l'exposició global de FBs per als celíacs (esquerra) i per als nouvinguts (dreta)



**Fig 6.6** Contribució dels diferents aliments analitzats a l'exposició global de FBs per a les dones adults (esquerra) i als homes adults (dreta)



**Fig 6.7** Contribució dels diferents aliments analitzats a l'exposició global de FBs per als adolescents (esquerra) i per als nens/es (dreta)

Els infants presenten una ingesta de fumonisines més elevada atès que presenten una relació entre la ingesta d'aliments, en aquest cas de cereals infantils (13g/kg de pes corporal i dia), i el pes corporal més elevada que el dels altres grups. La

concentració mitjana de fumonisines en els cereals infantils analitzats és de 12,49µg/kg (ng/g).

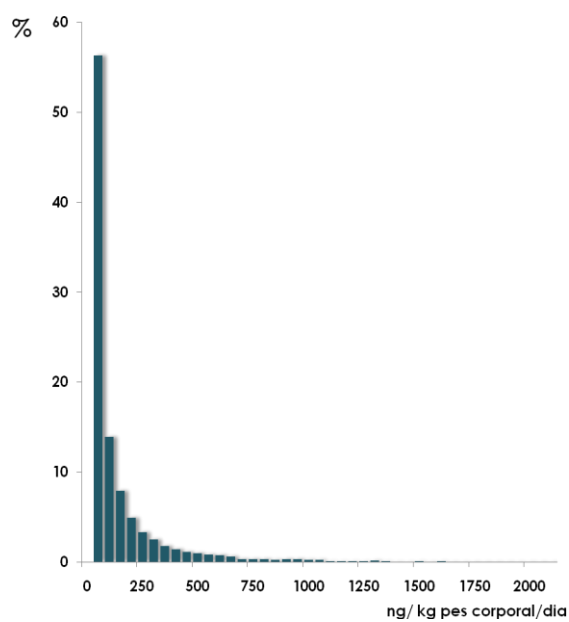
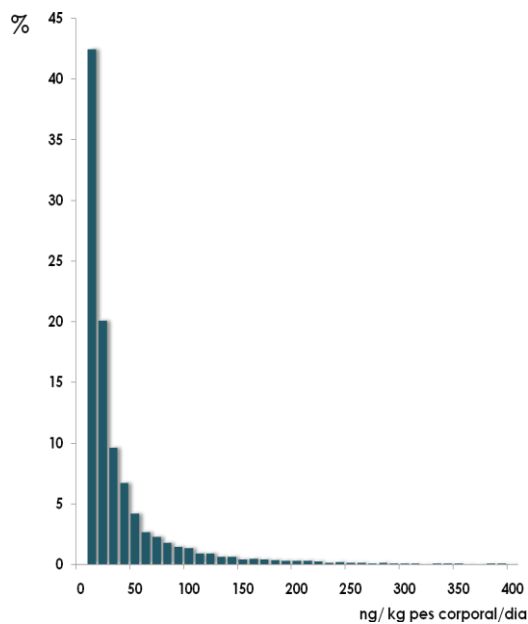
## 6.6 Estimació de l'exposició a les fumonisines mitjançant el mètode probabilístic

Mitjançant el model de simulació obtenim estimacions lleugerament diferents als valors obtinguts mitjançant el mètode directe. Les estimacions mitjanes són en tots casos més elevades, i en el cas de les dones (103 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>), lleugerament superior als homes (100 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>). Tot i això, els grups de població més exposats continuen sent els nadons i els nouvinguts. Com es pot observar en l'estimació dels percentils, el 50 % de la població pot estar exposada a valors molt baixos de la micotoxina, entre el rang de 13 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup> (celíacs) a 152 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup> (nadons) (Veure taules 6.3-6.6 i figures 6.8-6.11).

**Taula 6.3 Diferents estadístics obtinguts per a l'estimació de l'exposició de la població nouvinguda i celíaca a les FBs obtinguts mitjançant el model probabilístic (unitats en ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>)**

	Celíacs	Nouvinguts
N	10000	10000
Mitjana	33,2 [20,1; 52,2]	131,0 [71,6 ; 221,6]
Desviació estàndard	61,6 [24,8; 125,4]	291,3 [106,2; 548,6]
Asimetria	6,2	8,0
Curtosis	68,4	135,9
Mediana	12,9 [8,2; 19,7]	37,1 [18,4; 66,2]
Percentil 90	82,2 [43,7; 153,3]	337,0 [171,9; 631,5]
Percentil 95	132,4 [68,7; 276,6]	560,6 [278,1; 1264,8]

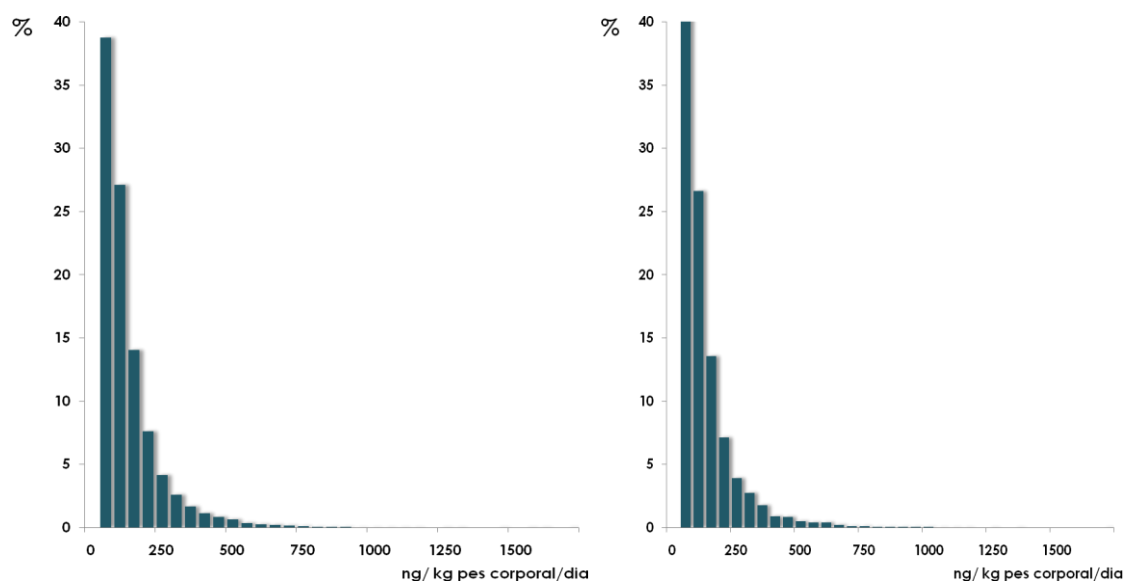




**Fig 6.8** Histograma de freqüències relatives de l'estimació de l'exposició de la població celíaca (esquerra) i nouvinguda (dreta) a les FBs, obtingut a través del mètode probabilístic

**Taula 6.4** Diferents estadístics obtinguts per a l'estimació de l'exposició de les dones i dels homes adults a les FBs obtinguts mitjançant el model probabilístic (unitats en  $\text{ng kg}^{-1} \text{pc dia}^{-1}$ )

	Dones	Homes
N	10000	10000
Mitjana	103,0 [91,8; 115,3]	100,4 [88,6; 113,3]
Desviació estàndard	116,5 [91,8; 147,3]	114,2 [89,8; 143,3]
Asimetria	3,6	3,3
Curtosis	22,5	17,6
Mediana	67,0 [58,9; 76,3]	64,2 [56,0; 73,9]
Percentil 90	226,7 [194,2; 268,0]	225,5 [187,8; 264,9]
Percentil 95	320,8 [263,4; 394,1]	313,3 [258,0; 394,5]

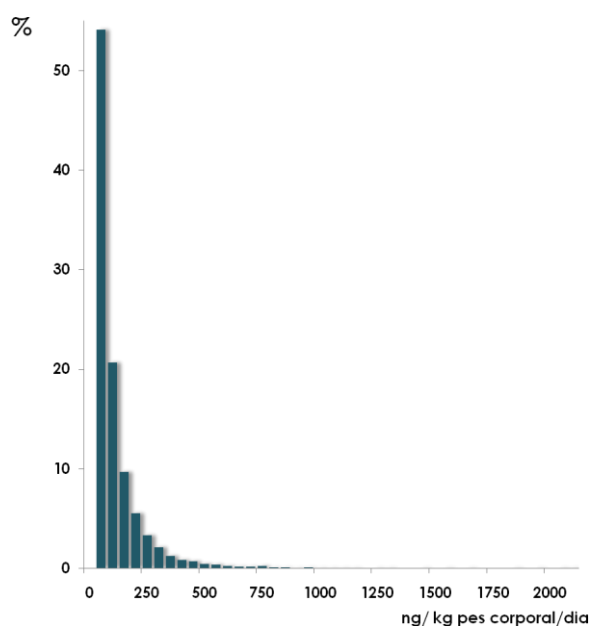
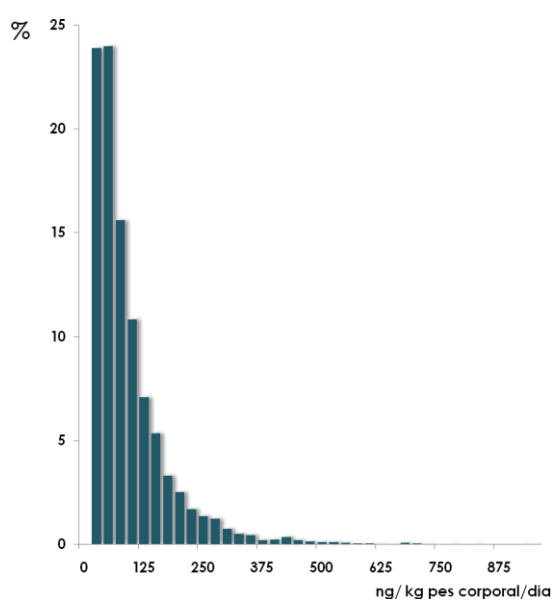


**Fig 6.9** Histograma de freqüències relatives de l'estimació de l'exposició de les dones (esquerra) i homes (dreta) adults a les FBs, obtingut a través del mètode probabilístic

**Taula 6.5** Diferents estadístics obtinguts per a l'estimació de l'exposició dels adolescents a les FBs obtinguts mitjançant el model probabilístic (unitats en  $\text{ng kg}^{-1} \text{pc dia}^{-1}$ )

Adolescents	Nens/es
-------------	---------

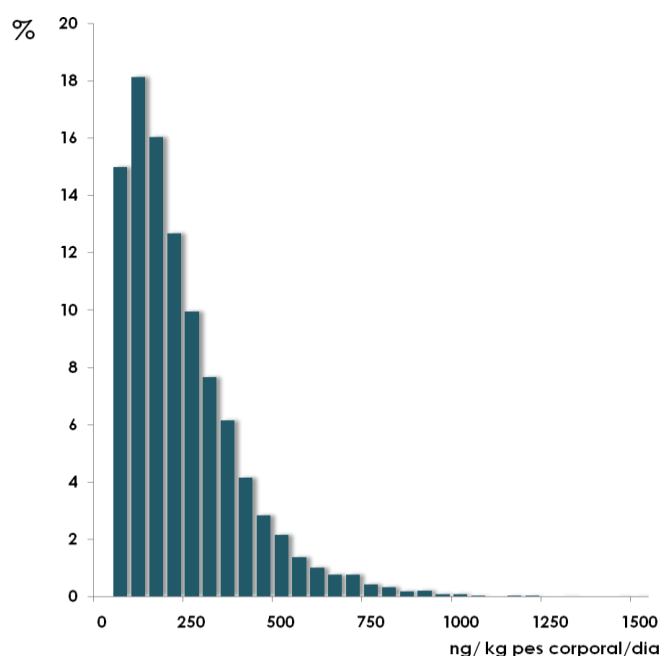
N	10000	10000
Mitjana	79,2 [69,0; 90,4]	85,3 [59,30; 120,0]
Desviació estàndard	83,2 [64,8; 103,9]	125,1 [62,7; 251,0]
Asimetria	2,8	5,0
Curtosis	12,1	44,7
Mediana	53,1 [44,5; 61,6]	44,6 [30,7; 63,7]
Percentil 90	175,8 [143,5; 211,8]	201,0 [128,3; 314,3]
Percentil 95	241,1 [191,3; 295,8]	293,7 [172,7; 489,7]



**Fig 6.10** Histograma de freqüències relatives de l'estimació de l'exposició dels adolescents (esquerra) i dels nens/es (dreta) a les FBs, obtingut a través del mètode probabilístic

**Taula 6.6** Diferents estadístics obtinguts per a l'estimació de l'exposició dels nadons a les FBs obtinguts mitjançant el model probabilístic (unitats en  $\text{ng kg}^{-1} \text{pc dia}^{-1}$ )

Nadons i Infants	
N	10000
Mitjana	195,19 [168,9; 223,7]
Desviació estàndard	161,9 [130,01; 201,47]
Asimetria	1,7
Curtosis	5,1
Mediana	152,3 [125,3; 185,5]
Percentil 90	403,0 [335,0; 484,7]
Percentil 95	508,2 [410,9; 650,4]



**Fig 6.11** Histograma de freqüències relatives de l'estimació de l'exposició dels nadons a les FBs, obtingut a través del mètode probabilístic

## 6.7 Avaluació del risc

Si comparem els valors estimats per als diferents grups de població amb el nivell d'ingesta tolerable de 2.000 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup> (WHO, 2001), podem observar que totes les estimacions es troben molt per sota d'aquest nivell de seguretat. En grups més exposats com el percentil 95 dels nadons i dels nouvinguts, el nivell d'exposició representa respectivament, el 25 i el 28 % del nivell d'ingesta tolerable (Fig. 6.12).

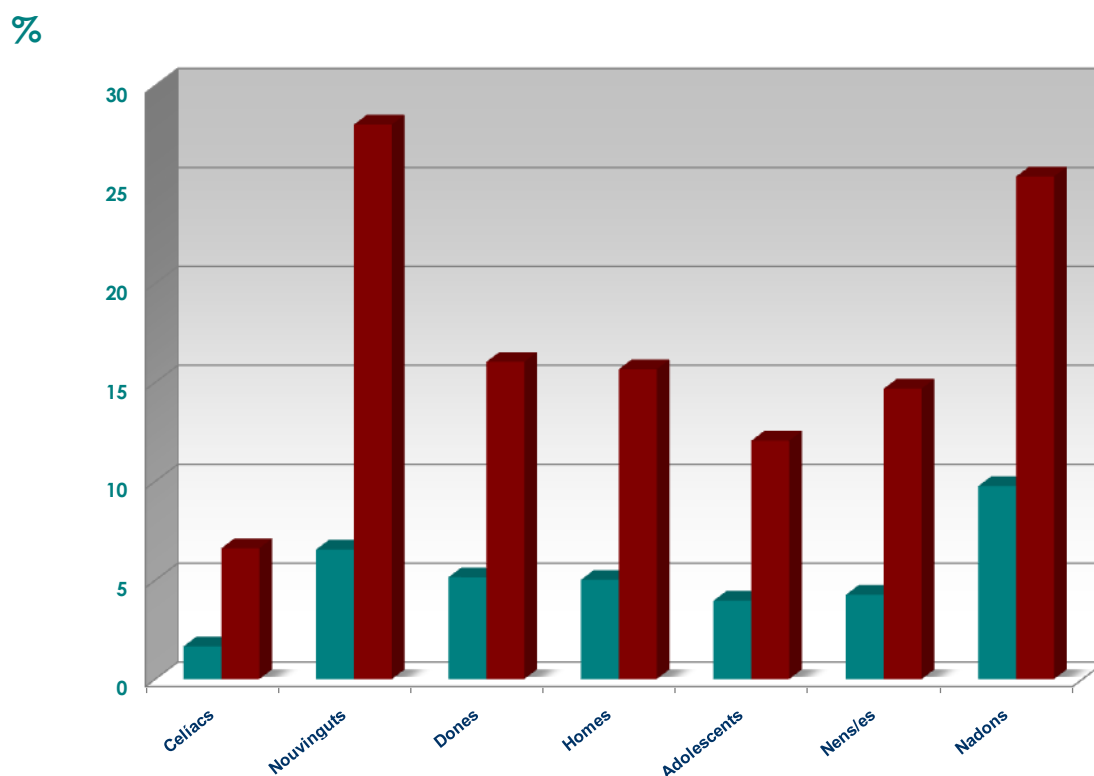


Fig 6.12 Representació gràfica del percentatge de la ingesta diària tolerable de fumonisines, estimat per cada grup de població per a la mitjana (verd) i per al percentil 95 (vermell)

## 6.8 Altres estudis d'exposició

Fins a la data només tenim constància de dos estudis previs que han fet alguna estimació de l'exposició de població espanyola a FBs. Aquests estudis van fer estimacions basades en assumpcions d'ingesta i en el cas d'Ariño et al., (2007), es van utilitzar dades de contaminació en panís no processat, sent la ingesta estimada de 3,8 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>. Per una altra banda, D'Arco et al., (2009) van estimar la l'exposició a les FBs dels nadons (1,7-720 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>) i dels adults (1,8-3,6 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>), a través d'aliments convencionals i ecològics, respectivament, mostrant diferències notables. El Primer Estudi de Dieta Total de França va mostrar una estimació mitjana i per al percentil 95 de 10 i 60 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup> per als adults, i de 50 i 180 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup> per als nens/es (Leblanc et al., 2005), en la línia dels resultats del present estudi. Les estimacions recollides en l'estudi europeu SCOOP (2003) mostren nivells variables, des de valors lleugerament superiors als del present estudi, tal i com es van estimar per als consumidors italians o als nadons de Noruega amb estimacions respectives de 520 i 860 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>. D'altres eren valors que estaven en la línia d'aquest estudi com les estimacions per a la població d'Àustria (77,1 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>) i Alemanya (129 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>).

## 6.9 Referències

Ariño A, Estopañan G, Juan T, Herrera A. 2007. Estimation of dietary intakes of fumonisins B1 and B2 from conventional and organic corn. *Food Control* 18:1058-1062.

Comissió Europea (CE). 2006. Reglament (CE) N° 1881/2006 of 19/12/2006. *Official Journal of the European Union*, L364, 5-24.

Comissió Europea (CE). 2007. Reglament (CE) N° 1126/2007 of 28/9/2007. *Official Journal of the European Union*, L255, 14-17.

D'Arco G, Fernández-Franzón M, Font G, Damiani P, Mañes J. 2008. Analysis of fumonisins B1, B2 and B3 in corn-based baby food by pressurized liquid extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 31:188-194.

IARC (International Agency for Research on Cancer). 2006. *International Agency for Research on Cancer (IARC) Monographs (2006)*. 2 April 2009. Vols. 1-95.

Leblanc J, Tard A, Volatier J, Verger P. 2005. Estimated dietary exposure to principal food mycotoxins from The First French Total Diet Study. *Food Addit Contam.* 22:652-72.

Marasas WFO. 1996. Fumonisin: History, world-wide occurrence and impact. *Adv Exp Med Biol.* 392:1-17.

SCF (Scientific Committee on Food). 2003. Updated opinion of the Scientific Committee on Food on Fumonisin B1, B2 and B3. Brussels, Belgium, April.

SCOOP (Scientific Cooperation Task 3.2.10 of the European Commission). 2003. Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU Member States. Final report. Directorate – General Health and Consumer Protection. European Commission, Brussels, Belgium.

Shephard GS, Thiel PG, Storckenstrom S, Sydenham EW. 1996. Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. *J AOAC Int.* 79:671–687.

Sydenham EW, Shephard GS, Thiel PG, Marasas WFO, Stockenström S. 1991. Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. *J Agric Food Chem.* 39:2014–2018.

Visconti A, Doko MB, Solfrizzo M, Pascale M, Boenke A. 1996. European Intercomparison Study for the Determination of Fumonisin in Maize. *Mikrochim Acta* 123:55-61.

Wang E, Riley RT, Meredith FI, Merrill JAH. 1999. Fumonisin B1 consumption by rats causes reversible, dose-dependent increases in urinary sphinganine and sphingosine. *J Nutr.* 129:214–220.

Yoshizawa T, Yamashita A, Luo Y. 1994. Fumonisin occurrence in corn from high- and low-risk areas for human esophageal cancer in China. *Appl Environ Microbiol.* 60:1626–1629

# 7 Ocratoxina A

L' ocratoxina A (OTA) és una micotoxina produïda pel metabolisme secundari de moltes espècies de fongs filamentosos, especialment del gènere *Aspergillus* i *Penicillium*. L'estructura pentacètida deriva de la família de les dihidrocoumarines acoblada a la  $\beta$ -fenilalanina, L-fenilalanina-N-[(5-cloro-3,3-dihidro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-1H-2-benzopirè-7-il)carbonil]-(R)-isocumarina (Fig. 7.1). Els metabòlits caracteritzats més importants són l' ocratoxina B, l' ocratoxina C, l' ocratoxina  $\alpha$  i l' ocratoxina  $\beta$ .

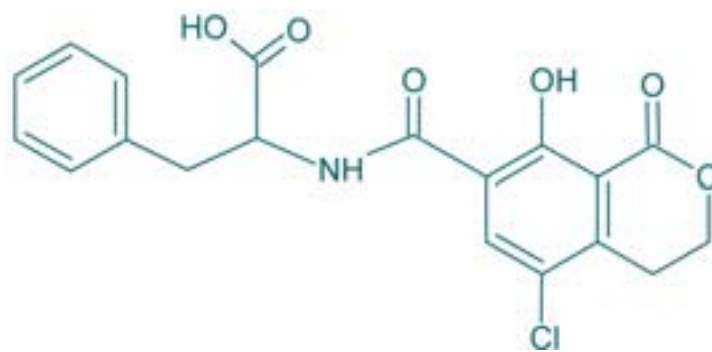


Fig. 7.1 Estructura molecular de l' ocratoxina A

L'OTA és un àcid orgànic feble amb un valor de pKa de 7.1 i una massa molar de 403,8 g mol<sup>-1</sup>. Presenta una elevada estabilitat, mostrant una gran resistència a l'acidesa i a les altes temperatures. Per tant, només és degrada parcialment en condicions normals de cocció, resistint altes pressions d'esterilització a 121 °C.

## 7.1 Vies d'exposició i toxicitat



Els principals aliments contaminats per OTA són els cereals i els seus derivats, que es consideren globalment, la principal font d'exposició a aquesta micotoxina. Més recentment, s'ha mostrat que el vi és una matriu alimentària que pot estar freqüentment contaminada amb OTA, i pot tenir una contribució important a l'exposició global de la micotoxina. A banda, s'ha trobat aquesta micotoxina en altres aliments com el cafè, espècies, fruits secs, cervesa, llegums o formatge.

El perfil toxicològic de l'OTA s'ha descrit principalment a partir del seu efecte nefrotòxic. Diferents estudis epidemiològics fets a Dinamarca, Hongria, Escandinàvia i Polònia, han demostrat el seu rol important en l'etiologia de la nefropatia porcina. També s'ha associat amb la nefropatia humana, concretament amb la Nefropatia Endèmica Balcànica i la Nefropatia Tunisiana. S'ha mostrat en rates el seu efecte altament tòxic en cèl·lules nervioses, i el seu efecte immunosupressor ha estat evidenciat tant a dosis baixes com a dosis altes. S'ha observat un potent efecte teratogènic en animals de laboratori. L'OTA pot travessar la placenta i acumular-se en teixit fetal causant diferents anomalies morfològiques. Tot i que en alguns estudis amb animals l'administració d'OTA ha induït carcinomes hepatocel·lulars i adenomes, no hi ha estudis que reportin una relació adequada entre l'exposició a l'OTA i el càncer humà (Pfohl-Leskowicz et al., 2007).

## 7.2 Valors de referència

- Nivells de seguretat toxicològica.

L'Autoritat Europea de Seguretat Alimentària (EFSA) va establir que l'OTA té efectes nefrotòxics, immunotòxics, neurotòxics i teratogènics a dosis elevades, i va establir una Ingesta Setmanal Tolerable (IST) de  $120 \text{ ng kg}^{-1} \text{ pc}$ , equivalent a  $17,14 \text{ ng kg}^{-1} \text{ pc dia}^{-1}$  (EFSA, 2006).

- Límits màxims en aliments.

La Comissió Europea (CE) va determinar els nivells màxims en aliments a base de cereals per a consum humà directe en  $3 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ ;  $10 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$  en panses;  $5 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$  en cafè torrat;  $2 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$  en vins i  $0,5 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$  en aliments infantils i aliments destinats a usos clínics especials (Comissió Europea, 2006).

### 7.3 Incidència i concentració d' ocratoxina A en els aliments

Els resultats de contaminació d'OTA en aliments del mercat català es mostren en la taula 7.1 i la figura 7.2. Els histogrames de freqüències relatives de la contaminació d'OTA en les diferents matrius alimentàries es troben en la figura 7.3. El percentatge més elevat de mostres positives es trobava en la cervesa (89 %), mentre que a la resta d'aliments era inferior al 50 %. La mitjana de les mostres positives dels aliments infantils, cereals d'esmorzar i pa de motlle, estaven per sota del límit màxim establert per la Comissió Europea (2006) ( $0,50$  i  $3 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), respectivament, considerant ambdós productes, aliments derivats dels cereals. Tot i que no s'han fixat límits màxims per a la cervesa i els fruits secs, la concentració mitjana dels aliments d'aquestes categories eren inferiors als nivells trobats en la resta d'aliments.

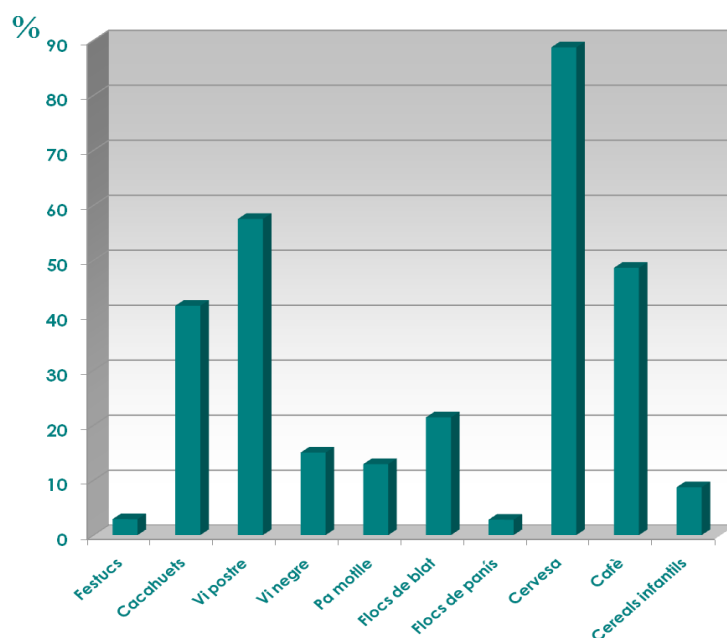


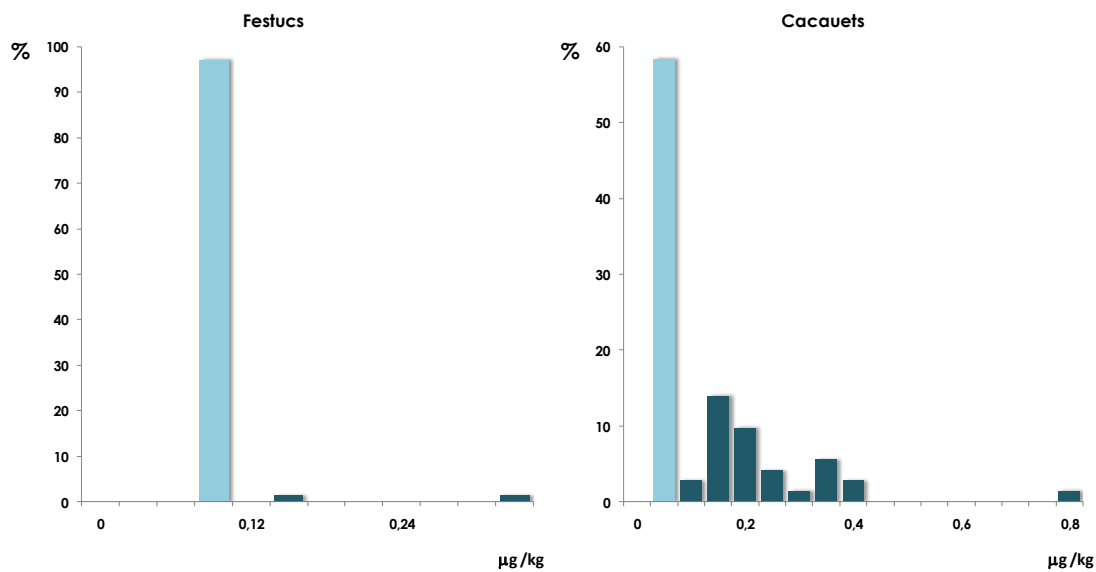
Fig. 7.2 Representació gràfica del percentatge de mostres per sobre del LD

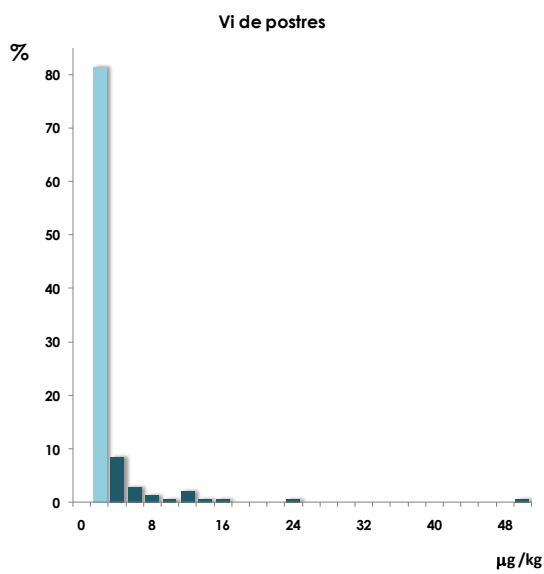
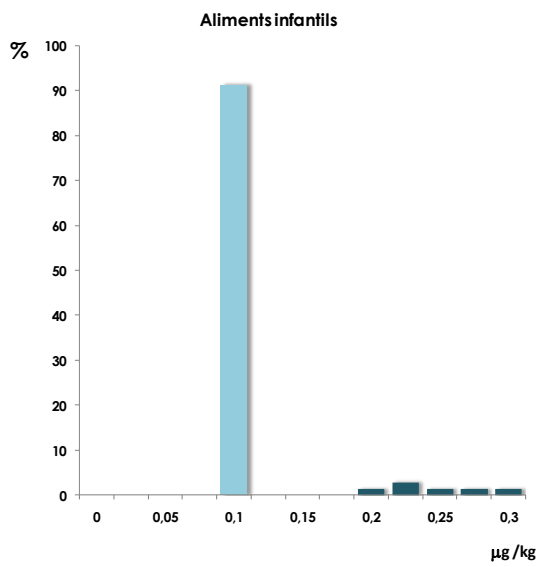
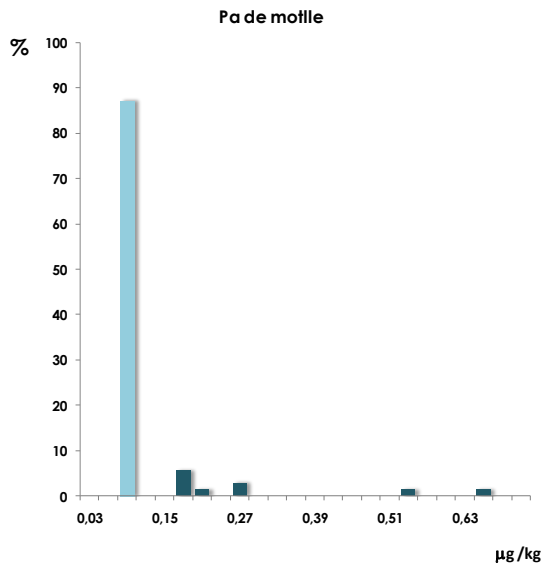
Taula 7.1 Resum de les mostres analitzades, incidència i concentració mitjana i màxima de les mostres positives en cada categoria.

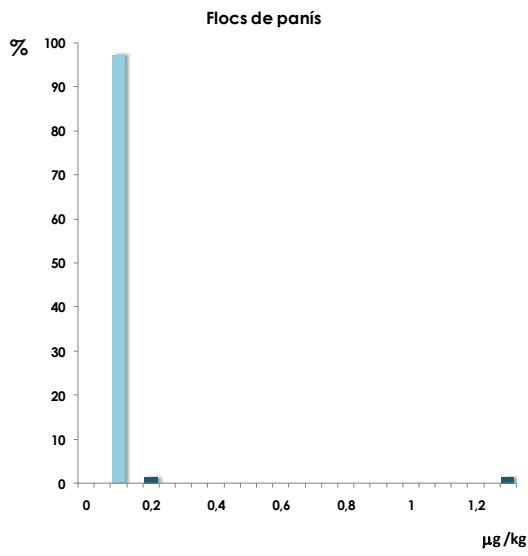
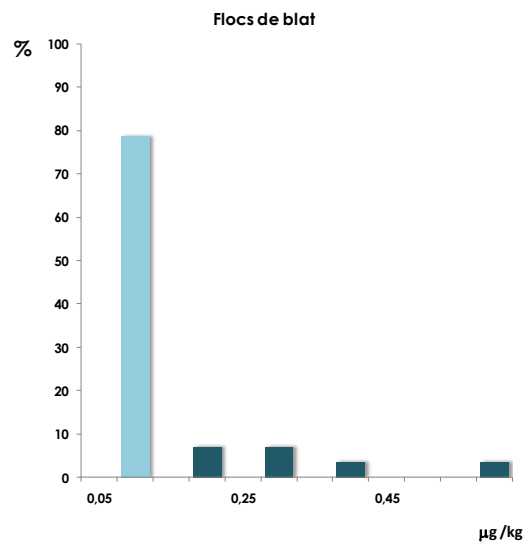
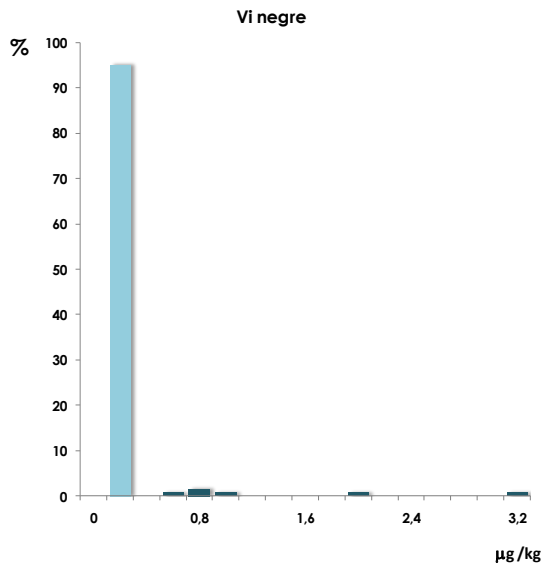
Matrius	n individual	n "composite"	Positives*/total	Mitjana±DE $\mu\text{g kg}^{-1}$	Max $\mu\text{g kg}^{-1}$
Flocs de panís	168	72	2/72	0,73±0,76	1,27
Flocs de blat	28	28	6/28	0,31±0,14	0,57
Pa de motlle	145	70	9/70	0,28±0,18	0,66
Cervesa	216	71	63/71	0,02±0,02	0,13
Vi de postres	141	141	81/141	2,85±6,50	48,68

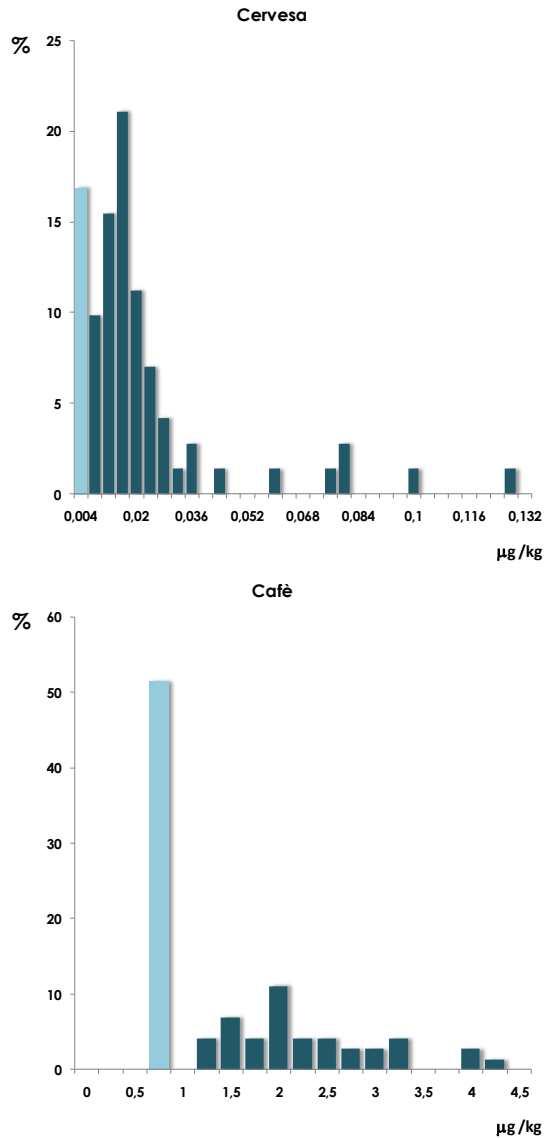
Vi negre	120	120	18/120	0,51±0,81	3,19
Cafè	204	72	35/72	2,17±0,79	4,21
Cacauets	215	72	30/72	0,21±0,14	0,77
Festucs	170	70	2/70	0,23±0,13	0,32
Aliments infantils	150	69	6/69	0,23±0,04	0,29

\* Positives: mostres per sobre del límit de detecció (LD)









**Fig. 7.3** Histogrames de freqüències relatives de la contaminació d'OTA en les diferents matrius alimentàries. (En blau cel, es representen aquelles mostres no detectades, amb el valor equivalent a LD/2)

#### 7.4 Ingesta diària estimada

Tenint en compte el gran nombre de mostres no detectades i atenent les recomanacions de GEMs/Food-WHO, es van realitzar dues estimacions, una considerant 0 i una altra considerant igual al LD d'aquelles mostres no detectades. Per tant, per a cada grup de població es mostren dos escenaris en funció de l'assumpció utilitzada.

