

### III. MATERIALS I MÈTODES

L'estudi es va dissenyar en base a les recomanacions de l'OMS al document "Guidelines for the study of dietary intakes of chemical contaminants" de 1985 (WHO, 1985), que tenia com finalitat bàsica el promoure la realització d'estudis de dieta total arreu del món, i establir uns criteris homogenis que permetessin la comparació dels resultats.

Seguint l'esmentat document, l'esquema general del treball realitzat ha estat el següent:

1. Consideració dels recursos econòmics disponibles per dur a terme l'estudi.
2. Consulta de fonts d'informació i bases de dades sobre la ingesta dels diferents tipus d'aliments per la població a estudiar; dades de consum nacional i/o dades de consum obtingudes d'enquestes nutricionals.
3. Estimació de la presència esperada dels contaminants que es volen estudiar en els diferents aliments o grups d'aliments.
4. Selecció dels aliments que finalment s'inclouran a l'estudi.
5. Selecció de les localitats de presa de mostra.
6. Obtenció, preparació i conservació de les mostres.
7. Realització de les determinacions analítiques i tractament de les dades.
8. Establiment dels diferents grups de població que s'inclouran a l'estudi.
9. Càlcul de la ingesta diària a través de la dieta del contaminants avaluats.
10. Comparació dels resultats amb altres estudis de similars característiques.
11. Avaluació dels riscos per la població.

## 1. Elecció del tipus d'estudi de dieta total

Per l'estimació de la ingesta de contaminants a través de la dieta, hi ha tres tipus d'estudis:

- Estudi del cistell de la compra
- Estudi d'aliments individuals
- Estudi de dietes duplicades

En els *estudis del cistell de la compra* s'analitzen els aliments que habitualment es troben al "cistell de la compra" de la població que es vol estudiar, i que, per tant, reflecteixen el tipus de dieta d'aquella població. La mostra a analitzar està formada per aquells aliments presents al cistell de la compra durant un període de temps determinat. Els aliments són analitzats individualment o formant "*composites*" en proporcions basades en dades de consum. Un "*composite*" és la mescla homogènia de diferents aliments o diferents mostres d'un mateix tipus d'aliment, per formar una sola mostra destinada a analitzar.

En els *estudis d'aliments individuals* es determinen les concentracions dels contaminants a avaluar en mostres d'aliments que es consumeixen habitualment, ja siguin crus o cuinats. Les concentracions obtingudes s'han de multiplicar per la quantitat d'aliment consumit per poder estimar la ingesta diària d'aquests contaminants. El consum diari dels diferents aliments s'obté d'estudis d'enquestes nutricionals o dades de consum. Aquests estudis són d'especial interès quan es vol detectar la presència d'un contaminant en un tipus d'aliment concret.

En els *estudis de dietes duplicades*, la mostra a analitzar és una rèplica d'una ració diària ingerida pels participants de l'estudi. L'avantatge principal d'aquest tipus d'estudi és la reducció de costos, ja que el nombre de mostres a analitzar és molt més petit que en els estudis del cistell de la compra o d'aliments individuals. La seva

major utilitat és l'avaluació de la ingesta de contaminants en grups especials de població, però serien poc útils en estudis globals de població considerada estàndard.

En la present avaluació d'ingesta de contaminants, es va optar per un model mixt, a fi d'aprofitar les avantatges de l'estudi d'aliments individuals rebaixant el cost econòmic. D'aquesta manera es van analitzar diversos "composites" o barreges formades a parts iguals d'un mateix tipus d'aliment, obtingut en varis establiments d'una determinada localitat. En l'apartat 3 d'aquesta mateixa secció s'esquematitza el procés de recollida de les mostres.

## **2. Selecció dels aliments**

La dieta dels catalans forma part majoritàriament de l'anomenada "dieta mediterrània", i està composta per una gran varietat d'aliments. Així doncs, per realitzar un estudi d'avaluació de l'exposició humana a contaminants a través de la dieta que sigui prou representatiu de la població general, és important incloure tots els grups d'aliments en les anàlisis realitzades.

Donada la varietat de la dieta de la població catalana i l'elevat cost econòmic que suposen les complexes analítiques que calia dur a terme, es van haver de seleccionar acuradament els aliments a estudiar. Per tal de fer aquesta selecció, es van seguir les recomanacions del document elaborat per l'OMS al 1985 i ja esmentat prèviament. Aquesta guia diferencia els criteris d'inclusió d'aliments, segons el tipus d'estudi escollit.

- a) Per als *estudis del cistell de la compra*, recomana la consulta de dades de consum mitjançant dos tipus de treballs: les guies de consum nacional que elaboren organismes de l'Estat, i les enquestes nutricionals fetes a la població. Es proposa la consulta d'ambdues i la combinació de les dades sempre que sigui possible.

b) Per als *estudis d'aliments individuals*, s'estableixen criteris quantitius segons les concentracions esperades dels contaminants a avaluar. A més, estan descrits certs criteris d'inclusió per estudis realitzats a Europa:

1. S'inclouran sempre el pa, les patates i la llet.
2. S'inclouran aliments consumits en quantitats entre 100 i 1000 g/dia.
3. S'inclouran aliments consumits entre 10 i 100 g/dia i amb nivells de contaminació esperats entre 10 i 100 vegades superior als aliments del punt anterior.
4. S'inclouran aliments consumits a partir d'1 g/dia i de concentració esperada entre 100-1000 vegades superior als del punt 2.

Atès que el present estudi és una combinació d'ambdós models (estudis del cistell de la compra i d'aliments individuals), es van tenir en compte les dues recomanacions.

