

PERFIL TOXICOLÓGICO DE LOS VEGETALES DE HOJA CONSUMIDOS EN CANARIAS:

CONTENIDO EN CONTAMINANTES TÓXICOS (METALES PESADOS Y NITRATOS) Y ESTIMACIÓN DEL RIESGO



**DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN APLICADA
A LAS CIENCIAS SANITARIAS**

Carmen Verónica Martín León

Las Palmas de Gran Canaria, 29 de mayo de 2023



Foto de portada: lechuga de cultivo hidropónico. Obtenida de la web el horticultor.org

**D. OCTAVIO PÉREZ LUZARDO, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE
CIENCIAS CLÍNICAS DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN
CANARIA,**

CERTIFICA,

Que el trabajo de investigación titulado "Perfil toxicológico de vegetales de hoja consumidos en Canarias: contenido en contaminantes tóxicos (metales pesados y nitratos) y estimación del riesgo", ha sido realizado por Dña. Carmen Verónica Martín León, en el Departamento de Ciencias Clínicas de la Universidad de Las Palmas, bajo su dirección y asesoramiento técnico y científico, y que una vez revisada la presente Memoria, la encuentra apta para su defensa ante tribunal.

Y para que así conste, y surta los efectos oportunos, extiende el presente certificado en Las Palmas de Gran Canaria, a 26 de mayo de 2023.

D. Octavio Pérez Luzardo



**D. LUIS MARÍA DOMÍNGUEZ BOADA CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE
CIENCIAS CLÍNICAS DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN
CANARIA,**

CERTIFICA,

Que el trabajo de investigación titulado "Perfil toxicológico de vegetales de hoja consumidos en Canarias: contenido en contaminantes tóxicos (metales pesados y nitratos) y estimación del riesgo", ha sido realizado por Dña. Carmen Verónica Martín León, en el Departamento de Ciencias Clínicas de la Universidad de Las Palmas, bajo su dirección y asesoramiento técnico y científico, y que una vez revisada la presente Memoria, la encuentra apta para su defensa ante tribunal.

Y para que así conste, y surta los efectos oportunos, extiende el presente certificado en Las Palmas de Gran Canaria, a 31 de mayo de 2023.

D. Luis María Domínguez Boada



**Dña. MARÍA DEL CARMEN RUBIO ARMENDÁRIZ, PROFESORA TITULAR DEL
ÁREA DE TOXICOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA Y
GINECOLOGÍA, PEDIATRÍA, MEDICINA PREVENTIVA Y SALUD PÚBLICA,
TOXICOLOGÍA, MEDICINA LEGAL Y FORENSE Y PARASITOLOGÍA, DE LA
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA,**

CERTIFICA,

Que el trabajo de investigación titulado "Perfil toxicológico de vegetales de hoja consumidos en Canarias: contenido en contaminantes tóxicos (metales pesados y nitratos) y estimación del riesgo", ha sido realizado por Dña. Carmen Verónica Martín León, área de Toxicología del departamento de Obstetricia y Ginecología, Pediatría, Medicina Preventiva y Salud Pública, Toxicología, Medicina Legal y Forense y Parasitología de la Universidad de La Laguna, bajo su dirección y asesoramiento técnico y científico, y que, una vez revisada la presente Memoria, la encuentra apta para su defensa ante tribunal.

Y para que así conste, y surta los efectos oportunos, extiende el presente certificado

en Las Palmas de Gran Canaria, a de 31 mayo de 2023.

Dña. María del Carmen Rubio Armendáriz

Agradecimientos

A mis hijos, Antonio y Carlota por el tiempo robado de su infancia para el desarrollo de esta tesis, fruto de mi ilusión y pasión por la investigación. Gracias por entenderme, apoyarme y ser los mejores hijos del mundo. Espero ser un ejemplo a seguir.

A Antonio, mi marido. Gracias por quererme, ayudarme y cuidarme durante estos veinticinco años. Por darme la fuerza, compañía y tu mirada de reconocimiento a mi capacidad de trabajo. Todo ello ha permitido que consiga terminar esta tesis.

A mis padres y hermano, mi principal fuente de valores en la infancia. Gracias por la educación que he recibido y el apoyo constante sin entender, muchas veces, las decisiones que he tomado.

A mi Yaya, abuela y madre, estás presente todos los días de mi vida.

A mi ángel, mi amiga Iballa, te fuiste demasiado pronto. No has podido estar aquí celebrando conmigo la satisfacción del trabajo bien hecho. Estuviste desde el principio y valoraste todo de mí. Bondad en persona, mi ejemplo a seguir.

A mis amigos, Cris, Tati, Ana, Mapi, Jose, Guada y Mónica. Gracias por cruzarse en mi camino y permanecer en él. Son fuente de aprendizaje diario, apoyo y cariño.

A todos los compañeros que me ayudaron en el estudio: técnicos de laboratorio y demás personal del Laboratorio de Salud Pública de Gran Canaria. Gracias por el esfuerzo realizado durante estos años, por el cariño y respeto que recibo de todos. Son los mejores compañeros que se puede tener.

Gracias a la Dra. Carmen Rubio, co-directora de tesis, por acogerme, apoyarme, coordinar todo a la perfección, por sus enseñanzas continuas y, sobre todo, lo más importante, su tiempo. Lo hemos conseguido juntas.

A todos los miembros del Grupo SERTOx, dirigido por D. Luis Domínguez Boada y D. Octavio Pérez Luzardo. Gracias por acogerme en el grupo y trabajar en el proyecto. Gracias a todos los que han puesto a punto las técnicas analíticas, han participado en los métodos de análisis y en las diferentes etapas de este.

A D. Arturo Hardisson, por su apoyo y confianza. Gracias por compartir horas de trabajo en equipo, conocimiento e inquietudes.

1. Introducción	9
1.1. Los nitratos en vegetales de hoja.	9
1.2. Elementos esenciales, tóxicos y potencialmente tóxicos en vegetales de hoja.	16
1.3. Importancia de la concentración de elementos tóxicos y nitratos en algas.	25
2. Justificación del trabajo de tesis doctoral	28
3. Objetivos	30
4. Metodología	32
4.1. Muestreo	33
4.2. Investigación de Nitratos. Procedimiento experimental.	36
4.3. Investigación de metales y otros elementos. Procedimiento experimental.	37
4.3.1. Proceso experimental para la determinación de elementos esenciales, tóxicos y potencialmente tóxicos en vegetales de hoja.	37
4.3.1.1. Proceso de digestión de muestras.	38
4.3.1.2. Procedimiento de análisis mediante ICP-MS.	38
4.3.2. Proceso experimental para la determinación de metales en algas.	39
4.3.2.1. Proceso de digestión de muestras.	39
4.3.2.2. Procedimiento de análisis mediante AA y Vapor frío.	40
4.4. Análisis estadístico.	43
4.5. Cálculo de la ingesta dietética y estimación del riesgo para la salud.	43
5. Resultados y Discusión	46

Contenido

5.1.	Resultados y Discusión: Artículo 1.	46
5.2.	Resultados y Discusión: Artículo 2.	62
5.3.	Resultados y Discusión: Artículo 3.	72
6.	Publicaciones.	
6.1.	Artículo 1.	96
6.2.	Artículo 2.	105
6.3.	Artículo 3.	117
7.	Conclusiones.	138
8.	Referencias bibliográficas.	141



1. Introducción

1.1. Los nitratos en vegetales de hoja.

Según la autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2008 a, b) que evaluó el riesgo y los beneficios del consumo de productos vegetales de hoja, existe un potencial riesgo toxicológico para la población general debido a su contenido en nitratos. A pesar de ello, el beneficio derivado de este tipo de alimentos supera el riesgo (Cunningham et al., 2013; Habermeyer et al., 2015.)

Diversos estudios establecen que los nitratos obtenidos de la dieta son buenos donantes de óxido nítrico (Kobayashi et al., 2015) y se les ha relacionado con un efecto beneficioso en el sistema cardiovascular (Bondonno et al., 2016; Jackson et al., 2017; Lovegrove et al., 2017), reducen la presión sanguínea (Hobbs et al., 2013) y la agregación plaquetaria (Apostoli et al., 2014), aterosclerosis (Ramms et al., 2016), protegiendo el endotelio cardiovascular (Yang et al., 2017).

A nivel metabólico, promueven un aumento de la insulina y tolerancia a la glucosa (Khalifi et al., 2015), previenen la resistencia a la insulina (Kobayashi et al., 2015) e influyen en los perfiles lipídicos, produciendo una disminución eficiente de los triglicéridos (Zand et al., 2017). También se relacionan con el aumento de la potencia muscular (Jones et al., 2018).

Sin embargo, a pesar de los beneficios citados anteriormente, su exposición excesiva puede tener efectos adversos.

Como se recoge en el informe de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN, 2011), en relación con la evaluación del riesgo de la exposición a nitratos en niños por consumo de acelgas, existe un riesgo para la salud derivado del consumo de vegetales de hoja.

El nitrato per se no es tóxico para los humanos, pero sí lo son sus metabolitos (nitrito, óxido nítrico y compuestos n-nitrosos) que se asocian a la metahemoglobinemia y la carcinogénesis (Brambilla et al., 2007). El porcentaje de conversión de nitrato a nitrito está en torno a un 5-7%, pudiendo llegar al 20% en algunas situaciones (EFSA, 2008 a, b).