Considerant el millor dels casos (ND=0), els adults presentaven la mitjana de la ingesta més elevada, seguits pels nadons, adolescents i nens/es. En el pitjor dels casos (ND=LD),

la mitjana més elevada es va trobar en els nadons, seguits pels adults, nens/es i adolescents (Taula 7.2).

L'augment observat en les diferents estimacions no era proporcional per a cada grup d'edat, sinó que depenia dels valors de LD dels diferents mètodes d'anàlisi dels aliments considerats.

**Taula 7.2 Ingesta diària estimada mitjançant el mètode directe**

Grup de població	Mitjana $\pm$ desviació estàndard (ng kg <sup>-1</sup> pc dia <sup>-1</sup> )	
	ND=0	ND=LD
Adults	0,47 $\pm$ 0,53	0,57 $\pm$ 0,68
Adolescents	0,16 $\pm$ 0,40	0,29 $\pm$ 0,45
Nens/es	0,08 $\pm$ 0,08	0,37 $\pm$ 0,35
Nadons	0,25 $\pm$ 0,24	2,34 $\pm$ 2,26

### 7.5 Contribució dels aliments a la ingesta

En les figures 7.4-7.6 es representen els percentatges de contribució de cada aliment a l'exposició global d'OTA per a cada grup de població. Tal i com s'observa en el gràfic del grup de població adulta, el cafè es la principal font d'exposició a la micotoxina. En el cas dels adolescents, la principal font d'exposició prové dels cereals d'esmorzar, seguidament del pa, del cafè i del pa de motlle, en proporcions similars. Les principals vies d'exposició considerades en els nens/es eren els cereals d'esmorzar seguit del pa de motlle.

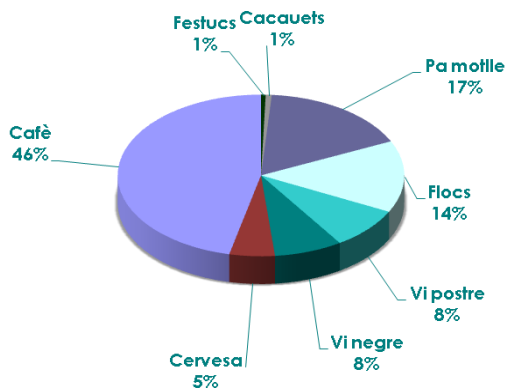


Fig. 7.4 Contribució dels diferents aliments analitzats a l'exposició global d'OTA per al grup dels adults

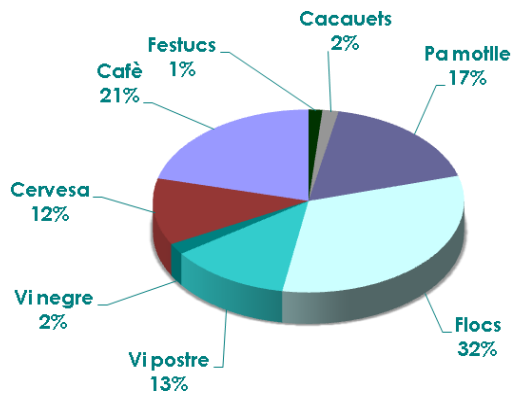


Fig. 7.5 Contribució dels diferents aliments analitzats a l'exposició global de OTA para les adolescents

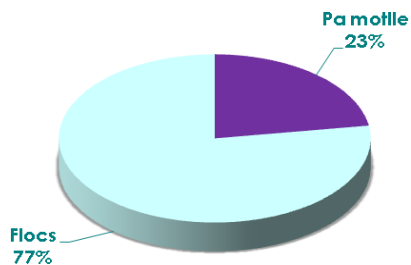


Fig. 7.6 Contribució dels diferents aliments analitzats a l'exposició global d'OTA per als nens/es

## 7.6 Estimació de l'exposició a l' ocratoxina A mitjançant el mètode probabilístic



En les taules 7.3-7.6 es mostren els resultats de l'exposició dels diferents grups de població a l'OTA, estimats mitjançant el mètode de simulació per als dos escenaris d'incertesa. Els valors mitjans eren similars a aquells obtinguts mitjançant el mètode directe, lleugerament superiors en el cas dels nens/es i nadons, i lleugerament inferiors en el cas dels adolescents i adults. Considerant les estimacions per a les medianes, en tots els casos eren inferiors, i en algun cas especial com els nadons, van mostrar valors pròxims al zero. En les figures 7.7-7.10 es representen els diferents histogrames procedents dels valors generats per simulació (n=10.000). En vermell es representa l'escenari d'exposició assumint ND=0 i en blau es representa el cas d'assumpció de ND=LD. Els intervals de confiança bootstrap confirmen la fiabilitat de les estimacions derivades del mètode de simulació, i alhora, coincidint amb la resta d'estudis, podem observar la disminució de la precisió en les estimacions dels percentils més alts.

**Taula 7.3 Diferents estadístics obtinguts per a l'estimació de l'exposició dels adults a l'OTA obtinguts mitjançant el model probabilístic (unitats en ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>)**

Adults	ND=0	ND=LD
N	10000	10000
Mitjana	0,37 [0,30; 0,46]	0,53 [0,46; 0,60]
Desviació estàndard	0,53 [0,31; 0,93]	0,48[0,34; 0,81]
Asimetria	6,855	4,418
Curtosis	86,050	50,951
Mediana	0,23 [0,19; 0,27]	0,41 [0,35; 0,47]
Percentil 90	0,80 [0,62; 0,99]	1,05 [0,87; 1,21]
Percentil 95	1,14 [0,83; 1,53]	1,31 [1,07; 1,58]

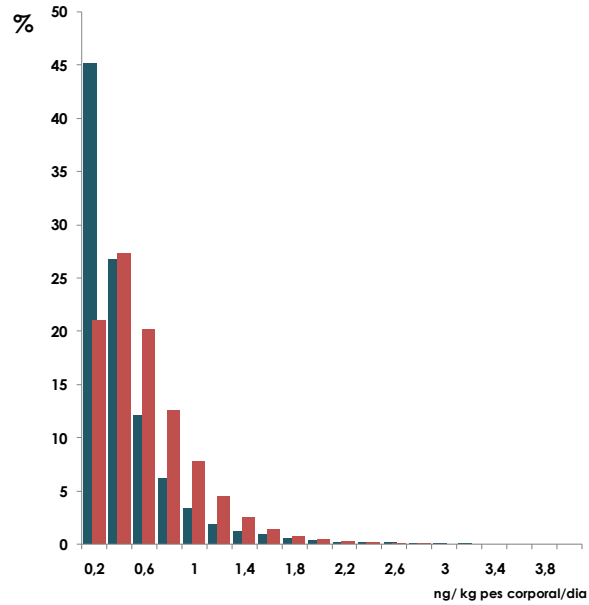


Fig. 7.7 Histograma de freqüències relatives de l'estimació de l'exposició del grup d'adults a l'OTA, obtingut a través del mètode probabilístic (en verd considerant ND=0, i en vermell ND=LD)

Taula 7.4 Diferents estadístics obtinguts per a l'estimació de l'exposició dels adolescents a l'OTA obtinguts mitjançant el model probabilístic (unitats en  $\text{ng kg}^{-1} \text{pc dia}^{-1}$ )

Adolescents	ND=0	ND=LD
N	10000	10000
Mitjana	0,14 [0,10; 0,24]	0,28 [0,23; 0,36]
Desviació estàndard	0,46 [0,12; 1,12]	0,45 [0,18; 0,99]
Asimetria	25,556	15,220
Curtosis	1015,766	364,753
Mediana	0,07 [0,05; 0,08]	0,20 [0,17; 0,23]
Percentil 90	0,28 [0,21; 0,38]	0,52 [0,44; 0,62]
Percentil 95	0,44 [0,30; 0,61]	0,68 [0,54; 0,85]

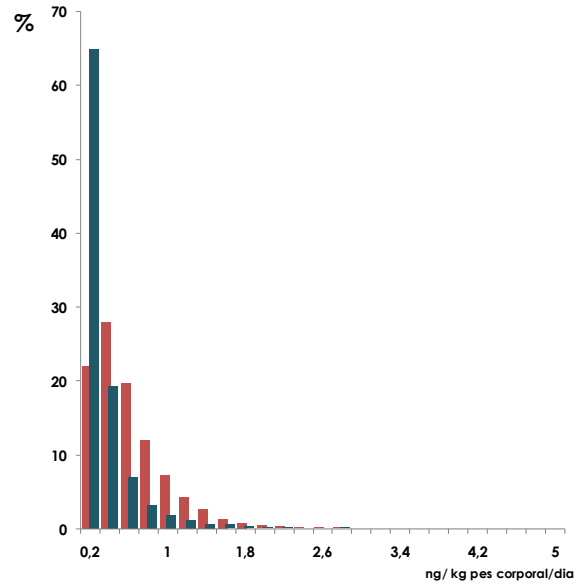


Fig. 7.8 Histograma de freqüències relatives de l'estimació de l'exposició dels adolescents a l'OTA, obtingut a través del mètode probabilístic (en verd considerant ND=0, i en vermell ND=LD)

Taula 7.5 Diferents estadístics obtinguts per a l'estimació de l'exposició dels nens/es a l'OTA obtinguts mitjançant el model probabilístic (unitats en  $\text{ng kg}^{-1} \text{pc dia}^{-1}$ )

Nens/nens	ND=0	ND=LD
N	10000	10000
Mitjana	0,090 [0,060; 0,138]	0,388 [0,317; 0,464]
Desviació estàndard	0,163 [0,069; 0,393]	0,301 [0,236; 0,398]
Asimetria	8,401	1,399
Curtosis	128,133	3,080
Mediana	0,048 [0,027; 0,070]	0,319 [0,236; 0,404]
Percentil 90	0,209 [0,143; 0,328]	0,804 [0,635; 1,029]
Percentil 95	0,303 [0,186; 0,547]	0,981 [0,749; 1,268]

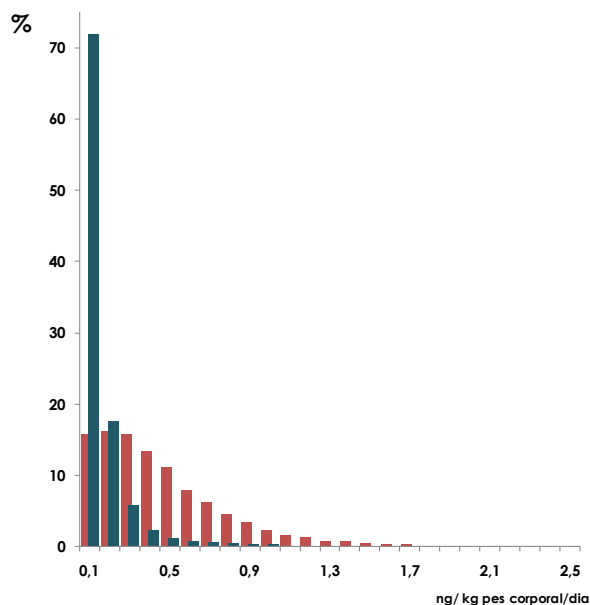
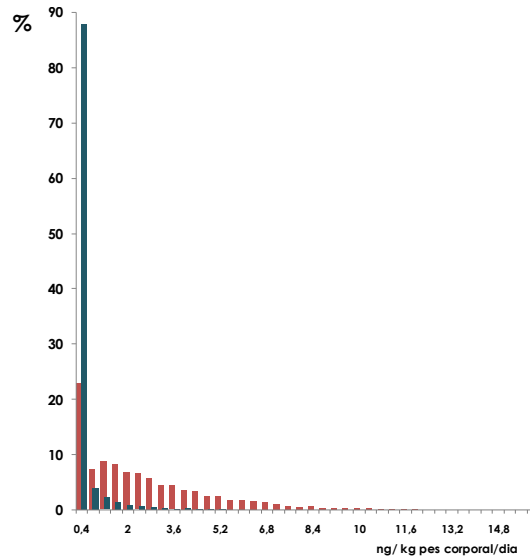


Fig. 7.9 Histograma de freqüències relatives de l'estimació de l'exposició dels nens/es a l'OTA, obtingut a través del mètode probabilístic (en verd considerant ND=0, i en vermell ND=LD)

Taula 7.6 Diferents estadístics obtinguts per a l'estimació de l'exposició dels nadons a l'OTA obtinguts mitjançant el mètode probabilístic (unitats en  $\text{ng kg}^{-1} \text{pc dia}^{-1}$ )

Nadons	ND=0	ND=LD
N	10000	10000
Mitjana	0,28 [0,14; 0,43]	2,42 [2,05; 2,81]
Desviació estàndard	1,11 [0,44; 2,08]	2,48 [2,03; 2,97]
Asimetria	9,167	1,693
Curtosis	129,703	4,150
Mediana	0,00 [0,00; 0,00]	1,77 [1,34; 2,19]
Percentil 90	0,58 [0,24; 1,16]	5,74 [4,72; 6,74]
Percentil 95	1,46 [0,65; 2,77]	7,23 [5,85; 8,87]



**Fig. 7.10 Histograma de freqüències relatives de l'estimació de l'exposició dels nadons a l'OTA, obtingut a través del mètode probabilístic (en verd considerant ND=0, i en vermell ND=LD)**

## 7.7 Avaluació del risc

En la figura 7.11 es representa el percentatge de la ingesta diària tolerable per a cada grup de població (mitjana i percentil 95), en el pitjor escenari que seria assumint que les mostres ND es substitueixen pel respectiu valor de LD.

Tot i tenir en compte que l'escenari representat és bastant improbable, les estimacions més altes (p95 nadons), es trobarien allunyades de la IDT, representant un 40 % d'aquest nivell. En la resta dels casos, aquest percentatge es inferior al 10 % (p95) i al 5 % (mitjana).

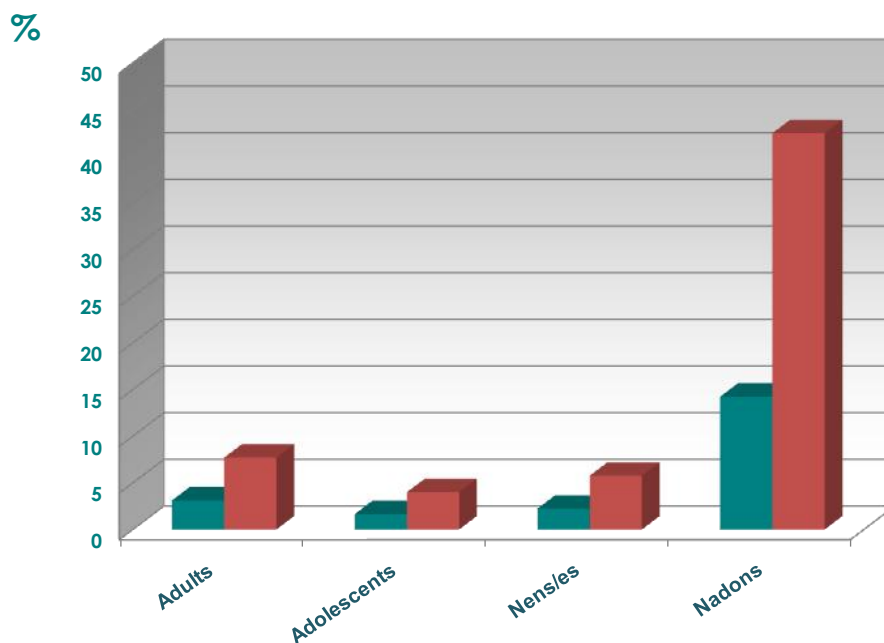


Fig. 7.11 Representació gràfica del percentatge de la ingesta diària tolerable d'OTA, estimat per cada grup de població per a la mitjana (verd) i per al percentil 95 (vermell) considerant ND=LD

## 7.8 Altres estudis d'exposició

En els estudis previs realitzats a Espanya en el marc de l'estudi europeu SCOOP (2002) es va estimar una ingesta mitjana de  $1,18 \text{ ng kg}^{-1} \text{ pc dia}^{-1}$ . En el mateix estudi es van documentar valors similars per a la població italiana i alemanya amb valors de  $1,13$  i  $1,09 \text{ ng kg}^{-1} \text{ pc dia}^{-1}$ , respectivament. Valors més elevats es van estimar per als nens/es alemanys amb valors compresos entre  $1,82$ - $3,14 \text{ ng kg}^{-1} \text{ pc dia}^{-1}$  i els nens anglesos ( $1,42 \text{ ng kg}^{-1} \text{ pc dia}^{-1}$ ). El mateix estudi va reportar valors d'exposició lleugerament inferiors per a adults de Grècia o d'Anglaterra ( $0,15$  i  $0,53 \text{ ng kg}^{-1} \text{ pc dia}^{-1}$ , respectivament).

Gauchi i Leblanc (2002) van dur a terme un estudi similar al que es presenta en aquest document, aplicant un mètode probabilístic robust amb dades de contaminació i consum de població francesa. En aquell estudi es van estimar valor mitjans de  $5,85 \text{ ng kg}^{-1} \text{ pc dia}^{-1}$  per als nens/es i valors entre  $3,04$  i  $3,50 \text{ ng kg}^{-1} \text{ pc dia}^{-1}$  per als adults, en ambdós casos força més elevats que en els valors estimats per a la població catalana.

Posteriorment Leblanc et al., (2005) van publicar el Primer Estudi de Dieta Total Francès, on van estimar l'exposició de la població francesa mitjançant un mètode determinístic. Els resultats oscil·laven entre 2,16 i 4,07 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>, per adults i nens/es, respectivament, i eren lleugerament inferiors als publicats per Gauchi et al. (2002), però continuaven sent més elevats als estimats en el present estudi.

En el Segon Estudi de Dieta Total Francès (ANSES, 2011) es va estimar que l'exposició mitjana de la població adulta se situava entre 0,28 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup> (hipòtesi baixa, LD=0) i 1,91 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup> (hipòtesi alta, LD=LQ). En el cas dels nens, l'exposició mitjana se situava entre 0,23 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup> (hipòtesi baixa) i 2,82 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup> (hipòtesi alta). El percentil 95 d'exposició representa menys del 20% de la ISTP en els adults i del 50% en els nens. En l'estudi, les anàlisis amb un resultat de micotoxina no detectada o no quantificada van atènyer el 99,5% de les mostres.

## 7.9 Referències

Comissió Europea (CE). 2006. Reglament (CE) N° 1881/2006 de 19/12/2006. Official Journal of the European Union, L364, 5-24.

Étude de l'Alimentation totales française (EAT 2) Tome1. ANSES, Juin 2011

Gauchi J-P, Leblanc J-C. 2002. Quantitative assessment of exposure to the mycotoxin ochratoxin A in food. RiskAnal 22:219-34.

Global Environment Monitoring System/Food- World Health Organization (GEMs/Food-WHO). 1995. Reliable evaluation of low-level contamination of food—workshop in the frame of GEMs/Food-EURO [Internet]. Kulmbach, Germany: GEMs/Food-WHO.

Leblanc J, Tard A, Volatier J, Verger P. 2005. Estimated dietary exposure to principal food mycotoxins from The First French Total Diet Study. *Food Addit Contam.* 22:652-72.

SCOOP (Scientific Cooperation Task 3.2.7 of the European Commission). 2002. Assessment of dietary intake of Ochratoxin A by the population of EU Member States Final report. Directorate – General Health and Consumer Protection. European Commission, Brussels, Belgium.

Pfohl-Leskowicz, A., Manderville, R.A. 2007. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Mol Nut Food Res.* 5:61-99



# 8 Patulina

La patulina (PAT) va ser aïllada com antibiòtic durant els anys 40 i, a causa del seu descobriment simultani per varis grups de recerca ha estat anomenada com clavacina, expansina, claviformina, clavatina i miocina C. Estructuralment, la patulina és la 4-hidroxi-4H-furo[3,2-c]piran-2(1H)-ona, una lactona heterocíclica insaturada (Fig. 8.1). Forma cristalls incoloros amb un punt de fusió de 111 °C i sublima al buit a temperatures de 70-100 °C. És soluble en aigua, metanol, etanol, acetona, acetat d'etil, èter i cloroform, i insoluble en benzè i èter de petroli. El seu màxim d'absorbància es troba a 275 nm ( $\epsilon$  16600). És estable en medi àcid, però es pot descomposar mantenint-la en ebullició en àcid sulfúric 2N durant sis hores. Perd la seva activitat biològica en medi àlcali ja que s'hidrolitza mentre que es redueix en presència de SO<sub>2</sub> i en condicions de fermentació.

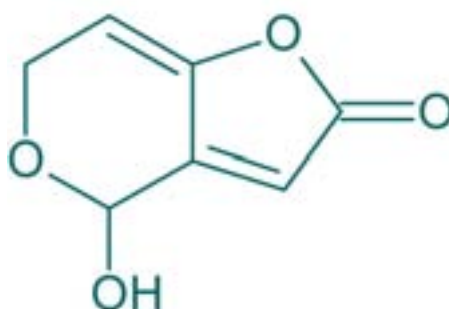


Fig. 8.1. Estructura molecular de la patulina

Al ser un alcohol secundari, redueix la solució de Fehling i decolora el permanganat de potassi. La PAT és produïda principalment per *Penicillium expansum*, tanmateix, també la poden produir espècies d'*Aspergillus*, *Paecylomyces* i *Byssochlamys*, i en menor concentració espècies d'*Alternaria*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Mucor* i *Phialophora* tots ells amb capacitat de produir malalties de postcollita a fruites i vegetals (Fuchs et al., 2008).

La producció de PAT és dependent de la temperatura i de la proporció de CO<sub>2</sub> i O<sub>2</sub> de l'aire. Les condicions òptimes de producció de PAT per *P. expansum* són: pH igual a 6 i temperatura de 25°C en pera i de 17 °C en poma. No obstant això, la producció de toxina es pot donar entre 0 i 25 °C, és a dir, fins i tot en condicions de refrigeració. La

producció és inhibida quan el fong es sotmet a una atmosfera amb una proporció de CO<sub>2</sub> del 3% i O<sub>2</sub> del 2% a 25°C (Barkai-Golan et al., 2008).

## 8.1 Vies d'exposició i toxicitat

La PAT s'ha detectat en una gran varietat de fruites, però en poma es troba en concentracions més elevades. Normalment les pomes després de la collita són emmagatzemades en condicions de refrigeració per tal de perllongar la vida útil algunes setmanes o fins i tot, alguns mesos. En aquestes condicions *P. expansum* continua creixent i produint PAT. Per aquest motiu, els productes que presenten nivells més elevats de PAT són aquells processats a partir de fruita, en especial poma, que han sofert un procés de refrigeració. S'observa una relació directa entre la zona malmesa de la fruita i la producció de PAT, tot i que hi ha casos en els quals no es manté aquesta relació.

La PAT és altament tòxica per a les cèl·lules animals i vegetals. Pot reaccionar amb els grups sulfhidril de proteïnes i polipèptids presents en els aliments. S'ha observat que provoca disrupció de la membrana plasmàtica, inhibició del transport d'aminoàcids dependent de sodi, interfereix en la traducció i la transcripció, inhibeix la síntesis d'ADN i de l'interferó  $\gamma$  que produeix les cèl·lules T tipus 1, i produeix ruptures persistents dels enllaços dobles i simples de la cadena de nucleòtids en *E. coli*, així com danys oxidatius en cèl·lules humanes. També poden inhibir l'activitat de nombrosos enzims degut a la seva afinitat pels grups sulfhidril i té un efecte inhibitori sobre paràmetres bioquímics tals com l'activitat ATPasa, alcalina fosfatasa, aldolasa i hexoquinasa.

En estudis on la PAT era administrada a dosis altes durant dos mesos es va observar un efecte carcinogènic amb la producció de sarcomes, però en estudis amb dosis baixes no es va observar aquest efecte (JECFA, 2002). La IARC conclou que no hi ha evidència adequada que demostrï un efecte carcinogènic de la PAT en animals d'experimentació i no s'ha avaluat el seu efecte en humans. Per tant, la IARC classifica a la PAT en el grup 3 (IARC, 1993). Els efectes aguts inclouen nàusees, vòmits i altres símptomes gastrointestinals que s'acompanyen de danys en el ronyó. S'ha observat que la PAT té propietats immunotòxiques a elevades concentracions. Quant a la DL<sub>50</sub> de la PAT en rates és de 15 i 25 mg kg<sup>-1</sup> si és injectada de forma subcutània. La mort de les rates és deguda a edema pulmonar (JECFA, 2002).

## 8.1 Valors de referència

- Nivells de seguretat toxicològica

La JECFA va revisar els nivells de seguretat l'any 1995. Com que la PAT no s'acumula a l'organisme i, considerant el patró de consum dels productes que la contenen, la Ingesta Setmanal Tolerable Provisional prèviament calculada es va canviar per la Ingesta Diària Tolerable Màxima Provisional (IDTMP) es va establir en  $0,4 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ pc dia}^{-1}$ , basada en un NOEL de  $43 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ pc dia}^{-1}$  i un factor de seguretat de 100.

- Límits màxims en aliments

El Reglament (CE) N° 1881/2006 de la Comissió de 19 de desembre de 2006 en el qual fixa el contingut màxim de determinats contaminants en els productes alimentaris, estableix un valor màxim de  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$  en suc de fruita, suc de fruita concentrats i reconstituïts i en nèctars de fruita, així com un valor màxim de  $25 \mu\text{g kg}^{-1}$  en productes sòlids elaborats amb pomes, inclosos la compota i el puré de poma destinats al consum directe excepte els destinats a alimentació infantil. També estableix un valor màxim de  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  per al suc de poma i productes sòlids elaborats a base de poma, inclosos la compota i el puré de poma destinats als lactants i nens de curta edat i venuts i etiquetats com a tal.

## 8.3 Incidència i concentració de patulina en els aliments

La PAT es va quantificar principalment en suc de poma (42,3 %) i en aliments infantils a base de poma (33,9 %), mentre que rarament es va trobar la micotoxina en els aliments sòlids a base de poma (5,2 %). Tot i això, el valor màxim ( $17,6 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) i la mitjana de les mostres positives més elevada ( $13,5 \pm 4,9 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) correspon a aquesta darrera categoria (Figs. 8.2-8.3 i Taula 8.1).

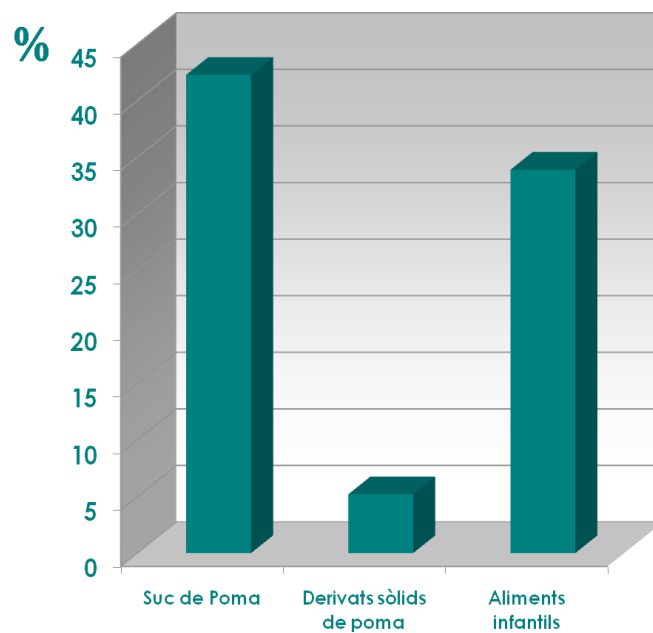
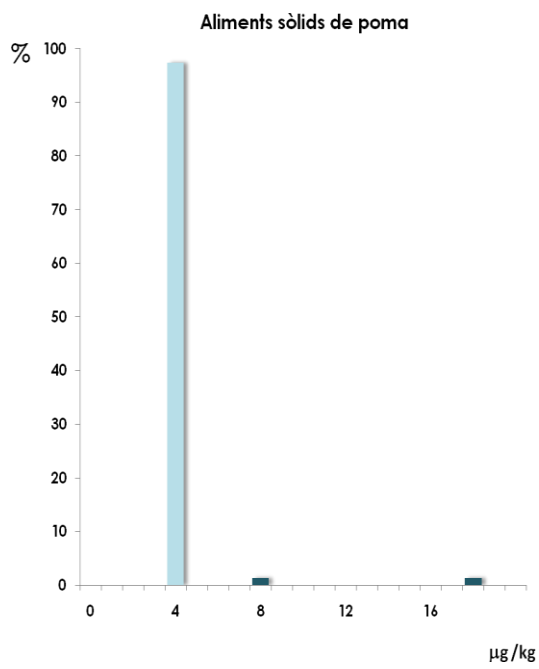
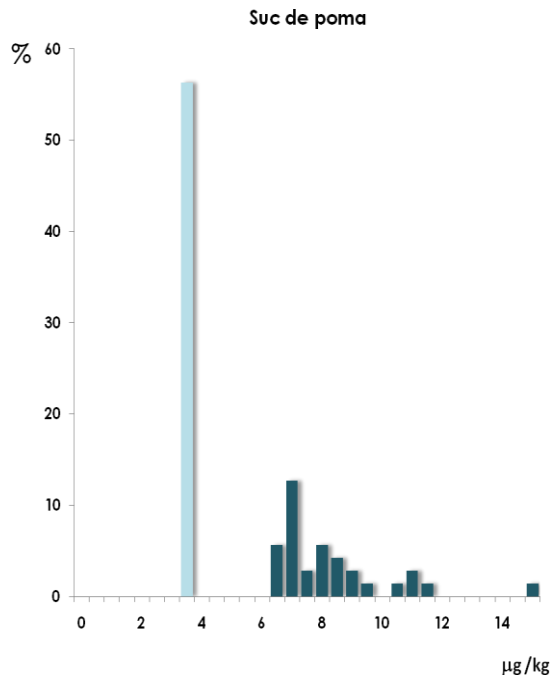
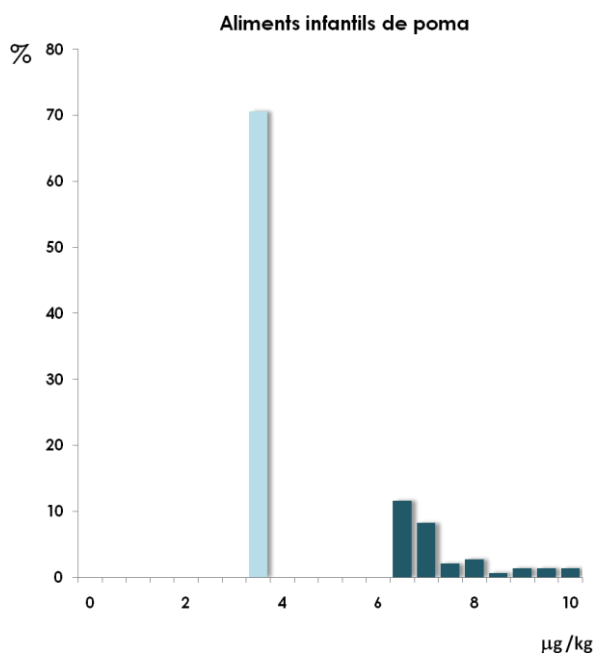


Fig. 8.2 Representació gràfica del percentatge de mostres per sobre del LQ

Taula 8.1 Resum de les mostres analitzades, incidència i concentració mitjana i màxima de les mostres positives en cada categoria

Matrius	n individual	n "composite"	Positives/total	Mitjana±DE µg kg <sup>-1</sup>	Max µg kg <sup>-1</sup>
Suc de poma	161	71	30/71	8,1±1,9	15,0
Derivats sòlids de poma	77	77	4/77	13,5±4,9	17,6
Aliments infantils	124	124	42/124	7,1±0,9	9,6





**Fig. 8.3** Histogrames de freqüències relatives de la contaminació de patulina en les diferents matrius alimentàries. (En blau cel, es representen aquelles mostres no quantificades, amb el valor equivalent a LD/2)

#### 8.4 Ingesta diària estimada

La metodologia de càlcul es descriu en detall en l'apartat 2.4.1 de la secció de metodologia. Per realitzar el càlcul de l'exposició de la població a la patulina, s'ha utilitzat el mètode de la hipòtesi mitjana o *middlebound* (MB), que adjudica un valor als no detectats igual a la meitat del límit de detecció ( $ND = LD/2$ ), considerant el LQ tres vegades el valor del LD.

La ingesta d'aliments derivats de poma a Catalunya es baixa entre la població adulta, mostrant un patró estacional u ocasional. En el cas de la població infantil o els nadons, el consum d'aquests aliments és més predominant, incrementant considerablement el nombre de consumidors. Per realitzar el càlcul de l'exposició a patulina, només es va considerar la població consumidora d'aliments derivats de poma. En el cas dels adults, representa un 12 %, en el cas dels adolescents, el percentatge de consumidors és del 43%, mentre que en el cas dels nens i dels nadons el percentatge va ser del 26% i 36 %, respectivament.

**Taula 8.2 Consum de suc de poma.**

Grup de població	% Consumidors	Ingesta diària (ml/dia)
Gent Gran	3	156
Celíacs	30	57
Nouvinguts	36	148
Homes	16	9
Dones	8	5
Adolescents	43	32
Nens/es	26	40
Nadons	37	108

**Taula 8.3 Ingesta d'aliments infantils a base de poma**

Categoria d'aliment	Mitjana (ml/dia)	P <sub>95</sub> (ml/dia)
Compota de poma	22,2	130
Compota multifruïtes	58,3	130
Suc de poma infantil	20,4	136

Observant els valors obtinguts mitjançant el mètode directe, podem identificar que els nadons i els nens/es, són el grup de població més vulnerable, amb una ingesta estimada de PAT més alta, i amb un elevat nombre de consumidors en aquests col·lectius (Taula 8.4).

**Taula 8.4 Ingesta diària estimada mitjançant el mètode directe.**

Grup de població	Mitjana ± desviació estàndard (ng kg <sup>-1</sup> pc dia <sup>-1</sup> )
Gent Gran <sup>1</sup>	-
Celíacs	6,53 ± 8,47
Nouvinguts	11,85 ± 6,80
Adults <sup>2</sup>	4,24 ± 5,54
Adolescents	7,71 ± 10,46
Nens/es	26,84 ± 29,89
Nadons	64,49 ± 67,96

<sup>1</sup>El nombre de consumidors en el grup de gent gran és massa baix per a fer els càlculs d'exposició

<sup>2</sup>Degut al baix nombre de consumidors, s'han tractat ambdós sexes conjuntament

## 8.5 Contribució dels aliments a la ingesta

Degut a la baixa contaminació i baix consum dels aliments sòlids derivats de poma, en el càlcul de l'exposició només es va tenir en compte el suc de poma com a font d'exposició per a la població no infantil.