Per una banda, es va realitzar una consulta exhaustiva de dades bibliogràfiques, tant a nivell nacional com internacional, referents als contaminants concrets que es volien estudiar. D'aquesta manera es van conèixer estudis de característiques similars realitzats prèviament, es van obtenir dades sobre els nivells actuals de contaminació en aliments, així com de les característiques i incidència dels compostos a analitzar, i es va poder fer una previsió dels nivells que s'esperava obtenir en els diferents grups d'aliments. Dins dels treballs d'àmbit nacional que es varen consultar, hi havia, per exemple, l'informe de 1997 del Govern Basc "Vigilancia de la contaminación química de los alimentos en la Comunidad Autónoma del País Vasco" (CAPV, 1997).

Altrament, i per tal de confeccionar la llista concreta dels aliments que havien de ser inclosos a l'estudi, es va recollir informació de dades de consum nacional i d'enquestes nutricionals realitzades a la mateixa zona on s'havia de dur a terme el treball. Principalment, es van consultar les següents fonts:

1. Publicació “Alimentación en España” del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), de 2000; on es troba la quantitat ingerida per càpita, en les diferents autonomies, dels diversos grups d'aliments i dels principals aliments que els integren.
2. Estudi de dieta realitzat per Capdevila i cols. (2000) a la Facultat de Medicina de Reus. Aquests investigadors van fer servir enquestes nutricionals per conèixer la ingesta dels principals grups d'aliments per la població.

Tenint en compte aquestes dues fonts d'informació, a més de la consulta del Llibre Blanc de l'Avaluació de l'estat nutricional de la població catalana (1992-93) del Departament de Sanitat i Seguretat Social de la Generalitat de Catalunya, es va poder fer una aproximació força acurada de la dieta estàndard de la població general catalana, i d'aquesta manera, seleccionar els aliments més adients que havien de formar part de l'estudi.

Així doncs, amb tota la informació obtinguda de les diferents publicacions i assessorats per les experiències prèvies, els diferents aliments que es van incloure a l'estudi van ser els següents:

1. **CARN:** vedella (hamburguesa, bistec), porc (filet, llom), pollastre (pit) i corder.
2. **PEIX:** lluç, sardina i musclo.
3. **VEGETALS:** enciam, tomàquet, patata, mongeta tendra i col-i-flor.
4. **FRUITES:** poma, taronja i pera.
5. **OUS:** ous de gallina.
6. **LLET I DERIVATS:** llet sencera, llet semidesnatada, iogurt i formatge.
7. **PA I CEREALS:** pa blanc, pa de motlle, arròs i pasta alimentària.
8. **LLEGUMS:** llenties i fesols.
9. **OLIS I GREIXOS:** oli d'oliva, oli de gira-sol i margarina.
10. **CONSERVES:** tonyina i sardines en oli.
11. **DERIVATS DE LA CARN:** pernil dolç, salsitxes tipus Frankfurt i xoriço.

Una altra distinció que es pot fer a l'hora de realitzar un estudi de dieta total, és si es consideraran els aliments crus o cuinats. És ben conegut que certs contaminants poden augmentar o disminuir la seva concentració en un cert tipus d'aliment després d'un procés d'elaboració com pot ser la barbacoa, la cocció o qualsevol altre tractament.

En el nostre cas, ens vam centrar exclusivament en l'anàlisi dels aliments sense cuinar, sense cap procés d'elaboració previ, tal com es troben al comerç. Tot i això, es va realitzar una tria de les parts comestibles en aquells aliments que així ho requerien, com ara treure les espines al peix o pelar la fruita.

### **3. Presa de mostra**

Cadascuna de les mostres finals o "composites" dels aliments a analitzar, estava formada d'una sèrie de submostres individuals del mateix tipus d'aliment. A l'hora d'establir quina quantitat de submostres formava cada "composite", no es van tractar d'igual manera tots els aliments. Uns presenten una major variabilitat deguda a diversos factors com podrien ser la venda al detall o de manera no envasada, i els altres formen part d'una mostra més homogènia, al tractar-se majoritàriament de productes envasats i de marques comercials, que poden estar a l'abast dels consumidors en els diferents establiments de diversos llocs. Així doncs, en base a aquestes premisses, per la recollida i posterior anàlisi de les mostres, es van establir dos grups segons la seva possible variabilitat.

Al primer grup es van incloure:

- carn de vedella (bistec i hamburguesa),
- porc (llom i salsitxa)
- pollastre (pit)
- corder
- peix i marisc (lluç, sardina i musclo)

- vegetals (enciam, tomàquet, patata, mongeta verda i col-i-flor)
- fruites (poma, taronja i pera)
- ous

Tots aquests aliments es comercialitzen majoritàriament sense envasar, per la qual cosa la seva procedència pot ser molt diversa segons la població a on siguin adquirits. Per tant, d'aquest grup es van analitzar 4 barreges o "composites" de cada tipus d'aliment, cadascuna formada per 10 submostres individuals del mateix producte.

El segon grup va incloure:

- llet de vaca (sencera i semidesnatada)
- derivats làctics (iogurt i formatge)
- cereals (pa blanc, pa de motlle, pasta i arròs)
- llegums (llenties i fesols)
- greixos (margarina)
- olis (oliva i gira-sol)
- peix en llauna (tonyina i sardina)
- productes derivats de la carn (pernil dolç, salsitxes tipus frankfurt i xoriç)

Els aliments d'aquest grup es troben, en general, envasats i es poden adquirir més o menys les mateixes marques comercials en tots els establiments i ciutats de presa de mostra. Conseqüentment, d'aquest segon grup només es varen analitzar 2 barreges o "composites" de cada tipus d'aliment, cadascuna composta per 8 submostres individuals.

Es van analitzar un total de 108 mostres corresponents als diferents tipus d'aliments. Tanmateix, pel que fa als PBDEs i PCDEs, degut a les baixes concentracions que d'entrada es preveïen obtenir en els aliments, la seva recent aparició en el camp d'interès toxicològic i la cara tecnologia emprada en les anàlisis,

el nombre de mostres analitzades es va reduir a la meitat, 54, en comptes de les 108 que es van analitzar per PCDD/Fs i PCBs.