Estos compuestos se absorben con una biodisponibilidad aproximada al 100% en la región proximal del intestino delgado y se distribuyen rápidamente dando lugar a altas concentraciones en saliva, suero y orina. El 65-70 % de los nitratos que se ingieren vía



oral se excretan por la orina y el 25% por sangre y saliva. De los que se excretan por la saliva, el 25% se reduce a nitritos por bacterias reductoras que están en la base de la lengua (Gangolli et al., 1994, Lundberg et al., 2008; 1994; AESAN, 2011). Los nitritos de la saliva, debido al pH ácido del estómago, se transforman en ácido nitroso que a su vez se descompone en óxido nítrico (EFSA, 2008 a,b). Como la mayoría de estos compuestos se excretan por orina, hay una reabsorción selectiva por el riñón junto con la reabsorción biliar y salivar (EFSA, 2008 a, b). Los nitratos también se reducen por bacterias entéricas y por la actividad de la enzima nitrato reductasa.

La metahemoglobinemia es una enfermedad caracterizada por la presencia de niveles anormalmente altos de metahemoglobina (Met-Hb) en sangre debido a la reducción del nitrato a nitrito, lo que provoca la oxidación de hemoglobina a metahemoglobina. Esta se produce cuando la velocidad de oxidación de la hemoglobina a metahemoglobina es superior a la capacidad de actuación de la enzima NADH-citocromo b5 metahemoglobina reductasa, encargada de reducir la metahemoglobina a hemoglobina (Herrera et al., 1996), o bien por causas congénitas de carencias de dicha enzima.

La metahemoglobinemia está asociada al “*Síndrome del niño azul*”, en el cual se produce un color gris azulado en la piel de principalmente niños menores de 4-6 meses. Este se origina debido a distintos factores como pueden ser (AESAN, 2011):

- Aumento de la proporción de hemoglobina fetal. Esta es más susceptible de ser oxidada a metahemoglobina por exposición a nitritos.
- pH gástrico elevado. Favorece el crecimiento de bacterias nitrato-reductoras y por tanto la transformación de nitrato a nitrito.
- Actividad reducida de la enzima NADH-citocromo b5 metahemoglobina reductasa.

La metahemoglobina no permite la captación de oxígeno por parte de los hematíes y produce una hipoxia tisular, cianosis (con concentraciones de metahemoglobina < 20%), taquipnea y alteración del estado mental (concentraciones de metahemoglobina > 20%), depresión del sistema nervioso central (concentraciones de metahemoglobina > 50%) y muerte en casos de concentraciones de metahemoglobina > 60-70% (AESAN, 2011).

En España se han dado algunos casos de metahemoglobinemia, todos asociados a consumo de puré casero de verduras almacenados no adecuadamente o por la reconstitución de fórmulas infantiles con aguas de cocción de verduras (AESAN, 2011).

Cuando el agua de bebida tiene una concentración de nitratos menor a 100 mg/L, el riesgo de metahemoglobinemia no es elevado (EFSA 2008 a, b). Sin embargo, en contraposición a esto, a concentraciones menores de la establecida, se dieron dos casos de síndrome del bebé azul en Estados Unidos, en los que los bebés enfermaron después de ser alimentados con fórmulas infantiles reconstituidas con agua de pozos privados conteniendo concentraciones de nitrato de 22,9 y 27,4 mg/l (Knobeloch et al., 2000). Otros estudios también relacionan los nitratos con metahemoglobinemia en niños e hipotiroidismo (Cunningham et al., 2013; Kobayashi et al., 2015; Karwowska et al., 2020).

Los nitratos no tienen asociado poder genotóxico (JECFA, 1998). Sin embargo, sí serán catalogados (categoría 2ª) como probables carcinógenos por el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC, 1978, 2010), debido a que intervienen en la formación de nitrosaminas (Magee et al., 1954). En el caso concreto de los nitritos, se les asocia con una alta incidencia de cáncer de estómago, colorrectal, esofágico, tiroideo renal y mamario (Bondonno et al., 2016; Karwowska et al., 2020).

Aunque los efectos nocivos de los nitratos son amparados por las grandes agencias de seguridad alimentaria europeas, son cuestionados por algunos autores (Van Grinsven et al., 2006; Watson et al., 2015) que recomiendan realizar más estudios que avalen sus efectos sobre la salud humana, principalmente, en lo que se refiere a sus niveles en aguas de bebida.

El 80% del nitrato en la dieta de las personas proviene del consumo de vegetales. Estos vegetales requieren nitrógeno biodisponible para realizar la fotosíntesis (Habermeyer et al., 2015; Hord et al., 2009; Karwowska et al., 2020).

La capacidad de acumular nitrato está en función de la concentración de la enzima nitrato-reductasa en las distintas zonas de la planta, así como del grado de absorción de nitrato y su transferencia a la planta (Santamaria et al., 1999; Hakeem et al., 2017). Hay múltiples factores que influyen en la capacidad de acumulación en el vegetal:

Época de recolección

La intensidad de la luz es un importante factor determinante en la concentración de nitratos en vegetales (Bottex et al., 2008; Aires et al., 2013, Hui et al., 2016).

En Europa la concentración de nitratos en vegetales es generalmente más alta en invierno, debido al menor número de horas de luz y la baja intensidad de esta (Tamme et al., 2010). Según un estudio realizado, el contenido de nitrato en las espinacas fue mayor en otoño e invierno que en primavera (Santamaria et al., 1999). Aunque existen excepciones a esta regla en función de la localización geográfica. Un estudio realizado en Irán mostró como en la época de invierno la concentración de nitratos era menor que en el período de primavera (Shahlaei et al., 2007).

Método de cultivo

La influencia del método de cultivo en la concentración de nitratos en los vegetales está demostrada en numerosos estudios. La composición del suelo es un factor importante en la acumulación de nitratos (Hakeem et al. 2017; Beule et al., 2019). Es generalizado el conocimiento de que su migración hacia la raíz de las plantas se debe a fenómenos de convección (EFSA, 2008 a, b). El tipo de producción es un factor importante (Meng et al., 2017; Tegeder et al., 2018). En los cultivos hidropónicos, que son un sistema de cultivo en agua, en ausencia de suelo, en el que los nutrientes son provistos a través del agua. Los vegetales obtenidos mediante este tipo de cultivos se ha visto que tienen una concentración mayor de nitratos que los cultivados de manera tradicional (Guadagnin et al., 2005).

En el caso de cultivos orgánicos existen más discrepancias entre los contenidos de nitratos presentes en ellos. En este tipo de cultivos, más orientados al proceso que al producto, comparados con los cultivos tradicionales, se utilizan de forma restrictiva fertilizantes y plaguicidas (Ahmed et al., 2017; Li et al., 2017, 2020), al contrario que en estos últimos para los que el uso de este tipo de productos está autorizado (FAO, 2020). Existen diversos estudios en los que se constata que vegetales obtenidos mediante cultivo orgánico tienen una concentración de nitratos menor a los tradicionales, como es el caso del llevado a cabo en muestras de espinacas, en el que, sin especificar concentración ni método analítico, establece menor concentración en cultivos orgánicos analizados los años 1962, 1969 y 1972 (Schuphan et al., 1974).

En esta misma línea, en un estudio comparativo sobre otros 41 análisis llevados a cabo en diferentes muestras de verduras (acelgas, lechugas, espinacas, patatas, entre otras) pudo concluirse que, la concentración de nitratos en verduras de cultivo orgánico es menor que en las de cultivo tradicional, excepto en el caso de las patatas, en las que no se pudieron establecer diferencias entre ambos tipos de cultivos (Woese et al., 1997).

Se llega a la misma conclusión en la revisión bibliográfica de 2006 realizada por Pussemier *et al.*, (2006), para vegetales de hoja ancha y patatas, no encontrándose en el caso de las últimas diferencias significativas entre el método de cultivo orgánico y tradicional.

Para el caso del análisis del contenido en nitratos en lechuga fresca, lechuga iceberg y espinacas frescas y congeladas, utilizando un método de cromatografía líquida de alta resolución, con detector ultravioleta, se encontró que en lechugas frescas de origen orgánico, la concentración de nitratos era menor, comparada con la de producción tradicional (Merino *et al.*, 2017). En el caso de la lechuga iceberg no se pudo demostrar diferencia, postulándose la posibilidad de causas genéticas.

En contraposición con el anterior estudio, en otro trabajo en el que se analizaron muestras de acelgas (entre otros vegetales como espinacas, coliflor, col y berenjenas) recolectadas en granjas y establecimientos de venta de cultivo orgánico (Matallana *et al.*, Parte B, Vol. 3) se encontraron concentraciones de nitratos más elevadas en los vegetales procedentes de cultivo orgánico, que las encontradas en bibliografía referentes a cultivos tradicionales.

Otros autores encontraron en sus investigaciones que las diferencias entre los diversos sistemas de agricultura no eran tan significativas, excepto para vegetales como la lechuga y la rúcula de agricultura hidropónica, donde se encontró una mayor concentración de nitratos, comparados con los que provenían de agricultura tradicional y esta a su vez, mayor que las cultivadas mediante agricultura orgánica (Guadagnin *et al.*, 2005). En este estudio, también se concluyó que los vegetales de cultivo hidropónico tienen un contenido en nitrato más homogéneo en las distintas estaciones.

En un estudio bibliográfico (Santamaria *et al.*, 2006) se concluía que los sistemas sin suelo (cultivos hidropónicos) cuentan con una clara ventaja sobre los sistemas de cultivo tradicionales, debido a una mejor absorción mineral durante las diversas fases del ciclo del crecimiento de la planta, ofreciendo además estos sistemas de crecimiento la ventaja de que permiten la producción de vegetales con baja acumulación de nitrato.