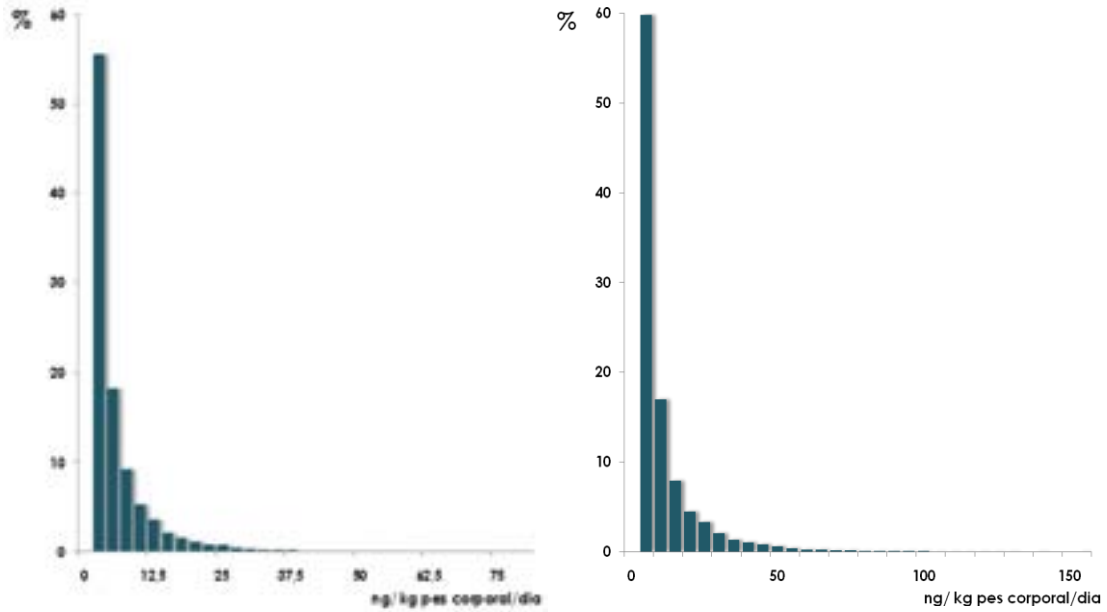
## 8.6 Estimació de l'exposició a patulina mitjançant el mètode probabilístic

En les taules 8.5 i 8.6 i les figures 8.4 i 8.5 es mostren els resultats referents a l'exposició a PAT calculats per als adults, adolescents i nadons consumidors d'aliments derivats de poma. En la resta de grups no hi ha un nombre suficient de consumidors per tal de fer l'ajust de la distribució i fer una simulació fiable de l'exposició.

**Taula 8.5 Diferents estadístics obtinguts per a l'estimació de l'exposició dels adults i dels adolescents a patulina obtinguts mitjançant el model probabilístic (unitats en ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>)**

	Adults	Adolescents
N	10000	10000
Mitjana	4,28 [3,01; 5,80]	7,85 [5,59; 10,56]
Desviació estàndard	8,437 [3,78; 9,76]	12,52 [7,66; 18,34]
Asimetria	3,523	3,583
Curtosis	18,86	18,85
Mediana	2,00 [1,24; 3,07]	3,28 [1,94; 4,91]
Percentil 90	10,95 [6,97; 16,10]	21,10 [13,76; 31,55]
Percentil 95	16,42 [9,59; 24,29]	31,50 [20,81; 50,57]

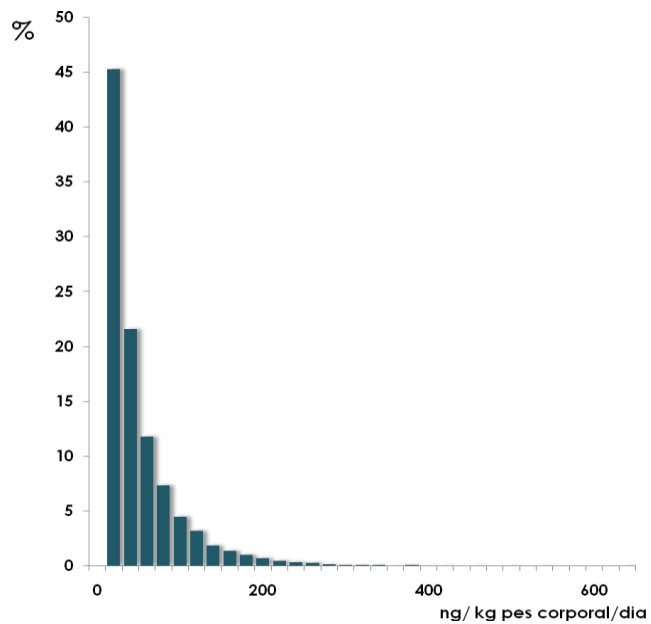




**Fig. 8.4** Histograma de freqüències relatives de l'estimació de l'exposició dels adults (esquerra) i adolescents (dreta) a patulina obtingut a través del mètode probabilístic

**Taula 8.6** Diferents estadístics obtinguts per a l'estimació de l'exposició dels nadons a patulina obtinguts mitjançant el model probabilístic (unitats en  $\text{ng kg}^{-1} \text{pc dia}^{-1}$ )

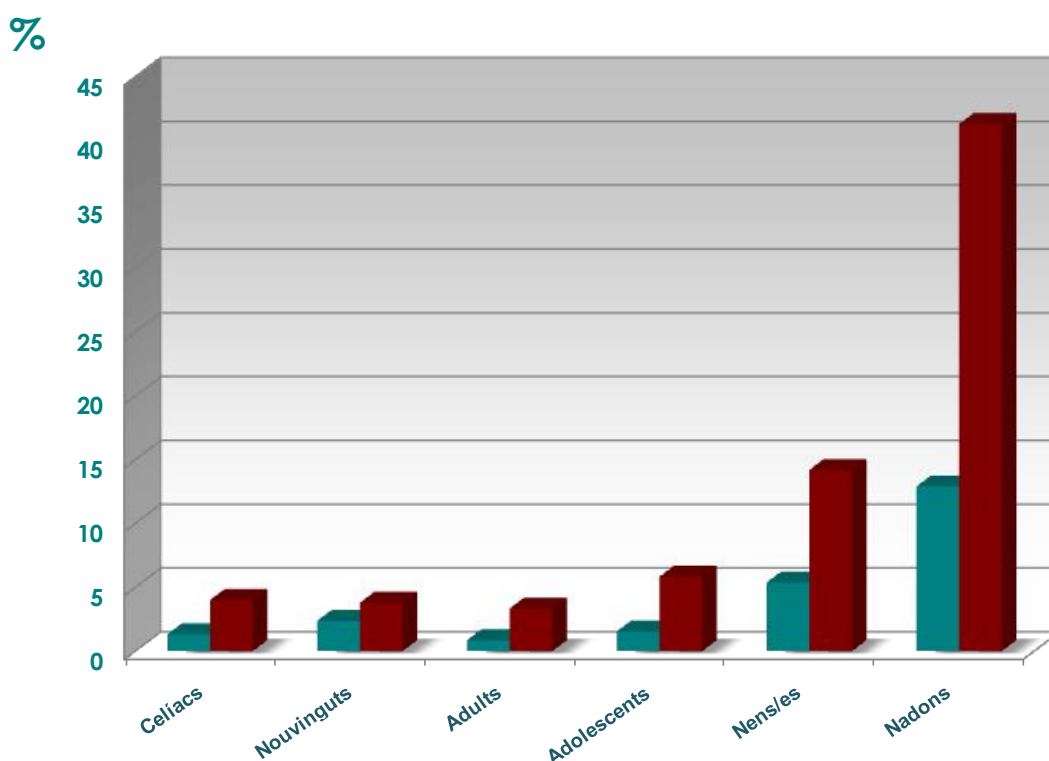
	Nadons
N	10000
Mitjana	39,92 [28,74; 53,24]
Desviació estàndard	48,49 [29,78; 73,05]
Asimetria	2,809
Curtosis	12,865
Mediana	23,47 [14,66; 34,03]
Percentil 90	97,46 [61,99; 137,96]
Percentil 95	136,41 [80,42; 193,30]



**Fig. 8.5** Histograma de freqüències relatives de l'estimació de l'exposició dels nadons a patulina obtingut a través del mètode probabilístic

### 8.7 Avaluació del risc

En el cas de la PAT, la ingesta estimada de patulina es troba, en tots els casos, lluny del valor de l'IDT de 400 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>, inclòs en el pitjor dels casos (percentil 95, grup dels nadons) (Fig. 8.7).



**Fig. 8.7 Representació gràfica del percentatge de la ingesta diària tolerable de patulina, estimat per cada grup de població per a la mitjana (verd) i per al percentil 95 (vermell)**

## 8.8 Altres estudis d'exposició

Els estudis previs realitzats a Espanya, van estimar la ingesta diària de PAT a partir de valors hipotètics de consum d'aliments derivats de poma. Aquestes estimacions es trobaven entre 15 i 55  $\text{ng kg}^{-1} \text{pc dia}^{-1}$  per als adults, entre 12 i 122  $\text{ng kg}^{-1} \text{pc dia}^{-1}$  per als nens i entre 86 i 252  $\text{ng kg}^{-1} \text{pc dia}^{-1}$  per als nadons (González-Osnaya et al., 2007; Murillo-Arbizu et al., 2009). Altres països europeus van mostrar valors similars als que es mostren en el present estudi. Per exemple, a França, es va estimar una ingesta mitjana diària de 18 i 30  $\text{ng kg}^{-1} \text{pc dia}^{-1}$  per a adults i nens, respectivament (Leblanc et al., 2005), i a Suècia, la ingesta mitjana respectiva va ser estimada en 4 i 8  $\text{ng kg}^{-1} \text{pc dia}^{-1}$  (Thuvander et al., 2001).

En el segon estudi d'alimentació total francès, la patulina no es va quantificar en cap aliment i només es va detectar en alguns aliments a base de poma, com la compota i la poma cuïta, el suc i la poma fresca. Atès l'alt nombre de mostres no detectades, superior al 60%, es va estimar l'exposició utilitzant el mètode de les hipòtesis baixa (lowerbound) i alta (upperbound). L'exposició mitjana en la hipòtesis baixa és de 0,67 (0,27-2,71)  $\text{ng kg}^{-1} \text{pc dia}^{-1}$  en adults i de 1,21 (0,85-1,96)  $\text{ng kg}^{-1} \text{pc dia}^{-1}$  en els nens, mentre que en la hipòtesis alta és de 21,2 (18,6-26,5)  $\text{ng kg}^{-1} \text{pc dia}^{-1}$  en els adults i de 39,3 (35-44,9)  $\text{ng kg}^{-1} \text{pc dia}^{-1}$  (ANSES, 2011).

## 8.9 Referències

Barkai-Golan R. 2008. *Penicillium* mycotoxins. In: Barkai-Golan R, Paster N, editors. Mycotoxins in fruits and vegetables. Amsterdam: Elsevier. p. 160–170.

Étude de l'Alimentation totales française (EAT 2) Tome1. ANSES, Juin 2011

Fuchs S, Sontag G, Stidl R, Ehrlich V, Kundi M, Knasmüller S. 2008. Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food Chem Toxicol.* 46:1398–1407.

González-Osnaya L, Soriano JM, Moltó JC, Mañes J. 2007. Exposure to patulin from consumption of apple-based products. *Food Addit Contam.* 24:1268–1274.

International Agency for Research on Cancer (IARC). 1993. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans, some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyon: IARC, 56: 489–521. Comissió Europea (CE). 2006.

Joint FAO/WHO Experts Committee on Food Additives (JECFA). 2002. Reports on tasks for scientific cooperation. Report of experts participating in Task 3.2.8 March 2002. Assessment of dietary intake of patulin by the population of EU Member States. Berlin: Directorate- General Health and Consumer Protection.

Leblanc J, Tard A, Volatier J, Verger P. 2005. Estimated dietary exposure to principal food mycotoxins from The First French Total Diet Study. *Food Addit Contam.* 22:652-72.

Murillo-Arbizu A, Amézqueta S, González-Peñas E, López de Cerain A. 2009. Occurrence of patulin and its dietary intake through apple juice consumption by the Spanish population. *Food Chem.* 113:420–423.

Reglament (CE) N° 1881/2006 of 19/12/2006. Official Journal of the European Union, L364, 5-24.

Thuvander A, Möller T, Enghardt H, Jansson A, Salomonsson A-C, Olsen M. 2001. Dietary intake of some important mycotoxins by the Swedish population. *Food Addit Contam.* 18:696–706.

World Health Organization (WHO). 1995. 44th Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Technical Report Series No. 859, 36. Geneva: WHO

# 9

## Tricotecens Tipus A. Toxina T-2 i HT-2

Els tricotecens són una família de micotoxines produïdes per diferents espècies del gènere *Fusarium* en cereals que creixen en regions temperades d'Amèrica, Europa i Àsia. Estructuralment són sesquiterpenoides cíclics, els quals estan dividits en quatre grups (A-D), destacant la toxina T-2 (T2) i la toxina HT-2 (HT2) del grup A (Fig. 9.1 i 9.2) i el deoxinivalenol (DON) i el nivalenol (NIV) del grup B (De Nijs et al., 1996; Gelderblom et al., 1988; Glenn, 2007).

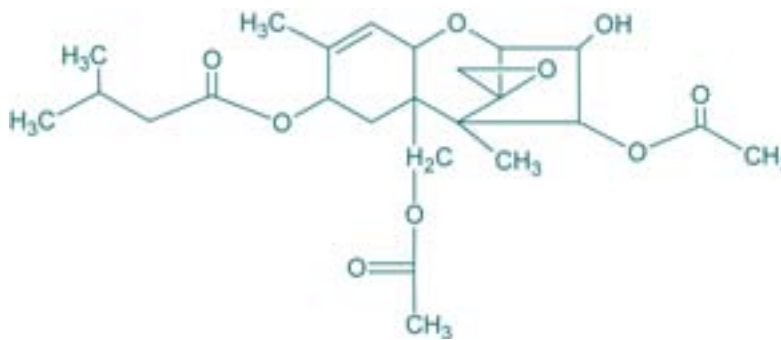


Fig. 9.1 Estructura molecular de la toxina T-2

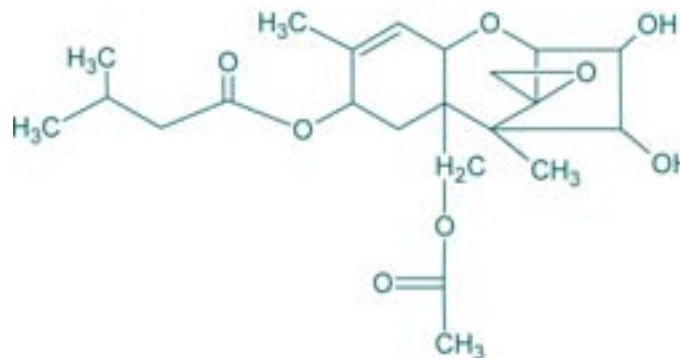


Fig. 9.2 Estructura molecular de la toxina HT-2

Els tricotecens són produïts en una gran varietat de cereals; per tant, aquestes micotoxines s'han detectat en un ampli rang d'aliments produïts a base de cereals (Lombaert et al., 2003; Schollenberger et al., 1999; Scott, 1997).

## 9.1 Vies d'exposició i toxicitat

La incidència de T2 i HT2 en els països europeus, es limita bàsicament als cereals de gra, tanmateix hi ha poca informació de la incidència en els aliments processats destinats per a consum humà. Com altres tricotecens, la T2 i HT2 són estables a la temperatura i, per tant, a la majoria dels processats industrials dels aliments.

Les toxines T2 i HT2 s'han estudiat àmpliament en animals, però, tot i els seus efectes, no se n'ha estudiat mai la toxicologia en humans. La T2 és un potent inhibidor de la síntesis de proteïnes i de la funció mitocondrial, tant *in vivo* com *in vitro*, i mostra efectes citotòxics i immunosupressors. A més, s'ha demostrat que és extremadament tòxica sobre la pell i les mucoses (Visconti et al., 1991; Eriksen et al., 2004). A través de la desacetilació de la toxina T2 s'obté la toxina HT2 com a metabòlit principal; tanmateix, hi ha poca informació disponible sobre l'efecte tòxic d'aquest metabòlit sol (Visconti, 2001; Sudakin, 2003).

## 9.2 Valors de referència

- Nivells de seguretat toxicològica.

L' SCF, després d'avaluar l'efecte de la T2 i la HT2 va concloure que l'efecte tòxic de les dues micotoxines no pot ser diferenciat. Per tant la IDTMP d'aquestes, combinades o separades, va ser inicialment establert en  $0,06 \mu\text{g kg}^{-1} \text{pc dia}^{-1}$  (SCF 2001). Posteriorment, el grup d'experts de contaminants de l'EFSA va establir una ingesta diària tolerable (IDT) de  $0,1 \mu\text{g kg}^{-1} \text{pc dia}^{-1}$  (EFSA, 2011).

- Límits màxims en aliments.

Actualment no s'ha fixat un contingut màxim de les toxines T-2 i HT-2 als cereals no elaborats i productes a base de cereals en la legislació europea. La Recomanació 2013/165/UE de la Comissió de 27 de març de 2013 sobre la presència de toxines T-2 i HT-2 en els cereals i e en els productes a base de cereals estableix uns nivells indicatius per als cereals i els productes a base de cereals destinats a aliments i pinsos, que van des de  $2000 \mu\text{g kg}^{-1}$  per a productes de la molta d'avena (clofolles)destinada als pinsos fins als  $15 \mu\text{g kg}^{-1}$  per aliments elaborats a base de cereals destinats a lactants i nenes de curta edat.

### 9.3 Incidència i concentració de les toxines T-2 i HT-2 en els aliments

En les figures 9.3 i 9.4 es pot observar que la HT2 va ser la toxina que es va trobar amb més freqüència en els aliments a base de cereals, especialment en els flocs d'esmorzar, la pasta, els aperitius de panís i, en menor percentatge en el pa de motlle. La T2 es va trobar en un baix percentatge de mostres de les categories esmentades anteriorment (<25 %). Les toxines T-2 i HT-2 no es van detectar en cap mostra de la categoria del pa ni de la cervesa. La mitjana de concentració de HT2 més elevada correspon a la categoria de panís dolç ( $144,8 \pm 63,2 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), mentre que la mitjana més elevada de T2 es va trobar en els aperitius de panís ( $82,8 \pm 170,2 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) (Taula 9.1).

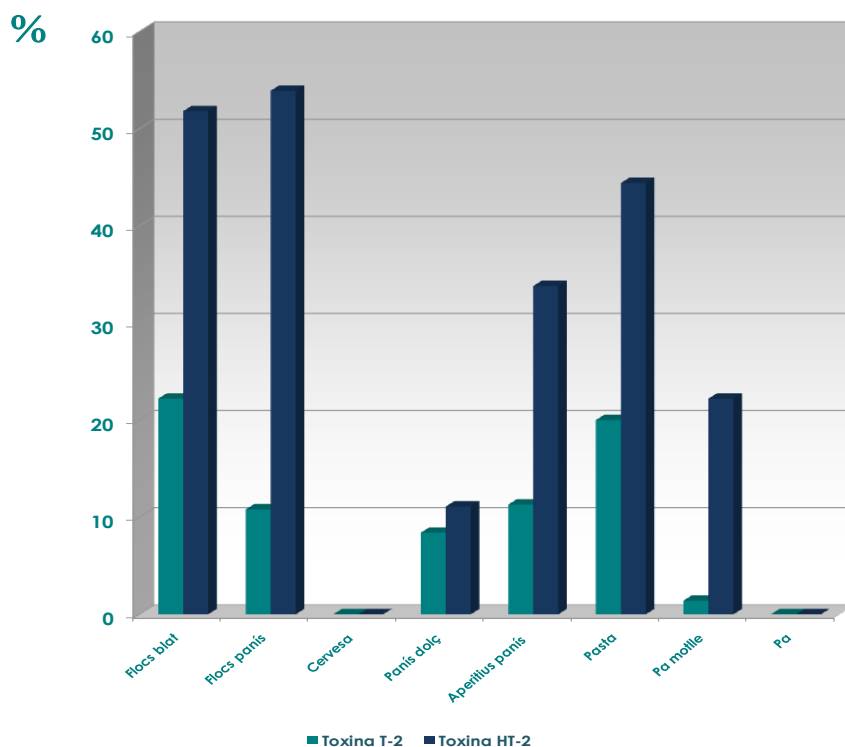


Fig. 9.3 Representació gràfica del percentatge de mostres per sobre del LD

Taula 9.1 Resum de les mostres analitzades, incidència i concentració mitjana i màxima de les mostres positives en cada categoria

Matrius	n	n	Positives*/total	Mitjana±DE	Max
---------	---	---	------------------	------------	-----



	individual	"composite"		$\mu\text{g kg}^{-1}$	$\mu\text{g kg}^{-1}$
<b>Toxina T-2</b>					
Pasta	201	70	14/70	27,0±9,7	55
Flocs de panís	156	65	7/65	24,4±12,4	52
Flocs de blat	27	27	6/27	41,2±24,2	75
Aperitiu panís	213	71	8/71	32,6±21,3	70
Panís dolç	185	72	6/72	144,8±63,2	256
Pa	31	31	0/31 <sup>1</sup>	-	-
Pa motlle	147	72	1/72	88	-
Cervesa	216	71	0/70 <sup>2</sup>	-	-

\* Positius: mostres per sobre del límit de detecció (LD).

1 Pa: LD=6 $\mu\text{g/Kg}$

2 Cervesa: LD=1 $\mu\text{g/L}$

Matrius	n individual	n "composite"	Positius*/total	Mitjana±DE $\mu\text{g kg}^{-1}$	Max $\mu\text{g kg}^{-1}$
<b>Toxina HT-2</b>					
Pasta	201	70	32/70	24,8±17,8	80
Flocs de panís	156	65	35/65	23,4±9,8	65
Flocs de blat	27	27	14/27	40,3±44,4	183
Aperitiu panís	213	71	24/71	82,8±170,2	895
Panís dolç	185	72	8/72	31,6±24,0	139
Pa	31	31	0/31 <sup>1</sup>	-	-
Pa motlle	147	72	16/72	39,2±16,1	75
Cervesa	216	71	0/70 <sup>2</sup>	-	-

\* Positius: mostres per sobre del límit de detecció (LD).

1 Pa: LD=6 $\mu\text{g/Kg}$

2 Cervesa: LD=1 $\mu\text{g/L}$

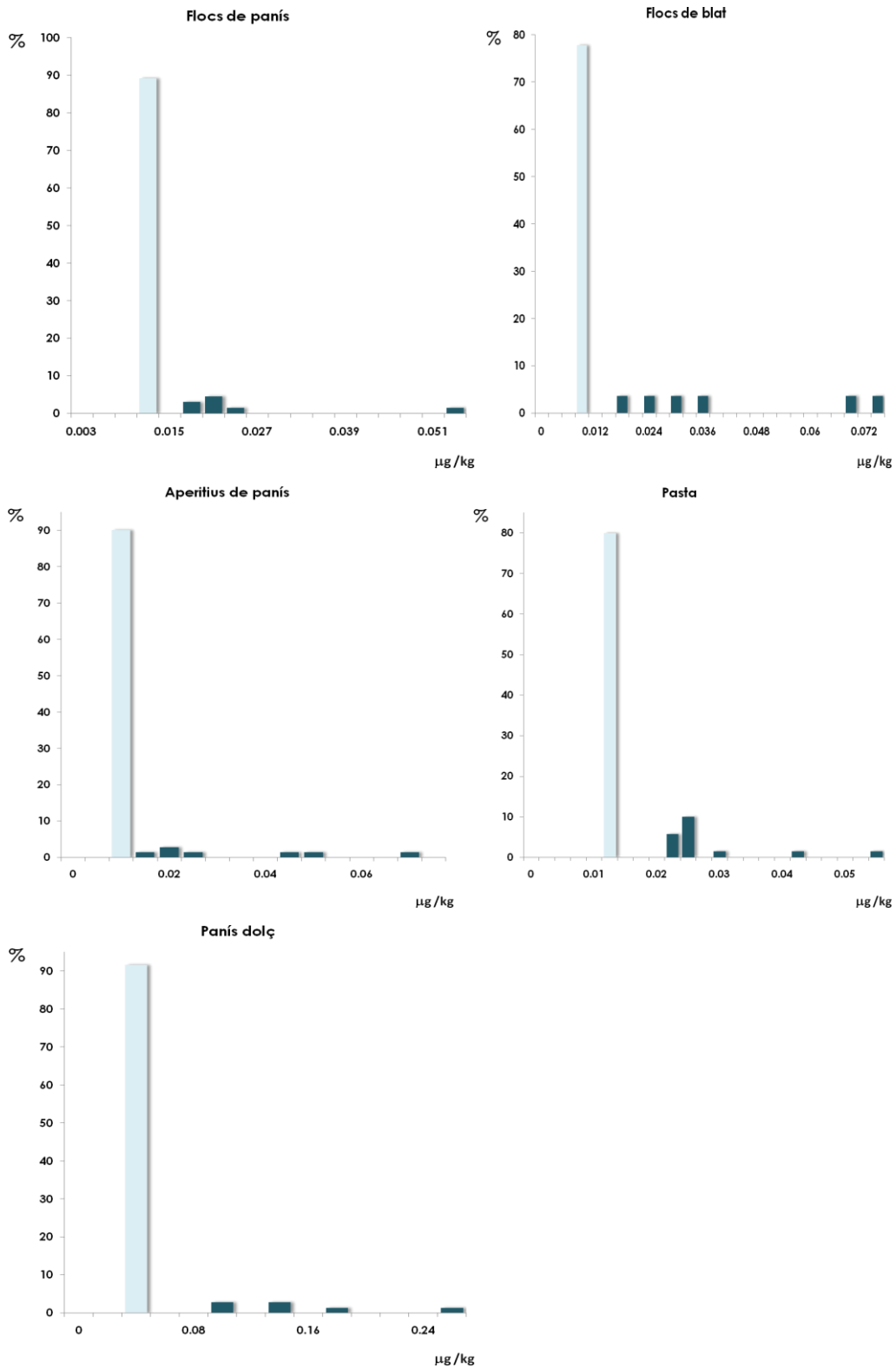
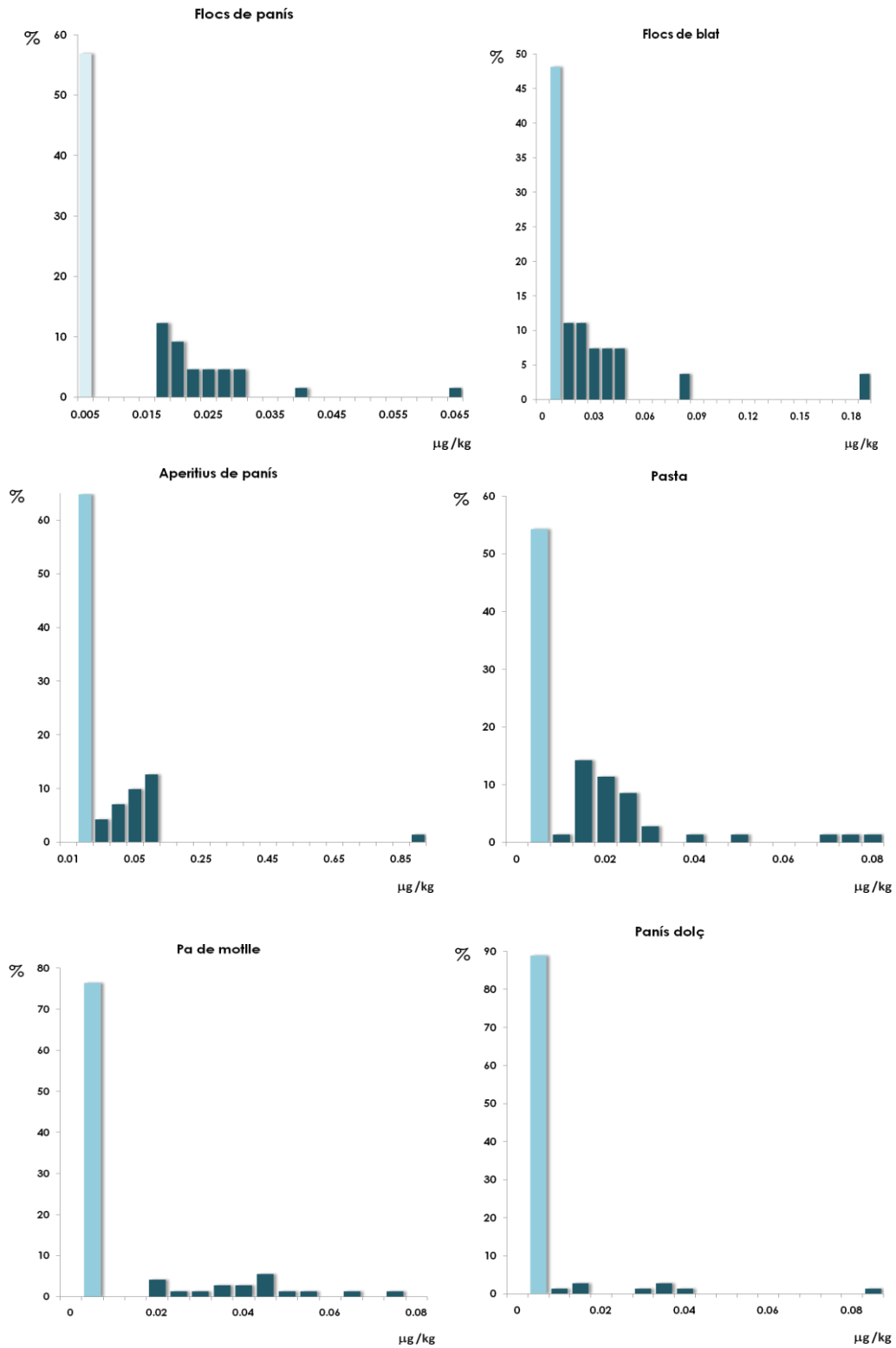


Fig. 9.4 Histogrames de freqüències relatives de la contaminació de T2 en les diferents matrius alimentàries. (En blau cel, es representen aquelles mostres no quantificades, amb el valor equivalent a LD/2)



**Fig. 9.5** Histogrames de freqüències relatives de la contaminació de HT2 en les diferents matrius alimentàries. (En blau cel, es representen aquelles mostres no quantificades, amb el valor equivalent a LD/2)

## 9.4 Ingesta diària estimada

A causa de l'elevat nombre de mostres que es van trobar entre el LD i el LQ, i atenent a les recomanacions de la JECFA es va considerar adient incorporar en el tractament estadístic les mostres situades dins aquest interval. A més, es van realitzar dues aproximacions addicionals per a tractar les mostres de contaminació no detectades (<LD). Per una banda, es va realitzar l'aproximació clàssica, en la qual es substitueixen les mostres no detectades (ND) pel valor equivalent al LD/2. Per una altra, es va realitzar l'estimació de la mitjana de contaminació del grup de dades corresponent a cada aliment ajustant els valors no detectats (censurats) mitjançant un mètode paramètric, conegut com el mètode de màxima versemblança (MLE). Finalment, es va fer la mateixa estimació però mitjançant el mètode no paramètric d'ajust, anomenat de Kaplan-Meier (KM) (EFSA 2010). L'estimació corresponent a la mitjana de contaminació es va combinar amb el consum individual a través del mètode directe o probabilístic seguint el procediment utilitzat en la resta d'estudis, àmpliament desenvolupat en la metodologia.

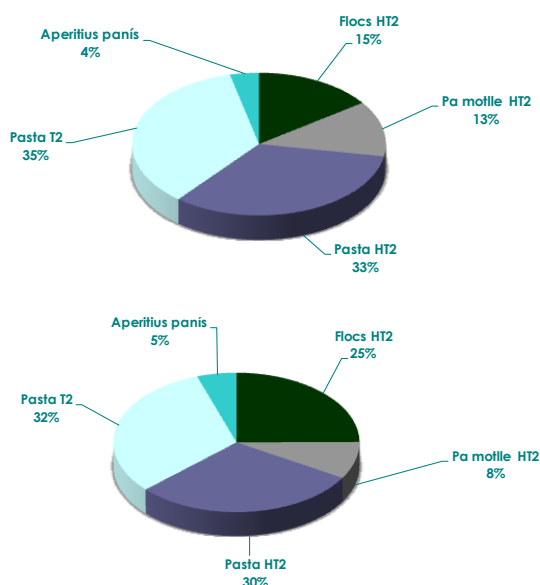
Degut al considerable nombre de mostres que es trobaven per sota del LD de la T2 en la majoria de categories, només es va considerar la pasta en el model d'exposició ja que mostrava un nombre adequat de mostres positives. Per la HT2 es van considerar les fonts d'exposició procedents dels aperitius de panís, la pasta, el pa de motlle i els flocs d'esmorzar. Mitjançant el mètode directe d'avaluació de la ingesta, podem identificar quins són els principals grups de risc de les toxines T-2 i HT-2. Els grups més exposats, s'espera que siguin els nens/es, considerant els tres escenaris d'incertesa (Taula 9.2).

**Taula 9.2 Ingesta diària estimada mitjançant el mètode directe.**

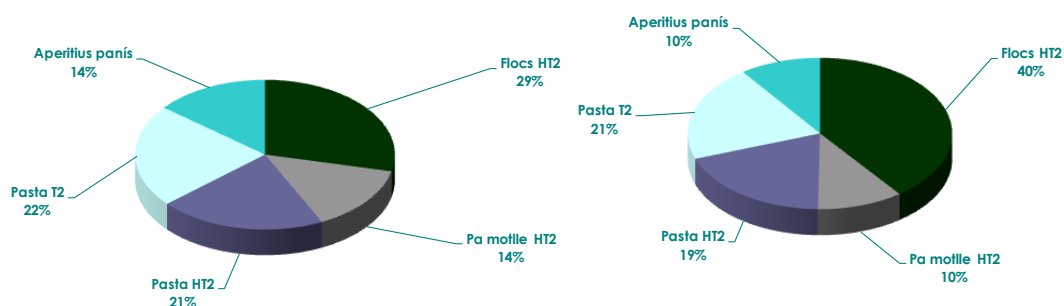
Grup de població	Mitjana ± desviació estàndard ( $\mu\text{g kg}^{-1} \text{pc dia}^{-1}$ )		
	ND=LD/2	MLE	KM
Dones adultes	0,014±0,012	0,016±0,015	0,011±0,010
Homes adults	0,016±0,014	0,019±0,023	0,012±0,011
Adolescents	0,032±0,025	0,040±0,036	0,027±0,022
Nens/es	0,065±0,045	0,079±0,056	0,056±0,041

## 9.5 Contribució dels aliments a la ingesta

En les figures 9.6 i 9.7 es mostren els gràfics on es representa la contribució relativa de cada toxina y de cada aliment a l'exposició global i conjunta a la T2 i HT2. En primer lloc destacar la contribució conjunta de la toxina T2 i HT2 procedent de la pasta, la suma de les quals representa un percentatge superior al 60 % entre la població adulta. Entre la població adolescent, l'exposició es reparteix de forma uniforme entre les diferents vies d'ingesta considerades. Entre la població infantil, la HT2 procedent dels flocs d'esmorzar i les toxines T2 i HT2 procedents de la pasta, representen els principals contribuïdors a l'exposició.



**Fig 9.6 Contribució dels diferents aliments analitzats a l'exposició global de T2 i HT2 per als homes (esquerra) i dones (dreta) adults**



**Fig. 9.7 Contribució dels diferents aliments analitzats a l'exposició global de T2 i HT2 per als adolescents (esquerra) i nens/es (dreta)**

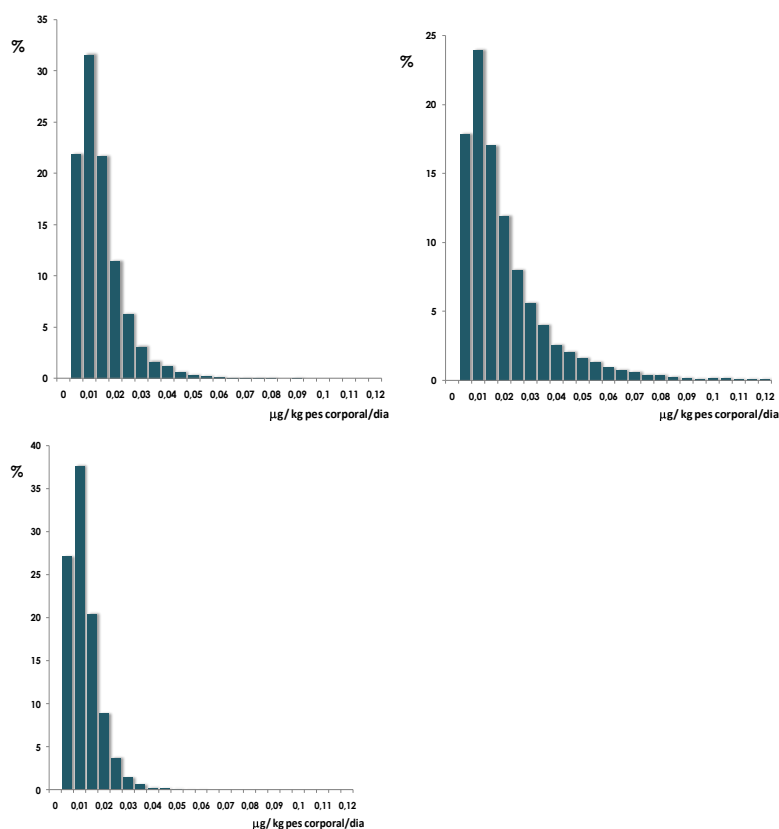
## 9.6 Estimació de l'exposició a la toxina T-2 i HT-2 mitjançant el mètode probabilístic

El mètode probabilístic permet obtenir estimacions fiables d'estadístics més complexes com els percentils, l'asimetria o la curtosis. A més, el mètode de *bootstrap* aporta els intervals de confiança relatius que es mostren en les taules 9.3 i 9.4 per als adults, adolescents i nens/es. Quan comparem els resultats obtinguts a través dels tres mètodes per tractar les dades censurades, podem observar que hi ha diferències considerables. L'aproximació a través del mètode MLE va mostrar les estimacions més elevades en tots els grups de població, mentre que els valors més baixos es van obtenir mitjançant el mètode KM. Considerant els nostres resultats, el grup de nens/es era el grup de població més exposat en cada escenari d'estimació de l'exposició. La mediana es va estimar en el rang entre 0,036 i 0,077  $\mu\text{g kg}^{-1} \text{pc dia}^{-1}$  a través del mètode KM i MLE respectivament. Entre claudàtors es mostren els intervals de confiança *bootstrap* per als principals estadístics, confirmant la fiabilitat de les estimacions procedents dels diferents mètodes de simulació. Això no obstant, es mostra la disminució de la precisió en els percentils més alts, fet àmpliament constatat. En les figures 9.8-9.11 es mostren els histogrames de freqüències relatives de l'estimació de l'exposició per a cada grup de població procedent dels diferents mètodes de tractament de la censura.