Per tal d'obtenir una mostra prou representativa dels aliments consumits per la població general de Catalunya, els aliments es van adquirir en les quatre capitals de província i en altres tres localitats catalanes de més de 100.000 habitants: Barcelona, Tarragona, Lleida, Girona, l'Hospitalet de Llobregat, Badalona i Terrassa.

No tots els aliments es van recollir en totes les localitats, sent les poblacions seleccionades també separades en dos grups. En ambdós grups es va incloure la localitat de Barcelona perquè la seva densitat de població es va considerar força representativa per efectuar la recollida de tots els aliments. En quatre de les poblacions escollides es van recollir els aliments corresponents al primer grup, i en les altres quatre els del segon grup.

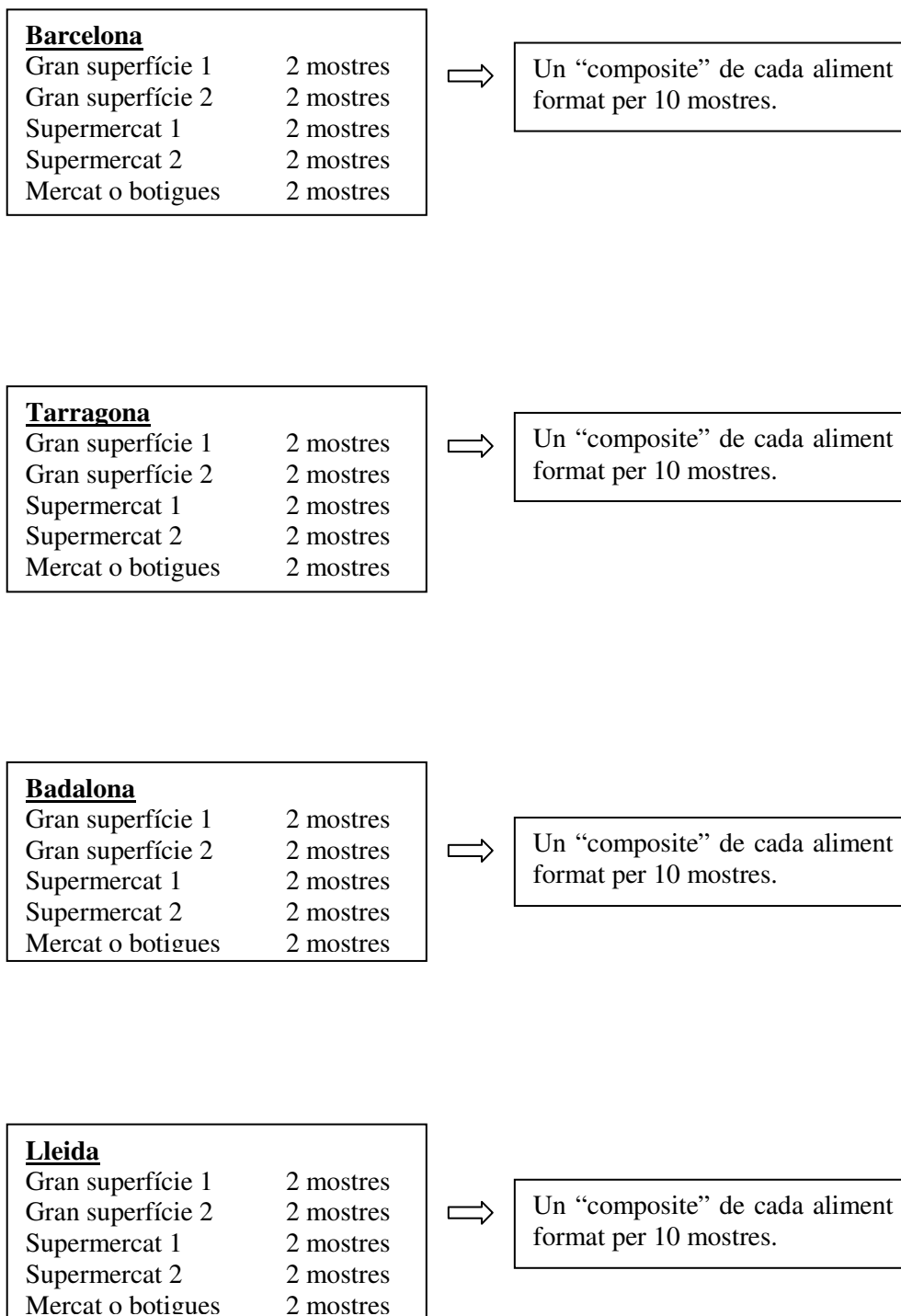
Els establiments per fer la compra dels aliments es van triar de manera que fossin prou representatius de cada localitat; és a dir, aquells on majoritàriament fa la compra la població. Així, d'entre els possibles llocs de compra, es van triar les dos grans superfícies i els dos supermercats més coneguts a la zona, el mercat municipal i/o alguna botiga de barri. Es va procurar variar el màxim possible de marca comercial. D'aquesta manera, es van adquirir els productes que, aplicant un punt de vista lògic i pràctic, tenien més probabilitats de ser escollits pels compradors, ja fos per tractar-se d'ofertes determinades o de marques més habituals.

Esquemàticament, el procés d'obtenció de les mostres es pot resumir així:

1. Desplaçament de l'equip de presa de mostres a la localitat en qüestió.
2. Obtenció de les mostres en els diferents establiments seleccionats.
3. Transport de les mostres degudament etiquetades al laboratori. Les mostres d'aliments poc perdurables es van transportar en neveres portables.