Por otro lado, los vegetales cultivados en invernaderos, se ha visto que tienen una concentración superior de nitratos, comparados con los cultivados al aire libre y en el mismo periodo de tiempo. Esto se explica debido a la baja intensidad de la luz y la alta mineralización de nitrógeno (Gangolli *et al.*, 1994).

Diferente distribución según la zona de la planta

Según un informe de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA 2008 a, b), la distribución de nitratos en las diversas partes de un producto vegetal no es uniforme. Si se quita el tallo y la nervadura central, el contenido de nitratos disminuye entre un 30-40% en lechugas y espinacas. La concentración de nitratos en ciertas partes del vegetal, como los peciolos y tallos, tiende a ser mayor que en las hojas. Lo mismo ocurre en órganos viejos, donde la concentración es mayor debido a que la actividad enzimática es menor.

En un estudio en el que se analizaron varios tipos de vegetales (coliflor, hojas y raíces de rábano, hinojo, nabos, perejil, pepino, berenjena, berros, patatas y remolacha), mostraba una mayor concentración de nitratos en ciertas partes del vegetal como los peciolos (entre 1500 y 3000 mg/kg) y menor en bulbos (1000-1500 mg/kg). El contenido en nitrato de los frutos superaba al de los tubérculos (estos últimos en torno a 500-1000 mg/kg) (Shahlaei et al., 2007).

Otro trabajo de revisión bibliográfica sobre 41 estudios del contenido de nitrato en diversos tipos de vegetales sin especificar, estableció mayores niveles de este en hojas, raíces y tubérculo nitrofilico (Woese et al. 1997). A la misma conclusión llegan los estudios de Ianmarino et al., 2014; Quijano et al., 2017; Kmecl et al., 2019; Salehzadeh et al., 2020.

De forma general, los datos proporcionados en el estudio de revisión bibliográfica realizado por Santamaria (2006) establecieron que la concentración de nitratos, en función de la zona de la planta (en este caso se estudió la rúcula), es mayor en bulbos, raíces, brotes, florescencia y tubérculos, siendo para las hojas su concentración mayor en externas que en internas. En el caso concreto de las acelgas, se acumuló más nitrato en el peciolo, en comparación con la nervadura central.

En otros trabajos realizados con especies vegetales de berros, lechuga y rúcula, se encontró mayor contenido de nitratos en tallos, comparado con el resto de las partes de la planta (Guadagnin et al., 2005).

Influencia del procesado

El nitrato es soluble en agua, por lo que lavando las hojas de los vegetales durante tres minutos se puede disminuir entre un 10-15% los niveles de este (Wai et al., 2011).

El procesado de los vegetales, por ejemplo, la congelación y procesos en los que se aplican elevadas temperaturas, también van a afectar a la concentración de nitrato presente en el producto final. Cuando los vegetales son sometidos a procesos térmicos como la cocción, se produce una disminución del contenido (Tamme et al., 2010).

La eliminación del tallo y nervadura central permite disminuir entre un 30-40% la concentración de nitratos. En lo que respecta al almacenamiento, es importante destacar que la refrigeración (7 días a 5°C) hace que se mantenga la concentración de nitrato, sin que se eleve. Además, se sabe que un almacenamiento inadecuado de hortalizas de hoja cocidas, por ejemplo, verduras almacenadas a temperatura ambiente durante largos períodos de tiempo, puede resultar en la conversión de nitrato a nitrito, conversión que puede verse acelerada cuando estas hortalizas están en forma de puré (AESAN, 2011).

Además de la localización, el contenido de nitrato puede diferir entre especies y variedades de plantas (Tang et al., 2018; Tegeder et al., 2018).

Debido a los mecanismos de toxicidad de los nitratos, las organizaciones internacionales de seguridad alimentaria han intentado establecer un límite máximo permitido. Así la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) han fijado la ingesta diaria admisible (IDA) de nitratos en 3,7 mg/Kg/ peso corporal (pc) /día (JECFA, 1998).

También se han establecido límites máximos de residuos para determinados tipos de alimentos que tienden a acumular altas concentraciones de nitratos, como son las espinacas, la lechuga, la rúcula, cereales y alimentos a base de cereales para lactantes y niños.

El contenido de nitratos en vegetales de hoja está regulado a través del Reglamento (UE) 915/2003 de la Comisión de 25 de abril de 2003, relativo a los límites máximos de determinados contaminantes en los alimentos y por el que se deroga el Reglamento (CE) nº1881/2006.

Este reglamento fija, además, en los vegetales anteriores, distintas concentraciones máximas de nitrato en función de la época de recolección, estableciendo dos temporadas:

* Temporada de invierno: Desde el 1 de octubre al 31 de marzo

* Temporada de verano: Desde el 1 de abril al 30 de septiembre

1.2. Elementos esenciales, tóxicos y potencialmente tóxicos en vegetales de hoja.

Como se dijo en el apartado anterior, los vegetales de hojas verdes son componentes indispensables de la dieta humana, ya que son fuentes relevantes de elementos esenciales (Hierro (Fe), Zinc (Zn), Cobre (Cu), Selenio (Se), Manganeseo (Mn), Molibdeno (Mo), Cobalto (Co)) (Watson et al., 2015) porque una ingesta insuficiente provoca deficiencias funcionales. Sin embargo, la seguridad en el consumo de los vegetales de hoja verde también es motivo de preocupación, ya que se ha demostrado que estas verduras acumulan metales pesados altamente tóxicos en mayor medida que otras verduras (Salehipour et al., 2015). Así, por ejemplo, el consumo de hortalizas de hoja se ha identificado como una fuente importante de Cadmio (Cd) en humanos, (Al Jassir et al., 2005; McBride et al., 2013; Zhu Huang et al., 2014; Huang et al., 2017; Rehman et al., 2017), Plomo (Pb) (Fernando Guerra et al., 2011; McBride et al., 2014; Ghasamidehkordi et al., 2018), Arsénico (As) (McBride et al., 2014) y Mercurio (Hg) (De Temmerman et al., 2009; Zhu Huang et al., 2014; Yang et al., 2019).

Cadmio.

El Cd es un metal pesado que no tiene funciones nutricionales ni fisiológicas en animales o humanos. Se encuentra en el medioambiente de forma natural, asociado a minerales como el Zn, Cu o Pb. Está presente en este medio como consecuencia de emisiones volcánicas, erosión y por la actividad antropogénica (polución y emisiones industriales) (AESAN, 2023).

La persistencia del Cd en el medio ambiente es muy larga (entre 10 y 40 años) y en el cuerpo humano representa un factor tóxico adicional (Vahter et al., 1996).

En el aire se presenta en forma de partículas en suspensión como producto de la emisión industrial.

En el agua puede aparecer como ion libre o formando complejos. Los ríos transportan grandes cantidades que pueden mantenerse 15.000 años.

En el suelo está presente debido a fuentes naturales o bien como consecuencia de la actividad humana. En ese medio es mucho más móvil y puede estar en forma soluble o insoluble (AESAN, 2023).

El Cd es un metal que induce daño tisular. Debido al estrés oxidativo es nefrotóxico y daña el túbulo renal. Puede causar el deterioro de la función mitocondrial y por su naturaleza divalente puede competir con elementos esenciales como el Zn (Moulis et al., 2010; Bernhoft et al., 2013). Algunos estudios muestran que, a mayor suministro de Zn, se produce una disminución de la absorción y acumulación del Cd, permitiendo una prevención o reducción de las acciones adversas que el Cd genera en el organismo (Brzóska et al., 2001).

Las mujeres son más propensas a verse afectadas por la toxicidad del Cd ya que presentan mayores tasas de absorción, comparado con los hombres. Esto se asocia a una disminución de reservas corporales de hierro (Fe). Para evitar una disfunción renal, el nivel máximo tolerable se ha establecido en 50 $\mu\text{g/g}$ de peso húmedo, correspondiéndose con una excreción urinaria de Cd de 2 μg al día (Satarug et al., 2000).

El Cd ha sido clasificado como un potencial carcinogénico por la IARC en 1993 (AESAN, 2023).

El consumo de productos marinos como algas, pescado o mariscos es una fuente importante de exposición a Cd (Rubio et al., 2006; EFSA, 2009). Aunque no deja de ser importante otras fuentes de exposición como lo es el agua potable, el tabaquismo y la exposición ocupacional (Vahter et al., 1996; AESAN, 2023).

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha fijado un nivel tolerable ingesta semanal (TWI) de Cd en 2,5 $\mu\text{g/kg}$ peso corporal/semana (EFSA, 2009). Además, en su informe científico sobre la exposición de cadmio a través de la dieta en la población europea del 18 de enero de 2012 (EFSA, 2012), establece altos niveles de cadmio en complementos alimenticios a base de crustáceos, moluscos y algas entre otros. Confirmando en esta revisión que es necesario reducir la exposición al cadmio principalmente en niños y adultos de alto consumo de los alimentos citados.



En consecuencia, es evidente la necesidad de un control y seguimiento del Cd en alimentos y medio ambiente, principalmente en población de riesgo (niños, embarazadas, población de alto consumo, entre otros) (Coni et al., 1992).

Actualmente en la UE hay establecidos límites máximos en determinados alimentos en el Reglamento (UE) 915/2003 de 25 de abril de 2003. Además, la Comisión Europea ha emitido una Recomendación (UE) 2014/193 sobre la reducción del cadmio en productos alimenticios y Recomendación (UE) 2018/464, relativo al control de metales y yodo en algas marinas, plantas halófilas y productos a base de algas, instando a participar activamente en el seguimiento periódico de las medidas de mitigación aplicadas.