**Taula 9.3 Diferents estadístics obtinguts per a l'estimació de l'exposició dels homes i de les dones a la T-2+HT-2 obtinguts mitjançant el model probabilístic (unitats en  $\mu\text{g kg}^{-1} \text{pc dia}^{-1}$ )**

Homes	ND=LD/2	MLE	KM
N	10000	10000	10000
Mitjana	0,027 [0,0025; 0,028]	0,036 [0,033; 0,040]	0,018 [0,017; 0,019]
Desviació estàndard	0,013 [0,011; 0,014]	0,020 [0,019; 0,028]	0,008 [0,007; 0,010]
Asimetria	0,977	1,857	0,956
Curtosis	1,271	5,606	1,274
Mediana	0,025 [0,022; 0,027]	0,031 [0,028; 0,034]	0,017 [0,016; 0,018]
Percentil 90	0,044 [0,039; 0,048]	0,066 [0,056; 0,076]	0,030 [0,026; 0,032]
Percentil 95	0,050 [0,044; 0,056]	0,082 [0,067; 0,097]	0,034 [0,030; 0,038]

Dones	ND=LD/2	MLE	KM
N	10000	10000	10000
Mitjana	0,038 [0,035; 0,042]	0,041 [0,038; 0,045]	0,034 [0,030; 0,038]
Desviació estàndard	0,025 [0,020; 0,031]	0,024 [0,020; 0,028]	0,028 [0,022; 0,035]
Asimetria	1,923	1,429	2,356
Curtosis	6,268	3,346	0,028
Mediana	0,032 [0,029; 0,036]	0,036 [0,032; 0,040]	0,026 [0,023; 0,029]
Percentil 90	0,070 [0,060; 0,081]	0,072 [0,063; 0,082]	0,068 [[0,056; 0,080]
Percentil 95	0,087 [0,072; 0,103]	0,087 [0,074; 0,100]	0,089 [[0,070; 0,108]



**Fig. 9.8** Histograma de freqüències relatives de l'estimació de l'exposició dels homes adults a la toxina T-2+HT-2, obtingut a través del mètode probabilístic (esquerra ND=LD/2, centre MLE, dreta KM)

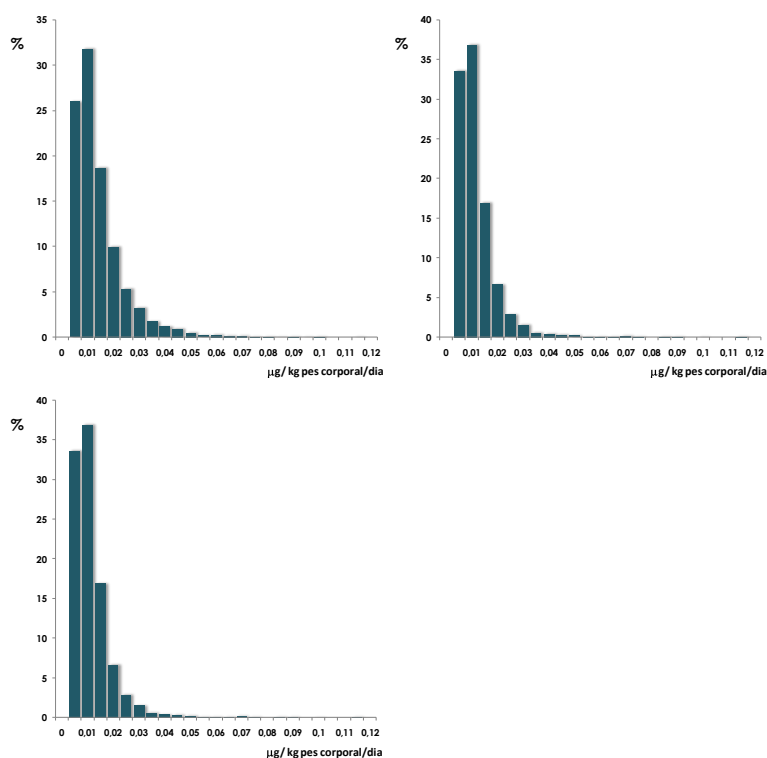


Fig. 9.9 Histograma de freqüències relatives de l'estimació de l'exposició de les dones adultes a la toxina T-2+HT-2, obtingut a través del mètode probabilístic (esquerra ND=LD/2, centre MLE, dreta KM)

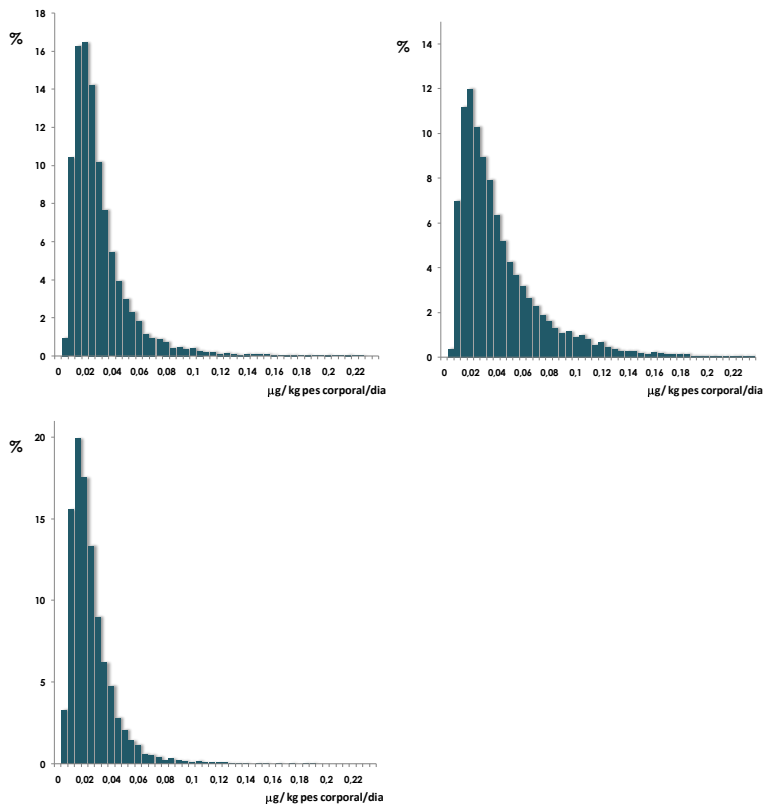
Taula 9.4 Diferents estadístics obtinguts per a l'estimació de l'exposició dels adolescents i dels nens/es a la toxina T-2+HT-2 obtinguts mitjançant el model probabilístic (unitats en  $\mu\text{g kg}^{-1} \text{pc dia}^{-1}$ )

Adolescents	ND=LD/2	MLE	KM
N	10000	10000	10000
Mitjana	0,041 [0,038; 0,044]	0,055 [0,050; 0,060]	0,029 [0,027; 0,031]
Desviació estàndard	0,021 [0,018; 0,025]	0,034 [0,028; 0,040]	0,015 [0,013; 0,017]
Asimetria	1,134	1,490	1,021
Curtosis	2,004	3,461	1,430
Mediana	0,037 [0,033; 0,040]	0,047 [0,042; 0,052]	0,026 [0,024; 0,029]
Percentil 90	0,069 [0,062; 0,077]	0,100 [0,086; 0,112]	0,049 [0,044; 0,054]
Percentil 95	0,081 [0,070; 0,092]	0,121 [0,102; 0,138]	0,057 [0,050; 0,065]

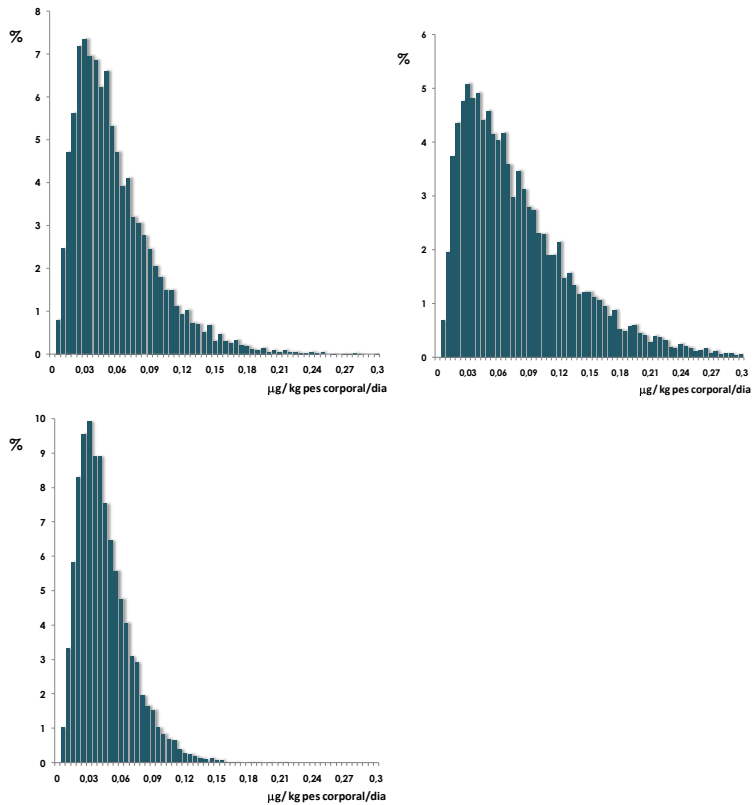
Nens/es	ND=LD/2	MLE	KM
N	10000	10000	10000
Mitjana	0,059 [0,054; 0,065]	0,091 [0,082; 0,099]	0,041 [0,038; 0,045]
Desviació estàndard	0,038 [0,032; 0,044]	0,059 [0,050; 0,069]	0,024 [0,020; 0,028]
Asimetria	1,559	1,393	1,371



Curtosis	3,632	2,749	2,898
Mediana	0,050 [0,044; 0,056]	0,077 [0,068; 0,087]	0,036 [0,032; 0,040]
Percentil 90	0,109 [0,094; 0,123]	0,170 [0,146; 0,191]	0,073 [0,064; 0,082]
Percentil 95	0,131 [0,111; 0,152]	0,204 [0,174; 0,238]	0,086 [0,074; 0,101]



**Fig. 9.10** Histograma de freqüències relatives de l'estimació de l'exposició dels adolescents a la toxina T-2+HT-2, obtingut a través del mètode probabilístic (esquerra ND=LD/2, centre MLE, dreta KM)



**Fig. 9.11** Histograma de freqüències relatives de l'estimació de l'exposició dels nens/es a la toxina T-2+HT-2, obtingut a través del mètode probabilístic (esquerra ND=LD/2, centre MLE, dreta KM)

### 9.7 Avaluació del risc

En la figura 9.12 es representa gràficament la mitjana de l'exposició per a les dones, homes, adolescent i infants, estimada a través de les tres aproximacions considerades. Tot i que no hi ha cap consens en la metodologia a considerar en els estudis d'estimació de l'exposició, en aquest cas considerem de referència l'aproximació MLE, per ser la més conservadora en les estimacions extremes.

En tots els casos aquesta estimació es troba per sota del nivell de seguretat de  $0,1 \mu\text{g kg}^{-1} \text{pc dia}^{-1}$ . Tanmateix, s'ha de tenir en especial consideració que el grup de risc (nens/es), ja que pot arribar a aquest líndar en els percentils alts de l'estimació.

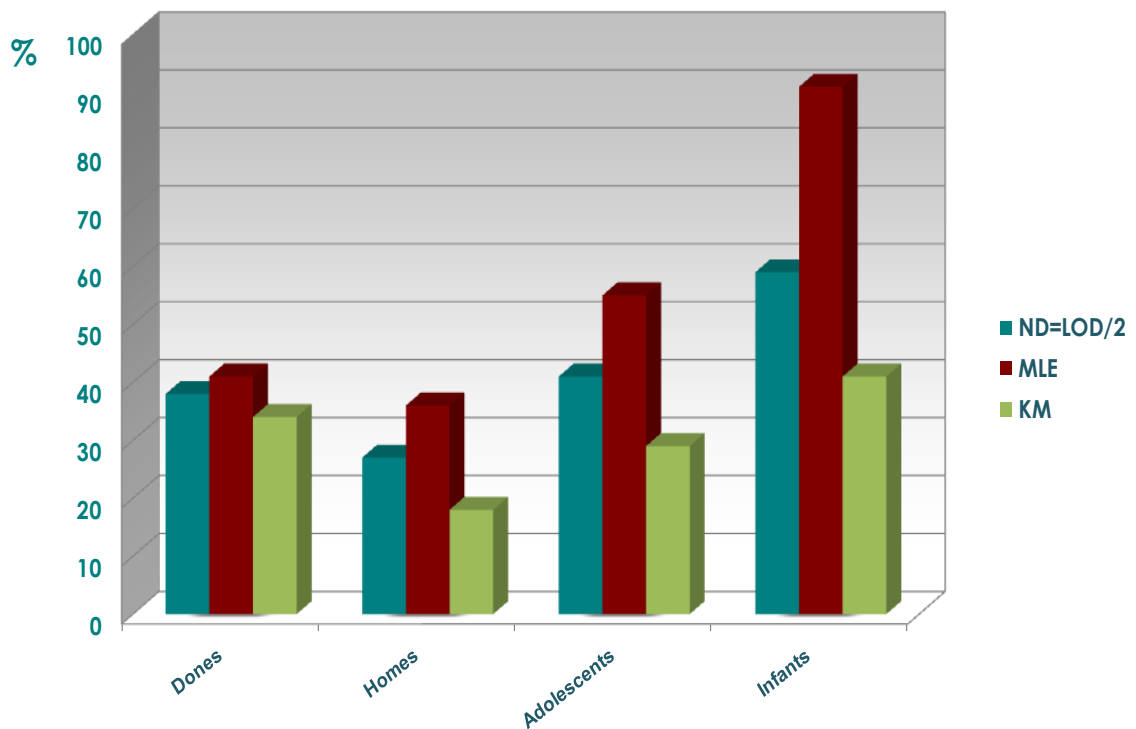


Fig. 9.12 Representació gràfica del percentatge de la ingesta diària tolerable de la toxina T2+HT2, estimat per cada grup de població per a la mitjana

### 9.8 Altres estudis d'exposició

Fins ara, s'han publicat pocs estudis per avaluar l'exposició a les toxines T-2 i HT-2 en països europeus o en altres regions. L'EFSA encara no ha presentat cap estudi sobre l'avaluació del risc d'aquestes toxines en els països membres. El JECFA va documentar l'estimació de l'exposició únicament de la dieta regional europea degut a la manca d'informació disponible en la resta de dietes regionals GEMS/Food (JECFA, 2001). L'exposició mitjana de les dues toxines es va calcular multiplicant la concentració mitjana de les toxines en cada aliment pel consum mitjà en la dieta regional, convertit a kg de pes corporal i dia, assumint un pes corporal de 60 kg. Amb aquestes consideracions es va estimar una exposició mitjana a la T2 en la dieta regional europea de  $0,008 \mu\text{g kg}^{-1} \text{pc dia}^{-1}$  i de  $0,009 \mu\text{g kg}^{-1} \text{pc dia}^{-1}$  a la HT2. A nivell nacional, el mateix estudi va estimar l'exposició de població de Noruega i Regne Unit a partir de dades de consum nacional dels principals cereals, i identificant als nens/es com el principal grup de risc.

El Primer Estudi de Dieta Total Francès va trobar només una mostra de 235 analitzades per sobre del LQ de HT2, amb una concentració de  $80 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Per tant, no van poder dur a terme l'avaluació de l'exposició d'aquesta toxina (Leblanc et al., 2005). El segon

Estudi de Dieta Total francès va trobar que el 100% de les mostres estaven per sota del límit de detecció o de quantificació. Les concentracions més altes de T-2 es van trobar en l'arròs i el blat dur o partit ( $2\mu\text{g kg}^{-1}$ ) i el pa torrat ( $1\mu\text{g kg}^{-1}$ ), i de HT-2 en la pasta i la fruita seca ( $3\mu\text{g kg}^{-1}$ ), el pa i els productes de panificació seca ( $2,1\mu\text{g kg}^{-1}$ ) i l'arròs i el blat dur o partit ( $2\mu\text{g kg}^{-1}$ ). En l'avaluació del risc, utilitzant el mètode de les hipòtesis alta i baixa, l'exposició mitjana de nens i adults en la hipòtesi baixa es va estimar lluny de la IDT, fins i tot en el percentil 95. En canvi, en la hipòtesi alta, l'exposició mitjana de nens i adults en el percentil 95 depassava la IDT en el cas dels nens i s'hi aproximava en el cas dels adults (ANSES, 2011).

## 9.9 Referències

Agence national de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES). 2011. Étude de l'alimentation totale française 2 . Tome 1. Trichothécenes.

De Nijs M, Rombouts F, Notermans S. 1996. *Fusarium* molds and their mycotoxins. J Food Safety 16:15-58.

Eriksen GS, Pettersson H. 2004. Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. Anim Feed Sci Technol. 114:205-239.

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

European Food Safety Authority (EFSA). 2011. Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of T-2 and HT-2 toxin in food and feed. EFSA J. 9: 2481.

Gelderblom WCA, Jaskiewicz K, Marasas WFO, Thiel PG, Horak RM, Vleggaar R, Kriek NPJ. 1988. Fumonisin - novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. Appl Environ Microbiol. 54:1806-1811.

Glenn AE. 2007. Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. Anim Feed Sci Technol. 137: 213-240.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). 2001. Safety Evaluation

of Certain Mycotoxins in Food. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization; p. 281-320.

Leblanc J, Tard A, Volatier J, Verger P. 2005. Estimated dietary exposure to principal food mycotoxins from The First French Total Diet Study. *Food Addit Contam.* 22:652-72.

Lombaert, G.A., Pellaers, P., Roscoe, V., Mankotia, M., Neil, R., Scott, P.M., 2003. Mycotoxins in infant cereal foods from the Canadian retail market. *Food Additives and Contaminants* 20, 494–504.

Schollenberger, M., Terry Jara, H., Suchy, S., Drochner, W., Müller, H.-M., 1999. A survey of Fusarium toxins in cereal-based foods marketed in an area of southwest Germany. *Mycopathologia* 147, 49– 57.

Scientific Committee on Food (SCF). Opinion on Fusarium toxins—Part 6: Group evaluation of T-2 toxin, HT-2 toxin, nivalenol and deoxynivalenol [Internet]. 26 February 2002. [Cited 2010 Feb 15]. Available from: <http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out123 en.pdf>.

Scott, P.M., 1997. Multi-year monitoring of Canadian grains and grain-based foods for trichothecenes and zearalenone. *Food Additives and Contaminants* 14, 333– 339.

Sudakin DL. 2003. Trichothecenes in the environment: relevance to human health. *Toxicol Lett.* 143:97-107.

Visconti A. 2001. Problems associated with Fusarium mycotoxins in cereals. *Bull Inst Compr Agric Sci Kinki University* 9:39-55.

Visconti A, Minervini F, Lucivero G, Gambatesa V. 1991. Cytotoxic and immunotoxic effects of Fusarium mycotoxins using a rapid colorimetric bioassay. *Mycopathologia* 113:181-186.

# 10 Tricotecens Tipus B. Deoxinivalenol

Els tricotecens són una família de micotoxines produïdes per diferents espècies del gènere *Fusarium* en cereals que creixen en regions temperades d'Amèrica, Europa i Àsia. Estructuralment són sesquiterpenoids cíclics, els quals estan dividits en quatre grups (A-D), destacant la toxina T2 (T2) i la toxina HT2 (HT2) del grup A i el deoxinivalenol (DON) i el nivalenol (NIV) del grup B (Gelderblom et al., 1988; De Nijs et al., 1996; Glenn, 2007).

El DON (Fig. 10.1) és la micotoxina més important del grup B dels tricotecens, i representa una de les micotoxines amb més rellevància, per la gran incidència en aliments de gran consum en totes les regions del planeta. Tot i que el DON és menys tòxic que les toxines T-2 i HT-2, és un dels contaminants més habituals dels cereals a escala mundial (Jelinek et al., 1989; Scott, 1989). Les principals espècies productores de DON són *Fusarium graminearum* i *Fusarium culmorum*.

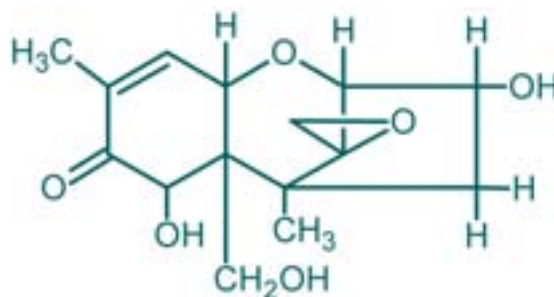


Fig. 10.1 Estructura molecular del deoxinivalenol

## 10.1 Vies d'exposició i toxicitat

El DON és un compost força estable, tant durant l'emmagatzematge com durant el processat i cuinat dels aliments. A causa de la seva resistència a la temperatura és d'esperar que es pugui trobar en els aliments processats destinats al consum humà. La incidència de DON s'ha documentat arreu de tots els països europeus, tant en cereals i derivats per a consum animal, com en aliments processats destinats al consum humà. Els aliments en els quals s'ha observat una major incidència són aquells aliments

derivats del blat i del panís, com els cereals d'esmorzar tipus "corn flakes", els aperitius de panís, el panís dolç en conserva, el pa o la pasta. Els estudis de toxicodinàmica del DON mostren que s'absorbeix en una baixa proporció en les aus, mentre que una quantitat més important es absorbeix en ovelles, vaques i porcs. Després de la ingesta, la micotoxina pot causar una toxicosis severa en humans i animals de granja. Els efectes aguts en humans es caracteritzen per dolor abdominal, mareig, mal de cap, irritació del coll, nàusees, vòmits, diarrea i sang en la femta (Rotter et al., 1996). La toxicitat crònica i subcrònica del DON està caracteritzada per la pèrdua de gana, anorèxia i alteració de l'eficiència nutricional. Alguns estudis mecanístics, tan *in vivo* com *in vitro*, han mostrat que a baixes concentracions, el DON pot potenciar o atenuar l'expressió de les citoquines, les quals poden alterar la regulació normal d'una gran varietat de funcions immunològiques. A altes concentracions, poden induir l'apoptosi dels leucòcits i produir immunosupressió generalitzada, que pot coincidir amb l'efecte immunològic desencadenat per la pèrdua de gana.

## 10.2 Valors de referència

- Nivells de seguretat toxicològica.

La ingesta diària tolerable de DON va ser establerta en  $1 \mu\text{g kg}^{-1} \text{pc dia}^{-1}$  (SCF, 2002) en base a la pèrdua de pes corporal en ratolins de laboratori. Aquest valor va ser confirmat per l'Autoritat Europea de Segureta Alimentària (EFSA) en 2007. En 2010, El Comitè Mixt FAO/OMS d'Experts en Additius Alimentaris (JECFA) va estendre la ingesta al conjunt de DON i dels seus derivats acetilats (3-Ac-DON i 15-Ac-DON), atès que aquests derivats es transformen en DON *in vivo*.

- Límits màxims en aliments.

Els límits màxims de DON en aliments establerts per la Comissió Europea (2006, 2007), són  $750 \mu\text{g kg}^{-1}$  en pasta,  $500 \mu\text{g kg}^{-1}$  en pa, massa, rebosteria, aperitius de cereals i cereals d'esmorzar, i  $200 \mu\text{g kg}^{-1}$  en aliments a base de cereals i aliments infantils per a lactants i infants.

### 10.3 Incidència i concentració de deoxinivalenol en els aliments

En el present estudi, anterior a 2010, únicament es va quantificar el DON en totes les matrius analitzades a base de cereal. La incidència més baixa correspon a la cervesa (1,4%), mentre que es va trobar en un gran nombre de mostres de cereals d'esmorzar, aperitius de panís, pasta i, sobretot, en pa (73,4-100%) (Fig. 10.2). Els histogrames de freqüències relatives de la contaminació de DON en les diferents matrius alimentàries es poden veure a la Fig. 10.3.

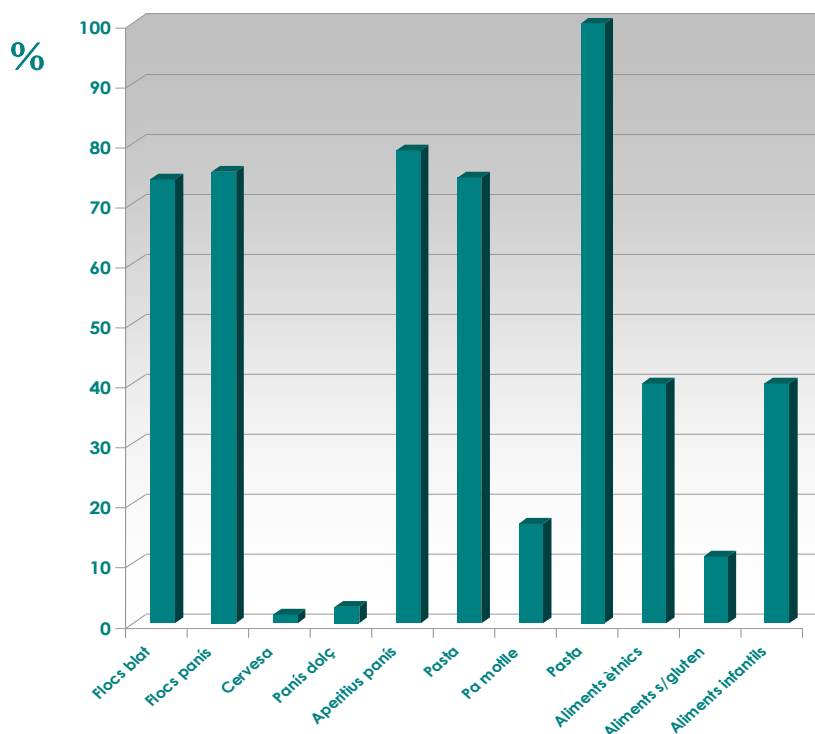


Fig. 10.2 Representació gràfica del percentatge de mostres positives per sobre del límit de quantificació del mètode d'anàlisi

Taula 10.1 Resum de les mostres analitzades, incidència i concentració mitjana i màxima de les mostres positives en cada categoria

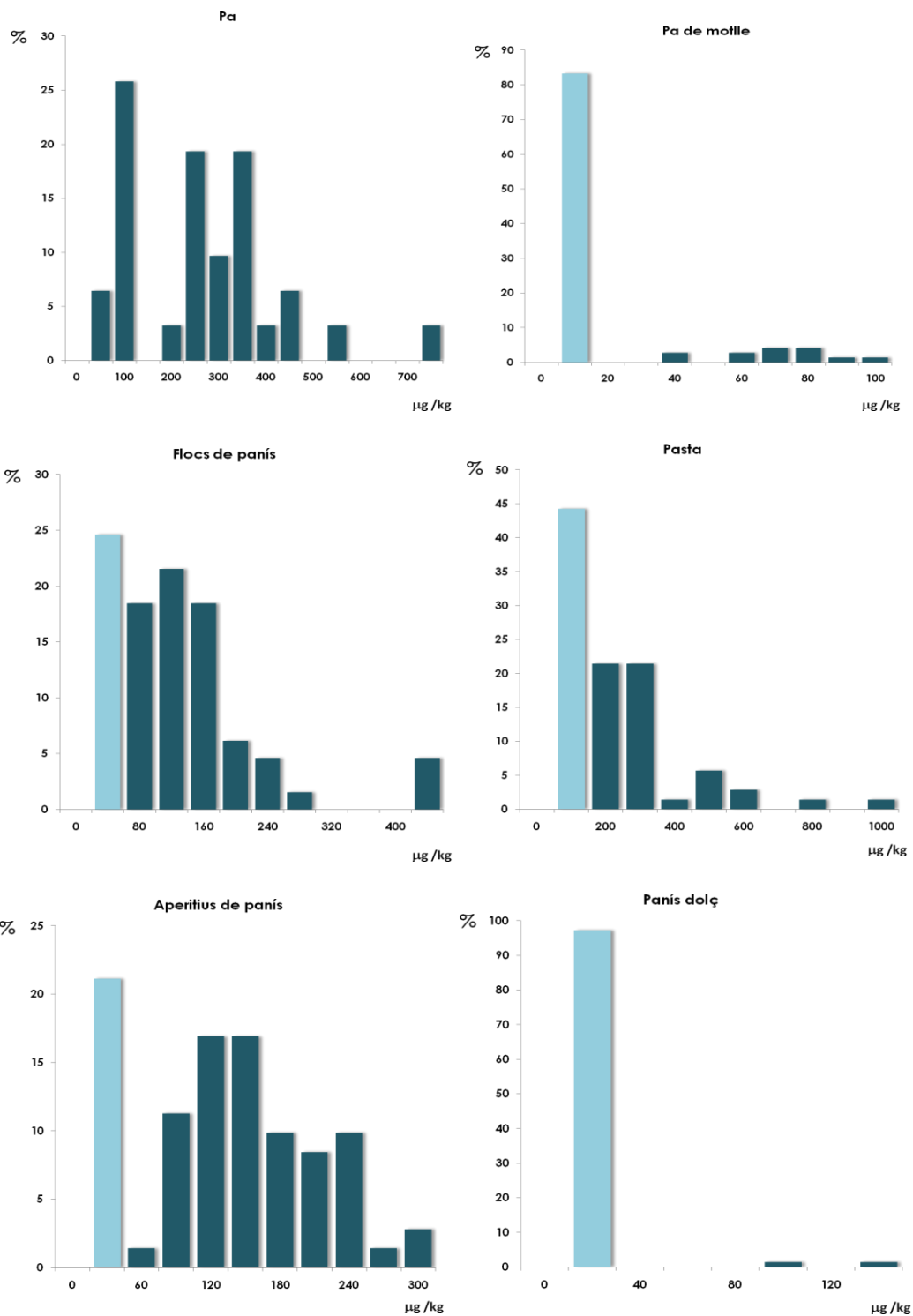
Matrius	n individual	n "composite"	Positives*/total	Mitjana±DE µg kg <sup>-1</sup>	Max µg kg <sup>-1</sup>
Pasta	201	70	52/70	226±177	946
Flocs de panís	156	65	49/65	109±77	580
Flocs de blat	27	27	20/27	190±117	437
Aperitius panís	213	71	56/71	154±58	304
Panís dolç	185	72	2/72	114±36	139
Pa	31	31	31/31	247±158	739
Pa motlle	147	72	12/72	68±18	98
Cervesa	216	71	1/70	12	12
Aliments infantils	30	30	12/30	131±54	286

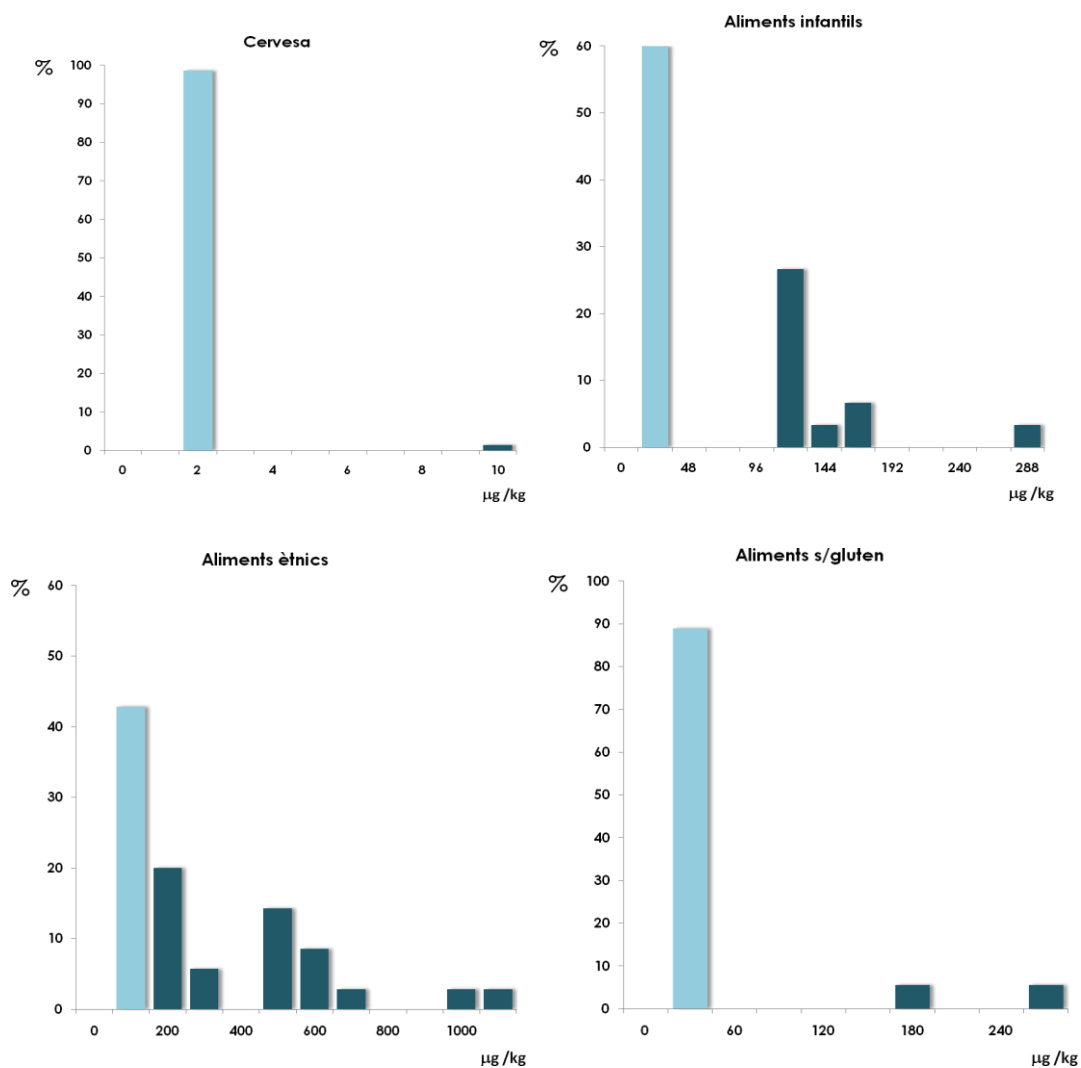


Aliments s/ gluten	18	18	2/18	216 ±76	270
Aliments ètnics	35	35	14/35	406 ±272	1080

\* Positives: mostres per sobre del límit de quantificació (LQ)

La concentració mitjana de les mostres positives oscil·la entre 12 µg kg<sup>-1</sup> (cervesa) i 247 ±158 µg kg<sup>-1</sup> del pa. Els nivells màxims es van trobar en pasta, pa i aliments ètnics (Taula 10.1).





**Fig. 10.3** Histogrames de freqüències relatives de la contaminació de DON en les diferents matrius alimentàries. En blau cel es representen aquelles mostres no quantificades, amb el valor equivalent a la meitat del límit de detecció (LD/2)

## 10.4 Ingesta diària estimada

La metodologia de càlcul es descriu en detall en l'apartat 2.5.2. i consisteix en calcular la mitjana i la desviació estàndard directament a partir de la distribució d'exposició estimada per als individus de cada grup de població. Mitjançant el mètode directe d'avaluació de l'exposició, podem identificar quins són els principals grups de risc derivats de l'exposició a deoxinivalenol. Els grups més exposats són els nadons i els nouvinguts, seguits dels nens/es (Taula 10.2).