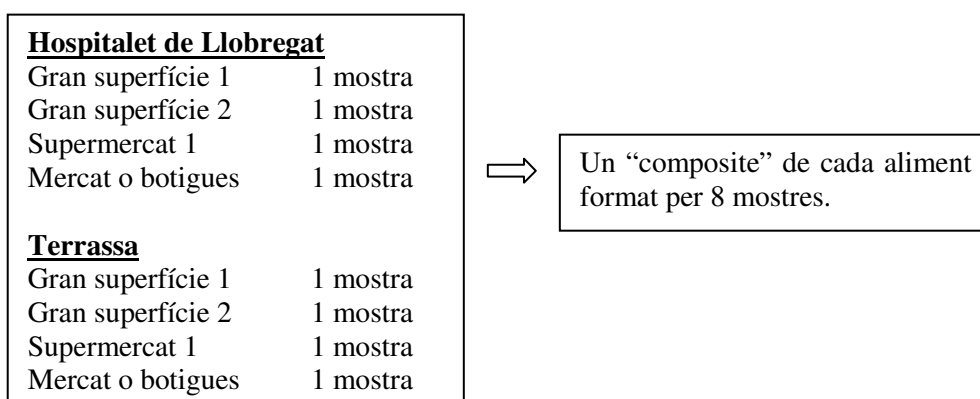
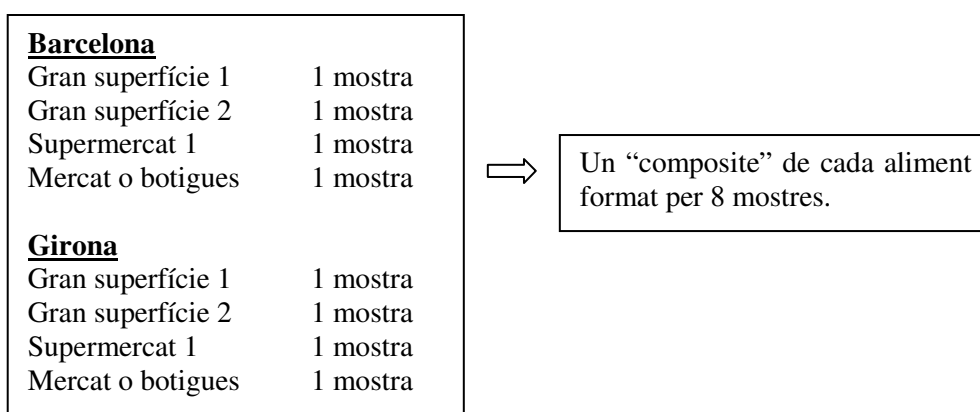


Concretament, la recollida dels 18 aliments que formaven part del primer grup (venda majoritària al detall) es va efectuar de la següent manera:



D'aquests 18 aliments es van obtenir quatre "composites" (un per cada localitat de recollida) formats per una barreja a parts iguals de 10 submostres independents del mateix tipus d'aliment.

Els 18 aliments corresponents al segon grup es van obtenir de la següent manera:



De cadascun d'aquests 18 aliments, es van preparar dos "composites" formats per 8 submostres a parts iguals del mateix tipus d'aliment obtingudes a dues localitats diferents.

Finalment, hi havia un total de 108 “composites” (72 corresponents als aliments de venda al detall i 36 corresponents als aliments envasats) que representava una gran diversitat pel que fa a la procedència, el tipus d’establiment i la localitat d’obtenció. En totes aquestes mostres d’aliments es van realitzar les anàlisis de dioxines i furans, i PCBs. Tal i com ja s’ha comentat prèviament, les anàlisis de PBDEs i PCDEs només es van dur a terme en la meitat de les mostres.

De totes les mostres recollides, es va conservar una part, perfectament condicionada, per tal de constituir un “arxiu històric” en el que es podria cercar, en un futur, la presència retrospectiva d’algun contaminant.

Per cada localitat de presa de mostra, es va elaborar un document o fitxa on es van anotar les dades bàsiques de la recollida (dia, hora, establiments, etc.) i les potencials incidències que tenien lloc (Annex 1).

#### **4. Pretractament de les mostres**

El procediment general de tractament de les mostres va ser el següent:

- Elaboració dels “composites”: homogeneïtzació
- Liofilització
- Conservació a -20 °C fins al moment de les anàlisis.

##### **4.1. Elaboració dels “composites”**

L’elaboració de “composites” té com a finalitat agrupar les diferents mostres individuals d’aliments per tal de reduir el nombre d’analítiques, però tenint una mostra final prou representativa.

Un cop al laboratori, es van processar primer de tot, els aliments frescos i que es podien espatllar amb facilitat, com ara el peix i la carn. La resta, es van guardar perfectament etiquetats i en nevera (si era necessari) fins al seu tractament. Per la manipulació dels aliments i la formació de les barreges, es van utilitzar eines de cuina estàndards (culleres, forquilles, ganivets, estisores, bols i escorredor).

Per l'elaboració dels "composites" es van pesar porcions iguals i equivalents de les mostres d'aliments obtingudes en els diferents establiments i localitats. En el cas que hi haguessin parts no comestibles, aquestes es van eliminar prèviament, com és el cas de les espines del peix, la pell de la fruita o els possibles ossos de la carn. En el cas de la carn, es va intentar que la proporció de greix fos la mateixa per totes les mostres que formaven part d'un "composite". Les verdures es van rentar amb aigua potable i es van deixar assecar en paper de filtre.

Un cop pesades, les diverses submostres de carn, peix, vegetals, fruites, ous (batuts), formatge, llegums, conserves, derivats de la carn, llet i iogurt es van barrejar fins a obtenir una pasta homogènia amb un robot de cuina (UFESA PD-5310). Aquesta pasta es va repartir en plaques de Petri rotulades amb les lletres d'identificació de la mostra, i a on es va anotar el pes exacte de "composite" que hi havia, per poder fer els posteriors càlculs de percentatge d'humitat. Aquest procés es mostra a la Figura 6. Les plaques de Petri es van guardar en congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$  fins al moment de ser liofilitzades.



**Figura 6.** Procés d'homogeneïtzació de les mostres i formació dels "composites".

#### 4.2. Liofilització i càlcul del percentatge d'humitat

Un cop es tenien els “composites” perfectament homogeneïtzats i en plaques de Petri, es passava a la liofilització de les mostres per extreure tota la humitat i facilitar així el posterior procés analític i la conservació. Degut a la gran quantitat de mostres que s'havien de liofilitzar i a la complexitat d'aquest procés, es va utilitzar un liofilitzador industrial, per la qual cosa es va comptar amb la col·laboració de l'empresa de productes per anàlisi clínic QCA S.L. (Amposta, Tarragona).