AESAN (2023) ha publicado unas recomendaciones de consumo relativas a crustáceos para así disminuir la exposición al Cd en aquellos consumidores habituales de marisco. En la cual se recomienda limitar el consumo de carne oscura de crustáceos, localizada en la cabeza.

Plomo.

Según la AESAN 2023, el plomo es un contaminante medioambiental cuya forma inorgánica es la más común en el medioambiente.

Los compuestos de plomo son liberados a la atmósfera debido a la actividad minera, fundición, fábrica de baterías y municiones, canalizaciones de agua, pinturas y gasolina (autorizado antiguamente).

En el agua está asociado a diversos materiales o en su forma iónica.

Las formas de presentación del plomo en el medioambiente son dos:

- Orgánica (formando parte de combustibles como la gasolina). Son los compuestos más tóxicos. Su exposición está centrada en entornos laborales.
- Inorgánica, siendo el más abundante en el medio y alimentos. Se absorbe más fácilmente en el organismo.

Se encuentra en altas concentraciones en frutas, verduras y cereales, como resultado de la deposición de Pb atmosférico (Nordberg et al., 2007; Rubio et al., 2004).

El Pb es uno de los metales más tóxicos que se conocen; se considera cancerígeno (Grupo 2B) para humanos (ATSDR, 2021).

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), en el año 2006, clasifica los compuestos de plomo inorgánico como probables carcinogénicos (IARC, 2006).

En adultos, causa enfermedades cardiovasculares, del sistema nervioso central, renales y problemas de fertilidad (Kumar et al., 2020).

Puede producirse una recirculación de este elemento durante el embarazo y provocar efectos neurológicos en el feto e incluso aborto (AESAN, 2023).

En los niños se ha observado efectos en el desarrollo cerebral, disminuyendo el coeficiente intelectual y produciendo cambios en el comportamiento (AESAN, 2023).

EFSA y JECFA, en el año 2010, ante la falta de evidencia de umbrales de toxicidad, consideraron apropiado retirar el umbral de seguridad toxicológica existente ya que no hay información científica suficiente para establecer uno nuevo. Por lo que no hay ingesta tolerable recomendada para el plomo. Recomiendan identificar las principales fuentes de plomo en la dieta (EFSA, 2010).

Las medidas legales tomadas por la UE para reducir la exposición al plomo son:

Reglamento (UE) 915/2023 de 25 de abril de 2023 relativo a los límites máximos de determinados contaminantes en los alimentos y por el que se deroga el Reglamento (CE) nº 1881/2006. Esta es la medida más eficaz para reducir la exposición.

Además, como en el caso del Cd, la Comisión Europea emitió la Recomendación (UE) 2018/464 de 19 de marzo de 2018, en la que insta a los Estados Miembros a controlar la presencia del plomo durante los años 2018-2020 y proponer nuevas medidas de gestión.

Por otro lado, el Comité Científico de AESAN en el año 2012, indicó que es necesario hacer una serie de recomendaciones para el consumo de carne de caza, ya que este tipo de alimento está sometido a un mayor riesgo por el tipo de munición empleada en dichas actividades (AESAN, 2023).

Mercurio.

El mercurio es un elemento químico que está presente de forma natural en la corteza terrestre como cinabrio o sulfuro de mercurio, también está presente como una impureza

de otros minerales como la pirita. Se puede encontrar en tres formas distintas: metálica (o elemental), en forma inorgánica y en forma orgánica (AESAN, 2023).

Este elemento es liberado al medio como consecuencia de procesos naturales como la actividad volcánica o erosión. Aunque también puede ser liberado por la acción del hombre a través de actividades industriales, eliminación de residuos, etc. Está presente en numerosos utensilios de la vida diaria como lámparas fluorescentes, aparatos eléctricos, amalgamas dentales, etc. (AESAN, 2023).

El mercurio metálico es muy volátil, está en la atmósfera y tiene una gran estabilidad.

El mercurio inorgánico, está en el suelo y procede de la reducción del mercurio metálico.

El mercurio orgánico está principalmente en forma de metilmercurio y dimetilmercurio en el agua. Procede de la metilación del mercurio inorgánico, bien por acción bacteriana o por reacción química directa. Este metilmercurio es el componente orgánico del mercurio más común en la cadena alimentaria. Se encuentra principalmente en pescados y mariscos, donde puede representar más del 90 % del mercurio total (AESAN, 2010).

El Hg se puede encontrar en forma de diferentes compuestos químicos de relevancia toxicológica (Carocci et al., 2014). Los compuestos de metilmercurio pueden causar daño cerebral, trastornos psicológicos, sordera, pérdida de la visión y de las habilidades motoras, etc.

Después de una ingestión, el metilmercurio se absorbe más rápido que el mercurio inorgánico debido a su naturaleza lipofílica, por lo que atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica y la placenta (AESAN, 2023).

Los compuestos inorgánicos de mercurio pueden dañar los riñones, el hígado y el cerebro (EFSA, 2012).

La primera evaluación del riesgo se realizó en 1972 por el Comité de expertos FAO/OMS y desde entonces se ha reevaluado en varias ocasiones.

En Europa, la EFSA también ha llevado a cabo varias evaluaciones del riesgo:

- Opinión científica sobre riesgos para la salud pública relacionados con el contenido de mercurio y metilmercurio en alimentos (EFSA 2012).

- Opinión científica sobre los beneficios para la salud derivados del consumo de pescado y mariscos, estableciendo una relación de riesgo asociado a la exposición al metilmercurio (EFSA 2014).
- Informe sobre los beneficios de consumo de pescado y marisco comparando los riesgos del metilmercurio (EFSA 2015).

En España, el Comité Científico de la Agencia Española de Consumo y Seguridad Alimentaria (AESAN), en el año 2010 elaboró el “Informe del Comité Científico de la AESAN en relación a los niveles de mercurio establecidos para los productos de la pesca”.

La EFSA (en 2012) ha fijado valores TWI (ingesta tolerable semanal) de 4 µg/kg peso corporal/semana (Hg inorgánico) y 1,3 µg/kg peso corporal/semana (metilmercurio). Para el cálculo de estos valores sólo ha utilizado como única fuente de exposición, los productos de la pesca, descartando el resto de los alimentos.

La legislación existente para el control del mercurio en alimentos se centra en productos e la pesca y complementos alimenticios (Reglamento (UE) 915/2023).

Independientemente de la existencia de un riesgo para la salud, AESAN establece una recomendación del consumo de pescado por sus beneficios para la salud, al igual que la EFSA en su opinión científica del año 2014 y 2015.

Arsénico.

El arsénico (As) es un metaloide (con propiedades tanto metálicas como no metálicas) presente en la naturaleza de forma natural (por la actividad volcánica entre otros) y por acción del hombre (emisiones industriales, herbicidas, combustibles fósiles, etc.).

Puede estar en forma inorgánica (As (III) y As (V)) y orgánica. La forma inorgánica es la más tóxica y la fuente de exposición es la ingesta de alimentos y agua.

Desde el punto de vista toxicológico, los compuestos de As se clasifican en tres grupos (AESAN, 2009):

- Inorgánicos: As (III); As (V).

- Orgánicos: ácido arsánico, ácido monometilarsónico (MMA), ácido dimetilarsónico (DMA), trimetilarsina óxido (TMAO), arsenobetaina (AsB), arsenocolina (AsC) y los arsenozúcares.
- Gas arsina y arseniuro de hidrógeno: volátiles no disponibles en alimentos.

La toxicidad de los compuestos de As depende de su forma química y de su estado de oxidación, siendo los inorgánicos mucho más tóxicos.

Aunque la determinación de especies arsenicales es muy importante, se prioriza en la determinación de As total y sólo cuando supere el umbral se afrontará la especiación.

En el agua está presente en forma inorgánica, al contrario que en el suelo que es la forma orgánica la más común. Debido a esto hay plantas como el arroz que absorben grandes cantidades de arsénico, lo que conlleva un alto contenido en piensos y alimentos.

Una exposición prolongada al arsénico inorgánico puede causar lesiones cancerígenas en la piel, cáncer de vejiga y pulmón. La IARC lo clasifica en el grupo I de cancerígenos en humanos.

Se estableció su potencial carcinogénico en 1987 por la IARC y en el grupo de trabajo Scoop en 2004, evaluó el riesgo por exposición al arsénico total (orgánico) en pescado principalmente.

Los humanos y animales absorben el As inorgánico en el tracto gastrointestinal principalmente y la sangre es el principal vehículo.

El As inorgánico puede atravesar la placenta y se puede excretar por la leche. La barrera hematoencefálica no es atravesada fácilmente (AESAN, 2023).

No hay un punto de referencia toxicológico para el arsénico debido a la falta de datos disponibles respecto a la concentración de arsénico inorgánico en la dieta. La EFSA y la JECFA han adoptado el margen de exposición (MOE) que es un ratio entre la dosis a la que no se observan efectos adversos (BMD, NOAEL) dividido entre el nivel de exposición real a la sustancia a través de la dieta.

Según la EFSA, la exposición global de arsénico, en todas las fuentes posibles, está en un rango muy pequeño, pero no descarta un riesgo para la salud en ciertos consumidores.

La Comisión Europea ha establecido un programa para recopilar información sobre la presencia de arsénico y sus formas químicas desde el año 2016 al 2018. Tras este programa se emite la Recomendación (UE) 2018/464 de 19 de marzo para el control de este elemento entre otros en algas marinas, plantas halófilas y productos a base de algas marinas, instando a recopilar datos de As en estos productos para así actualizar los límites existentes y añadir nuevos alimentos.