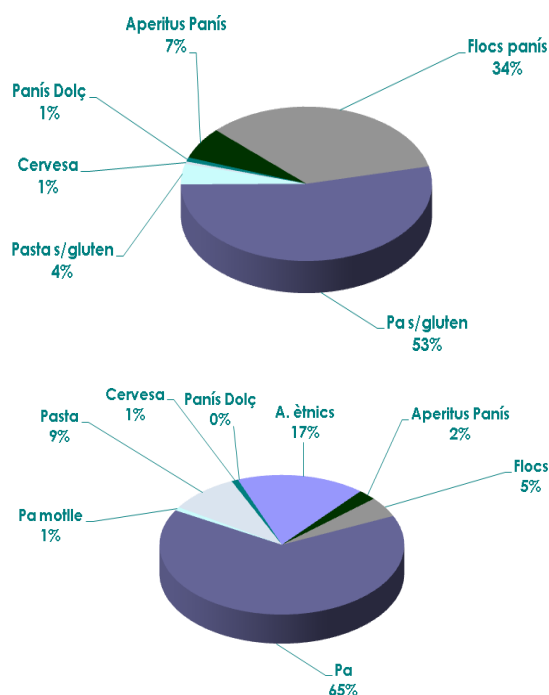
**Taula 10.2** Ingesta diària estimada mitjançant el mètode directe

Grup de població	Mitjana ± desviació estàndard (µg kg <sup>-1</sup> pc dia <sup>-1</sup> )
------------------	--

Nadons	0,74±0,71
Nouvinguts	0,57±0,47
Nens/es	0,36±0,27
Adolescents	0,15±0,13
Celíacs	0,13±0,09
Homes	0,10±0,08
Dones	0,09±0,07
Gent gran	0,04±0,04

## 10.5 Contribució dels aliments a la ingesta

La principal font d'exposició de la micotoxina deriva de la ingesta de pa en tots els grups d'edat, representant una contribució en l'exposició global entre el 53 i el 83 %. La contribució de la pasta també és important en tots els grups d'edat, amb una contribució que oscil·la entre el 9 i el 18 %. Cal destacar l'elevada contribució dels aliments ètnics entre els grups de nouvinguts (17 %), principalment el cuscús i la farina de panís. Entre els diferents grups d'edat podem observar un descens de la contribució dels flocs d'esmorzar amb l'edat, passant del 11 % en els infants, a inexistent en la gent gran (Figs. 10.4-10.6).



**Fig. 10.4** Contribució dels diferents aliments analitzats a l'exposició global de DON per a la població celíaca (esquerra) i nouvinguda (dreta)

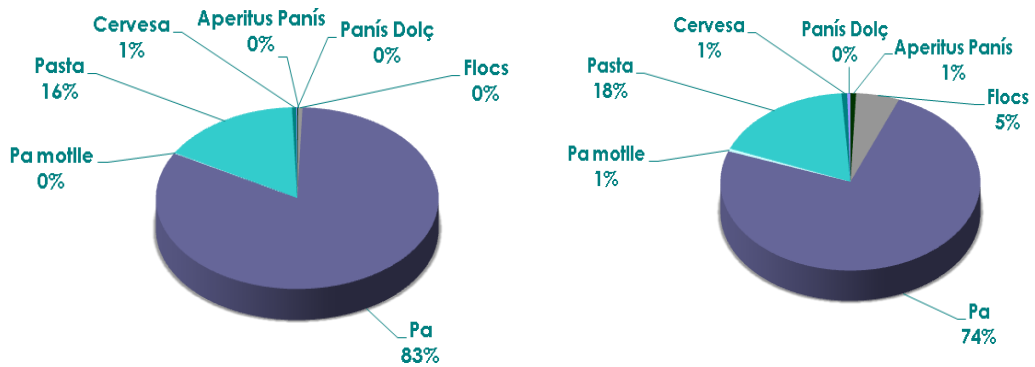


Fig. 10.5 Contribució dels diferents aliments analitzats a l'exposició global de DON per a la gent gran (esquerra) i per als adults (dreta)

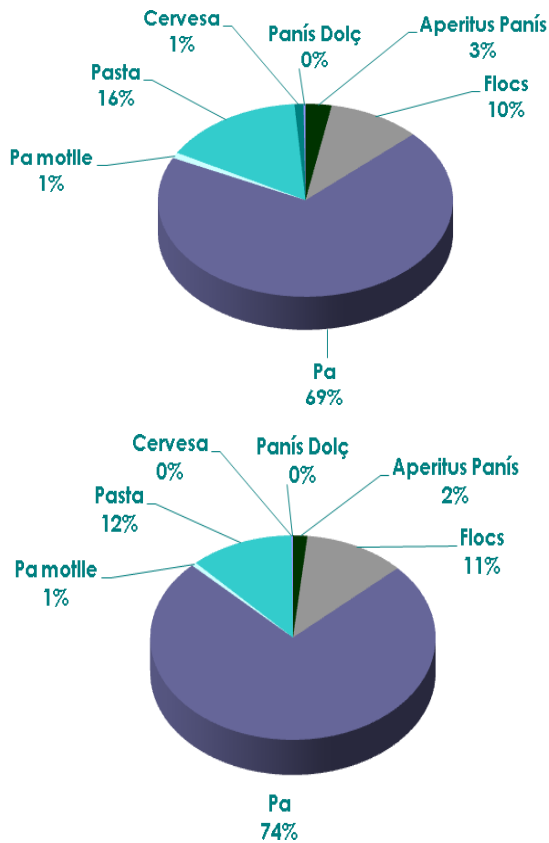


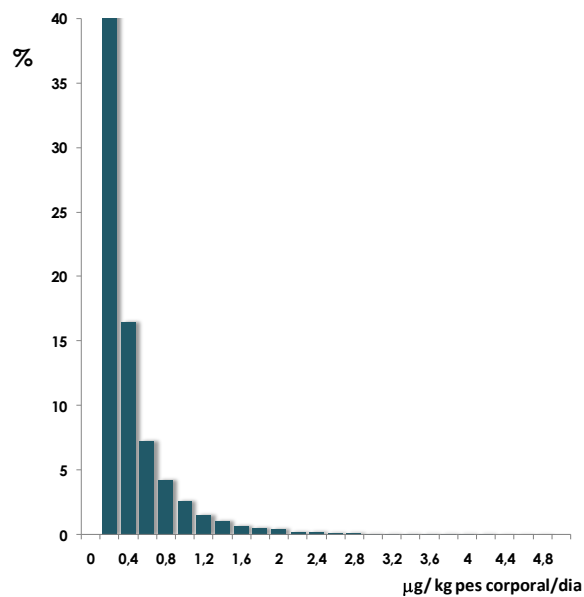
Fig. 10.6 Contribució dels diferents aliments analitzats a l'exposició global de DON per als adolescents (esquerra) i nens/es (dreta)

## 10.6 Estimació de l'exposició al deoxinivalenol mitjançant el mètode probabilístic

El mètode de simulació ens permet determinar els intervals de confiança de cada estadístic, permetent la validació dels mateixos. En aquest cas, l'estimació de la mitjana és més elevada per als nous que en els nadons, una estimació sensiblement més elevada que la proporcionada mitjançant el mètode directe. Per als percentils alts podem observar grans intervals de confiança que demostren una baixa precisió en l'estimació (Taules 10.3 a 10.7; Figs. 10.7-10.11).

**Taula 10.3 Diferents estadístics per a l'estimació de l'exposició de la gent gran a DON obtinguts mitjançant el model probabilístic (unitats en  $\mu\text{g kg}^{-1} \text{pc dia}^{-1}$ )**

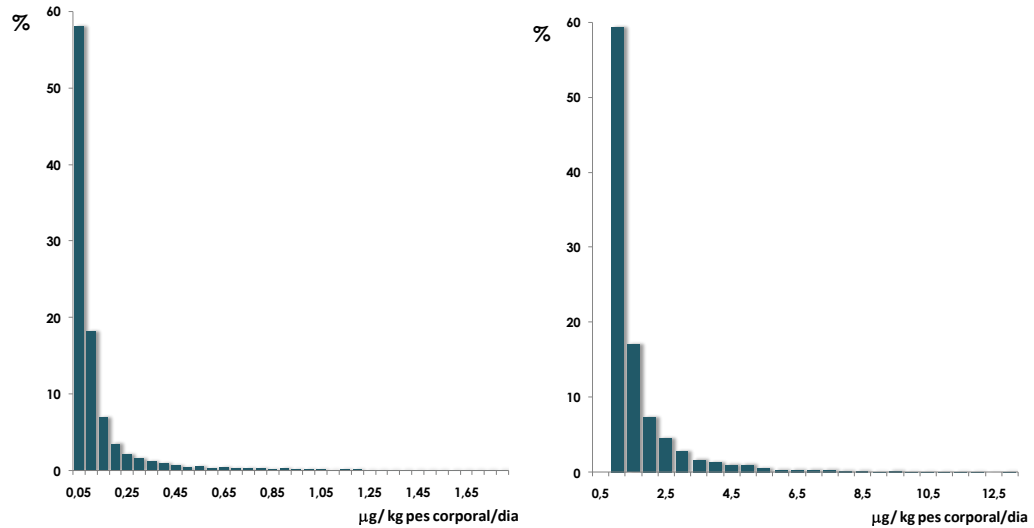
Gent gran	
N	10000
Mitjana	0,28 [0,19; 0,40]
Desviació estàndard	0,48 [0,24; 0,88]
Asimetria	5,58
Curtosis	59,47
Mediana	0,12 [0,07; 0,18]
Percentil 90	0,71 [0,43; 1,12]
Percentil 95	1,08 [0,66; 1,95]



**Fig. 10.7** Histograma de freqüències relatives de l'estimació de l'exposició de la gent gran a DON, obtingut a través del mètode probabilístic

**Taula 10.4** Diferents estadístics per a l'estimació de l'exposició dels celíacs i de la població nouvinguda a DON obtinguts mitjançant el model probabilístic (unitats en  $\mu\text{g kg}^{-1} \text{pc dia}^{-1}$ )

	Celíacs	Nouvinguts
N	10000	10000
Mitjana	0,15 [0,07 ; 0,33]	0,96 [0,56 ; 1,58]
Desviació estàndard	0,55 [0,10 ; 1,21]	1,98 [0,70 ; 4,09]
Asimetria	19,20	6,95
Curtosis	724,87	79,96
Mediana	0,04 [0,03 ; 0,06]	0,36 [0,22 ; 0,55]
Percentil 90	0,29 [0,12 ; 0,81]	2,24 [1,23 ; 4,33]
Percentil 95	0,64 [0,22 ; 2,07]	3,82 [1,89 ; 8,79]



**Fig. 10.8** Histograma de freqüències relatives de l'estimació de l'exposició de la població celiàcia (esquerra) i nouvinguda (dreta) DON, obtingut a través del mètode probabilístic

**Taula 10.5** Diferents estadístics obtinguts per a l'estimació de l'exposició de les dones i dels homes adults a DON obtinguts mitjançant el model probabilístic (unitats en  $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ pc dia}^{-1}$ )

	Dones	Homes
N	10000	10000
Mitjana	0,56 [0,48; 0,64]	0,37 [0,32; 0,42]
Desviació estàndard	0,77 [0,55; 1,05]	0,48 [0,35; 0,66]
Asimetria	4,97	4,79
Curtosis	41,65	41,08
Mediana	0,32 [0,27; 0,36]	0,22 [0,19; 0,25]
Percentil 90	1,26 [1,03; 1,47]	0,82 [0,68; 0,98]
Percentil 95	1,84 [1,43; 2,26]	1,18 [0,94; 1,45]

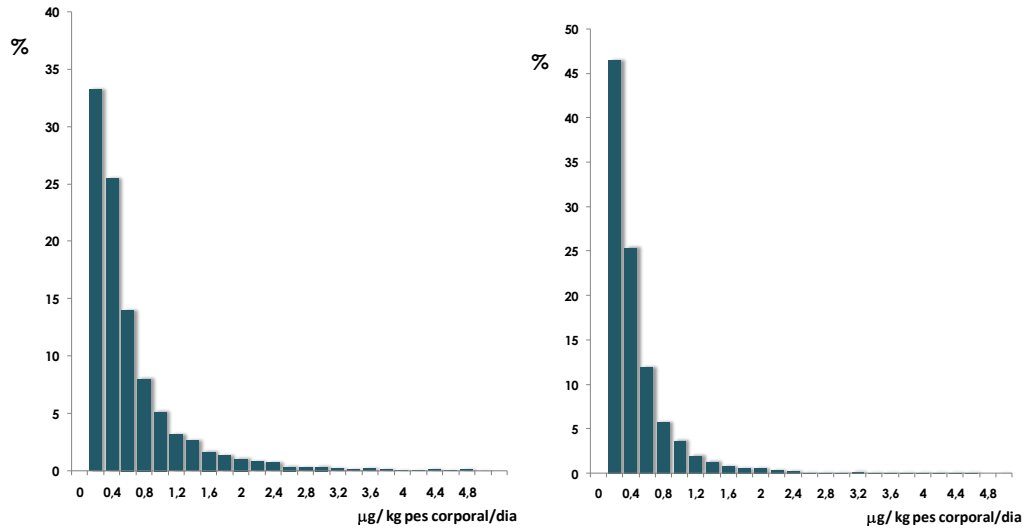


Fig. 10.9 Histograma de freqüències relatives de l'estimació de l'exposició de les dones (esquerra) i homes (dreta) a DON, obtingut a través del mètode probabilístic

Taula 10.6 Diferents estadístics obtinguts per a l'estimació de l'exposició dels infants i dels nadons a DON obtinguts mitjançant el model probabilístic (unitats en  $\mu\text{g kg}^{-1} \text{pc dia}^{-1}$ )

	Adolescents	Nens / es
N	10000	10000
Mitjana	0,43 [0,37; 0,51]	0,68 [0,37; 1,23]
Desviació estàndard	0,55 [0,41; 0,70]	1,83 [0,48; 4,47]
Asimetria	3,26	10,16
Curtosis	14,39	156,74
Mediana	0,25 [0,21; 0,29]	0,24 [0,16; 0,35]
Percentil 90	0,99 [0,80; 1,28]	1,38 [0,80; 2,86]
Percentil 95	1,46 [1,12; 1,98]	2,49 [1,16; 5,60]



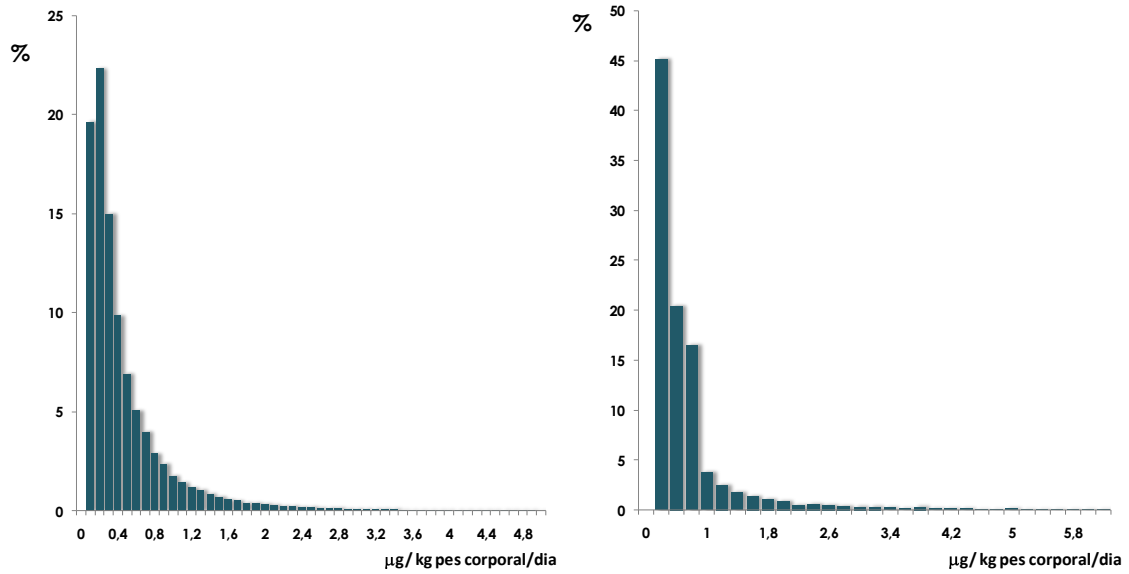
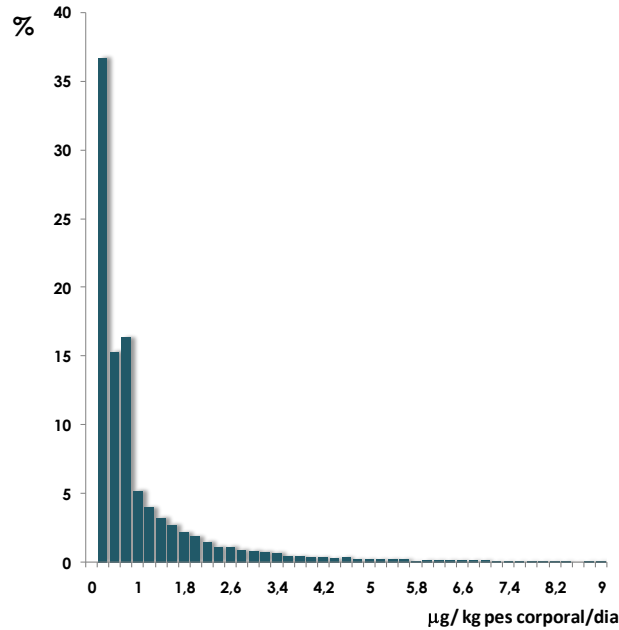


Fig. 10.10 Histograma de freqüències relatives de l'estimació de l'exposició dels adolescents (esquerra) i dels nens/es (dreta) a DON, obtingut a través del mètode probabilístic

Taula 10.7 Diferents estadístics obtinguts per a l'estimació de l'exposició dels nadons a DON obtinguts mitjançant el model probabilístic (unitats en  $\mu\text{g kg}^{-1} \text{pc dia}^{-1}$ )

Nadons	
N	10000
Mitjana	0,90 [0,67; 1,19]
Desviació estàndard	1,51 [0,93; 2,56]
Asimetria	4,80
Curtosis	42,15
Mediana	0,36 [0,25; 0,53]
Percentil 90	2,33 [1,62; 3,21]
Percentil 95	3,57 [2,40; 5,46]



**Fig. 10.11 Histograma de freqüències relatives de l'estimació de l'exposició dels nadons a DON, obtingut a través del mètode probabilístic**

### 10.7 Avaluació del risc

L'estimació de l'exposició mitjana mostra que els grups més exposats al DON són els nouvinguts i els nadons. En tots els grups de població els valors mitjans es troben per sota del nivell de seguretat de  $1 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ pc dia}^{-1}$ ; tanmateix, en el cas dels principals grups de risc l'estimació mitjana representa el 96 i el 90 %, de la ingesta diària tolerable. Els grans consumidors de cada grup (percentil 95) excedeixen el nivell de seguretat, amb l'excepció del grup dels celíacs (Fig. 10.12).

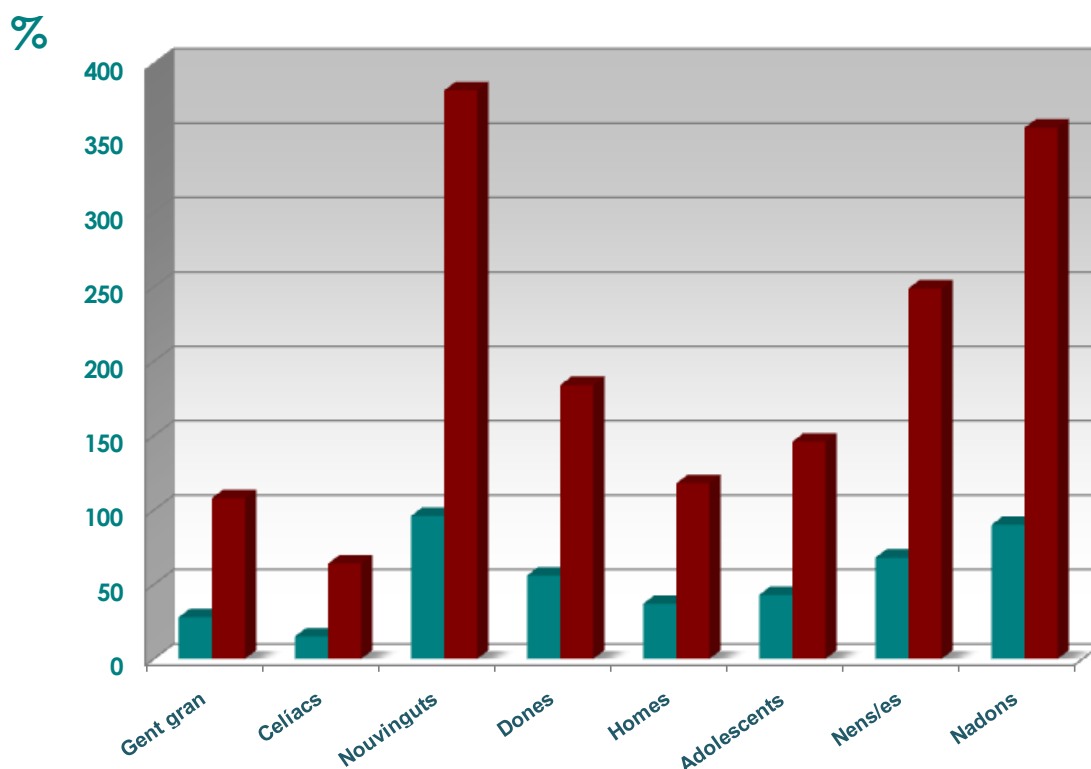


Fig. 10.12 Representació gràfica del percentatge de la ingesta diària tolerable del DON, estimat per cada grup de població per a la mitjana (verd) i per al percentil 95 (vermell)

## 10.8 Altres estudis d'exposició

Els estudis previs realitzats a Europa també van estimar una elevada exposició de la població al DON. El Comitè Mixt FAO/OMS d'Experts en Additius Alimentaris (JECFA) va estimar la ingesta diària de DON en cinc regions diferents, mostrant que la regió de l'Orient Mitjà presentava els valors d'exposició més elevats ( $2,4 \mu\text{g kg}^{-1} \text{pc dia}^{-1}$ ), seguida de l'Extrem Orient i Europa ( $1,6$  i  $1,4 \mu\text{g kg}^{-1} \text{pc dia}^{-1}$ , respectivament) (Canady et al. 2001).

D'altra banda, en el Primer Estudi Francès de Dieta Total, es va estimar que la ingesta diària mitjana i la corresponent al percentil 95 de DON per als adults era de  $0,28$  i  $0,57 \mu\text{g kg}^{-1} \text{pc dia}^{-1}$ , respectivament, mentre que les mateixes estimacions per als nens/es eren de  $0,45$  i  $0,93 \mu\text{g kg}^{-1} \text{pc dia}^{-1}$ , respectivament (Leblanc et al. 2005). En el segon estudi de dieta total francès, es va estimar mitjançant el mètode de les hipòtesis alta i baixa l'exposició mitjana i percentil 95 al DON i als seus derivats acetilat (3-Ac-DON i 15-Ac-DON). En la hipòtesi baixa la mitjana i percentil 95 va ser de  $0,373 \mu\text{g kg}^{-1} \text{pc dia}^{-1}$  i  $716 \mu\text{g kg}^{-1} \text{pc dia}^{-1}$  en els adults, i de  $544 \mu\text{g kg}^{-1} \text{pc dia}^{-1}$  i  $1,018 \mu\text{g kg}^{-1} \text{pc dia}^{-1}$  en els nens. En la hipòtesi alta, l'exposició mitjana i el percentil 95 van ser de  $0,411 \mu\text{g kg}^{-1} \text{pc dia}^{-1}$

dia<sup>-1</sup> i 0,768µg kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup> en els adults, i de 0,615µg kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup> i 1,131µg kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup> en els nens. L'exposició al DON va ser lleugerament més elevada que en el primer estudi. En els adults i nens el pa i els productes de panificació seca semblen ser els contribuents principals de l'exposició (60% i 40% respectivament en la hipòtesis baixa).

A Holanda, mitjançant una metodologia probabilística, es va concloure que els nens d'un any d'edat, eren el principal grup de risc, amb una ingesta diària estimada de 0,46 i 1,00 µg kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>, per a la mediana i per al percentil 95, respectivament (Pieters et al. 2004).

## 10.9 Referències

Agence national de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES). 2011. Étude de l'alimentation totale française 2 . Tome 1. Trichothécenes.

Canady RA, Coker RD, Rgan SK, Krska R, Kuiper-Goodman T, Olsen M, Pestka JJ, Resnik S, Schlatter J. 2001. Deoxynivalenol. Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food. Fifty-Sixth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Geneva, p. 420–555.

Comissió Europea (CE). 2006. Reglament (CE) N° 1881/2006 of 19/12/2006. Official Journal of the European Union, L364, 5-24.

Comissió Europea (CE). 2007. Reglament (CE) N° 1126/2007 of 28/9/2007. Official Journal of the European Union, L255, 14-17.

De Nijs M, Rombouts F, Notermans S. 1996. *Fusarium* molds and their mycotoxins. J Food Safety 16:15-58.

Gelderblom WCA, Jaskiewicz K, Marasas WFO, Thiel PG, Horak RM, Vleggaar R, Kriek NPJ. 1988. Fumonisin - novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. Appl Environ Microbiol. 54:1806-1811.

Glenn AE. 2007. Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. Anim Feed Sci Technl. 137: 213-240.

Jelinek CF, Pohland AE, Wood GE. 1989. Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds-an update. *Journal AOAC* 72:223-230.

Leblanc J, Tard A, Volatier J, Verger P. 2005. Estimated dietary exposure to principal food mycotoxins from The First French Total Diet Study. *Food Addit Contam.* 22:652-72.

Pieters MN, Bakker M, Slob W. 2004. Reduced intake of deoxynivalenol in the Netherlands: A risk assessment update. *Toxicol Lett.* 153:145-153.

Rotter BA, Prelusky DB, Pestka JJ. 1996. Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *J Toxicol Environ Health - A.* 48:1-34.

SCF (2002). Opinion on Fusarium toxins—Part 6: Group evaluation of T-2 toxin, HT-2 toxin, nivalenol and deoxynivalenol (adopted on 26 February 2002). Available in: [http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out123\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out123_en.pdf). Accessed on 15 February 2010.

Scott PM. 1989. *Trichothecene Mycotoxicosis: Pathophysiologic Effects*. Boca Raton: CRC Press. The natural occurrence of trichothecenes; p. 1-26.

# 11 Zearalenona

La zearalenona (ZEA) és una micotoxina estrogènica no esteroïdal produïda per *Fusarium graminearum* i altres espècies del gènere *Fusarium*. Químicament, la ZEA és una lactona d'àcid resorcíclic, descrit com a lactona de l'àcid 6-[10-hidroxi-6-oxo-*trans*-1-undecenil]-B-resorcíclic (Fig. 11.1). En els mamífers, el grup ceto- del carboni 8 és reduït per donar lloc a dos metabòlits estereoisòmers de la ZEA ( $\alpha$  i  $\beta$ ).

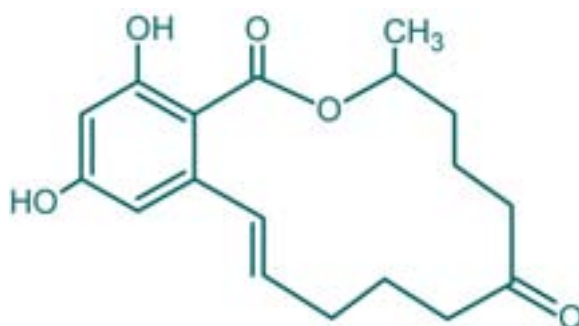


Fig. 11.1 Estructura molecular de la zearalenona

Els fongs productors poden contaminar de forma regular cereals com el blat, el panís, l'arròs, entre d'altres, procedents de regions temperades, per tant, es pot trobar en aliments processats que se'n derivin.

## 11.1 Vies d'exposició i toxicitat

La incidència de ZEA en cereals i pinsos ha estat àmpliament documentada arreu del món i a Espanya, essent escassos els estudis duts a terme per avaluar la contaminació d'aquesta micotoxina en aliments processats per a consum humà en el nostre país. Els pocs estudis que s'han dut a terme en la nostra regió, han mostrat que els principals aliments que poden estar contaminats són els cereals d'esmorzar tipus "corn flakes", els aperitius de panís, el panís dolç en conserva o la cervesa.

L'absorció de la ZEA s'ha observat que és ràpida i abundant en rates i conills (Kuiper-Goodman et al., 1987; Ramos et al., 1996), i s'ha estimat que està en un rang d'entre el 80 i el 85% en porcs (Biehl et al., 1993). Les principals biotransformacions de la ZEA en els animals són la hidroxilació, que comporta la formació dels metabòlits  $\alpha$ -zearalenol i  $\beta$ -zearalenol, la conjugació, i els metabòlits reduïts amb l'àcid glucurònic. Els estudis de toxicodinàmica mostren que la micotoxina és eliminada de l'organisme principalment per femta, tot i que pot ser excretada en l'orina en forma de metabòlits lliures o bé conjugats.

Hi ha estudis que demostren que al rumen té lloc una degradació microbiològica i altres suggereixen que la reducció de la zearalenona a  $\alpha$ -zearalenol té lloc de forma activa a la mucosa intestinal. En estudis *In vitro* s'ha observat la capacitat que tenen determinats bacteris d'eliminar la ZEA del medi de cultiu. Alguns investigadors han demostrat aquesta efectivitat utilitzant soques de *Lactobacillus*.

La ZEA i alguns dels seus metabòlits han mostrat capacitat d'unir-se competitivament amb els receptors estrogènics. Per tant, la toxicitat està associada amb problemes reproductius en alguns animals, com el porc i l'ovella en els quals s'han observat problemes de fertilitat, i possiblement també es puguin donar en humans (Gromadzka et al., 2009; Krska et al., 2003; Wood, 1992). La ZEA pot ser un important agent etiològic d'intoxicació en infants i fetus exposats a aquesta micotoxina, amb conseqüències com telarquia i pubarquia prematura, així com increment de les mames (CAST, 2003). L'avaluació duta a terme per la IARC sobre el potencial carcinogènic de la ZEA, va concloure que no és classificable per la seva carcinogenicitat (grup 3), tanmateix, estudis més recents han mostrat que la ZEA pot estimular potencialment el creixement de cèl·lules canceroses amb receptors estrogènics en glàndules mamàries d'humans.

## 11.2 Valors de referència

- Nivells de seguretat toxicològica.  
Basat en els darrers estudis toxicològics, el Panell sobre Contaminants en la Cadena Alimentària de la EFSA ha establert recentment el nivell d'ingesta tolerable de 250 ng kg<sup>-1</sup> (EFSA, 2011).
- Límits màxims en aliments.  
La Comissió Europea ha establert un nivell màxim de ZEA en pa, massa de pa, rebosteria, aperitius a base de cereals i cereals d'esmorzar de 50 µg kg<sup>-1</sup>, excepte per a aquells a base de panís, els nivells dels quals és de 100 µg kg<sup>-1</sup>, i un nivell màxim de 20 µg kg<sup>-1</sup> en aliments de cereals processats i aliments infantils per a nadons i nens/es de curta edat (Comissió Europea, 2006, 2007).

## 11.3 Incidència i concentració de zearalenona en els aliments

El resum dels resultats d'incidència de ZEA, la mitjana de concentració i el valor màxim de les mostres positives es mostren en la figura 11.2 i taula 11.1. Els histogrames de freqüències relatives de la contaminació per a aquesta micotoxina en les diferents matrius alimentàries es mostren a la figura 11.3. El percentatge més elevat de mostres positives es va trobar en el pa de motlle (43,7%), mentre que la ZEA no es va quantificar en les mostres de flocs de panís ni d'aliments sense gluten (pa, pasta i brioixeria fets amb farina de panís). La concentració mitjana de les mostres positives oscil·la en el rang de 3,1±1,4 a 5,9±6,8 µg kg<sup>-1</sup>, i en el cas dels aliments infantils, la mitjana era de 4,1±0,6 µg kg<sup>-1</sup>. Els valors màxims de contaminació es van trobar en pa de motlle (20,9 µg kg<sup>-1</sup>) i aperitius de panís (22,8 µg kg<sup>-1</sup>), valors allunyats del límit de la CE de 50 µg kg<sup>-1</sup>.