Les mostres liofilitzades es van polvoritzar i homogeneïtzar de nou en una cambra seca i freda, i es van fer els càlculs dels percentatges d'humitat (Figura 7). Cada mostra es va dividir en les diferents alíquotes destinades a l'anàlisi o a l'arxiu i, es va condicionar en els recipients adequats per la seva conservació fins al moment de ser utilitzada.



**Figura 7.** Procés de liofilització i càlcul del percentatge d'humitat.

És important conèixer la quantitat exacta d'aigua extreta de la mostra per poder expressar les concentracions finals dels contaminants avaluats en pes fresc, i fer els posteriors càlculs d'ingesta. Per tal de determinar el percentatge d'humitat de cada mostra, es van pesar les plaques de Petri abans i després de la liofilització, calculant per diferència la quantitat d'aigua. Es van confeccionar unes fitxes per anotar aquestes dades i fer els càlculs posteriorment (Annex 2). A les Taules 7 i 8 es

presenten els percentatges d'humitat de les diferents mostres d'aliments, així com la humitat mitjana de cada tipus d'aquests.

L'arròs, la pasta, els olis i la margarina es van tractar de la mateixa manera que la resta de les mostres, però, en aquests casos, degut a que la quantitat d'aigua de les mostres és pràcticament nul·la, no es va realitzar la liofilització i el seu pes fresc es considera equivalent al pes sec. El pa es va deixar assecar a temperatura ambient fins a pes constant i per diferència de pes es va obtenir el percentatge d'humitat.

**Taula 7.** Percentatges d'humitat de les mostres d'aliments corresponents al grup 1.

Aliment	humitat per mostra								humitat mitjana
	1	74,19%	19	72,80%	37	74,40%	55	73,35%	
<i>bistec vedella</i>	1	74,19%	19	72,80%	37	74,40%	55	73,35%	73,69%
<i>hamb. vedella</i>	2	66,60%	20	69,46%	38	66,88%	56	68,80%	67,94%
<i>llom porc</i>	3	72,12%	21	71,16%	39	72,07%	57	71,56%	71,73%
<i>salsitxa porc</i>	4	65,92%	22	66,30%	40	66,13%	58	54,76%	63,28%
<i>pit pollastre</i>	5	74,70%	23	75,00%	41	74,22%	59	74,70%	74,66%
<i>corder</i>	6	74,72%	24	72,59%	42	74,15%	60	71,98%	73,36%
<i>lluç</i>	7	80,79%	25	82,54%	43	82,02%	61	81,13%	81,62%
<i>musclo</i>	8	83,47%	26	83,30%	44	81,03%	62	85,29%	83,27%
<i>sardina</i>	9	67,43%	27	66,23%	45	68,53%	63	65,75%	66,99%
<i>enciam</i>	10	95,60%	28	95,30%	46	95,70%	64	96,30%	95,73%
<i>tomàquet</i>	11	93,80%	29	94,00%	47	93,47%	65	94,26%	93,88%
<i>patata</i>	12	82,54%	30	81,28%	48	81,07%	66	81,20%	81,52%
<i>col-i-flor</i>	13	91,78%	31	91,05%	49	91,91%	67	94,83%	92,39%
<i>mongeta tendra</i>	14	91,18%	32	89,94%	50	90,90%	68	87,74%	89,94%
<i>poma</i>	15	83,20%	33	84,63%	51	85,29%	69	85,37%	84,62%
<i>taronja</i>	16	87,30%	34	86,73%	52	87,47%	70	86,90%	87,10%
<i>pera</i>	17	83,80%	35	85,59%	53	85,47%	71	85,09%	84,99%
<i>ous de gallina</i>	18	76,57%	36	75,81%	54	76,88%	72	77,27%	76,63%

**Taula 8.** Percentatges d'humitat de les mostres d'aliments corresponents al grup 2.

Aliment	humitat per mostra				humitat mitjana
	73	88,60%	91	88,60%	
<i>llet sencera</i>	73	88,60%	91	88,60%	88,60%
<i>llet semidesnatada</i>	74	89,90%	92	90,32%	90,11%
<i>iogurt</i>	75	87,70%	93	88,30%	88,00%
<i>formatge</i>	76	33,00%	94	32,99%	33,00%
<i>pa barra</i>	77	13,00%	95	13,00%	13,00%
<i>pa motlle</i>	78	29,60%	96	30,10%	29,85%
<i>llenties</i>	81	78,90%	99	79,03%	78,97%
<i>mongetes</i>	82	75,77%	100	76,67%	76,22%
<i>tonyina en oli</i>	86	59,31%	104	59,54%	59,43%
<i>sardines en oli</i>	87	58,26%	105	55,70%	56,98%
<i>pernil dolç</i>	88	73,60%	106	80,08%	76,84%
<i>salsitxa Frankfurt</i>	89	56,17%	107	59,15%	57,66%
<i>xoriço</i>	90	44,85%	108	42,17%	43,51%

### 5. Determinació analítica de PCDD/PCDFs, PCBs, PBDEs i PCDEs

En les mostres d'aliments es van determinar els següents compostos:

- Policlòrdibenzo-p-dioxines (PCDDs) i policlòrdibenzofurans (PCDFs): els 17 congèneres substituïts en posicions 2, 3, 7, 8.
- Bifenils policlorats (PCBs): set marcadors mediambientals (IUPAC No. 28, 52, 101, 118, 138, 153 i 180) i els congèneres IUPAC No. 77, 126, 169 i 105.
- Difenil èters polibromats (PBDEs): homòlegs de 4 a 8 àtoms de brom.
- Difenil èters policlorats (PCDEs): homòlegs de 4 a 8 àtoms de clor.