Esta última recomendación ha puesto de manifiesto que las algas de variedad Hijiki presentan un elevado contenido en arsénico inorgánico. Mismo planteamiento se puede extraer del informe del Comité científico de la AESAN sobre la presencia de arsénico en algas destinadas al consumo humano (AESAN 2009).

Por primera vez en la UE, se ha fijado unos límites máximos de As inorgánico en arroz y productos derivados del arroz, Reglamento (UE) 915/2023 de la Comisión de 25 de abril de 2023.

En España se encuentra regulado el contenido máximo de As aguas de consumo humano en el Real Decreto 3/2023, de 10 de enero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano, su control y suministro, en el que el máximo de As en aguas es 10 µg/L.

Aluminio.

El aluminio (Al) es un metal tóxico que no tienen efectos fisiológicos y es clasificado por la IARC en el año 2020 como carcinógeno en humanos. Tiende a acumularse en el cuerpo humano en tejidos, cerebro, huesos, riñón e hígado.

En la revisión realizada por Hardisson et al., 2017 se concluye que el Al es un metal tóxico que interfiere con ciertos elementos esenciales como el calcio (Ca). Es capaz de reemplazar el calcio e interrumpir procesos de mineralización y crecimiento óseo. Además, es un agente neurotóxico y aumenta la probabilidad de desarrollar Alzheimer, daños cognitivos y enfermedades neurológicas. Esta probabilidad aumenta en aquella población con problemas renales ya que el riñón es un órgano clave en el proceso de excreción del Al.

La presencia de Al en hortalizas y frutas depende del agua de riego y de los suelos donde crecen. Como en el caso de los nitratos, dependiendo de la especie, el Al puede acumularse en diferentes partes de la planta.

La EFSA en el 2011, ha fijado una ingesta semanal tolerable (TWI) de 1 mg/kg peso corporal/semana.

Elementos potencialmente tóxicos.

El consumo de hortalizas de hoja pueden generar riesgos para la salud debido a su contaminación con otros elementos potencialmente tóxicos como los elementos de tierras raras (REE) y otros elementos clasificados en este trabajo de tesis como elementos menores (MEs), cuya presencia en el medio ambiente es cada vez mayor.

Múltiples factores pueden aumentar la acumulación de elementos tóxicos y potencialmente tóxicos en el medio ambiente y los cultivos, como el uso intensivo de agroquímicos, la aplicación de lodos de depuradora a las tierras de cultivo, la contaminación atmosférica (Radwan et al., 2006; Ali et al., 2012) y la eliminación de productos electrónicos.

Muchos de estos elementos están incluidos en la lista de contaminantes prioritarios desarrollada por la Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades (ATSDR, 2021). Estos nuevos “elementos esenciales” para la industria están siendo estudiados en cuanto a su toxicidad ya que se ha observado que su presencia en los seres vivos ha ido en aumento en los últimos años (Jiang et al., 2012; Li X et al., 2013; Amyot et al., 2017; González et al., 2017; Henríquez et al., 2017; Liu et al., 2017; Cabrera et al., 2020; Henríquez et al., 2020; Shi et al., 2022).

Según los estudios epidemiológicos y experimentales disponibles, el rango de acciones tóxicas va desde el daño celular, la interferencia con enzimas, proteínas y macromoléculas, y el daño a los orgánulos celulares, entre otros efectos, e incluso la carcinogénesis (Tchonnwou et al., 2012).

Para el grupo REE se han reportado diferentes efectos adversos para la salud (Pagano et al., 2015), como una asociación con la proliferación celular (Jenkins et al., 2011), alteraciones en la diferenciación estrogénica (Liu et al., 2012), promoción de la peroxidación lipídica (Rico et al., 2013), formación de especies reactivas de oxígeno (I,

R et al., 2012) y disminución del contenido de hemoglobina (Henríquez et al., 2017), entre otros.

Aunque existen pocos estudios, se ha descrito que el polvo sahariano, y en general el material particulado (PM10, PM2.5) (Directiva 2008/50/CE), pueden transportar elevadas cantidades de algunos elementos (Remoundaki et al., 2011; Bozlaker et al., 2013), entre ellos REE (Bozlaker et al., 2013; Henríquez et al., 2017; Henríquez et al., 2018).

1.3. Importancia de la concentración de elementos tóxicos y nitratos en algas.

El consumo de algas ha sido durante mucho tiempo parte de la dieta tradicional en Asia y actualmente está creciendo en popularidad en el mundo occidental. Según la Organización de las Naciones Unidas para Alimentación y la Agricultura (FAO), la producción de algas en Europa está en un 10% de la producción mundial (Bouga et al., 2015; McHugh et al., 2003; Organic Monitor, 2014). La industria mundial de algas factura más de 6 millones de dólares al año y más del 99% se producen en Asia, principalmente China (FAO 124:120).

Las algas comestibles se pueden clasificar en cuatro grandes grupos: algas azules, rojas, pardas y verdes.

Las algas destacan por su contenido en vitamina B12, ácidos grasos omega-3, selenio, yodo y fibra (MacArtain et al., 2008). Sin embargo, además de nutrientes de alto valor, son capaces de transferir metales tóxicos para el consumidor como cadmio (Cd), plomo (Pb) o mercurio (Hg). Estos elementos de relevancia toxicológica están presentes en las aguas marinas como contaminantes, los cuales son caracterizados por su bioacumulación en la cadena trófica.

La EFSA (2009) ha fijado un nivel tolerable de ingesta semanal (TWI) de Cd de 2,5 µg/kg persona/semana.

También destaca el contenido de nitratos (NO₃⁻) a partir de fuentes naturales (ciclo del nitrógeno) y fuentes antropogénicas (fertilizantes, ganadería intensiva, aguas residuales, etc.) (Boroujerdnia et al., 2007; Karwowska et al., 2020; León et al., 2020).



Al ser organismos autótrofos que realizan la fotosíntesis, utilizan el nitrógeno y sus derivados para ciclos biológicos, por lo que concentran mayor cantidad de nitratos. A pesar de ello, son un alimento que carece de límites legales para nitratos y esto representa un riesgo para los consumidores. Así la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la EFSA establecen una ingesta diaria admisible (IDA) de 3,7 mg/kg peso corporal/día para nitratos (JECFA, 1998), cantidad que sigue vigente a pesar de varias reevaluaciones de la EFSA (2017).

Un estudio de Rubio et al., 2021, destaca la importancia del control de otra alga azul, la espirulina. Esta especie de cianobacterias filamentosa y multicelular crece en medios alcalinos y ha ganado popularidad porque se considera un alimento funcional con alto valor nutricional (Soni et al., 2017), por lo que se puede encontrar en el mercado en diferentes formas de presentación con dosis recomendadas variables según fabricante.

En este estudio (Soni et al., 2017) se concluye que no supone un riesgo para el consumidor en cuanto a la exposición de metales tóxicos como el Al, Cd y Pb, pero debe controlarse la presencia de éstos en preparados de espirulina para garantizar la calidad y seguridad.

El Reglamento (UE) 915/2023 de la Comisión establece un límite máximo para el Pb en complementos alimenticios de 3,0 mg/kg de peso húmedo.

En este sentido, un estudio realizado por la Comunidad Autónoma de Cataluña para la Recomendación (UE) 2018/464, pone de manifiesto que las algas de la variedad *Hijiki* presentan un elevado contenido de arsénico inorgánico. Esto viene a refrendar lo que establece el informe del Comité Científico de la AESAN 2009 sobre la presencia de arsénico en algas destinadas al consumo humano, publicado en 2009.

Aunque España no es un país de alto consumo de algas, sí que hace unas recomendaciones relativas al consumo de alga *Hijiki* por presencia de arsénico inorgánico.

Esta alga (*Hijiki*), se utiliza en restaurantes japoneses y coreanos (no en chinos), para la preparación de sopas y ensaladas. Su procesado disminuye el contenido de As total entre el 68-73% y un 61-73% el As inorgánico. Aunque es una afirmación no compartida por diversos autores, en la que señalan que estos procedimientos no disminuyen la concentración (AESAN, 2023).



Aunque no se han detectado efectos tóxicos debido al consumo de estas algas, diversas agencias alimentarias aconsejan evitar el consumo de esta alga Hijiki por su elevado contenido en As inorgánico.



2. Justificación del Trabajo de Tesis Doctoral

Justificación del trabajo de tesis doctoral



En el apartado “Introducción” de este trabajo de Tesis Doctoral se describe la existencia de ciertos vegetales que no son regulados explícitamente en lo que respecta a elementos tóxicos y nitratos.

En el caso de los nitratos, el contenido de estos puede ser muy elevado y su consumo es considerable en ciertas regiones. Los vegetales más consumidos a nivel europeo son principalmente la lechuga y las espinacas, por lo que la declaración de la EFSA se basó únicamente en dichos vegetales y su regulación se realizó a través del Reglamento (UE) nº 915/2023).

En España hay un consumo importante en acelgas, que dentro de la UE es casi exclusiva en nuestro país (AESAN, 2011). Además, dentro de España hay regiones donde por tradición culinaria se elaboran otros vegetales ricos en nitratos como es el caso del berro (*Nasturtium officinale*) en las Islas Canarias. En este archipiélago, el consumo de acelgas y berros es tan alto como el de espinacas y lechugas (Serra et al., 2000; AECOSAN, 2011; AECOSAN, 2014). Actualmente no hay un límite legal establecido de nitratos para las acelgas y los berros.