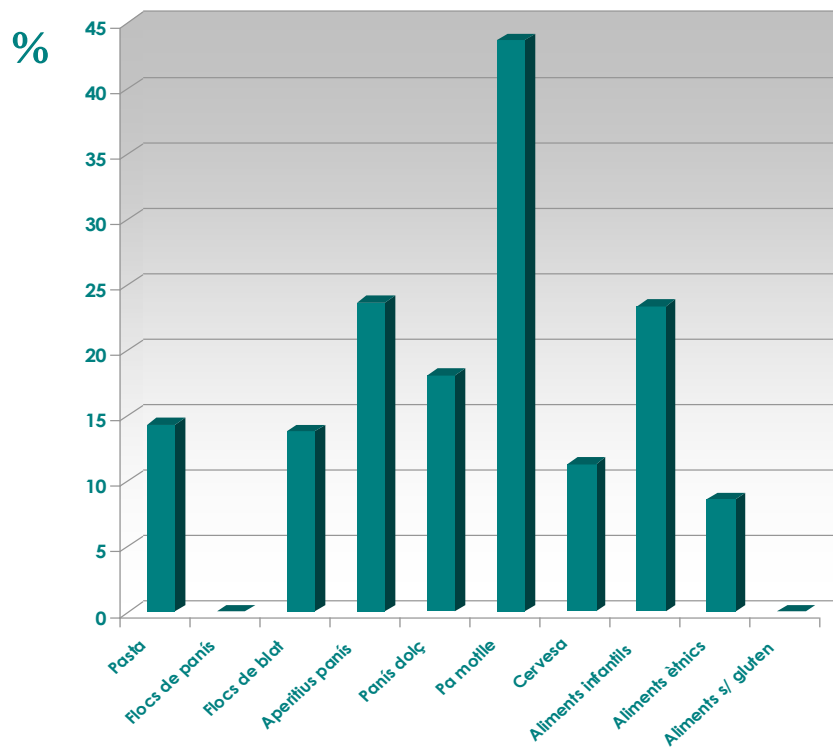


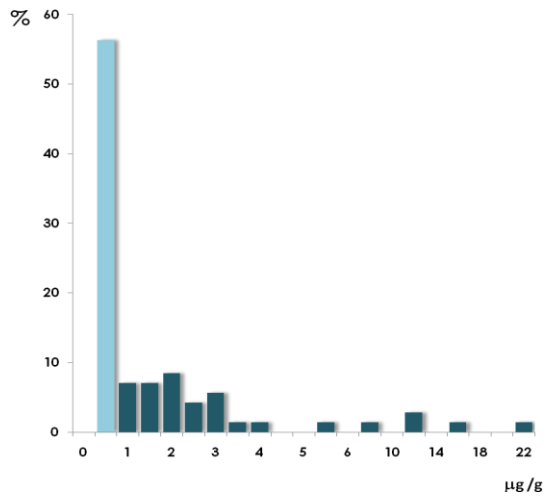
Fig. 11.2 Representació gràfica del percentatge de mostres per sobre del LQ

Taula 11.1 Resum de les mostres analitzades, incidència i concentració mitjana i màxima de les mostres positives en cada categoria

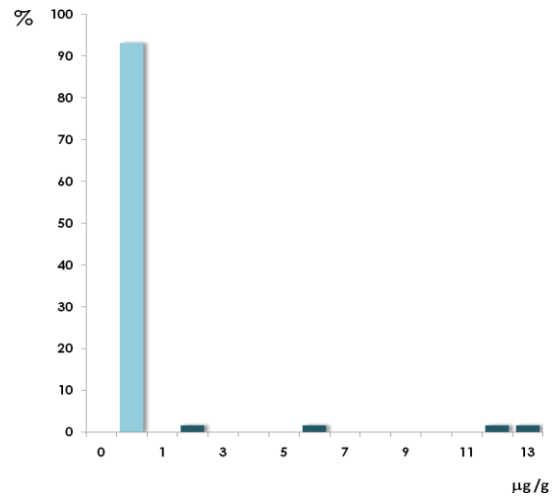
Matrius	n individual	n "composite"	Positives*/total	Mitjana±DE µg kg <sup>-1</sup>	Max µg kg <sup>-1</sup>
Pasta	201	70	10/70	3,8±1,8	5,9
Flocs de panís	168	71	0/71	-	-
Flocs de blat	29	29	4/29	6,3±5,4	12,1
Aperitiu panís	216	72	17/72	5,9±6,8	22,8
Panís dolç	185	72	13/72	4,9±0,7	5,9
Pa motlle	145	71	31/71	3,7±4,5	20,9
Cervesa	216	71	8/71	3,1±1,4	5,1
Aliments infantils	30	30	7/30	4,1±0,6	5,4
Aliments s/gluten	27	27	0/27	-	-
Aliments ètnics	35	35	3/35	6,2±5,4	12,4

\* Positives: mostres per sobre del límit de quantificació (LQ)

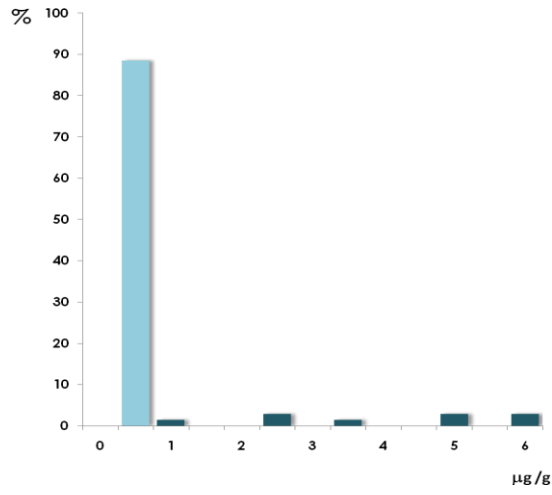
Pa de motlle



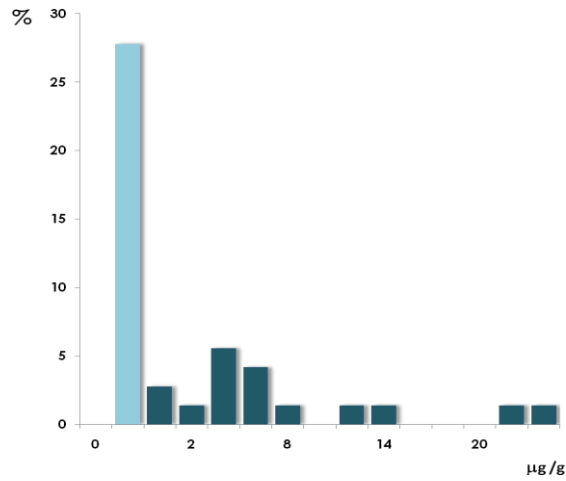
Flocs de panís



Pasta



Aperitiu de panís



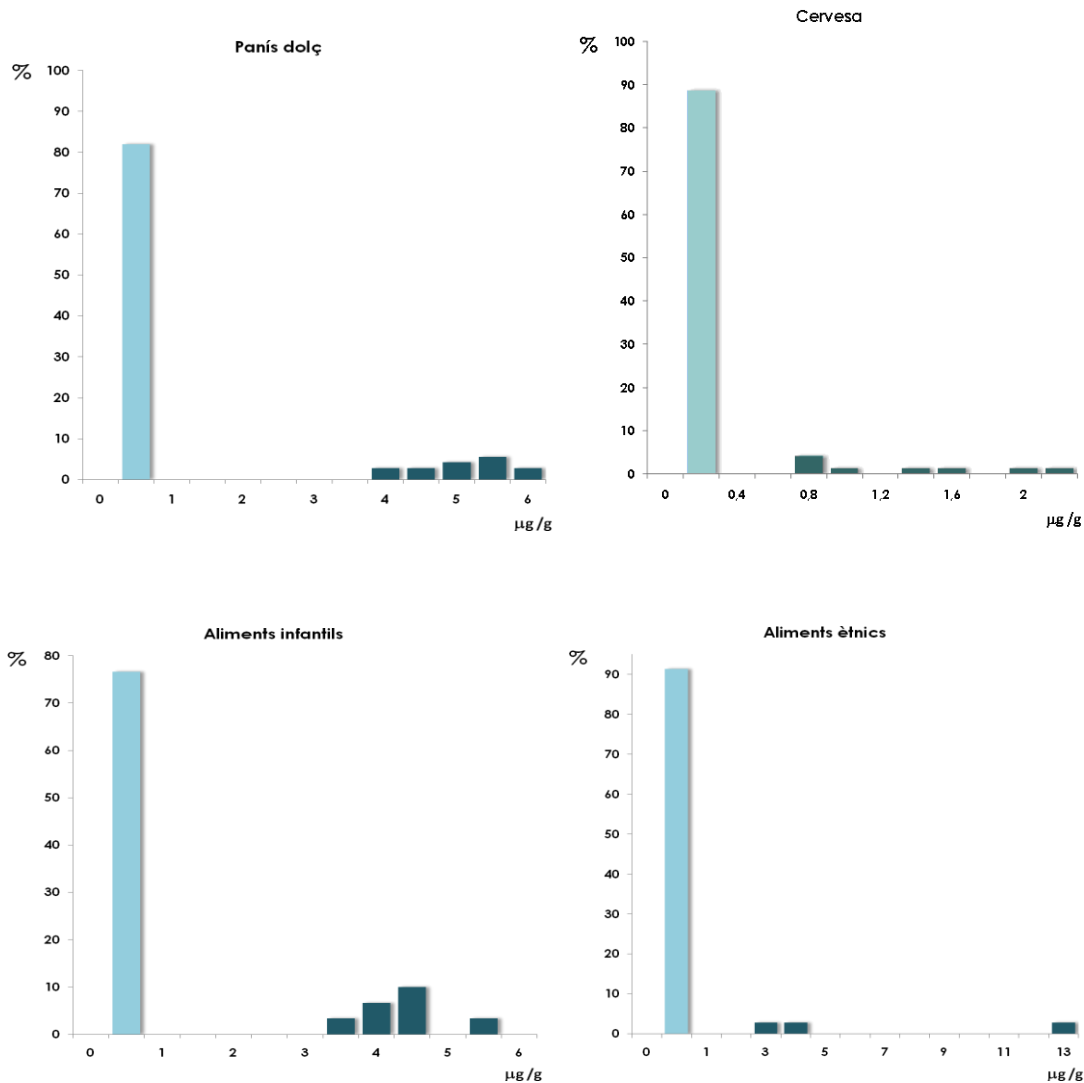


Fig. 11.3 Histogrames de freqüències relatives de la contaminació de ZEA en les diferents matrius alimentàries. (En blau cel, es representen aquelles mostres no quantificades, amb el valor equivalent a LD/2)

## 11.4 Ingesta diària estimada

La metodologia de càlcul es descriu en detall en l'apartat 2.5.2, i consisteix en calcular la mitjana i la desviació estàndard directament a partir de la distribució d'exposició estimada per als individus de cada grup de població. Mitjançant la primera aproximació amb el mètode directe, podem identificar que els nadons són el grup més exposat a la ZEA, seguits pels nens i els nouinguts (Taula 11.2).

Taula 11.2 Ingesta diària estimada mitjançant el mètode directe

Grup de població	Mitjana ± desviació estàndard (ng kg <sup>-1</sup> pc dia <sup>-1</sup> )
------------------	--

Gent gran	0,40±0,48
Celíacs	0,95±0,70
Nouvinguts	1,95±2,03
Dones	0,99±1,06
Homes	1,29±1,26
Adolescents	1,80±1,62
Nens/es	3,45±2,57
Nadons	15,05±14,52

### 11.5 Contribució dels aliments a la ingesta

La principal font d'exposició a ZEA varia en funció del patró alimentari de cada grup de població, condicionat pels hàbits vinculats a l'edat i a la cultura. D'aquesta manera podem detectar que la principal font d'ingesta per a la gent gran és la pasta i la cervesa, mentre que en els adolescents i els nens, la principal font d'ingesta és el pa de motlle, els flocs d'esmorzar i la pasta. Finalment, podem observar que per al col·lectiu de població nouvinguda, la principal font d'exposició a ZEA és la farina de panís i els seus derivats (Figs. 11.4-11.6).

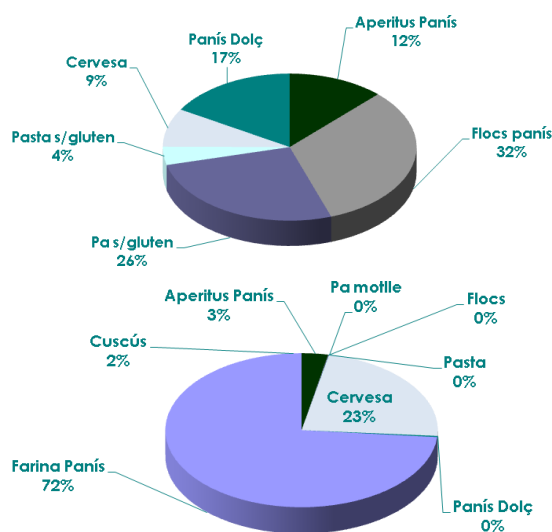


Fig. 11.4 Contribució dels diferents aliments analitzats a l'exposició global de ZEA per als celíacs (esquerra) i nouvinguts (dreta)

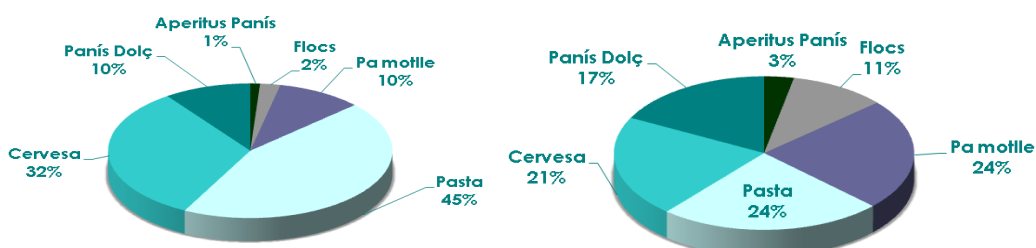


Fig. 11.5 Contribució dels diferents aliments analitzats a l'exposició global de ZEA per a la gent gran (esquerra) i adults (dreta)

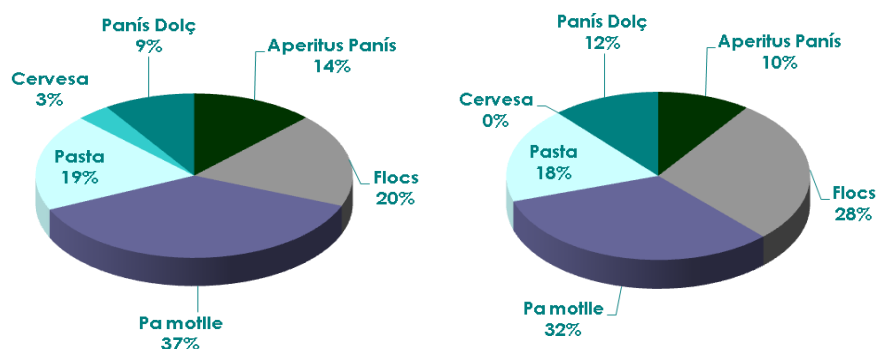


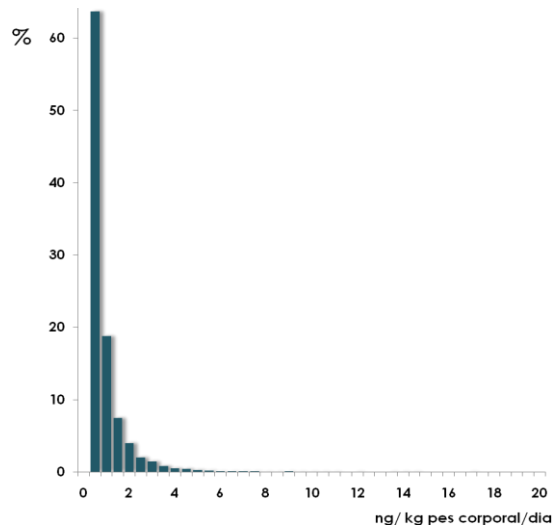
Fig. 11.6 Contribució dels diferents aliments analitzats a l'exposició global de ZEA per als adolescents (esquerra) i nens/es (dreta)

### 11.6 Estimació de l'exposició a zearalenona mitjançant el mètode probabilístic

Les estimacions realitzades mitjançant el model probabilístic mostren uns valors sensiblement superiors a les mitjanes estimades mitjançant el mètode directe, especialment per a la població immigrant, que mostra uns valors d'exposició pròxims als dels nads (Taules 11.3-11.7 i Figs. 11.7-11.11).

Taula 11.3 Diferents estadístics obtinguts per a l'estimació de l'exposició de la gent a la ZEA obtinguts mitjançant el model probabilístic (unitats en  $\text{ng kg}^{-1} \text{pc dia}^{-1}$ )

Gent gran	
N	10000
Mitjana	0,63 [0,45; 0,88]
Desviació estàndard	0,94 [0,48; 1,70]
Asimetria	4,88
Curtosis	41,06
Mediana	0,33 [0,23; 0,46]
Percentil 90	1,05 [0,94; 2,23]
Percentil 95	2,20 [1,36; 3,78]



**Fig. 11.7 Histograma de freqüències relatives de l'estimació de l'exposició de la gent gran a la ZEA, obtingut a través del mètode probabilístic**

**Taula 11.4 Diferents estadístics obtinguts per a l'estimació de l'exposició de la població celíaca i nouvinguda a la ZEA, obtinguts mitjançant el model probabilístic (unitats en  $\text{ng kg}^{-1} \text{pc dia}^{-1}$ )**

	Celíacs	Nouvinguts
N	10000	10000
Mitjana	2,27 [1,03; 4,43]	14,51 [5,67; 29,68]
Desviació estàndard	6,61 [1,75; 12,83]	46,83 [11,29; 108,62]
Asimetria	9,84	8,31
Curtosis	182,07	100,30
Mediana	0,40 [0,24; 0,70]	1,65 [0,93; 2,99]
Percentil 90	5,38 [2,27; 12,23]	33,50 [12,04; 85,89]
Percentil 95	10,24 [4,22; 29,59]	72,34 [25,46; 192,84]

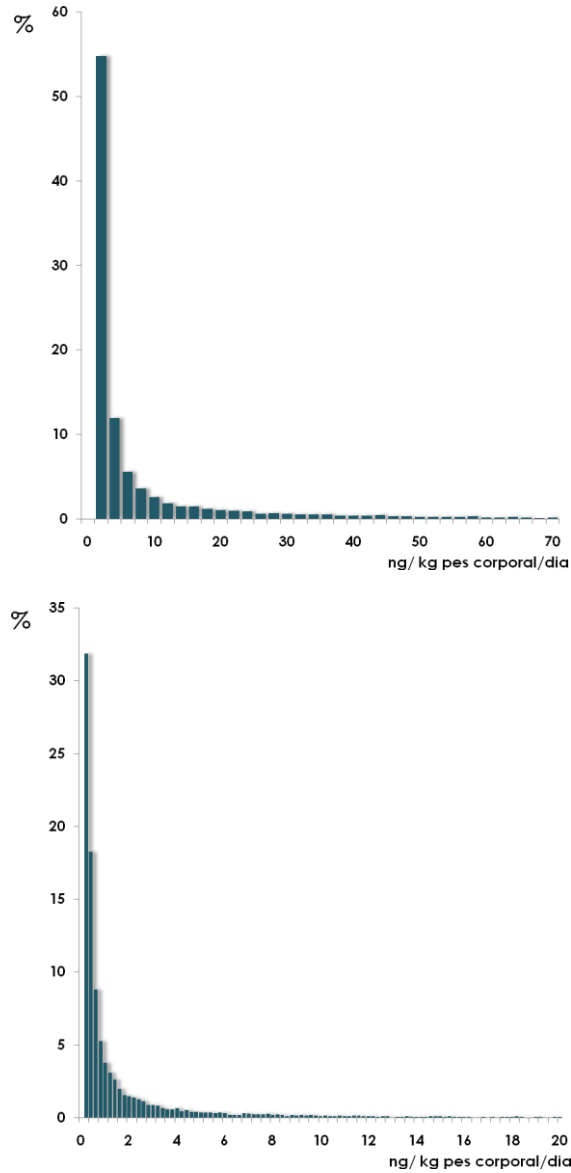
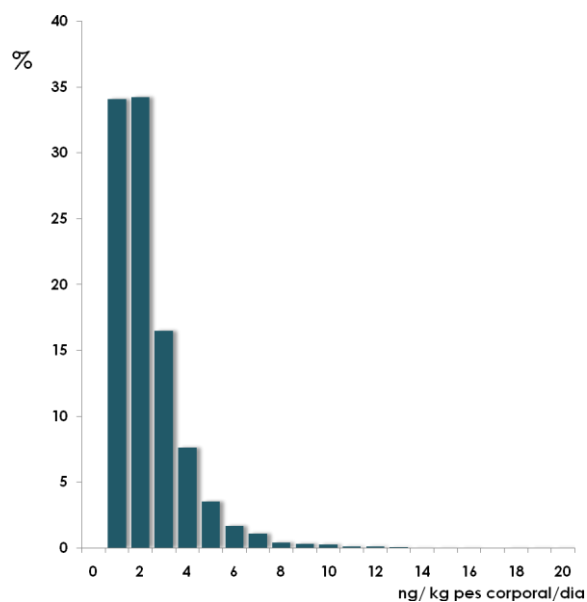
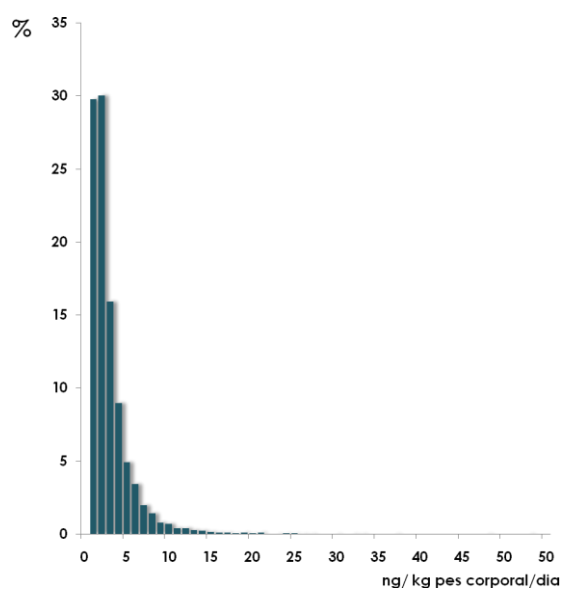


Fig. 11.8 Histograma de freqüències relatives de l'estimació de l'exposició de la població celíaca (esquerra) i nouvinguda (dreta) a ZEA, obtingut a través del mètode probabilístic

Taula 11.5 Diferents estadístics obtinguts per a l'estimació de l'exposició de les dones i dels homes adults a la ZEA, obtinguts mitjançant el model probabilístic (unitats en  $\text{ng kg}^{-1} \text{pc dia}^{-1}$ )

	Dones	Homes
N	10000	10000
Mitjana	2,40 [2,14; 2,69]	1,82 [1,65; 1,99]
Desviació estàndard	2,71 [2,02; 4,22]	1,57 [1,26; 1,94]

Asimetria	5,12	2,91
Curtosis	62,60	15,76
Mediana	1,61 [1,44; 1,79]	1,39 [1,24; 1,53]
Percentil 90	5,12 [4,35 ; 5,91]	3,57 [3,16; 4,07]
Percentil 95	6,99 [5,86; 8,63]	4,66 [3,99; 5,55]

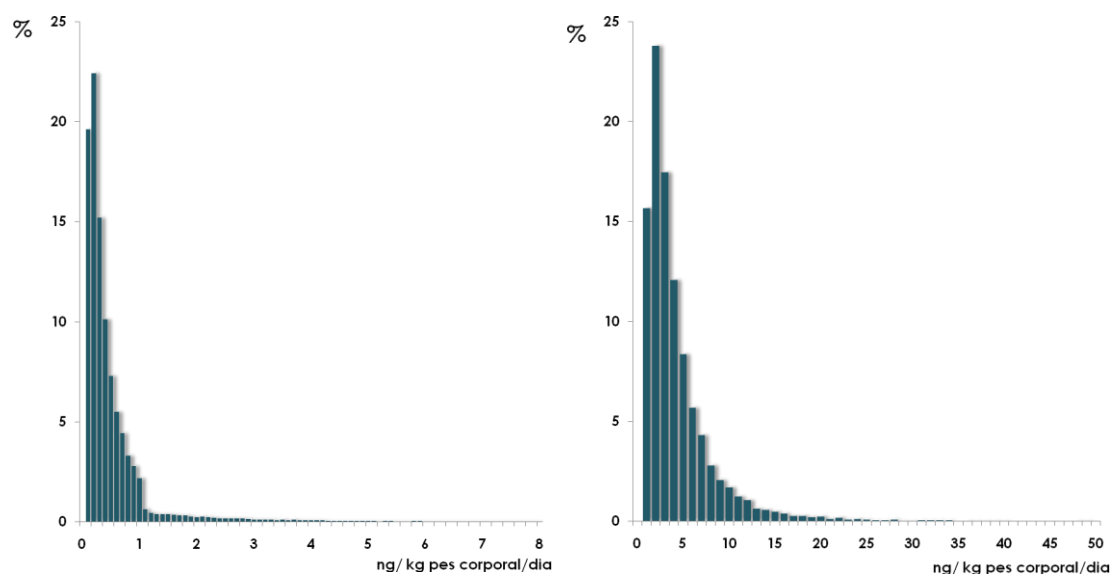


**Fig. 11.9** Histograma de freqüències relatives de l'estimació de l'exposició de les dones (esquerra) i dels homes (dreta) adults a ZEA, obtingut a través del mètode probabilístic



**Taula 11.6 Diferents estadístics obtinguts per a l'estimació de l'exposició dels adolescents i dels nens/es a la ZEA obtinguts mitjançant el model probabilístic (unitats en ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>)**

	Adolescents	Nens/es
N	10000	10000
Mitjana	2,01 [1,79; 2,24]	3,75 [2,88; 4,82]
Desviació estàndard	1,78 [1,39; 2,27]	3,99 [2,31; 6,47]
Asimetria	2,81	3,46
Curtosis	14,00	20,07
Mediana	1,50 [1,33; 1,68]	2,54 [1,93; 3,33]
Percentil 90	4,08 [3,45; 4,75]	7,94 [5,59; 11,44]
Percentil 95	5,36 [4,44 ; 6,52]	10,92 [6,96; 16,66]



**Fig. 11.10 Histograma de freqüències relatives de l'estimació de l'exposició dels adolescents (esquerra) i dels nens/es (dreta) a la ZEA, obtingut a través del mètode probabilístic**

Taula 11.7 Diferents estadístics obtinguts per a l'estimació de l'exposició dels nadons a la ZEA, obtinguts mitjançant el model probabilístic (unitats en ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>)

Nadons	
N	10000
Mitjana	18,61 [13,72; 24,96]
Desviació estàndard	33,11 [19,09; 68,89]
Asimetria	6,71
Curtosis	92,88
Mediana	7,45 [5,08; 10,53]
Percentil 90	49,22 [32,95; 68,34]
Percentil 95	73,38 [51,07; 109,36]

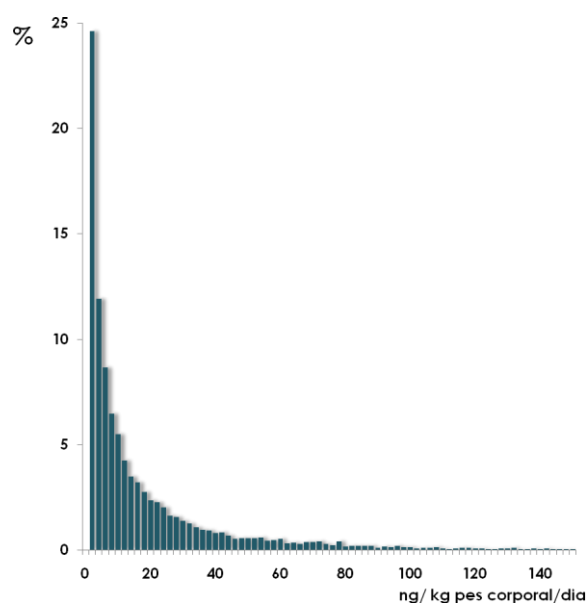


Fig. 11.11 Histograma de freqüències relatives de l'estimació de l'exposició dels nadons a la ZEA, obtingut a través del mètode probabilístic

## 11.7 Avaluació del risc

Al comparar la ingesta estimada de ZEA per a cada grup de població amb la màxima ingesta tolerable de  $250 \text{ ng kg}^{-1} \text{ pc dia}^{-1}$ , podem observar que totes les estimacions són molt allunyades del nivell de risc, inclosos el percentil 95 dels principals grups de risc, nadons i nouvinguts (Fig. 11.2).

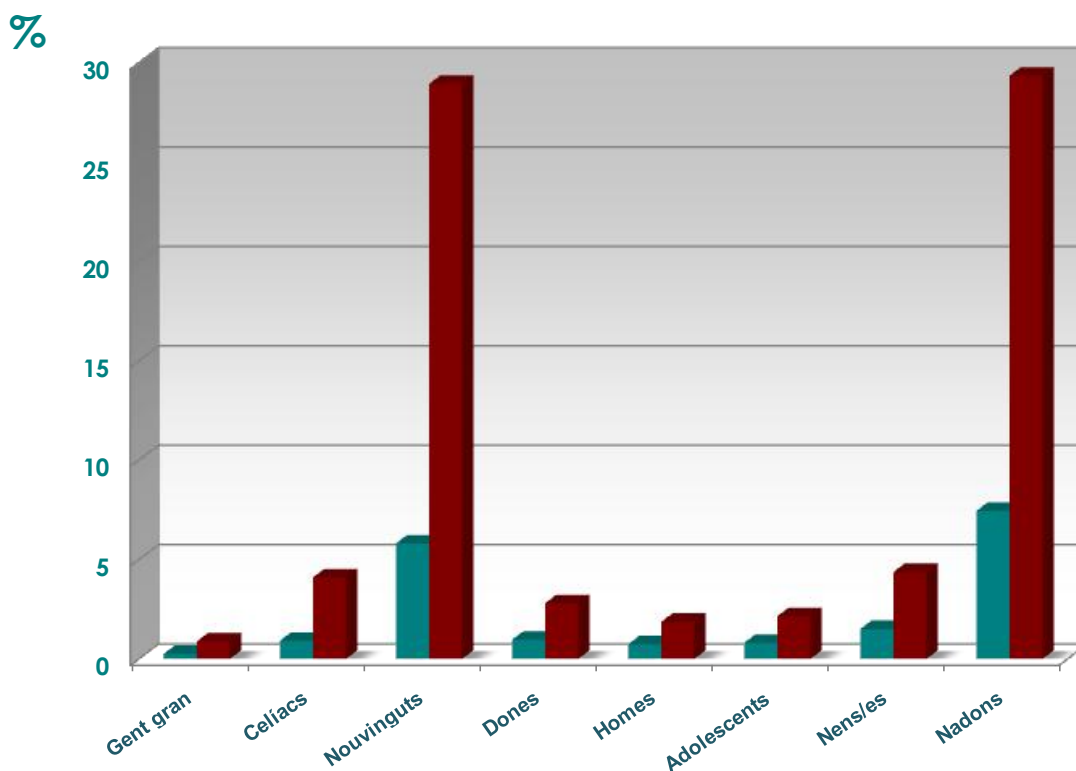


Fig. 11.12 Representació gràfica del percentatge de la ingesta diària tolerable de ZEA, estimat per cada grup de població per a la mitjana (verd) i per al percentil 95 (vermell)

## 11.8 Altres estudis d'exposició

Els principals estudis realitzats prèviament per avaluar l'exposició de grups poblacionals a la ZEA són l'estudi europeu SCOOP (2003) i el Primer i Segon Estudi Francès de Dieta Total (Leblanc et al., 2005; ANSES, 2011), que es van dur a terme combinant els valors de contaminació i d'ingesta mitjançant un mètode directe.

Tot i les limitacions per comparar els diferents estudis, podem observar que les estimacions realitzades a França eren més elevades que les del nostre estudi. En el primer estudi es van calcular una ingesta mitjana de  $33 \text{ ng kg}^{-1} \text{ pc dia}^{-1}$  per adults i  $66$

ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup> per als nens/es, mentre que una estimació de 70 i 132 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>, respectivament, es va realitzar per al percentil 95 (Leblanc et al., 2005). En el segon estudi, mitjançant el mètode de la hipòtesi alta (UB) i baixa (LB), es van estimar una ingesta mitjana per als adults de 5,9 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup> (LB) i 25,5 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup> (UB) i per als nens de 11,5 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup> (LB) i 46,2 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup> (UB). En el 99,6 % de les mostres no es va detectar o quantificar la micotoxina.

Valors més baixos es van estimar en altres països europeus. Per exemple, es va estimar una ingesta de 0,8 i 4,1 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup> per adults d'Itàlia i Portugal. A més, l'exposició a ZEA de nens i nadons d'Àustria, Finlàndia, Alemanya, Noruega i del Regne Unit, es va estimar en el rang comprès entre 8,0 i 31,6 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup> (SCOOP, 2003).

## 11.9 Referències

Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES). 2011. Étude de l'alimentation totale française 2. Tome 1. Zéaralénone.

Biehl ML, Prelusky DB, Koritz GD, Hartin KE, Buck WB, Trenholm HL. 1993. Biliary excretion and enterohepatic cycling of zearalenone in immature pigs. *Toxicol Appl Pharmacol.* 121:152-159.

Council for Agricultural Science and Technology (CAST). 2003. *Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human system; Task Force Report* Ames, IA. 139: 48-58.

Comissió Europea (CE). 2006. Reglament (CE) N° 1881/2006 of 19/12/2006. *Official Journal of the European Union*, L364, 5-24.

Comissió Europea (CE). 2007. Reglament (CE) N° 1126/2007 of 28/9/2007. *Official Journal of the European Union*, L255, 14-17.

European Food Safety Authority (EFSA). 2011. *Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food.* *EFSA J.* 9(6):2197.

Gromadzka K, Waśkiewicz A, Goliński P, Świetlik J. 2009. Occurrence of estrogenic mycotoxin - Zearalenone in aqueous environmental samples with various NOM content. *Water Res.* 43:1051-1059.

Krska R, Pettersson H, Josephs RD, Lemmens M, Mac Donald S, Welzig E. 2003. Zearalenone in maize: Stability testing and matrix characterisation of a certified reference material. *Food Addit Contam.* 20:1141-1152.

Kuiper-Goodman T, Scott PM, Watanabe H. 1987. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regul Toxicol Pharmacol.* 7:253-306.

Leblanc J, Tard A, Volatier J, Verger P. 2005. Estimated dietary exposure to principal food mycotoxins from The First French Total Diet Study. *Food Addit Contam.* 22:652-72.

Ramos AJ, Hernández E, Plá-Delfina JM, Merino M. 1996. Intestinal absorption of zearalenone and *in vitro* study of non-nutritive sorbent materials. *Int J Pharm.* 128, 129-137.

SCOOP (Scientific Cooperation Task 3.2.10 of the European Commission). 2003. Collection of occurrence data of Fusarium toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU Member States. Final report. Directorate – General Health and Consumer Protection. European Commission, Brussels, Belgium.

Wood GE. 1992. Mycotoxins in foods and feeds in the United States. *J Anim Sci.* 70:3941-3949.

# 12

## Biomarcadors de l'exposició a

### l'ocratoxina A

A banda dels mètodes convencionals per avaluar l'exposició a l'ocratoxina A (OTA), que combinen les dades de contaminació d'aliments amb dades d'ingesta d'aquests aliments per part de la població, s'han proposat altres mètodes basats en la determinació d'aquesta micotoxina, o algun dels seus metabòlits, en plasma i orina. Aquesta aproximació coneguda com a marcadors biològics o biomarcadors, té l'avantatge de no veure's afectada per l'efecte de les diferents matrius alimentàries en la biodisponibilitat i de reduir la variabilitat entre individus associada a l'absorció intestinal.

Després de la ingesta, l'OTA s'absorbeix ràpidament en l'estómac i l'intestí prim de rates i ratolins (Pfohl-Leszkowicz i Manderwille, 2007). Quan l'OTA arriba al torrent sanguini, aquesta es troba unida a proteïnes sèriques, principalment albúmina i d'altres macromolècules, en proporció variable en funció de l'espècie (Galtier et al., 1981).

En els animals, la concentració de toxina i dels seus metabòlits en teixits i plasma, depèn de l'espècie i del sexe, de la dosi administrada, del mode i durada d'administració, la composició de la dieta, així com de l'estat de salut de l'animal (Ringot et al., 2006).

Fuchs i Hult (1992) van considerar que l'OTA unida a l'albúmina sèrica i altres macromolècules sèriques són un magatzem corporal mòbil de la toxina, ràpidament disponible per alguns teixits durant molt de temps. S'ha suggerit que la circulació enterohepàtica i la reabsorció renal faciliten la persistència de la micotoxina en l'organisme durant molt de temps. Per tant, tot i que els aliments consumits presentin concentracions baixes d'OTA, si aquests es consumeixen durant un període molt perllongat, l'exposició renal fins i tot a baixes dosis pot esdevenir toxicològicament significativa (Fuchs i Hult, 1992).

La principal via d'eliminació és via renal, tot i que es poden excretar via biliar, en femta i llet. Considerant la difusió de la toxina al plasma, la ingesta d'OTA es pot calcular

mitjançant l'equació de Klaassen. Els biomarcadors de l'exposició a l'OTA utilitzats en el present estudi van ser: la concentració d'OTA en plasma i la concentració d'OTA i del seu metabòlit ocratoxina alfa (OT $\alpha$ ) en orina.

Les mostres de sang per a la determinació d'OTA en plasma es van recollir en dues etapes. En primer lloc, es va estudiar la incidència de l'OTA en plasma en nou poblacions de la regió central de la província de Lleida i la seva relació amb les característiques del grup. Les mostres es van obtenir durant els mesos de març a maig de 2008. En la segona part de l'estudi en plasma, i amb l'objectiu d'estudiar diferències estacionals i regionals, les mostres es van recollir en setze poblacions tant en el centre com al nord de la província de Lleida, així com en tres estacions de l'any. Els participants van completar qüestionaris sobre consum d'aliments possiblement contaminants per OTA amb l'objecte d'estimar la seva ingesta.

## **12.1 Metodologia**

### **12.1.1 Plasma**

#### **12.1.1.1 Mostreig**

Les mostres de sang es van recollir en dues etapes: en una primera etapa, durant els mesos de març a maig de 2008 en nou localitats de la plana de Lleida (Alcarràs, Almacelles, Arbeca, Artesa de Segre, Balaguer, les Borges Blanques, Lleida, Tàrraga i Torà). En una segona part de l'estudi, les mostres es van recollir tant de la plana (n=243, a les localitats d'Agramunt, Albatàrrec, Alcarràs, Alcoletge, Alfarràs, Alguaire, Artesa de Segre, Linyola, Lleida, Mollerussa, Penelles, Tàrraga i Torres de Segre), com del nord (n=82, en les localitats de la Pobla de Segur, la Seu d'Urgell i Viella), durant els mesos d'octubre i novembre de 2008 (tardor, n=116), gener i febrer de 2009 (hivern, n=98), i juliol i agost de 2008 (estiu, n=111). El nombre total de mostres en aquest segon estudi va ser 325. Els participants eren voluntaris sans, que col·laboraven amb el del Banc de Sang de l'Hospital Arnau de Vilanova, als quals se'ls va informar de l'estudi i van signar el seu consentiment.

Les mostres es van dipositar en Vacutainers® amb EDTA com anticoagulant. El plasma es va separar per centrifugació a 1000 g durant 10 min a 4 °C i emmagatzemat a -25°C fins l'anàlisi.

### 12.1.1.2 Anàlisis d'OTA

L'OTA es va extreure del plasma mitjançant separació líquid-líquid seguit per una purificació en columnes d'immunoafinitat OCHRAPREP® (R-Biopharm, Alemanya). La detecció de l'OTA en plasma es va realitzar mitjançant cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC).

La ingesta d'OTA ( $k_0$ , ng OTA  $\text{kg}^{-1}$  pes corporal  $\text{dia}^{-1}$ ) es va calcular mitjançant l'equació de Klaassen (Klaassen 1986), tal i com es mostra:

$$k_0 = Cl_p \times \frac{C_p}{A}$$

On  $Cl_p$  és l'evacuació diària d'OTA del plasma ( $\text{mL kg}^{-1}$  pes corporal  $\text{dia}^{-1}$ );  $C_p$  és la concentració plasmàtica d'OTA ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) i  $A$  és la biodisponibilitat de l'OTA. Es va utilitzar el valor  $Cl_p$  de  $0.99 \text{ mL kg}^{-1}$  pes corporal/dia procedent de Miraglia et al. (1996) derivada de Studer-Rohr et al. (1995).  $A$  va ser estimat per ser del 50 % (Comissió Europea 2002). Per tant, amb aquestes assumpcions, l'equació resultant era:

$$k_0 = 0.99 \times \frac{C_p}{0.5} = 1.97 \times C_p$$

## 12.1.2 Orina

### 12.1.2.1 Mostreig

Les mostres d'orina van ser donades per voluntaris sans, habitants de la ciutat de Lleida ( $n=72$ ) durant els mesos d'octubre, novembre i desembre de 2009.