Les determinacions analítiques dels diferents contaminants avaluats es van realitzar al Department of Analytical Laboratory del laboratori col·laborador Meß- und Prüfstelle technischer Umweltschutz GmbH. (MPU) de Berlín per l'equip del Dr. L. Müller. Les mostres van arribar al laboratori alemany liofilitzades, congelades i en perfectes condicions.

L'anàlisi de PCDD/PCDFs, PCBs, PBDEs i PCDEs es va realitzar d'acord amb el mètode alemany VDI 3499 i l'US EPA 1625 descrit per l'Agència Americana de Protecció Mediambiental.

Les anàlisis es van dur a terme en sèries de 5 mostres i un blanc. Abans de l'extracció, les mostres es van homogeneïtzar.

### 5.1. Extracció de les mostres

Per les mostres sòlides, es van barrejar de 5 a 10 g d'aquestes amb una petita quantitat de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i amb una mescla d'estàndards marcats:

- <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-PCDD/Fs: (almenys una dioxina i furà per cada grau de cloració).
- <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-PCBs: (almenys un PCB per cada grau de cloració).
- <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-PBDEs: <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-TetraBDE-47, <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-PentaBDE-99, <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-HexaBDE-153, <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-HexaBDE-154, <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-HeptaBDE-183.
- <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-PCDEs: <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-TetraCDE-68, <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-PentaCDE-86, <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-HeptaCDE-180.

Les mostres es van extreure en Soxhlet durant 24 h amb un dissolvent orgànic adequat per cada tipus de mostra. Els dissolvents utilitzats en cada cas es detallen a continuació:

- toluè per les mostres de vegetals, fruites, arròs, llegums, ous, llet i derivats.
- hexà:diclorometà (1:1) per mostres de carn, peix i musclos.
- petrolèter per mostres de peix en oli.



Es va aïllar la fracció lipídica de les mostres i es va utilitzar una part d'aquesta per la purificació. Per les mostres d'oli i margarina es van dissoldre 2 g en hexà, i es van utilitzar directament pel procés de purificació.

### **5.2. Purificació o “clean-up”**

La purificació i fraccionament de les mostres es va dur a terme mitjançant cromatografia d'absorció amb un procés de múltiples etapes. Es va utilitzar una columna multicapa de sílica amb la següent estructura (de dalt a baix: sulfat sòdic, sílica, sílica/àcid sulfúric, sílica, sílica/hidròxid potàssic, sílica) seguida de columnes d'alumina i BioBeads SX3.

El pas final va ser la reducció de les diferents fraccions que contenen les PCDD/PCDFs, PCBs, PCDEs i PBDEs al volum necessari per realitzar les anàlisis.

### **5.3. Anàlisi i quantificació per HRGC/HRMS**

Prèviament a l'anàlisi, es van afegir estàndards marcats amb  $^{13}\text{C}$  per tal de poder calcular els percentatges de recuperació.

L'extracte purificat es va analitzar per cromatografia d'absorció atòmica d'alta resolució acoblada a espectrometria de masses també d'alta resolució (HRGC/HRMS). L'ús de la cromatografia de gasos d'alta resolució és necessari per a la separació de les diferents famílies d'homòlegs, així com per obtenir una bona separació dels congèneres dins de cada família. La detecció es va efectuar per espectrofotometria de masses d'impacte electrònic a una resolució mínima de 10.000.

Es va utilitzar un cromatògraf de gasos Fisons CE 8000 acoblat a un sistema VG Autospec Ultima. L'anàlisi dels tetra- a octa- congèneres de PCDD/PCDFs i de PBDEs

i PCDEs es va realitzar amb columnes no polars tipus DB5. L'anàlisi de PCBs es va realitzar mitjançant una columna DB-XLB.

La quantificació dels diferents compostos es va realitzar mitjançant els estàndards interns. Les concentracions es van expressar en ng/kg (pes sec i/o pes greix).

#### 5.4. Càlcul dels equivalents tòxics (TEQ) de PCDD/Fs i PCBs

La toxicitat de les dioxines s'expressa en equivalents tòxics (TEQ). Cada un dels 17 congèneres substituïts en les posicions 2, 3, 7, 8 té assignat un factor de toxicitat equivalent (TEF) relatiu al congènere més tòxic (2, 3, 7, 8- tetraclorodibenzo-*p*-dioxina o TCDD). El TEQ total es va calcular amb el sumatori de multiplicar el TEF de cada congènere ( $TEF_{i,j}$ ) per la seva concentració ( $C_{i,j}$ ) en la mescla:

$$TEQ = \sum (TEF_{iPCDD} \cdot C_{iPCDD} + (TEF_{jPCDF} \cdot C_{jPCDF}))$$

Per expressar la toxicitat de PCDD/PCDFs i PCBs es van utilitzar els factor de toxicitat equivalent establerts per l'OMS al 1998 (OMS-TEF) (Van Leeuwen i cols., 2000). Per tal de poder comparar els resultats de la ingesta de PCDD/PCDFs amb altres estudis previs realitzats en varis països, també es van utilitzar els factors d'equivalència tòxica de l'OTAN (I-TEF).

Les Taules 9 i 10 mostren els valors d'OMS-TEF pels 17 congèneres de dioxines i furans substituïts en posicions 2,3,7,8, i pels 5 congèneres de PCBs analitzats al present treball i que tenen un TEF assignat per l'OMS. La Taula 11 mostra els valors dels I-TEF pels 17 congèneres de dioxines i furans.