Respecto al contenido de elementos tóxicos y potencialmente tóxicos, en Canarias se dan varias circunstancias que podría aumentar el riesgo de contaminación de elementos anteriormente citados. Por un lado, esta región tiene un alto uso de productos pesticidas, que se considera uno de los más altos de Europa. Según cálculos, en 2001 Canarias consumía 12 veces más pesticidas por hectárea que el resto de España (Díaz et al., 2001), y la situación no ha mejorado 20 años después (Alonso et al., 2021). Además de la aplicación de agroquímicos u otras prácticas que podrían incrementar el número de elementos en las tierras de cultivo, la intrusión de polvo sahariano (llamado "calima") se presenta con frecuencia durante todo el año en este archipiélago. Aunque existen pocos estudios, se ha descrito que el polvo sahariano, y en general el material particulado (PM10, PM2.5) (Directiva 2008/50/CE), pueden transportar altas cantidades de algunos elementos (Remoundaki et al., 2011; Bozlaker et al., 2013), incluyendo REE (Elementos de Tierras Raras) (Henríquez et al., 2017; Bozlaker et al., 2013; Henríquez et al., 2018), por lo que una hipótesis plausible es que la llegada frecuente de “calima” a Canarias podría influir en el contenido de todos estos elementos en los vegetales cultivados localmente.

Justificación del trabajo de tesis doctoral



Por otro lado, como vegetales de hoja con un consumo en alza, están las algas. Éstas son organismos autótrofos que realizan la fotosíntesis; es decir, por su propia naturaleza, utilizan el nitrógeno y sus derivados para sus ciclos biológicos. Por lo tanto, estos organismos concentran mayores cantidades de nitratos. A pesar de ello, las algas son un alimento que, hasta la fecha, no se le han asignado límites legales de nitratos, y esto representa un riesgo para los consumidores.

Ocurre lo mismo con el contenido en elementos tóxicos, existen pocos estudios que determinen la cantidad de Pb, Cd y Hg en algas, y a su vez que permitan evaluar la contribución a las ingestas permitidas y por tanto establecer una regulación de los límites permitidos.



3. Objetivos



1

Determinar los niveles de nitratos en vegetales de hoja verde cultivados en Canarias, regulados y no regulados, siguiendo un patrón estacional y diferenciando el sistema de producción.

2

Estimar la contribución de cada tipo de vegetal a la ingesta de nitratos por parte de la población canaria y realizar una evaluación del riesgo asociado al consumo de vegetales, cuyo contenido máximo de nitrato está regulado en comparación con el riesgo asociado a los no regulados.

3

Determinar el contenido de metales tóxicos (Cd, Pb, Hg) y nitratos en las diferentes especies de algas comestibles comercializadas en Europa.

4

Evaluar la contribución de cada tipo de alga a la ingesta permitida de estos elementos tóxicos.



5

Determinar los niveles de elementos esenciales, tóxicos y potencialmente tóxicos (48 elementos) en vegetales de hoja verde cultivados en Canarias.

6

Estimar la contribución de cada tipo de vegetal a la ingesta de estos elementos esenciales, tóxicos o potencialmente tóxicos, por parte de la población canaria.



4. Metodología

Tras el desarrollo de un estudio analítico basado en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector de diodo array (PDA), para el análisis de nitratos, y un estudio analítico de espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente y espectrofotometría de absorción atómica, para determinar distintos tipos de elementos en muestras de distintos tipos de vegetales de hoja y algas. Se evalúa el riesgo asociado al consumo de estos vegetales por el aporte de nitratos y determinados elementos químicos.

Los vegetales de hoja estudiados fueron: berros (*Nasturtium officinale*), acelgas (*Beta vulgaris*), espinacas (*Spinacia oleracea*), cogollos de Tudela, canónigos, rúcula (*Eruca vesicaria*), mezclas de vegetales de cuarta gama, brotes de lechuga, lechuga romana (*Latuca sativa. longitolia*), Lechuga iceberg (*Latuca sativa*) y algas (Tabla 2).

Los elementos químicos analizados fueron organizados en tres grupos:

Elementos esenciales, considerados así porque su déficit puede causar deficiencias funcionales en el organismo, las cuales pueden revertirse si se vuelve a una ingesta adecuada (Wada et al., 2004; Platel et al., 2016; Gupta et al., 2019):

Hierro (Fe), Zinc (Zn), Cobre (Cu), Selenio (Se), Manganeseo (Mn), Molibdeno (Mo) y Cobalto (Co).

Elementos tóxicos: así demostrado y cuya presencia en vegetales de hoja ha sido relevante (McBride et al., 2013; Rehman et al., 2017). Cadmio (Cd), Plomo (Pb), Arsénico (As) y Mercurio (Hg).

Elementos potencialmente tóxicos: Plata (Ag), Aluminio (Al), Bario (Ba), Berilio (Be), Cromo (Cr), Níquel (Ni), Antimonio (Sb), Estaño (Sn), Estroncio (Sr), Talio (Tl), Uranio (U), **Tierras raras (REEs):** Cerio (Ce), Disprobio (Dy), Erblio (Er) (Erblio), Europio (Eu), Galio (Ga), Gadolinio (Gd), Holmio (Ho), Indio (In), Lantano (La), Lutecio (Lu), Niobio (Nb), Praseodimio (Pr), Samario (Sm), Tantalio (Ta), Terbio (Tb), Tulio (Tm), Itrio (Y), Iterbio (Yb). **Elementos minoritarios (MEs):** Oro (Au), Bismuto (Bi), Platino (Pt), Torio (Th) y Vanadio (V).

Como datos de referencia se utilizan los relativos al consumo de vegetales de hoja aportados por las encuestas ENCA (Serra et al., 2000) y ENALIA (AECOSAN, 2014), teniendo presente el dato de ingesta diaria admisible (IDA) establecido por el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA, 2002).



4.1. Muestreo

En esta investigación se estudiaron un total de 297 muestras de vegetales de hoja, según el patrón de consumo en Canarias (AECOSAN, 2011, 2014, Serra et al., 2000.). El muestreo se realizó entre marzo del año 2016 a septiembre del año 2019 y se diferencia por periodos, según el período invernal (producto recolectado del 1 de octubre al 31 de marzo) y el período estival (productos recolectados del 1 de abril al 30 de septiembre) y siempre que hubiera disponibilidad se muestrearon vegetales de cultivo tradicional y ecológico (Tabla 1). De esta forma, se adquirió 60 muestras de berros (24 ecológicos y 36 convencionales); 45 muestras de acelgas (17 ecológicas y 28 convencionales); 53 muestras de lechuga romana (todas de producción convencional); 38 muestras de lechuga iceberg (12 ecológicas y 26 convencional); 15 muestras de Cogollos de Tudela (6 ecológicas y 9 convencionales); 22 muestras de mezclas para ensaladas (también llamadas “ensaladas listas para comer” o “Ensaladas de 4ª gama”, todas de producción convencional); 14 muestras de rúcula (todas de producción convencional); y 50 muestras de espinacas (17 ecológicas y 33 convencionales).

Las muestras de vegetales se adquirieron en los grandes supermercados que abastecen la mayor parte población canaria (Figura 1). En el caso de muestras de agricultura ecológica, fueron adquiridos en establecimientos especializados en productos orgánicos.

El muestreo se planteó según los criterios establecidos en Reglamento (CE) nº 1882/2006 de la Comisión, por el que se establece el muestreo y métodos de análisis para el control oficial del contenido de nitratos en determinados productos alimenticios.

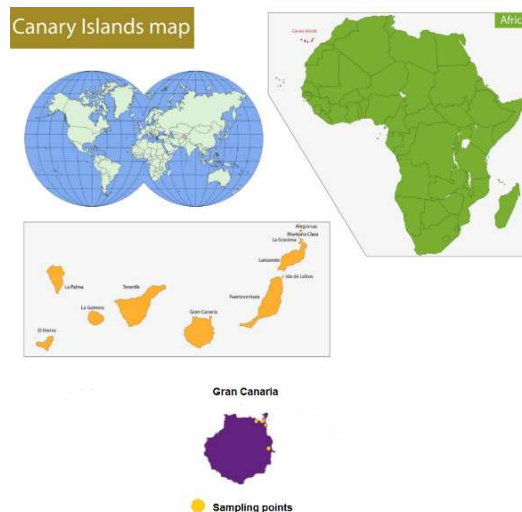


Figura 1: Mapa de muestreo



Tabla 1. Características de las muestras de vegetales analizados.

Especie	Nombre común	Tipo de cultivo	Nº de muestras
<i>Nasturtium officinale</i>	Berros	Ecológico	24
		Convencional	36
<i>Beta vulgaris</i>	Acelgas	Ecológico	17
		Convencional	28
<i>Latuca sativa longitolia</i>	Lechuga Romana	Convencional	53
<i>Latuca sativa</i>	Lechuga Iceberg	Ecológico	12
		Convencional	26
<i>Latuca sativa longitolia</i>	Cogollo de Tudela	Ecológico	6
		Convencional	9
-	Ensalada 4ª Gama	Convencional	22
<i>Eruca vesicaria</i>	Rúcula	Convencional	14
<i>Spinacia oleracea</i>	Espinacas	Ecológico	17
		Convencional	33

Para el caso de las algas, se estudiaron 72 muestras de algas comestibles (verde, parda y roja) comercializadas en Tenerife (Islas Canarias) y adquiridas en diferentes zonas comerciales entre los meses de enero y diciembre de 2020 (Tabla 2). Las muestras se almacenaron a temperatura ambiente y en sus envases originales hasta su tratamiento.