### 12.1.2.2 Anàlisis d'OTA

L'OTA i l'OT $\alpha$  van ser separades per un procés d'extracció líquid-líquid, i la detecció d'aquestes toxines es va realitzar mitjançant cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) amb detector de fluorescència.

## 12.1.3 Tractament estadístic

Les diferències entre grups es van avaluar mitjançant els tests no paramètrics de Wilcoxon (per analitzar diferències entre dos grups) i de Kruskal-Wallis (per analitzar



diferències entre dos o més grups). L'anàlisi es va dur a terme amb el programa estadístic JMP®.

## 12.2 Resultats i discussió

### 12.2.1 Plasma

La població estudiada es va classificar per sexes i per edats, definint el grup A (de 18 a 29 anys), el grup B (de 30 a 44 anys) i el grup C (més de 45 anys). El nombre de participants en cada grup i en cada etapa de mostreig es mostren en les taules 12.1 i taula 12.2.

#### 12.2.1.1 Presència d'OTA en plasma

Les taules 12.1 i 12.2 mostren els nivells d'OTA trobats en plasma en els mostrejos realitzats en els diferents municipis de Lleida. En el primer estudi es van trobar dues mostres no detectades, mentre que en el segon estudi totes les mostres van ser positives.

Es poden observar distribucions i nivells de contaminació similars en ambdós estudis, tot i que el valor màxim del segon mostreig va ser més alt que en el primer mostreig, mentre que els valors de la mitjana i la mediana van ser inferiors en el segon estudi.

**Taula 12.1. Distribució dels nivells d'OTA en plasma (ng mL<sup>-1</sup>) segons el sexe i l'edat, en la primera etapa de mostreig (unitats en ng mL<sup>-1</sup>)**

	n	Mitjana±DE	Mediana	Rang	p95	p97.5	p99
Total	279	0,86±1,07	0,54	0,11-8,68	2,51	4,05	7,60
Sexe							
Homes	132	0,89±1,03	0,57	0,12-8,03	2,92	4,05	4,17
Dones	147	0,83±1,11	0,49	0,11-8,68	2,42	2,94	7,60
Grups d'edat							
A	80	0,87±1,19	0,57	0,12-8,03	2,72	5,04	8,03
B	94	0,64±0,55	0,47	0,11-3,04	1,65	2,47	3,04
C	105	1,05±1,29	0,66	0,14-8,68	2,92	4,17	7,60

**Taula 12.2 Distribució dels nivells d'OTA en plasma (ng mL<sup>-1</sup>) segons el sexe i l'edat, en la segona etapa de mostreig (unitats en ng mL<sup>-1</sup>)**

	n	Mitjana±DE	Mediana	Rang	p95	p97.5	p99
Total	325	0,80±1,01	0,50	0,06-10,92	2,11	2,71	5,93
Sexe							
Homes	160	1,60±0,79	0,50	0,06-7,13	1,99	2,71	4,29
Dones	165	1,65±0,81	0,49	0,06-10,92	2,15	2,69	5,04
Grups d'edat							
A	87	0,63±0,55	0,41	0,06-2,53	1,92	2,09	2,38
B	116	0,82±1,02	0,48	0,06-6,47	2,18	3,60	6,13
C	122	0,90±1,23	0,55	0,07-10,92	2,20	2,72	6,22
Regió							
Plana	243	0,79±1,04	0,48	0,06-10,92	2,11	2,59	4,92
Muntanya	82	0,83±0,93	0,53	0,21-6,47	1,99	3,48	4,67
Estació							
Tardor	116	0,73±0,65	0,52	0,06-4,24	1,85	2,16	3,36
Hivern	98	0,87±1,48	0,42	0,07-10,92	2,13	4,87	7,24
Estiu	111	0,80±0,81	0,55	0,06-6,47	2,13	2,62	2,78

Es van avaluar les diferències entre els nivells d'OTA en plasma segons el sexe i l'edat dels diferents participants. En els dos estudis no es van observar diferències significatives entre els nivells d'OTA en el plasma dels homes i de les dones, mentre que al comparar els nivells entre sexes, es van observar diferències significatives entre els grups B i C en el primer estudi, i entre el grup A i C, en el segon. A més, es va observar que el grup C presentava, en els dos casos, els valors més elevats.

D'altra banda, es va estudiar la incidència de l'OTA en diferents regions. En el primer estudi, es van tenir en compte poblacions de la regió de la plana de Lleida, i no es van trobar diferències significatives entre les mateixes. En el segon estudi, es van considerar les poblacions de la plana i de la muntanya, no es van trobar diferències al comparar ambdós àmbits geogràfics.

Finalment, en el segon estudi es van analitzar les diferències estacionals (tardor, hivern i estiu), i tampoc eren significatives, tot i que els valors màxims d'OTA en plasma i la major freqüència de valors elevats van ser observats en les mostres recollides durant hivern.

### 12.2.1.2 Estimació de la ingesta en base als nivells plasmàtics d'OTA

Les taules 12.3 i 12.4 mostren les distribucions de l'estimació de la ingesta d'OTA, calculades a partir de les concentracions d'OTA en plasma. En ambdós casos, els valors obtinguts no van superar els valors provisionals d'ingesta diària tolerable (IDTP) de 14 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup> (EFSA, 2006) i 17 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup> (JECFA, 2007), exceptuant alguns casos dels valors màxims o percentils alts.

Els resultats dels anàlisis de diferències entre grups de població, regions i estacions van ser idèntics als resultats obtinguts al comparar els nivells plasmàtics, ja que els valors d'estimació de la ingesta són múltiple dels nivells d'OTA en plasma.

**Taula 12.3 Estimació de la ingesta d'OTA (ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>) en funció dels nivells d'OTA en plasma, segons sexe i edat, en la primera etapa de mostreig (ng mL<sup>-1</sup>)**

	n	Mitjana±DE	Mediana	Rang	P95	P97.5	P99
Total	279	1,69±2,11	1,05	0,22-17,10	4,94	7,98	14,97
Sexe							
Homes	132	1,75±2,03	1,13	0,24-15,82	5,75	7,98	8,21
Dones	147	1,64±2,19	0,97	0,22-17,10	4,77	5,79	14,97
Grups d'edat							
A	80	1,71±2,34	1,12	0,24-15,82	5,36	9,93	15,82
B	94	1,26±1,08	0,93	0,22-5,99	3,25	4,87	5,99
C	105	2,07±2,54	1,30	0,28-17,10	5,75	8,21	14,97

**Taula 12.4 Distribució dels nivells d'OTA en plasma (ng mL<sup>-1</sup>) segons el sexe i l'edat, en la segona etapa de mostreig (ng mL<sup>-1</sup>)**

	n	Mitjana±DE	Mediana	Rang	p95	p97.5	p99
Total	325	1,57±1,99	0,98	0,11-21,51	4,15	5,33	11,69
Sexe							
Homes	160	1,55±1,77	0,99	0,12-14,04	3,92	5,33	8,46
Dones	165	1,59±2,20	0,97	0,11-21,51	4,24	5,29	9,94
Grups d'edat							
A	87	1,25±1,08	0,80	0,12-4,98	3,78	4,12	4,70
B	116	1,61±2,01	0,95	0,11-12,74	4,29	7,08	12,08
C	122	1,77±2,43	1,08	0,14-21,51	4,33	5,35	12,24
Regió							
Plana	243	1,55±2,05	0,95	0,11-21,51	4,15	5,11	9,69
Muntanya	82	1,64±1,84	1,05	0,40-12,74	3,92	6,86	9,19
Estació							
Tardor	116	1,45±1,28	1,02	0,11-8,36	3,65	4,26	6,61
Hivern	98	1,71±2,91	0,82	0,14-21,51	4,98	9,60	14,27
Estiu	111	1,59±1,59	1,08	0,12-12,74	4,20	5,17	5,47

## 12.2.2 Orina

De la mateixa manera que en l'estudi en plasma, la població es va classificar d'acord el sexe i l'edat, en les diferents categories de la secció anterior. El número de persones per a cada grup s'enuncia en les taules 12.5 i 12.6.

Al contrari dels resultats observats en l'estudi en plasma, la presència d'OTA en orina no va ser del 100 %, mostrant valors molt més baixos. Es va observar que tan sols el 13 % de les mostres van presentar nivells detectables de la toxina, mentre que el 61 % de les mostres van ser positives a OT $\alpha$ . Els valors de les distribucions d'OTA i d'OT $\alpha$  en orina es detallen en les taules 12.5 i 12.6. Es va observar un cas extrem en la distribució d'OT $\alpha$  (21,26 ng mL<sup>-1</sup>) en una mostra corresponent a un participant del grup d'edat C. Les diferències entre les concentracions d'ambdós ocratoxines en els grups de població (sexe i edat) no van ser significatives.

**Taula 12.5 Distribució dels nivells d'OTA en orina (ng mL<sup>-1</sup>) segons sexe i edat**

	n	Mostres positives (%)	Mitjana $\pm$ DE	Mediana	Rang
Total	72	9(12,5)	0,237 $\pm$ 0,181	0,185	0,057-0,562
Sexe					
Homes	29	3(10,3)	0,304 $\pm$ 0,233	0,238	0,111-0,562
Dones	43	6(14,0)	0,204 $\pm$ 0,163	0,140	0,057-0,445
Grups d'edat					
A	24	5(20,8)	0,280 $\pm$ 0,219	0,238	0,057-0,562
B	24	1(4,2)	0,111	-	-
C	24	3(12,5)	0,208 $\pm$ 0,144	0,185	0,077-0,363

**Taula 12.6. Distribució dels nivells d'OT $\alpha$  en orina (ng mL<sup>-1</sup>) segons sexe i edat**

	n	Mostres positives (%) <sup>*</sup>	Mitjana $\pm$ DE	Mediana	Rang <sup>*</sup>
Total	71	43(60,6)	0,441 $\pm$ 0,508	0,248	0,056-2,894
Sexe					
Homes	28	18(64,3)	0,387 $\pm$ 0,370	0,254	0,056-1,387
Dones	43	25(58,1)	0,480 $\pm$ 0,593	0,223	0,092-2,894
Grups d'edat					
A	24	11(45,8)	0,775 $\pm$ 0,800	0,441	0,092-2,894
B	24	15(62,5)	0,410 $\pm$ 0,354	0,278	0,056-1,387
C	23	17(73,9)	0,251 $\pm$ 0,230	0,196	0,099-1,073

\* Presència i valors màxims excloent el valor fora de rang de 21.62 ng d'OT $\alpha$ /mL, el qual prové d'un home del grup d'edat C

### 12.3 Conclusions

L'elevada presència d'OTA en plasma mostra la importància de l'exposició de la població estudiada a aquesta micotoxina. Tot i que part dels valors d'ingesta estimada van ser inferiors als valors provisionals de referència, es van observar casos en els quals aquests valors van ser superats. Per tant, és important minimitzar la contaminació dels aliments per tal de reduir l'exposició deguda a la ingesta en els casos extrems de consum.

La detecció d'OTA i del seu metabòlit OT $\alpha$  en orina també va permetre confirmar l'exposició de la població a l'OTA, i va permetre tenir en compte la presència d'ambdues ocratoxines, i en particular la presència d'OT $\alpha$ , donada la seva major presència, en aquest fluid biològic com un altre biomarcador d'exposició d'OTA. La major facilitat d'obtenció de mostres, amb respecte a les mostres de sang, és una altra

raó per considerar aquesta matriu. Tanmateix, encara és necessari establir la relació entre les concentracions d'aquestes toxines en fluids fisiològics i la ingesta diària d'OTA.

## 12.4 Referències

EFSA (European Food Safety Authority). 2006. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to ochratoxin A in food (Question no EFSA-Q-2005-154). The EFSA Journal 365: 1-56.

Fuchs R and Hult K. 1992. Ochratoxin A in blood and its pharmacokinetic properties. Food Chem Toxicol. 30:201-204.

Galtier P, Alvinerie M, Charpentreau JL. 1981. The pharmacokinetic profiles of ochratoxin A in pigs, rabbits and chickens. Food Cosmet Toxicol. 19:735-738.

JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). 2007. In: Evaluation of certain food additives and contaminants. 68th Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO technical report series no. 947, Geneva, p. 208.

Pfohl-Leszkowicz A, Manderville RA. 2007. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. Mol Nutr Food Res. 51:61-99.

Ringot D, Chango A, Schneider Y, Larondelle Y. 2006. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. Chem-Biol Interact. 159:18-46.

# 13

## Biomarcadors de l'exposició a les fumonisines

Les fumonisines (FBs) són micotoxines produïdes per *Fusarium verticillioides* i *F. proliferatum* que sovint poden contaminar el blat de moro. La FB<sub>1</sub> (Fig. 13.1) i la FB<sub>2</sub> s'absorbeix pobraement en rosegadors i simis, i és ràpidament eliminada de la sang, mentre que una petita concentració s'acumula en els teixits com el fetge i els ronyons.

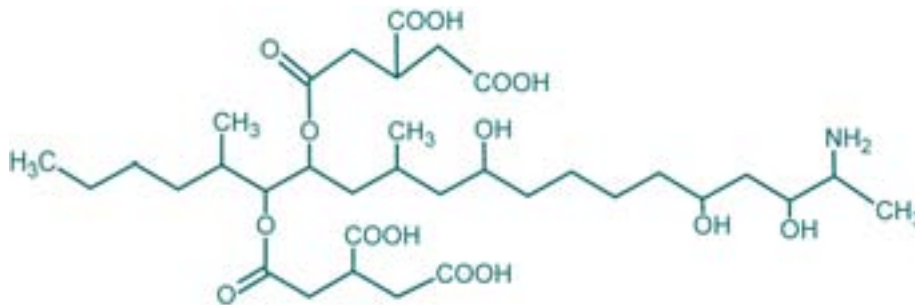


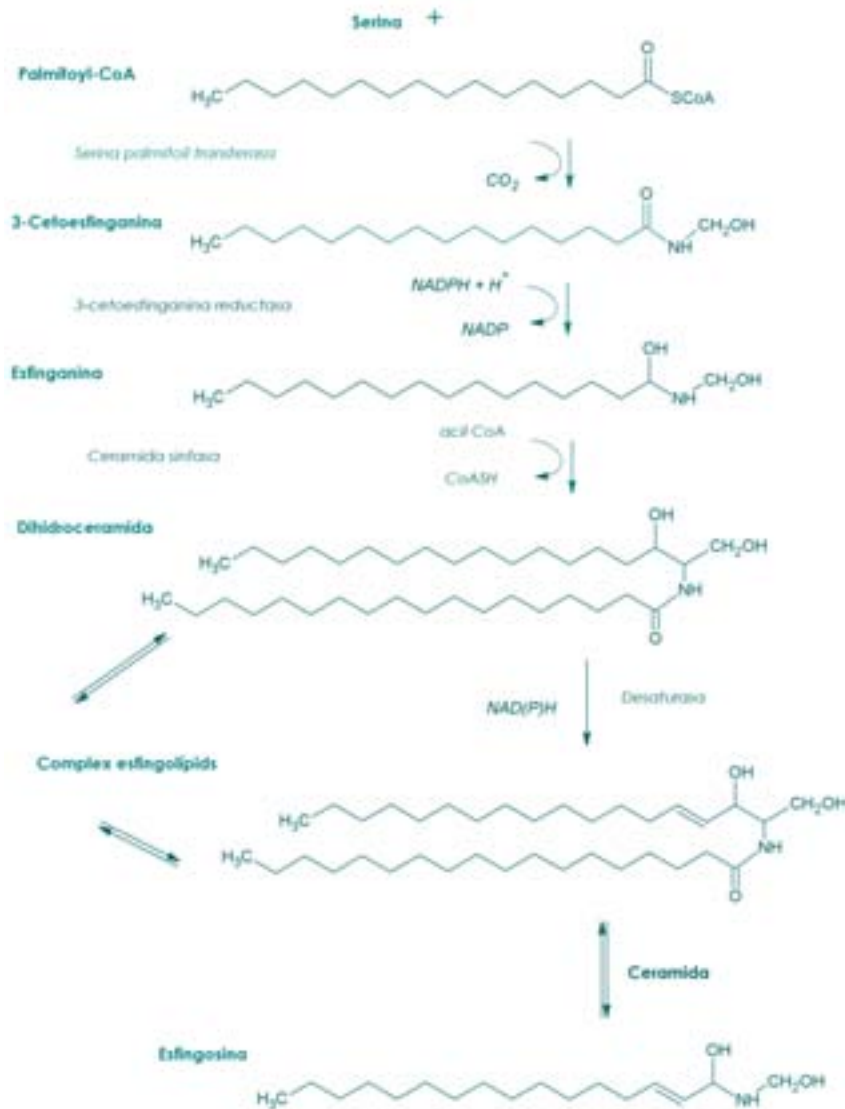
Fig. 13.1 Estructura molecular de la fumonisina B<sub>1</sub>

La gran homologia de les FBs amb els esfingolípidis determina que el mecanisme d'acció es basi en la inhibició competitiva de l'enzim ceramida sintasa. Aquesta disrupció provoca la pertorbació del metabolisme de la ceramida i dels esfingolípidis. La conseqüència immediata de la inhibició de la ceramida sintasa és l'acumulació de la base esfingoidea que funciona de substrat, l'esfinganina (Sa) i en menor grau d'esfingosina (So) (Fig. 13.2).

L'increment en el ràtio Sa/So en orina s'ha proposat com a indicador específic de l'exposició a FBs, validat amb èxit *in vitro* i *in vivo en rates*, i en procés de validació en humans. L'acumulació de Sa i So s'ha mostrat que produeix toxicitat cel·lular i inhibició del creixement (Wang et al., 1999). El fetge i els ronyons són els principals òrgans diana, tot i que s'ha observat variacions en funció de l'espècie, de la dosi i del sexe. S'ha mostrat que la FB<sub>1</sub> és un potent promotor del càncer en rates després de la iniciació amb dietilnitrosamina i AFB<sub>1</sub>. L'exposició humana a FBs s'ha relacionat amb càncer d'esòfag i de fetge a Sud-àfrica i Xina, i recentment amb defectes del tub neuronal a



la regió confrontant de Mèxic amb Texas (Sydenham et al., 1991; Yoshizawa et al., 1994). L'Agència Internacional de Recerca del Càncer (IARC) ha classificat a la FB<sub>1</sub> com a possible carcinogen humà (grup 2B) (IARC, 2006).



**Fig. 13.2 Biosíntesi de novo d'esfingosina a partir de palmitoyl-CoA i serina. Les fumonisines bloquegen la ceramida sintasa, inhibint la conversió d'esfingosina a dihidroceramida**

L'objectiu del present estudi va ser avaluar els nivells d'esfinganina i d'esfingosina en plasma i orina, així com calcular el ràtio Sa/So en mostres procedents de població resident a Catalunya. El treball es va estructurar en dues parts experimentals: en la primera part, es van comparar els nivells plasmàtics i urinaris de Sa, So i el ràtio Sa/So de dos grups de població; i en la segona part, els nivells urinaris d'aquests esfingolípids procedents d'un grup de consumidors d'aliments a base de panís i d'un grup control, es van monitoritzar durant dues setmanes en condicions controlades d'ingesta d'aliments a base de panís.

## **13.1 Metodologia**

### **13.1.1 Disseny de l'estudi**

Aquest estudi no va sotmetre a cap risc als donadors de mostres biològiques, ni tampoc se'ls va induir a modificacions nocives dels hàbits alimentaris. Cada participant va ser informat sobre l'estudi i tots van signar un consentiment personalitzat.

#### **13.1.1.1 Estudi dels nivells d'esfingolípid en plasma**

Les mostres de sang van ser donades per 136 voluntaris sans residents a Catalunya durant 2008 seguint l'aprovació del Comitè Ètic de la Universitat de Lleida. La sang era extreta i emmagatzemada en Vacutainers® amb anticoagulant (EDTA) i seguidament es centrifugava a 1000 g durant 10 min, i el plasma resultant s'emmagatzemava a -20°C fins l'anàlisi químic.

La ingesta dels aliments a base de panís s'avaluava, administrant un qüestionari de freqüència de consum d'aliments (QFCA), i l'exposició a les FBs s'estimava combinant el consum amb les dades de contaminació que s'havien obtingut prèviament, i àmpliament descrites en el capítol específic dedicat a FBs d'aquest document. Finalment es va dividir la població en dos grups en funció de l'exposició estimada a les FBs: exposats i no exposats.

#### **13.1.1.2 Estudi dels nivells d'esfingolípid en orina**

La primera orina del matí es va recollir a 89 voluntaris amb recipients estèrils durant 2009. Les mostres es van transportar en refrigeració i es van emmagatzemar a -20°C fins l'anàlisi. L'exposició individual a les FBs es va avaluar administrant un QFCA i un registre de tres dies (R3) durant els dies anteriors de la recollida d'orina. L'exposició a les FBs s'estimava combinant el consum amb les dades de contaminació que s'havien obtingut prèviament, àmpliament descrites en el capítol específic dedicat a FBs d'aquest document.

La població es va agrupar per una banda, en exposats a altes concentracions de FBs i per una altra, en exposats baixes concentracions. Addicionalment es van obtenir set mostres de l'Hospital Arnau de Vilanova, procedents de pacients amb càncer d'esòfag.

### 13.1.1.3 Estudi de seguiment dels esfingolípidis al llarg del temps

Per tal de conèixer els canvis dels nivells urinaris dels esfingolípidis al llarg del temps, es va monitoritzar l'orina de dos grups de voluntaris durant dues setmanes. Un grup estava format per consumidors habituals d'aliments a base de panís (grup d'exposats, n=24), i l'altre grup eren no consumidors d'aquests aliments (grup control, n=12). El grup exposat tenia restringit el consum dels aliments de panís durant 16 dies, amb l'excepció del setè dia (dia 0), quan la ingesta era completament lliure. El grup control tenia el consum restringit durant tot el període sense excepcions (Fig. 13.3). A l'inici de l'estudi, els hàbits alimentaris van ser avaluats amb un QFCA. La ingesta d'aliments a base de panís durant el dia de consum lliure es va registrar mitjançant mesures casolanes, pesades i prèviament estandarditzades. Els aliments consumits van ser analitzats, mitjançant mètodes analítics degudament validats, per tal de determinar la presència i concentració de fumonisines. La primera orina del matí es va recollir dels voluntaris del grup control, els dies -7, 0, 4 i 8, mentre que el grup exposat va donar dues mostres addicionals (dia 1 i 6). Les mostres es van emmagatzemar a -20°C fins a l'anàlisi.

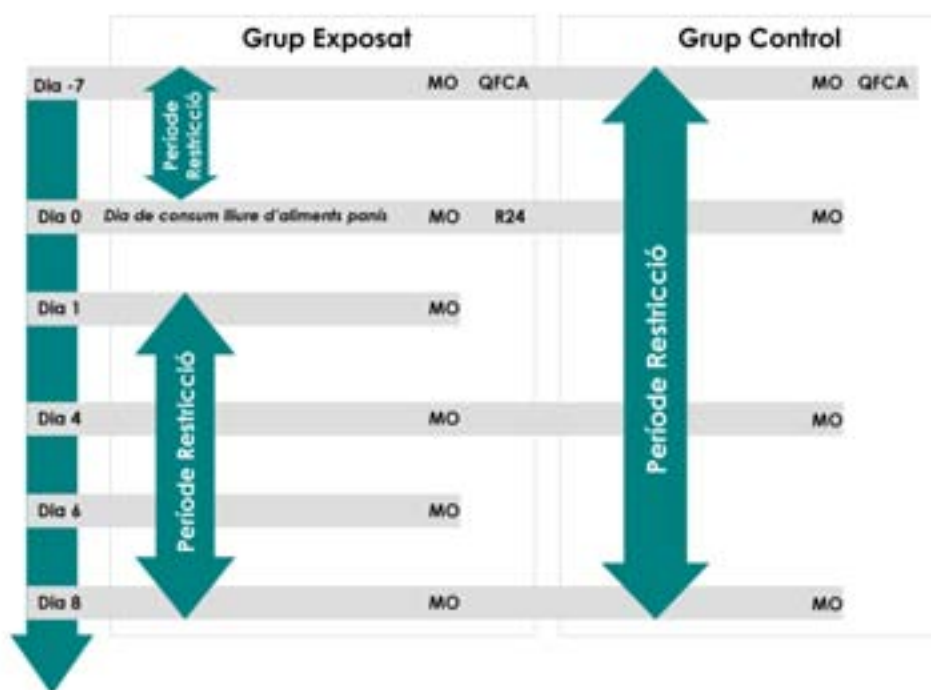


Fig 13.3 Disseny de l'estudi controlat per avaluar els esfingolípidis al llarg del temps (MO, mostra d'orina; QFCA, qüestionari de freqüència de consum d'aliments; R24, registre de 24 hores)

### 13.1.2 Anàlisi de fumonisines en els aliments

Per a l'extracció i purificació de les FBs de la cervesa es van mesclar 5 mL de mostra degassificada amb 15 mL de tampó fosfat, i posteriorment, la mescla es passava a través de columnes d'immunoafinitat FUMONIPREP® (R-Biopharm, Alemanya).. Quant a les matrius sòlides, 10 g de mostra triturada es mesclava amb 1 g de NaCl i 50 mL de solució d'extracció (50% aigua, 25% metanol i 25 % d'acetonitril), agitant durant 20 minuts. 10 mL d'extracte filtrat es diluïa amb 40 mL de tampó fosfat i es passava per la columna d'immunoafinitat.

Les FBs de l'extracte purificat es determinaven per HPLC amb detector de fluorescència, realitzant una derivatització en pre-columna amb una solució d'*o*-ftaldialdehid per augmentar la fluorescència. La longitud d'ona d'excitació i d'emissió va ser de 335 i 440 nm, respectivament. La fase mòbil estava formada per una solució de dihidrogen fosfat de sodi (0.1 M) i metanol.

El LQ del mètode de determinació de FBs en cervesa va ser de 11.7 µg kg<sup>-1</sup>, i per a la resta de matrius sòlides de 15.6 µg kg<sup>-1</sup>.

### 13.1.3 Anàlisi de Sa i So en plasma

500 µl de plasma es va desproteïnitzar amb 2 mL de metanol, i la proteïna es va fer precipitar mitjançant centrifugació a 1200 g durant 10 min a 10 °C. Una alíquota de sobrenedant es va mesclar amb clorur de potassi (0.8%) i hidròxid potàssic. La mescla va ser extreta amb acetat d'etil mitjançant rotació en agitador orbital durant 20 min, i les fases van ser separades per centrifugació a 1100 g durant 15 min, tal i com descriuen Castegnaro et al. (1998). La fase orgànica es va evaporar completament sota el flux de nitrogen a 55 °C. Les mostres es resuspenien amb 275 µl de metanol-aigua (88:12), agitats en vòrtex. L'extracte purificat s'analitzava per HPLC amb detector de fluorescència, realitzant una derivatització en pre-columna amb una solució d'*o*-ftaldialdehid per augmentar la fluorescència. La longitud d'ona d'excitació va ser de 340 nm. La fase mòbil estava formada per una solució de metanol-aigua (88:12).

#### 13.1.4 Anàlisi de Sa i So en orina

L'extracció de Sa i So de l'orina es va realitzar mitjançant el mètode de Castegnaro et al. (1996) amb algunes adaptacions. Breument, 20 mL d'orina es va centrifugar a 2000 g durant 15 min a 10°C, per tal d'aïllar les cèl·lules. El pelet de cèl·lules es resuspenia en 2 mL d'aigua destil·lada amb 50 µL d'hidròxid de potassi. Seguidament, s'afegia acetat d'etil i es mesclava vigorosament amb el vòrtex durant 1 min. La mescla es centrifugava a 2000 g durant 15 min i la capa superior es guardava mentre que en la inferior es realitzava una altra extracció. La fase orgànica amb els esfingolípid s'evaporava sota el flux de nitrogen. L'extracte purificat s'analitzava per HPLC amb detector de fluorescència, realitzant una derivatització en pre-columna amb una solució d'*o*-ftaldialdehid per augmentar la fluorescència. La longitud d'ona d'excitació va ser de 340 nm. La fase mòbil estava formada per una solució de metanol-aigua (88:12).

#### 13.1.5 Tractament estadístic

El ràtio Sa/So es va calcular individualment, dividint els nivells de Sa pels de So de cada voluntari/a, i s'expressa en forma de mediana, mitjana i desviació estàndard de cada grup.

El test Mann-Whitney es va utilitzar per comparar diferències entre dos grups, i el test Kruskal-Wallis es va utilitzar per comparar més mostres. L'anàlisi de components principals es va dur a terme amb l'objecte d'obtenir una matriu de correlacions associant el ràtio Sa/So amb els factors associats.

El tractament estadístic es va realitzar amb el software SAS Enterprise v2.0.0.417® i el SAS v9.0®.

### 13.2 Resultats

#### 13.2.1 Estudi dels nivells d'esfingolípid s en plasma

En aquest primer estudi, 136 donadors de sang van ser agrupats en consumidors d'aliments de panís (n=68) i en no consumidors (n=68). L'exposició mitjana estimada per al primer grup va ser de  $0.23 \pm 0.11 \mu\text{g kg}^{-1} \text{pc dia}^{-1}$ . Les medianes eren de 0.53 i 0.46 per als consumidors i no consumidors, respectivament. Tot i que es van trobar diferències significatives quan es comparaven els ràtios Sa/So entre els diferents grups,

no es van trobar diferències entre els nivells d'esfinganina, essent l'esfingosina el màxim responsable de la variació del ràtio en el grup d'exposats (Taula 13.1).

**Taula 13.1 Nivells d'esfinganina i esfingosina en plasma de població catalana, procedent de l'estudi transversal**

	Exposició		Sa <sup>b</sup>	So <sup>b</sup>	Ràtio Sa/So <sup>b</sup>
	N	Fumonisines <sup>a</sup> µg kg <sup>-1</sup> pc dia <sup>-1</sup>	ng mL <sup>-1</sup>	ng mL <sup>-1</sup>	
No consumidors	68	0,00	4,12 (6,5±9,2)	8,51 (14,3±16,5)	0,46 (0,45±0,12)
Consumidors	68	0,23±0,11	3,14 (4,1±3,6)	5,89 (7,8±6,8)	0,53 (0,54±0,16)

<sup>a</sup> Mitjana±desviació estàndard

<sup>b</sup> Mediana (Mitjana ± desviació estàndard)

### 13.2.2 Estudi dels nivells d'esfingolípid en orina

En aquest estudi transversal, es van seleccionar 78 voluntaris per determinar els nivells urinaris de Sa i So, agrupats en consumidors i no consumidors o consumidors esporàdics d'aliments a base de panís. La ingesta mitjana estimada a través del R3 era de 0,013 i 0,046 µg kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>, per a homes i per a dones, respectivament, mentre que les estimacions respectives de 0,089 i 0,057 µg kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>, es van fer utilitzant el FFQ.

Els nivells de Sa, So i els seus ràtios, així com l'ingesta estimada de FBs per a cada grup es mostren en la taula 13.2. La mediana dels ràtios Sa/So era de 0.40 i 0.56 per al grup de no consumidors i consumidors, respectivament. Al comparar les medianes dels ràtios entre exposats i no exposats, s'observen diferències significatives, encara que no s'observen diferències entre els nivells de Sa i So. Les mostres dels pacients amb càncer d'esòfag van mostrar valors mitjans de Sa i So de 0,376±0,471 i 0,208±0,484 ng mL<sup>-1</sup>, respectivament, mentre que la mitjana del ràtio Sa/So era 0,363±0,458, no es van observar diferències significatives amb la resta de població sana.

**Taula 13.2 Nivells d'esfinganina i esfingosina en orina de població catalana, procedent de l'estudi transversal**

	Exposició		Sa <sup>b</sup>	So <sup>b</sup>	Ràtio Sa/So <sup>b</sup>
	N	Fumonisines <sup>a</sup> µg kg <sup>-1</sup> pc dia <sup>-1</sup>	ng mL <sup>-1</sup>	ng mL <sup>-1</sup>	
Poc/No consumidors	43	0,02±0,02	0,38 (0,95±2,15)	0,83 (2,57±5,02)	0,40 (0,55±0,47)
Consumidors	35	0,14±0,83	0,26 (1,29±2,15)	0,57 (2,59±0,85)	0,56 (0,62±0,47)

<sup>a</sup> Mitjana±desviació estàndard

<sup>b</sup> Mediana (Mitjana±desviació estàndard)

### 13.2.3 Estudi de seguiment dels esfingolípidis al llarg del temps

L'exposició a les FBs es va realitzar combinant la informació de consum del registre del dia 0, amb les dades de contaminació procedents de les mostres recollides aquell mateix dia. El nivell de concentració mitjana en aperitius de panís, "tortillas" mexicanes, pastís de panís i panís dolç era de 134, 99 i 100 µg kg<sup>-1</sup> i no detectat, respectivament. Aquests valors eren lluny dels límits establerts per la Comissió Europea. Els voluntaris es van classificar en funció del seu consum en grup control (no consumidors), poc exposats (<0,6 µg kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>, mitjana de 0,43±0,12 µg kg<sup>-1</sup>) i exposats (>0,6 µg kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>, mitjana de 0,84±0,26 µg kg<sup>-1</sup>).

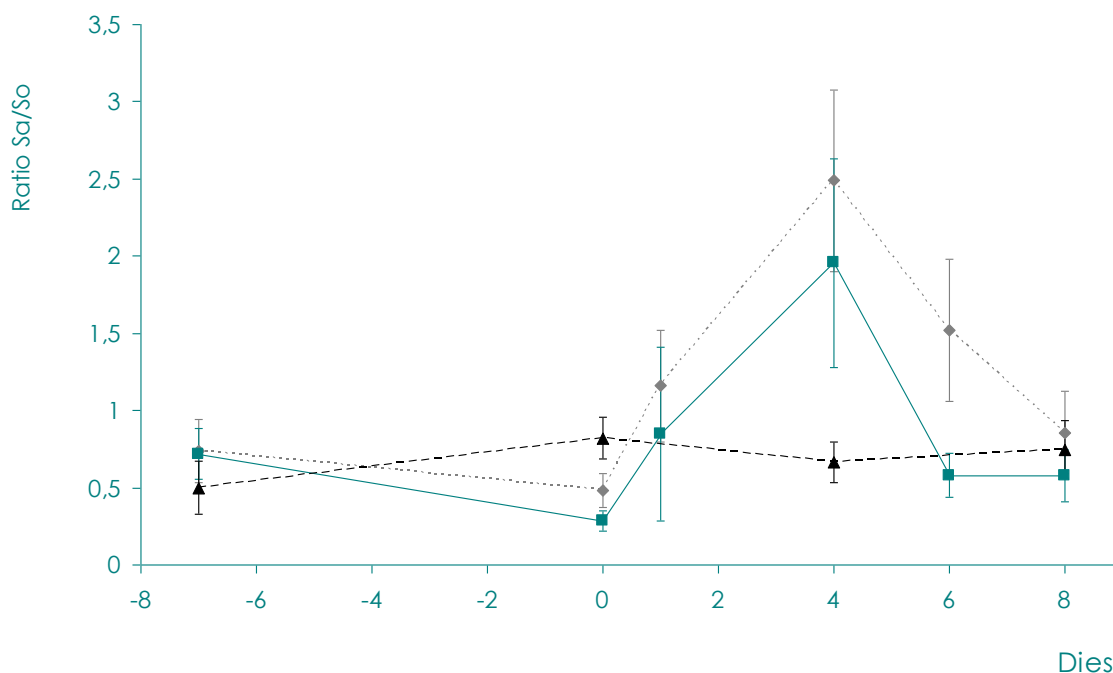
Els valors mitjans de concentració de Sa i So, i els seus ràtios es mostren en la taula 13.3. La mediana de concentració de Sa al començament de l'estudi era de 0,27, 0,28 i 0,14ng mL<sup>-1</sup>, respectivament, mentre que els nivells de So eren de 1,23, 0,68 i 0,33 ng mL<sup>-1</sup>, respectivament. La mediana dels ràtios Sa/So era bastant similar entre grups, sense diferències estadísticament significatives. Durant la primera setmana de restricció d'aliments de panís, no es van observar diferències entre els ràtios Sa/So dels diferents grups, tanmateix, després del dia de consum lliure, es va observar un increment en els grups exposats mentre no hi havia variació en el grup control. El màxim increment del ràtio Sa/So es va observar al quart dia després del dia de consum lliure, amb mitjanes de 1,96±2,24 i 2,54±2,00 ng mL<sup>-1</sup> per al grup de poc exposats i exposats, respectivament, mentre la mitjana del grup control romanien en 0,67±0,49 ng mL<sup>-1</sup> (Fig. 13.2). Després de quatre dies es va observar una estabilització dels ràtios en els nivells inicials en tots els grups.