**Taula 9.** Factors de toxicitat equivalent establerts per l'OMS per PCDD/Fs.

<i>Congènere</i>	<i>OMS-TEF</i>	<i>Congènere</i>	<i>OMS-TEF</i>
2,3,7,8-TCDD	1	2,3,7,8-TCDF	0.1
1,2,3,7,8-PeCDD	1	1,2,3,7,8-PeCDF	0.05
		2,3,4,7,8-PeCDF	0.5
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.1	1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.1	1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.1	1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.1
		2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.01	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.01
		1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.01
OCDD	0.0001	OCDF	0.0001

**Taula 10.** Factors de toxicitat equivalent establerts per l'OMS per PCBs.

<i>Congènere</i>	<i>OMS-TEF</i>
PCB-77: 3,3',4,4'-tetraclorobifenil	0.0001
PCB-105: 2,3,3',4,4'-pentaclorobifenil	0.0001
PCB-118: 2,3',4,4',5-pentaclorobifenil	0.0001
PCB-126: 3,3',4,4',5-pentaclorobifenil	0.1
PCB-169: 3,3',4,4',5,5'-hexaclorobifenil	0.01

**Taula 11.** Factors de toxicitat equivalent establerts per l'OMS per PCDD/Fs.

<i>Congènere</i>	<i>I-TEF</i>	<i>Congènere</i>	<i>I-TEF</i>
2,3,7,8-TCDD	1	2,3,7,8-TCDF	0.1
1,2,3,7,8-PeCDD	0.5	1,2,3,7,8-PeCDF	0.05
		2,3,4,7,8-PeCDF	0.5
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.1	1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.1	1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.1	1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.1
		2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.01	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.01
		1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.01
OCDD	0.001	OCDF	0.001

Quan en algunes de les mostres analitzades, determinats congèneres es troben per sota del seu respectiu límit de detecció, es poden seguir diferents criteris per tractar aquest congèneres a l'hora de calcular el valor global de TEQ:

1. calcular la contribució al TEQ global de cada congènere no detectat com a "0".
2. calcular la contribució al TEQ global de cada congènere no detectat com a la meitat del seu respectiu límit de detecció.
3. calcular la contribució al TEQ global de cada congènere no detectat com al seu respectiu límit de detecció.

Malisch i col·laboradors, al 2000, proposen utilitzar un o altre criteri segons la finalitat dels resultats. Així, quan es tracta de comparar les concentracions de PCDD/PCDFs observades en diferents tipus d'aliments amb els límits establerts pels diferents organismes oficials, com ara la Comissió Europea, i descartar aliments que puguin estar contaminats i no ser aptes pel consum humà, es dona als congèneres no detectats un valor igual al seu respectiu límit de detecció. En canvi, quan el que es tracta és de fer una estimació de la ingesta mitjana a través de la dieta de dioxines i furans per

la població, als congèneres no detectats, se'ls hi assigna un valor igual a la meitat del seu respectius límits de detecció.

### 6. Càlcul de la ingesta diària dels contaminants avaluats

La ingesta total a través de la dieta de cada un dels contaminants avaluats (PCDD/PCDFs, PCBs, PBDEs i PCDEs) es va calcular com el resultat de la suma de multiplicar la concentració del respectiu contaminant en cada aliment per la quantitat d'aquell aliment ingerida per un individu, segons la fórmula següent (Casarett i Doull's, 2001):

$$\text{Ingesta total} = \Sigma(\text{Concentració de contaminant en aliment} \cdot \text{Quantitat d'aliment ingerida})$$

L'estimació de la mitjana del consum diari d'aliments per la població (g/dia) es va obtenir d'un treball recent realitzat a la Facultat de Medicina de Reus per Capdevila i cols. (2000).

Aquest treball forma part d'un estudi nutricional sobre població sana de 2 a 80 anys que es ve realitzant a Reus des del 1983. En aquell any es va seleccionar a l'atzar una mostra de 625 famílies, a partir del cens municipal, de les quals finalment van participar 345, amb un total de 1358 individus. El 1993 es va tornar a contactar amb les mateixes famílies que havien participat el 1983 (Arija i cols., 1996), i el 1999 es van tornar a posar en contacte amb les famílies participants a les dues fases anteriors, i es van reclutar algunes famílies noves per tal de compensar les perdudes. Per a la valoració de la ingesta alimentària i de nutrients, es va fer un recordatori de 24 hores durant 3 dies no consecutius i incloent-hi sempre un de festiu. Es va entrevistar en cada cas a la persona en qüestió i a la persona responsable de la preparació del menjar. Per facilitar la determinació de les quantitats ingerides es va fer servir un àlbum fotogràfic d'aliments, i per valorar alguns aliments, com ara l'oli,

es va fer servir una taula amb valors estandarditzats de les quantitats utilitzades en alguns plats com a valor de referència. La recollida de dades tenia lloc al mateix domicili dels participants, i la van dur a terme 4 enquestadors que havien passat per un període d'aprenentatge i estandardització previ.

La Taula 12 recull la quantitat mitjana d'aliments ingerida diàriament per un home adult (g/dia) i el percentatge que suposa cada aliment a la ingesta diària total (% ID). Es va considerar com a "home adult" un individu d'entre 20 i 65 anys i es va assumir per aquest una mitjana de pes de 70 kg.

**Taula 12.** Ingesta diària dels diferents aliments per un home adult.

<b>Aliment</b>	<b>g/dia</b>	<b>% ID</b>
<i>carn</i>	185	12,8
<i>peix</i>	92	6,4
<i>vegetals</i>	226	15,7
<i>fruites</i>	239	16,6
<i>ous</i>	34	2,4
<i>llet</i>	217	15,0
<i>làctics</i>	106	7,3
<i>cereals</i>	206	14,3
<i>tubercles</i>	74	5,1
<i>llegums</i>	24	1,7
<i>greixos</i>	41	2,8
<b>TOTAL</b>	<b>1444</b>	<b>100,0</b>

Del mateix estudi realitzat per Capdevila i cols. al 2000, es van extreure dades de la ingesta diària d'aliments corresponents a diferents grups d'edat i sexe. La

població d'estudi es va dividir en varis grups d'edat tenint en compte les diferències en les necessitats fisiològiques i l'activitat física realitzada en cada etapa. La Taula 13 mostra la ingesta diària dels diferents tipus d'aliments per aquests grups de població.