Las algas analizadas pertenecen a las especies *Eisenia bicyclis* (Arame), *Laminaria ochroleuca* (Kombu), *Undaria pinnatifida* (Wakame), *Gracilaria* (Agar agar), *Sargassum fusiforme* (Hijiki), *Porphyra* (Nori), *Himanthalia elongata* (Espagueti de Mar), *Ulva Lactuca* (Lechuga de Mar), *Mastocarpus stellatus* (Musgo Estrellado) y mezcla de especies.



Tabla 2. Características de las muestras de algas analizadas.

Especie	Nombre común	Tipo	Nº de muestras	Origen
<i>Gracilaria</i>	Agar agar	Roja	3	Desconocido
<i>Undaria pinnatifida</i>	Wakame	Parda	5	Galicia (España,EU)
			4	Japón (No EU)
			3	Desconocido
<i>Laminaria ochroleuca</i>	Kombu	Parda	13	Galicia (España,EU)
			3	Japón (No EU)
			3	Desconocido
<i>Sargassum fusiforme</i>	Hijiki	Parda	3	Japón (No EU)
<i>Porphyra</i>	Nori	Roja	5	Corea (No EU)
			3	Japón (No EU)
			4	Galicia (España,EU)
<i>Eisenia bicyclis</i>	Arame	Parda	4	Japón (No EU)
<i>Himanthalia elongata</i>	Sea spaghetti (Espagueti de mar)	Parda	7	Galicia (España,EU)
<i>Ulva Lactuca</i>	Sea lettuce (Lechuga de mar)	Verde	4	Galicia (España,EU)
<i>Mastocarpus stellatus</i>	Starry moss (Musgo estrellado)	Roja	4	Galicia (España,EU)
-	Mezcla de especies	Parda y roja	4	Galicia (España,EU)

4.2. Investigación de nitratos. Procedimiento experimental.

Todo el procedimiento analítico para la determinación de nitratos en vegetales y algas sigue el método oficial EN 12014-4:2005 y se llevó a cabo en el Laboratorio de Salud Pública de Las Palmas de Gran Canaria, acreditado según la Norma ISO/IEC 17025 por la Entidad Nacional Española de Acreditación (ENAC).

Tras homogeneizar 100 g de la muestra (parte comestible) con un molinillo (Knifetc 1095, Foss, Hillerød, Dinamarca), se pesan 2.5 ± 0.2 g de homogeneizado y se mezcla con 25 ml de agua ultrapura a 70 °C y 1.25 ml de una solución saturada de tetraborato de disodio (bórax) (Sigma Aldrich, Darmstadt, Alemania). Esta mezcla, se lleva a ebullición durante 15 min en un baño María (Precistern 6000141, Selecta, Madrid, España).

Tras atemperar las muestras, se añadió agua ultrapura hasta alcanzar un peso de 61.5 g. Se centrifugó a 4500 rpm durante 15 min (centrífuga Macrotronic BL, Selecta, Madrid, España) y el sobrenadante se purificó utilizando cartuchos de extracción en fase sólida, C18 (6ml, 500 mg) (Waters, Milford, MA, USA) que fueron acondicionados con 5 ml de metanol grado LC-MS (Panreac, España).

Los extractos purificados se diluyeron 1:1 con agua ultrapura antes del análisis cromatográfico. En base a la experiencia previa del laboratorio, las muestras que se esperaba que tuvieran una alta concentración de nitrato (>625 mg/kg) se diluyeron a 1:20 con agua ultrapura para hacerlas coincidir con el rango de medición. Antes de colocar las muestras en los viales de cromatografía, se filtraron los extractos a través de filtros de jeringa de 0.2 μm \times 47 mm (VWR, Radnor, PA, EE. UU.).

El análisis cromatográfico se realizó el mismo día de la extracción utilizando un equipo de cromatografía líquida de Waters modelo 2695 (Waters Corporation, Milford, MA, EE. UU.), con inyección automática y detector de diodo array (HPLC-DAD). El sistema está interconectado a un ordenador para el control del instrumento, adquisición y procesamiento de datos, a través de un software cromatográfico (Empower™, Waters).

La columna cromatográfica es una IC-Pak de 50 mm de largo \times 4.6 mm de diámetro interno y un tamaño de partícula de 10 μm . El volumen de inyección es de 10 μL .



Las fases móviles están formadas por un tampón de fosfato 0.05 M (A) y agua ultrapura (B) y el sistema de separación utiliza un modo isocrático a 1.0 ml/min a temperatura constante (25 °C).

El detector de PDA se programó a una longitud de onda fija de 210 nm.

El tiempo de retención del nitrato fue de 11.51 min y el límite de cuantificación fue de 500 mg/kg. La presencia de nitrato en la muestra se confirmaba también mediante la comparación del espectro de absorción obtenido para ese pico frente a los espectros de referencia del analito, guardados en la correspondiente librería, obtenidos a partir de materiales de referencia y patrones (en matriz)

La incertidumbre del método es del 14% en todo el rango de trabajo (500 mg/kg a 8000 mg/kg), con un factor $k=2$, donde k es un factor que depende del nivel de confianza con que se estime la incertidumbre. En general se usa $k=2$ para un nivel de confianza del 95%, si se considera que la incertidumbre sigue una distribución gaussiana, con grados de libertad suficientes para garantizar su fiabilidad.

La recuperación del método está entre 96.7-105.4%.

Para la cuantificación de los analitos en las muestras se realizó el correspondiente calibrado con patrones estándar en un intervalo de concentraciones de 2.5 a 50 mg/kg. La recta de calibrado fue trazada por ajuste de mínimos cuadrados dando una función lineal forzada a pasar por el origen, resultando una ecuación de la recta tipo $y=mx$, donde “y” es área del pico cromatográfico, “x” la concentración del analito y “m” la pendiente de la recta. El software del equipo proporcionó de manera directa la concentración de nitratos, para ello comparó el área medida en los picos correspondientes al nitrato en la muestra analizada frente a la recta de calibrado obtenida.

4.3. Investigación de metales y otros elementos. Procedimiento experimental.

Para las algas analizadas se realizó un proceso de digestión y determinación diferente que para los vegetales de hoja.

4.3.1. Proceso experimental para determinación de elementos esenciales, tóxicos y potencialmente tóxicos en vegetales de hoja.



4.3.1.1. Proceso de digestión de muestras.

Las muestras de vegetales se homogeneizaron manualmente utilizando un mortero de teflón libre de metales hasta formar una masa homogénea. La digestión ácida de las muestras homogeneizadas se realizó con la ayuda de un digestor de microondas (Ethos Up, Milestone SRL, Italia).

Se pesó 500 mg de homogeneizado vegetal en los recipientes de digestión y se añadió 50 µL de la solución estándar interna (Sc, Ge, Rh e Ir a una concentración madre de 20 mg/ml cada uno) (CPA Chem, Stara Zagora, Bulgaria), 2.5 ml de ácido nítrico al 65% (HNO₃) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y 7.5 ml de agua Mili-Q a cada muestra.

El digestor fue programado en tres etapas a 1800W de potencia: una primera etapa de 5 minutos a 100°C, seguida de una etapa de 5 minutos a 150°C, seguida de una tercera etapa de 15 minutos a 200°C (Tabla 3).

Tabla 3: Condiciones instrumentales del proceso de digestión de vegetales con microondas.

Etapa nº	Rampa (min)	Temperatura (°C)
1	5'	100
2	5'	150
3	15'	200

Después de enfriar, los productos de digestión completos se transfirieron a tubos de polipropileno de fondo cónico y se diluyeron a 15 ml con agua Mili-Q.

Los blancos de reactivos se prepararon de manera similar a las muestras, y cada diez muestras se incluyeron en el lote analítico.

Finalmente, se tomó una alícuota de cada muestra para su análisis.

4.3.1.2. Procedimiento de análisis mediante ICP-MS.

Para los análisis instrumentales, se empleó un ICP-MS Agilent 7900 (Agilent Technologies, Tokio, Japón) equipado con conos de níquel estándar y un nebulizador

de flujo cruzado con un puerto de gas de reposición (nebulizador ×400, Savillex Corporation, MN, EE. UU.) para todas las mediciones.

Todos los datos se adquirieron y procesaron con el software de análisis de datos Agilent MassHunter (versión 4.2).

Diariamente, ICP-MS se optimizó utilizando una solución que consiste en una mezcla de Cs, Co, Li, Mg, Tl e Y (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE. UU.).

Para cada muestra, se realizaron tres digestiones en paralelo y todas las mediciones se realizaron por triplicado de cada vial, por lo que cada valor cuantitativo presentado en este estudio representa la media de 9 mediciones individuales en el equipo.

Todo el procedimiento fue verificado antes de cada análisis de muestras.

Las recuperaciones obtenidas oscilaron entre el 84 y el 117%.

Las curvas de calibración eran lineales para todos los elementos (coeficientes de regresión ≥ 0.995).

Los LOD y LOQ instrumentales se calcularon como la concentración del elemento que producía una señal tres y diez veces mayor que la de los blancos.

Los LOQ de la muestra se calcularon multiplicando el LOQ instrumental por el factor de dilución (1:10 v:v).

4.3.2. Proceso experimental para determinación de metales en algas.

4.3.2.1. Proceso de digestión de muestras.

Se introdujo un gramo de cada muestra previamente homogeneizada en recipientes de digestión de teflón (GO para Smart Vent, Anton Parr, Austria), se añadió 4 ml de ácido nítrico al 65% (HNO₃) (Sigma Aldrich, Darmstadt, Alemania) y 2 ml de peróxido de hidrógeno (Sigma Aldrich, Darmstadt, Alemania).