**Taula 13.3 Nivells d'esfinganina i esfingosina (mediana) en orina de població catalana al llarg del temps, procedent de l'estudi controlat (unitats absolutes en ng mL<sup>-1</sup>)**

	Dia -7	Dia 0	Dia 1	Dia 4	Dia 6	Dia 8
<b>Ràtio Sa/So</b>						
Control	0,25	0,62		0,52		0,45
Poc Exposats	0,70	0,26	0,27	1,10	0,43	0,47
Exposats	0,51	0,39	0,80	2,43	0,98	0,45
<b>Esfingosina</b>						
Control	1,23	0,53		0,30		0,21
Poc Exposats	0,68	0,45	0,36	0,19	0,28	0,32
Exposats	0,33	0,20	0,15	0,08	0,12	0,31
<b>Esfinganina</b>						
Control	0,27	0,14		0,12		0,16
Poc Exposats	0,28	0,13	0,12	0,24	0,19	0,15
Exposats	0,14	0,10	0,19	0,19	0,12	0,16

Nota: grup control (no consumidors), poc exposats (<0,6 µg/kg pc/dia) i exposats (>0,6 µg/kg pc/dia)





**Fig 13.4 Ràtios Sa/So al llarg del temps (mediana): grup control ( ▲ ), poc exposats ( ■ ) i exposats ( ◆ )**

L'anàlisi de components principals va mostrar que la correlació més elevada amb la l'exposició de FBs es donava amb el ràtio Sa/So del dia 4 ( $r=0,332$ ;  $p<0,01$ ), i una baixa correlació amb la resta de dies i de factors (Figura 13.2).

### 13.3 Conclusions

Aquest és el primer estudi fet a Espanya per avaluar la relació entre l'exposició a les FBs i els nivells plasmàtics i urinaris d'esfingolípid (esfingosina i esfinganina), i el seu ràtio Sa/So, proposat com a biomarcador.

Els resultats van mostrar nivells més elevats en plasma que en orina, i diferències significatives quan es comparaven els homes amb les dones.

Quan es van comparar els ràtios de plasma i orina, procedents de l'estudi transversal, es van observar diferències significatives, però no es va poder elucidar el mecanisme d'acció. A través de l'estudi controlat, per avaluar l'evolució temporal dels nivells d'esfingolípid, es va determinar que el quart dia després de la ingesta, s'observa la màxima alteració del ràtio Sa/So en humans.

## 13.4 Referències

Castegnaro M, Garren L, Galendo D, Gelderblom WCA, Chelule P, Dutton MF, Wild CP. 1998. Analytical method for the determination of sphinganine and sphingosine in serum as a potential biomarker for fumonisin exposure. *J Chromatogr B*. 720:15-24.

Castegnaro M, Garren L, Gaucher I, Wild CP. 1996. Development of a new method for the analysis of sphinganine and sphingosine in urine and tissues. *J Nat Toxins* 4:284-290.

IARC (International Agency for Research on Càncer). 2006. International Agency for Research on Càncer (IARC) Monographs (2006). 2 April 2009. Vols. 1-95.

Sydenham EW, Shephard GS, Thiel PG, Marasas WFO, Stockenström S. 1991. Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. *J Agric Food Chem*. 39:2014-2018.

Wang E, Riley RT, Meredith FI, Merrill JAH. 1999. Fumonisin B1 consumption by rats causes reversible, dose-dependent increases in urinary sphinganine and sphingosine. *J Nutr*. 129:214-220.

Yoshizawa T, Yamashita A, Luo Y. 1994. Fumonisin occurrence in corn from high- and low-risk areas for human esophageal càncer in China. *Appl Environ Microbiol*. 60:1626-1629.

# 14

## Presència i co-presència d'aflatoxines, deoxinivalenol, fumonisines i zearalenona en aliments especials: aliments sense gluten i d'importació

Les aflatoxines (AFs) són unes de les micotoxines més importants produïdes pel gènere *Aspergillus* i poden ser sintetitzades en un ampli nombre d'aliments no processats, tan importants com els cereals, els fruits secs, les figues seques i les espècies (Malone et al., 2000). L'aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) és la micotoxina més carcinogènica que es coneix i s'ha documentat àmpliament l'evidència que és el principal factor de risc per al carcinoma hepatocel·lular, i per això ha estat classificada en el grup 1 per l'Agència Internacional per la Recerca del Càncer (IARC, 2002).

Les toxines més importants del gènere *Fusarium* són els tricotecens, la zearalenona (ZEA) i les fumonisines (FBs), que es poden trobar aïllades o simultàniament, fins i tot amb altres micotoxines com les AFs, en cereals i per tant en aliments processats derivats (Jestoi 2008). Els tricotecens són una família de sesquiterpenoids cíclics, els quals es divideixen en 4 grups (tipus A-D) d'acord el grup funcional. Els tricotecens del tipus B són, tot sovint, representats pel deoxinivalenol (DON), essent el més freqüent a Catalunya i d'altres països europeus (Cano Sancho et al., 2011). Les fumonisines B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) i B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>) són micotoxines produïdes per *F. verticilloides* i *F. proliferatum* que poden contaminar sobretot el panís, per tant, les FBs es troben principalment en panís i aliments processats derivats (Nelson et al., 1992). La ZEA és una micotoxina estrogènica produïda per *F. graminearum* i altres espècies de *Fusarium*, les quals poden infectar una àmplia varietat de cereals, incloent el panís i el blat en regions suaus i temperades del planeta (Jelinek et al. 1989; Patel et al. 1996).

Els nivells de micotoxines tant en aliments no processats com en aliments processats per consum humà van ser fixats pel Reglament 1881/2006 del 19 de desembre de 2006 i pel Reglament 1126/2007 del 28 de setembre de 2007 (Comissió Europea, 2006, 2007) i posteriorment pel Reglament 105/2010 del 5 de febrer de 2010 i el Reglament 165/2010 del 26 de febrer del mateix any (Comissió Europea, 2010a,b). Derivat d'estudis de toxicitat, l'Agència Europea de Seguretat Alimentària (EFSA) ha determinat uns nivells d'exposició, toxicològicament segurs, per a les FBs de 2000 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup> (SCF, 2003), per al DON de 1000 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup> (SCF, 2002) i per a la ZEA de 200 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup> (EFSA, 2004). Quant a l'avaluació del risc de les AFs, els comitès científics internacionals no han establert un límit de seguretat degut al seu potencial carcinogènic i genotòxic.

Generalment, en els estudis d'avaluació de l'exposició a contaminants químics d'origen alimentari no es tenen en consideració alguns grups de població, que tot i poder ser minoritaris, mostren marcades diferències en el patró de consum alimentari. Entre aquests grups de població podem destacar, per una banda, els celíacs que han de substituir els aliments a base de blat per aquells lliures de gluten, i per una altra, els grups de població nouvinguda que manté certa adherència al patró alimentari del país d'origen. Considerant que durant l'any 2009 la població nouvinguda representava entorn al 16 % de la població catalana total (Migracat, 2010), es justifica clarament l'avaluació de forma específica de l'exposició d'aquest col·lectiu a les micotoxines.

Els objectius d'aquest treball són, avaluar la presència i la co-presència d'AFs, DON, FBs i ZEA en mostres d'aliments d'importació destinats específicament a la població nouvinguda i aliments sense gluten, i addicionalment, avaluar l'exposició d'una mostra de població nouvinguda i celíaca a aquests contaminants alimentaris.

## **14.1 Metodologia**

### **14.1.1 Mostres**

Les mostres d'aliments d'importació es van agafar en botigues de barri especialitzades en importació d'aliments del Magreb, Països de l'Est o Amèrica Llatina, o en supermercats o hipermercats amb secció d'aliments d'importació. Els aliments eren principalment, cuscús, farina de panís, farina de blat, crema de panís i sèmola de panís.

Els aliments sense gluten es van agafar en botigues especialitzades en dietètica i nutrició, o supermercats i hipermercats amb secció de productes dietètics. Els productes mostrejats eren principalment, pa, pasta i rebosteria sense gluten.

En total es van agafar 35 mostres d'aliments d'importació i 18 mostres d'aliments sense gluten.

## **14.1.2 Mètodes analítics**

### **14.1.2.1 Aflatoxines**

El procés per determinar les AFs, va consistir en una extracció, mesclant i agitant 10 g de mostra triturada amb 15 mL de solució d'acetonitril i aigua (60:40), durant 20 minuts. La mescla agitada es va filtrar i purificar mitjançant columnes d'immunoafinitat AFLAPREP® (R-Biopharm, Alemanya).

El contingut en AFs de l'extracte final es va determinar per HPLC amb detector de fluorescència, fent ús d'un derivatitzador fotoquímic post-columna, tipus UVE™ Derivatizer LC Tech, per a intensificar el senyal. La longitud d'ona d'excitació era de 365 nm, i la d'emissió a 0-13 min i 13-25 min era de 455 i 425 nm, respectivament. La fase mòbil va consistir en una solució d'aigua, metanol i acetonitril (70:17:17).

### **14.1.2.2 Deoxinivalenol**

Cinc grams de mostra triturada es va mesclar amb 40 mL d'aigua destil·lada i es va agitar durant 10 min, finalment es va filtrar amb un filtre de microfibra. 4 mL de mostra filtrada es va passar a través de la columna d'immunoafinitat DONPREP® (R-Biopharm, Alemanya) i aquesta es va rentar amb 10 mL d'aigua destil·lada. El DON es va eluir amb 3 mL d'etanol grau HPLC. Les mostres purificades es van evaporar sota el flux de nitrogen. Cada mostra evaporada es va resuspendre amb fase mòbil (aigua mili-Q, acetonitril i metanol en proporcions 920:40:40). El DON es va determinar per HPLC amb detector UV a la longitud d'ona de 218 nm.

### 14.1.2.3 Fumonisines

Deu grams de mostra triturada es va mesclar amb 1 g de NaCl i 50 mL de solució d'extracció (50% aigua, 25% metanol i 25 % d'acetonitril), agitant durant 20 minuts. 10 mL d'extracte filtrat es va diluir amb 40 mL de tampó fosfat i es va passar per la columna d'immunoafinitat FUMONIPREP® (R-Biopharm, Alemanya).

Les FBs de l'extracte purificat es van determinar per HPLC amb detector de fluorescència, realitzant una derivatització en pre-columna amb una solució d'o-ftaldialdehid per augmentar la fluorescència. La longitud d'ona d'excitació i d'emissió era de 335 i 440 nm, respectivament. La fase mòbil estava formada per una solució de dihidrogen fosfat de sodi (0.1 M) i metanol.

### 14.1.2.4 Zearalenona

L'extracció i purificació de la ZEA es va realitzar mesclant la mostra triturada amb solució d'extracció d'acetonitril i aigua (75:25), i es va agitar durant 10 minuts. Finalment es va filtrar, i es va mesclar amb solució fosfat per passar per la columna d'immunoafinitat EASI-EXTRACT® ZEARALENONE (R-Biopharm, Alemanya). L'elució es va realitzar invertint el flux tres vegades amb 1,5 mL d'acetonitril i passant lliurement 1,5 mL d'aigua milli-Q.

La determinació i quantificació de la ZEA en l'extracte es va fer per HPLC amb detector de fluorescència. La longitud d'ona d'excitació i d'emissió era de 274 i 455 nm, respectivament. La fase mòbil va consistir en una solució d'acetonitril i aigua milli-Q (60:40).

## 14.1.3 Avaluació de l'exposició

Per avaluar l'exposició alimentària a les micotoxines, es va realitzar un estudi nutricional mitjançant qüestionaris de consum d'aliments (QFCA) específic per a la població nouvinguda i celíaca. El QFCA inclou aquells aliments que poden estar potencialment contaminats amb micotoxines i disponibles a Catalunya. Entrevistadors entrenats van entrevistar 70 celíacs adults i 56 adults nouvinguts, un entrevistador d'origen àrab va realitzar les entrevistes entre la població procedent del Magreb per tal d'augmentar la fiabilitat de les respostes.

Quant al tractament de les mostres no detectades, es va seguir el criteri establert en l'informe elaborat en el Workshop in the frame of GEMS/Food-EURO on Reliable Evaluation of Low-Level Contamination of Food (GEMS/Food-WHO, 1995), on s'aconsella que en els casos on es troba un percentatge de no quantificats superior al 60%, es realitzin dues estimacions, utilitzant 0 i el LD per tots els valors no detectats, per tal d'obtenir una estimació senzilla de la mitjana.

Assumint independència entre el consum ( $C_{\pi_j}$ ) i la contaminació ( $T_j$ ), així com entre els seus productes, es va estimar l'exposició mitjana de la població  $\pi$  amb la mostra de població  $\pi_0$ , tal i com es representa:

$$\hat{E}_{\pi_0} = \sum_{j=1}^p \bar{C}_{\pi_0,j} \bar{T}_j$$

On  $\bar{C}_{\pi_0,j}$  és la mitjana del consum normalitzat de l'aliment  $j$  en un grup població  $\pi_0$ , i  $\bar{T}_j$  és la mitjana dels valors de contaminació disponibles d'aquest aliment. Considerant aquestes assumpcions, es va calcular l'estimació de la mitjana i de la variància de la mostra, mitjançant el que anomenem en aquest treball com a "mètode directe". Aquesta aproximació a l'exposició s'hauria de considerar una aproximació teòrica, ja que degut a les esmentades assumpcions, esdevé una aproximació molt simplificada a l'estimació poblacional real. L'exposició global es va avaluar considerant fonts d'exposició addicionals i de consum general entre la resta de població com són els flocs de panís, el pa, el pa de motlle, els aperitius de panís, el panís dolç, els festucs i els cacauets.

## 14.2 Resultats

### 14.2.1 Presència i co-presència de micotoxines

Les mostres d'aliments sense gluten estaven compostades principalment per farina de panís o d'arròs per tal d'evitar incorporar el gluten en el producte. Les AFs i la ZEA no es van detectar en cap mostra, mentre que el DON es va trobar en dues mostres de pasta i pa amb nivells respectius de concentració de 162,7 i 270,0  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Les FBs es

van detectar en 6 mostres d'un total de 18, essent la FB<sub>1</sub> la més present en un interval de concentració entre 5,70 i 18,90 µg kg<sup>-1</sup>.

La FB<sub>1</sub> i la FB<sub>2</sub> eren les micotoxines més importants que es varen trobar en la categoria d'aliments d'importació, amb un percentatge de contaminació entre el 51 i el 40 %, respectivament (veure Taula 14.1), principalment detectades en aliments a base de panís. La concentració de la FB<sub>1</sub> estava entre 16,1 i 547,0 µg kg<sup>-1</sup>, mentre que l'interval de contaminació de la FB<sub>2</sub>, anava de 25,7 a 135,2 µg kg<sup>-1</sup>. El DON es va detectar en 15 de les 35 mostres, però en aquest cas, principalment en aliments a base de blat. L'interval de concentracions es trobava entre 124,7 i 657,1 µg kg<sup>-1</sup>. La presència de ZEA i d'AFs va ser molt baixa, detectant-ne només en 3 i en 4 mostres, respectivament. La presència simultània de la FB<sub>1</sub> i la FB<sub>2</sub> es va observar en la majoria de les mostres. També es van observar d'altres combinacions com FBs-DON (4 mostres), FBs-AFs (2 mostres), FS-DON-ZEA (1 mostra) i FBs-AFs-DON (1 mostra).

**Taula 14.1 Presència i co-presència de micotoxines en aliments d'importació (unitats µg kg<sup>-1</sup>)**

	AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>	DON	FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	ZEA
<i>Aliments a base de panís</i>								
Farina panís	-	-	-	-	188,85	18,00	-	-
Farina panís	-	-	-	-	-	21,68	-	-
Farina panís	-	-	-	-	150,67	26,29	25,66	3,83
Farina panís	6,46	-	-	-	168,53	188,63	53,04	-
Farina panís	-	-	-	-	-	59,79	35,04	-
Farina panís	-	-	-	-	-	159,63	62,26	-
Farina panís blanca	-	2,29	-	1,57	-	129,86	41,92	-
Farina panís especiada	-	-	-	-	-	254,71	30,79	-
Farina panís flocada	-	-	-	-	-	104,65	54,66	-
Farina panís groga	-	-	-	-	-	297,25	48,46	-



Farina panís blanca	-	-	-	-	-	55,91	31,63	-
Sèmola panís	-	-	-	-	161,85	-	-	-
Sèmola blanca panís	-	-	-	-	-	510,79	108,98	-
Sèmola fina panís	-	-	-	-	-	154,91	52,18	-
Sèmola grossa panís	-	-	-	-	509,74	98,33	34,55	-
Crema panís	14,25	-	-	-	-	112,95	53,32	-
Crema panís	-	-	-	-	-	16,18	-	-
<i>Aliments a base de blat</i>								
Cuscús	-	-	-	-	429,99	-	-	-
Cuscús	-	-	-	-	-	16,10	-	-
Cuscús	-	-	-	-	432,38	-	-	-
Cuscús	-	-	-	-	657,07	-	-	2,40
Cuscús	-	-	-	-	-	-	-	-
Cuscús	-	-	-	-	152,55	-	-	-
Cuscús	-	-	-	-	523,45	-	-	-
Cuscús	-	-	-	-	214,06	-	-	-
Cuscús	-	-	-	-	-	-	-	-
Cuscús	-	-	-	-	-	-	-	-
Cuscús amb fruits secs	-	-	-	-	-	546,98	135,19	-
Farina blat	-	-	-	-	442,66	-	-	-
Sèmola blat	-	-	-	-	-	-	-	-
Sèmola blat	-	-	-	-	458,69	-	-	-
Sèmola blat	-	-	-	-	124,74	-	-	-
Sèmola blat dur	-	-	-	-	581,41	-	-	-
Pasta amb vegetals	-	-	-	-	-	-	-	12,37
<i>Altres</i>								
Sèmola ordi	-	-	-	-	-	-	-	-

#### 14.2.2 Avaluació de l'exposició a les micotoxines

Donat el baix nombre de mostres contaminades de la categoria de productes sense gluten no va fer possible l'avaluació de l'exposició mitjançant un mètode simplificat, especialment per a les AFs on es va observar un ampli nombre de mostres no detectades.

En el cas dels nouvinguts, tot i trobar un percentatge més elevat de mostres contaminades, es va estimar un nivell de contaminació bastant ampli en funció de la substitució realitzada, més marcada en el cas de les AFs i la ZEA. Els patrons alimentaris dels individus entrevistats estaven fortament relacionats amb el seu país d'origen. El cuscús era principalment consumit pels individus procedents del Magreb, i la farina de panís pel col·lectiu procedent de l'Amèrica Llatina. En la taula 14.3 es mostra

l'exposició a cada micotoxina procedent del cuscús i de la farina de panís, i de forma global, considerant aquells altres aliments no específics que poden contribuir a l'exposició. En tots els casos els valors es trobaven allunyats dels valors de seguretat de 2000 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup> de les FBs (SCF 2003), de 200 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup> de la ZEA (EFSA 2004), de 1000 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup> del DON (SCF 2002) o 1 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup> per a les AFs.

**Taula 14.2 Exposició dietètica estimada de la població nouvinguda a les AFs, DON, FBs i ZEA a través d'aliments especials d'importació (mitjana ± desviació estàndard, unitats en ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>)**

	AFB <sub>s</sub>	FB <sub>s</sub>	DON	ZEA
<b>Exposició a partir del cuscús</b>				
ND=0	0.00±0.00	2.84±1.90	9.79±2.28	0.01±0.46
ND=LOD	0.00±0.64	3.24±2.16	9.99±2.31	0.04±1.66
<b>Exposició a partir de la farina de panís</b>				
ND=0	0.31±81.29	53.89±36.13	16.06±3.74	0.14±7.14
ND=LOD	0.35±49.62	54.06±36.11	18.60±4.31	0.31±14.57
<b>Avaluació de l'exposició global</b>				
ND=0	0.38±0.55	149.15±162.57	429.12±386.76	1.95±2.03
ND=LOD	0.70±0.78	149.72±162.43	431.86±386.40	2.15±2.11
<b>% TDI</b>				
ND=0	38±55	7±8	43±39	1±1
ND=LOD	70±78	7±8	43±39	1±1

### 14.3 Conclusions

En resum, les FBs es varen trobar de forma generalitzada en els aliments a base de panís procedents de botigues especialitzades en aliments d'importació. El DON es va trobar principalment en cuscús i alguns aliments d'importació. Els aliments sense gluten presentaven un baix percentatge de mostres contaminades amb FBs (6 de 18) i de DON (2 de 18), mentre que les AFs i la ZEA només es van detectar en 6 aliments d'importació. Considerant aquest resultat, aquests productes especials no haurien de representar una preocupació per a la salut dels col·lectius que els consumeixen.

### 14.4 Referències

Cano-Sancho G, Valle-Algarra FM, Jiménez M, Burdaspal P, Legarda TM, Ramos AJ, Sanchis V, Marin S. 2011 Presence of trichothecenes and co-occurrence in cereal-based food from Catalonia (Spain). *Food Control* 22:490-495.

Comissió Europea (CE). 2006. Reglament (CE) N° 1881/2006 of 19/12/2006. *Official Journal of the European Union*, L364, 5-24.

Comissió Europea (CE). 2007. Reglament (CE) N° 1126/2007 of 28/9/2007. *Official Journal of the European Union*, L255, 14-17.

Comissió Europea (CE). 2010a. Reglament (CE) N° 105/2010 of 05/2/2010. *Official Journal of the European Union*, L35, 7-8.

Comissió Europea (CE). 2010b. Reglament (CE) N° 165/2010 of 26/2/2010. *Official Journal of the European Union*, L50, 8-12.

European Food Safety Authority (EFSA). 2004. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to zearalenone as undesirable substance in animal feed. *EFSA J.* 1-41.

Global Environment Monitoring System/Food- World Health Organization (GEMs/Food-WHO). 1995. Reliable evaluation of low-level contamination of food—workshop in the frame of GEMS/Food-EURO [Internet]. Kulmbach, Germany: GEMs/Food-WHO.

IARC (International Agency for Research on Cancer). 2002. Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans (Lyon: IARC), 82:171.

Jelinek CF, Pohland AE, Wood GE. 1989. Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds-an update. *J AOAC Int.* 72:223-230.

Jestoi M. 2008. Emerging Fusarium-Mycotoxins Fusaproliferin, Beauvericin, Enniatins, and Moniliformin-A Review. *Crit Rev Food Sci.* 48:21-49.

Malone BR, Humphrey CW, Romer TR, Richard JL. 2000. Determination of Aflatoxins in Grains and Raw Peanuts by a Rapid Procedure with Fluorometric Analysis. *J AOAC Int.* 83:95-98.

Migracat (Observatori de la Immigració a Catalunya). 2010. [Internet] Disponible a: <http://www.gencat.cat/dasc/publica/butlletilMMI/xifres6/index.htm>. Accedit el 18.01.11.

Nelson PE, Plattner RD, Shackelford DD, Desjardins AE. 1992. Fumonisin B<sub>1</sub> production by *Fusarium* species other than *F. moniliforme* in section *Liseola* and by some related species. *Appl Environ Microb.* 58:984-989.

Patel S, Hazel CM, Winterton AGM, Mortby E. 1996. Survey of ethnic foods for mycotoxins. *Food Addit Contam.* 13:833-841.

SCF (Scientific Committee on Food). 2002. Opinion on *Fusarium* toxins—Part 6: Group evaluation of T-2 toxin, HT-2 toxin, nivalenol and deoxynivalenol. Brussels, Belgium, February.

SCF (Scientific Committee on Food). 2003. Updated opinion of the Scientific Committee on Food on Fumonisin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>3</sub>. Brussels, Belgium, April.

# 15

## Resum i conclusions

### 15.1 Presència de micotoxines a Catalunya

**Aflatoxines totals (B<sub>1</sub>+B<sub>2</sub>+G<sub>1</sub>+G<sub>2</sub>):** els resultats van mostrar una baixa presència d'aflatoxines en tots els productes, excepte en pebre vermell, festucs i cacauets, els quals van mostrar els percentatges més elevats de mostres positives (57 %, 20 % i 11,1 %, respectivament). En la resta de categories es varen detectar en un baix percentatge de mostres, i no es va trobar en cap mostra d'aliments sense gluten ni d'aliments infantils.

**Aflatoxina M<sub>1</sub>:** l'aflatoxina M<sub>1</sub> es va detectar en el 94,4 % de les mostres analítiques de llet sencera UHT per sobre del nivell de detecció de 5 ng kg<sup>-1</sup>, mentre que no es va detectar en les mostres de formatge i només en 2 de les 72 mostres de iogurt (LD = 25 ng kg<sup>-1</sup>). Tot i els elevats valors d'incidència en llet, la concentració mitjana de les mostres positives va ser de 9,69±2,07 ng kg<sup>-1</sup>, lluny dels límits de la CE (50 ng kg<sup>-1</sup>).

**Fumonisines (B<sub>1</sub>+B<sub>2</sub>):** en el present estudi, es van trobar FBs en totes les matrius analitzades a base de cereal amb l'excepció del panís dolç. El percentatge més elevat es va trobar en la cervesa (90 %) i en els aperitius de panís (61 %). En quan als aliments especials, es van trobar fumonisines en més de la meitat de mostres d'aliments ètnics i en un baix percentatge d'aliments infantils i sense gluten. Els nivells més alts de contaminació es van trobar en farina de panís (682,2 µg kg<sup>-1</sup>) i aperitius de panís (475,5 µg kg<sup>-1</sup>).

**Ocratoxina A (OTA):** . el percentatge més elevat de mostres positives es va trobar en la cervesa (89 %), mentre que a la resta d'aliments va ser inferior al 50 %. Les mitjanes de les mostres positives dels aliments infantils, cereals d'esmorzar i pa de motlle, estaven per sota del límit màxim establert per la CE. Tot i que no s'han fixat límits màxims per a

la cervesa i els fruits secs, la concentració mitjana dels aliments d'aquestes categories eren inferiors als nivells trobats en la resta d'aliments.

**Patulina:** la patulina es va quantificar principalment en suc de poma (42,3 %) i en aliments infantils a base de poma (33,9 %), mentre que rarament es va trobar en els aliments sòlids a base de poma (5,2 %). Tot i això, el valor màxim ( $17,6 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) i la mitjana de les mostres positives més elevada ( $13,5 \pm 4,9 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) correspon a aquesta darrera categoria.

**Tricotecens grup A. Toxina T-2 i HT-2:** la toxina HT-2 va ser la toxina que es va trobar amb més freqüència en els aliments a base de cereals, especialment en els flocs d'esmorzar, la pasta, els aperitius de panís i en menor percentatge en el pa de motlle. La toxina T-2 es va trobar en un baix percentatge de mostres de les categories esmentades anteriorment (<25 %). Les toxines T-2 i HT-2 no es van detectar en cap mostra de la categoria del pa ni de la cervesa. La mitjana de concentració de toxina HT-2 més elevada correspon a la categoria de panís dolç ( $144,8 \pm 63,2 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), mentre que la mitjana més elevada de toxina T-2 es va trobar en els aperitius de panís ( $82,8 \pm 170,2 \mu\text{g kg}^{-1}$ ).

**Tricotecens grup B. Deoxinivalenol:** la incidència més baixa correspon a la cervesa (1.4%), mentre que es va quantificar en un gran nombre de mostres de cereals d'esmorzar, aperitius de panís, pasta i, sobretot, en pa (73,4-100%). La concentració mitjana de les mostres positives oscil·la entre els  $12 \mu\text{g kg}^{-1}$  de la cervesa i els  $247 \pm 158 \mu\text{g kg}^{-1}$  del pa. Els nivells màxims es varen trobar en pasta, pa i aliments ètnics.

**Zearelenona (ZEA):** el percentatge més elevat de mostres positives es va trobar en el pa de motlle (43.7%), mentre que la ZEA no es va quantificar en les mostres de flocs de panís. La concentració mitjana de les mostres positives va oscil·lar en el rang de  $3,1 \pm 1,4$  a  $5,9 \pm 6,8 \mu\text{g kg}^{-1}$ , i en el cas dels aliments infantils, la mitjana va ser de  $4,1 \pm 0,6 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Els valors màxims de contaminació es varen trobar en pa de motlle ( $20,9 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) i aperitius de panís ( $22,8 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), valors allunyats del límit de la CE de  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

## 15.2 Avaluació de l'exposició

**Aflatoxines Totals (B<sub>1</sub>+B<sub>2</sub>+G<sub>1</sub>+G<sub>2</sub>):** els nadons, els nens/es i adolescents presentaven els valors més elevats d'exposició, seguits per la població nouvinguda. Considerant que les mostres no detectades tinguessin un valor igual a zero, els marges d'exposició (MEs), per als adults i nens/es, serien superiors a 10.000, valor per sobre del qual, l'EFSA va determinar que l'AFB<sub>1</sub> no contribueix al mecanisme de carcinogènesi. La resta d'estimacions, tot i ser altament conservacionistes, estan en la línia de les estimacions fetes per l'EFSA per al "GEMS/Food cluster F" i per al "cluster B". En el present treball es va estimar el risc de cada grup de població, confirmant la baixa contribució de les AFs en la prevalença de càncer de fetge en aquesta regió.

**Aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>):** el grup de població més exposat a l'AFM<sub>1</sub>, s'espera que siguin els nens/es. La ingesta estimada d'AFM<sub>1</sub> es troba en tots els casos lluny del valor de IDT de 1 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>. Fins i tot el pitjor dels casos (percentil 95, grup dels nens), es mostra lluny del màxim nivell tolerable.

**Fumonisines (B<sub>1</sub>+B<sub>2</sub>):** els grups de població més exposats continuen essent els nadons i els nouvinguts. Com es pot observar en l'estimació dels percentils, el 50 % de la població pot estar exposada a valors molt baixos de la micotoxina, entre el rang de 13 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup> (celíacs) a 152 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup> (nadons). Si comparem els valors estimats per als diferents grups de població amb el nivell d'ingesta tolerable de 2000 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>, podem observar que totes les estimacions es troben molt per sota d'aquest nivell de seguretat. En grups més exposats com el percentil 95 dels nadons i dels nouvinguts, el nivell d'exposició representa respectivament, el 25 i el 28 % del nivell d'ingesta tolerable.

**Ocratoxina A (OTA):** el grup de població més exposat a l'OTA van ser els nadons. Tot i tenir en compte que l'escenari representat es bastant improbable (substituint totes les no detectades pel valor del LD), les estimacions més altes (percentil 95, grup dels nadons), es trobarien allunyades de la IDT, representant un 40 % d'aquest nivell. En la resta dels casos, aquest percentatge es inferior al 10 % (percentil 95) i al 5 % (mitjana).

**Patulina (PAT):** en el cas de la patulina, la ingesta estimada de patulina es troba, en tots els casos, lluny del valor de l'IDT de 500 ng kg<sup>-1</sup> pc dia<sup>-1</sup>, inclòs el pitjor dels casos (percentil 95, grup dels nadons). El grup de població més exposat eren els nadons, seguits dels nens/es.

**Tricotecens grup A. Toxina T2 i HT2:** el baix nombre de mostres positives va obligar a aplicar una metodologia específica per tractar les mostres no detectades. Tot i que no hi ha cap consens en la metodologia a considerar en els estudis d'estimació de l'exposició, en aquest cas, considerem de referència l'aproximació MLE, per ser la més conservadora en les estimacions extremes. En tots els casos aquesta estimació es troba per sota del nivell de seguretat de  $0,1 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ pc dia}^{-1}$ . Tanmateix, s'ha de tenir en especial consideració el grup de risc (nens/es), ja que pot arribar a aquest llindar en els percentils alts de l'estimació.

**Tricotecens grup B. Deoxinivalenol:** l'estimació de l'exposició mitjana mostra que els grups més exposats al DON són els nouvinguts i els nadons. En tots els casos els valors mitjans es troben per sota del nivell de seguretat de  $1 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ pc dia}^{-1}$ , tanmateix, en el cas dels principals grup de risc l'estimació mitjana representa el 96 i el 90 %, de la ingesta diària tolerable. Els percentils elevats poden excedir el nivell de seguretat, especialment en els nouvinguts.

**Zearalenona:** els nadons són el grup més exposat a la ZEA, seguits pels nens i els nouvinguts. Al comparar la ingesta estimada de ZEA per a cada grup de població amb la màxima ingesta tolerable de  $250 \text{ ng kg}^{-1} \text{ pc dia}^{-1}$ , podem observar que totes les estimacions són molt allunyades del nivell de risc, inclosos el percentil 95 dels principals grups de risc, nadons i nouvinguts.

### 15.3 Conclusions

- La presència de micotoxines en els aliments procedents del mercat català en general és baixa. Les micotoxines que es troben amb major freqüència són els tricotecens tipus B (deoxinivalenol), les fumonisines i l'ocratoxina A.
- Els nivells de concentració als quals s'han quantificat les micotoxines es trobaven per sota del nivell màxim establert per la Comissió Europea.
- Els grups de població més exposats a les micotoxines són els nadons, nens/es i el col·lectiu de població nouvinguda.
- En tots els casos, els nivells d'exposició d'aquestes micotoxines es troben per sota dels nivells de seguretat. Tanmateix, l'exposició al deoxinivalenol i la toxina T2 i HT2 pot excedir aquest llindar en els percentils alts dels grups de població més exposada.



# Abreviacions

## Micotoxines i altres compostos

<b>AFB<sub>1</sub></b>	Aflatoxina B <sub>1</sub>
<b>AFB<sub>2</sub></b>	Aflatoxina B <sub>2</sub>
<b>AFG<sub>1</sub></b>	Aflatoxina G <sub>1</sub>
<b>AFG<sub>2</sub></b>	Aflatoxina G <sub>2</sub>
<b>AFM<sub>1</sub></b>	Aflatoxina M <sub>1</sub>
<b>AFs</b>	Aflatoxines totals (B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> +G <sub>1</sub> +G <sub>2</sub> )
<b>DON</b>	Deoxinivalenol
<b>FB<sub>1</sub></b>	Fumonisina B1
<b>FB<sub>2</sub></b>	Fumonisina B2
<b>FBs</b>	Fumonisines totals (B1+B2)
<b>HT2</b>	Toxina HT-2
<b>NIV</b>	Nivalenol
<b>OPA</b>	Solució de o-ftaldialdehid
<b>OTA</b>	Ocratoxina A
<b>OT<math>\alpha</math></b>	Ocratoxina alfa
<b>PAT</b>	Patulina
<b>Sa</b>	Esfinganina
<b>So</b>	Esfingosina
<b>T2</b>	Toxina T-2
<b>TRCs</b>	Tricotecens
<b>ZEA</b>	Zearalenona

## Organismes internacionals

<b>ACSA</b>	Agència Catalana de Seguretat Alimentària
<b>EFSA</b>	European Food Safety Agency / Autoritat Europea de Seguretat Alimentària
<b>IARC</b>	International Agency for Research on Cancer / Agència Internacional d'Investigació del Càncer
<b>JECFA</b>	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives / Comitè Mixt FAO/WHO d'Experts en Additius Alimentaris
<b>SCF</b>	Scientific Committee on Food / Comitè Científic en Alimentació
<b>WHO</b>	World Health Organisation / Organització Mundial per la Salut

## Altres abreviacions

<b>ALARA</b>	As Low As Reasonably Achievable / Tant baix com sigui practicable
<b>BMD</b>	Benmarch Dose / Dosi Benmarch
<b>BMDL<sub>10</sub></b>	BMD que incrementa el risc de càncer un 10% sobre el control
<b>fdp</b>	Funció de densitat de probabilitat
<b>IC<sub>b</sub></b>	Interval de confiança "bootstrap"
<b>IDT</b>	Ingesta diària tolerable
<b>IDTMP</b>	Ingesta diària tolerable màxima provisional
<b>IST</b>	Ingesta setmanal tolerable
<b>KM</b>	Kaplan-Meier
<b>LD</b>	Límit de detecció
<b>LQ</b>	Límit de quantificació
<b>LOAEL</b>	Nivell més baix al qual s'observen efectes adversos
<b>NOAEL</b>	Nivell al qual no s'observen efectes adversos
<b>MOE</b>	Marge d'exposició
<b>MLE</b>	Estimació de màxima versemblança
<b>ND</b>	No detectat
<b>QFCA</b>	Qüestionari de freqüència de consum d'aliments
<b>TD<sub>50</sub></b>	Dosi tòxica mediana
<b>VHB</b>	Virus de l'hepatitis B