**Taula 13.** Ingesta diària (g/dia) d'aliments segons edat i sexe.

Edat (anys)	4-9		10-19		20-34		35-50		51-65		>65	
	<i>M</i>	<i>F</i>	<i>M</i>	<i>F</i>	<i>M</i>	<i>F</i>	<i>M</i>	<i>F</i>	<i>M</i>	<i>F</i>	<i>M</i>	<i>F</i>
<i>carn</i>	140	140	181	153	225	138	166	127	163	110	121	107
<i>peix</i>	54	49	64	60	75	73	95	77	106	88	78	82
<i>vegetals</i>	130	120	164	161	189	174	249	217	239	216	191	188
<i>fruites</i>	199	193	205	199	211	205	244	209	261	266	298	238
<i>ous</i>	34	19	30	21	38	23	31	25	34	22	29	16
<i>llet</i>	326	292	303	230	229	243	224	242	198	275	219	288
<i>làctics</i>	113	115	136	109	124	89	103	87	91	98	69	75
<i>cereals</i>	200	201	263	179	237	162	207	135	175	118	178	135
<i>tubercles</i>	69	58	87	66	79	59	74	55	69	57	90	49
<i>llegums</i>	26	25	25	23	23	22	28	26	21	20	25	19
<i>greixos</i>	33	34	41	31	43	31	43	32	37	30	28	30

M: sexe masculí; F: sexe femení.

Per tal de poder expressar la ingesta dels diferents contaminants avaluats en funció del pes corporal dels diferents grups de població establerts, es van assumir els valors mitjana de pes presentats a la Taula 14.

**Taula 14.** Pes corporal assumit pels diferents grups de població.

<b>Edat (anys)</b>	4-9		10-19		20-34		35-50		51-65		>65	
<b>Sexe</b>	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
<b>Pes corporal (kg)</b>	24	24	56	53	70	55	70	55	70	55	70	55

### 7. Avaluació del risc per la població

La legislació de diferents països estableix, per determinats contaminants continguts en aliments, nivells límit o màxims permesos, així com nivells d'ingesta tolerable. No tots els tòxics tenen regulació per llei, i a més, sovint no existeix un consens internacional definitiu sobre els riscos que poden suposar els diferents contaminants. Per les substàncies avaluades, ens vam atendre bàsicament a les disposicions de la Unió Europea i de l'OMS. També es van tenir en compte, els valors de toxicitat proposats per altres organismes com ara l'Agència Americana de Protecció Mediambiental (US EPA) o l'Agència de Registre de Substàncies Tòxiques i Malalties (ATSDR).

Un cop obtinguts els resultats analítics i realitzats els càlculs per estimar la ingesta dels contaminants avaluats per la població estàndard i pels diferents grups de població seleccionats, es van comparar les dades obtingudes amb els valors de referència toxicològics, en el cas que estiguessin establerts. D'aquesta manera es va estimar el risc per la salut dels consumidors degut a la ingesta de dioxines i furans i PCBs "dioxin-like".

En el cas dels PBDEs i PCDEs, l'avaluació dels riscos es complica, ja que no existeixen valors de referència toxicològics clarament establerts. Pels PBDEs, es va utilitzar com a valor de referència toxicològic el LOAEL (nivell més baix d'un tòxic al que s'observen efectes adversos per la salut), que es va comparar amb la ingesta dietètica d'aquests compostos obtenint així el marge de seguretat entre la ingesta i els



possibles efectes tòxics. Pels PCDEs es va estimar el risc per la població assumint la similitud entre aquests compostos i els PCBs en quant a les seves característiques toxicològiques.

Per l'avaluació dels riscos per la població deguts a la ingesta de les substàncies avaluades, es van tenir en compte els següents paràmetres concrets, segons la toxicitat de la substància i la legislació corresponent:

### **7.1. Risc tòxic no cancerigen**

L'exposició a una determinada substància no suposarà un risc quan existeixi un marge de seguretat adient entre la ingesta i els valors de referència establerts.

El risc tòxic de PCDD/PCDFs i PCBs "dioxin-like" es va calcular comparant la ingesta diària estimada de les substàncies a avaluar amb la Ingesta Diària Tolerable (TDI) i/o la Ingesta Setmanal Tolerable Provisional (PTWI).

- Ingesta Diària Tolerable (TDI): Aquest valor representa l'exposició diària tolerable per l'home com a resultat de la presència dels contaminants en els aliments i en l'aigua de beguda.
- Ingesta Setmanal Tolerable Provisional (PTWI): És el valor toxicològic de referència per contaminants que puguin acumular-se en l'organisme humà. Aquest valor representa l'exposició setmanal tolerable per l'home a aquells contaminants inevitablement associats al consum d'aliments.

Pel cas de la TDI, per exemple, la fórmula aplicada per calcular el risc degut a una determinada substància és la següent:

$$\text{Risc} = \text{Ingesta diària mitjana} / \text{TDI}$$

Si aquest quocient és inferior a 1, la ingesta a través de la dieta del tòxic avaluat no suposarà un risc significatiu per la població. Quan més gran sigui el resultat d'aquest quocient, existirà un major risc per la població de patir efectes tòxics deguts a la substància avaluada.

## 7.2. Risc cancerigen

Pels efectes cancerígens, el risc s'expressa com la probabilitat de patir càncer al llarg de la vida. El risc cancerigen es va avaluar comparant la ingesta d'un determinat tòxic amb el valor de la potència cancerígena ("slope factor"), que consisteix en un factor que multiplicat per la concentració ingerida d'un determinat tòxic cancerigen, dóna la magnitud de la població amb risc d'afectació de processos cancerígens. S'expressa, normalment, en mg/kg de pes corporal/dia.

Per les dioxines i furans, es va utilitzar el valor de potència cancerígena suggerit per l'Agència Americana de Protecció Mediambiental (US EPA, 2000),  $1 \times 10^{-3}$  per pg TEQ/kg/dia.