Se cerraron los recipientes de digestión de teflón y la digestión se inició en un horno de microondas (Multiwave GO Plus, Anton Parr, Austria), aplicando el programa de digestión que se muestra en la Tabla 4. Se realizó tres digestiones por muestra.



Tabla 4: Condiciones instrumentales del proceso de digestión de muestras de algas con microondas.

Etapa nº	Rampa (min)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	15'	50	5
2	5'	60	4
3	5'	70	3
4	3'	90	2
5	20'	180	10

Tª límite: 200°C.
Tª enfriamiento: 50°C

Después de la digestión, las muestras se transfirieron a un matraz volumétrico de 10 ml y se llenaron hasta la marca con agua destilada ultrapura. Posteriormente se depositaron en frascos herméticos.

4.3.2.2. Procedimiento de análisis mediante AA y Vapor frío.

El método analítico fue la espectrofotometría de absorción atómica (AAS) y para el Hg se utilizó la técnica de generación de hidruros por vapor frío con sistema de inyección de flujo (FIAS), métodos analíticos aprobados en el Reglamento de la Comisión 333/2007 (CE) de 28 de marzo 2007, por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los niveles de plomo, cadmio, mercurio, estaño inorgánico, 3-MCPDF y benzo(a)pireno en los alimentos.

La determinación de Cd y Pb se realizó con un espectrofotómetro de absorción atómica (AS-800, PerkinElmer, Waltham, MA, EE. UU.) dotado de cámara de grafito (HGA-800, Perkin Elmer, EE. UU.) (GF-AAS). La determinación de Hg se realizó con vapor frío en un espectrofotómetro de absorción atómica (AS-800, PerkinElmer, Waltham, MA, EE. UU.) (CV AAS) con un sistema de inyección de flujo con un método de generación de hidruros y vapor frío (FIMS-400, PerkinElmer, Waltham, MA, EE. UU.).



Las longitudes de onda instrumentales (nm) fueron Cd (228.8), Pb (283.3) y Hg (253.7). Los límites instrumentales de cuantificación (LOQ) del método fueron Cd (0.020 mg/kg), Pb (0.040 mg/kg), y Hg (0.10 mg/kg).

En la tabla 5 y 6 se muestran las condiciones instrumentales para las determinaciones de Cd, Pb y Hg.

Tabla 5: Condiciones instrumentales de la cámara de grafito.

Element	Step	Temperature (°C)	Ramp time (min)	Hold time (min)	Internal Flow	Gas type
Cd	1	110	10	20	250	Normal
	2	130	15	30	250	
	3	700	10	20	250	
	4	1500	0	5	0	
	5	2450	1	3	250	
Pb	1	110	1	30	250	Normal
	2	130	15	30	250	
	3	700	10	20	250	
	4	1500	0	5	0	
	5	2450	1	3	250	
Read step: 4; injection temp (°C): 20.						



Tabla 6: Condiciones instrumentales del sistema de vapor frío.

Element	Volume: 20 µl	Diluent volumen 0 µl		Diluent location: 131
	Time (s)	Pump 1 speed	Pump 2 speed	Valve position
Hg	15	100	120	Fill
	11	100	120	
	15	0	120	Inject

Los reactivos y patrones utilizados en el análisis del mercurio fueron:

Permanganato Potásico con riqueza 99.5% (Panreac Química SLU, Barcelona, España), Ácido Clorhídrico (riqueza 37%) (Merck KGaA, Darmstadt Alemania), Hidróxido sódico (riqueza 98%) (Merck KGaA, Darmstadt Alemania), Borohidruro sódico (riqueza 98%) (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt Alemania), Solución patrón de Mercurio de 1000 mg/l (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt Alemania), patrón externo de comprobación de recta de calibrado con 4.6 mg/l de Hg (tolerancia ± 0.6 mg/l) (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt Alemania).

Los reactivos y patrones utilizados en el análisis del cadmio y plomo fueron la solución patrón de Cadmio de 1000 mg/l (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt Alemania), patrón de Plomo de 1000 mg/l (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt Alemania), patrón externo de comprobación de recta de calibrado con 19 mg/l de Cadmio (tolerancia ± 5 mg/l) y 25 mg/l de Plomo (tolerancia ± 5 mg/l) (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt Alemania).

Para asegurar la exactitud y precisión del método se utilizó un material de referencia certificado. Para el Cd y Pb se utilizó BCR-279 (lechuga de mar) y para el Hg NIST SRM 1577 y BCR-278 R MT.

La recuperación obtenida en todos los casos fue superior al 95%.



4.4. Análisis estadístico.

Los análisis estadísticos realizados en este trabajo se han llevado a cabo con el software informático GraphPad Prism 6.0 y 8.4.3 (para las algas) (GraphPad Software, CA, EE. UU.).

La distribución de las concentraciones de nitrato y metales en cada tipo de muestra se evaluó mediante la prueba de *Kolmogorov-Smirnov* (K-S). Esta prueba permite medir el grado de concordancia existente entre la distribución de un conjunto de datos y una distribución teórica específica (distribución normal), es decir, una prueba para medir el tipo de distribución (normal o no) que sigue una serie de datos (Kolmogorov, 1933).

De acuerdo con la prueba de K-S, las concentraciones no siguieron una distribución normal, por lo que los resultados, aparte de como media \pm desviación estándar, se han expresado en términos de la mediana y el rango intercuartílico. Por la misma razón (distribución no normal), las diferencias observadas en las concentraciones de nitrato y metales entre los diversos grupos de vegetales estudiados, en el ámbito del tipo de cultivo y temporada de recolección, se establecieron a partir de la prueba estadística no paramétrica (no requiere que la distribución de la población estudiada sea caracterizada por determinados parámetros) U de *Mann-Whitney*. Esta prueba, versión no paramétrica, de la habitual prueba t de *Student*, se aplica para comprobar la heterogeneidad de dos muestras independientes. Un valor de probabilidad (P) inferior a 0,05 se ha considerado estadísticamente significativo.

4.5. Cálculo de la ingesta dietética y estimación del riesgo para la salud.

En el estudio de la ingesta de nitratos y otros elementos a través de vegetales muestreados, se multiplicó el consumo de cada tipo de vegetal (g/día) en la población canaria (Serra et al., 2000) por el valor de la mediana de la concentración de nitrato o elementos (mg/kg peso fresco) en cada vegetal analizado, dividido todo ello por el peso corporal (adultos 68.48 kg) y niños (34.48 kg) (AECOSAN, 2006). Los resultados de esta estimación de la ingesta se expresaron en mg/kg de peso corporal/día. Esto se estimó tanto para los consumidores de perfil medio (Percentil 50), como los consumidores de alto consumo (Percentil 97.5).

Para el caso de las algas los datos de consumo se obtuvieron del estudio de Zava et al., 2011, (4 g/día) peso seco.

Las estimaciones se realizaron para los grupos de edad: adultos (>17 años) y niños (7-12 años) (AECOSAN, 2006).

Para la estimación de la relación del riesgo-beneficio, los valores de ingesta diaria estimada (EDI) en cada tipo de consumidor (Percentil 50 y 97.5) y por grupo de edad, se compararon con el nivel de Ingesta Diaria Admisible aceptado (3.7 mg/kg pc/día) (JECFA, 1998) para el caso de los nitratos.

Los valores de referencia para elementos esenciales estudiados son los reportados por la EFSA (2006, 2016, 2021) y la EPA (2021) para elementos tóxicos, elementales y potencialmente tóxicos.

En el caso de elementos esenciales, se utilizaron los DRV (valores dietéticos de referencia) establecidos por la EFSA (EFSA 2006, 2016, 2021; EPA 2021).

Para los elementos tóxicos, los valores de referencia utilizados son los TRV (Valores tóxicos de referencia) establecidos por la EFSA (EFSA 2010, 2012, 2021).

En este estudio no se ha realizado especiación de Arsénico, como referencia se ha tomado la opinión científica de la EFSA, en la que establece que la proporción de arsénico inorgánico en vegetales de hoja es de un 65% del arsénico total (EFSA, 2021).

Respecto al mercurio, tampoco se ha hecho especiación, se ha tenido en cuenta lo establecido que según EFSA (EFSA, 2012), el porcentaje de metilmercurio en distintos vegetales oscila entre un 5 y un 30%. En este estudio se ha considerado el 20% para el cálculo de la EDI.

Para el caso del Pb, se establece lo mismo que para el estudio de algas una BMDL de 0.63 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pc/día para efectos nefrotóxicos y 1.50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pc/día para daños cardiovasculares (EFSA, 2010).

Los elementos potencialmente tóxicos como tierras raras (REE) y minoritarios (ME), se ha considerado lo establecido por la EFSA, 2020, aquellos no tienen TRV, el valor considerado es el establecido por algunos autores de 61 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal (Zhuang et al., 2017; EPA, 2021).

En el caso de las muestras de algas, los valores de ingesta tolerable diaria o semanal se obtuvieron de los estudios de Rubio et al., 2021. Cada elemento estudiado tiene un

estándar de ingesta diaria/semanal tolerable (TDI/TWI) y/o niveles de dosis de referencia (límite inferior de confianza) (BMDL) establecido por la EFSA y OMS.

Así en el caso del Cd, la TWI es de 2.5 µg/kg pc/semana (EFSA, 2012).

El Pb tiene una BMDL de 0.63 µg/kg pc/día para efectos nefrotóxicos y 1.50 µg/kg pc/día para daños cardiovasculares (EFSA, 2010).

La contribución (%) se calculó con la fórmula:

$$C\% = [EDI / \text{Valores de referencia}] \times 100.$$



5. Resultados y Discusión



5.1. Resultados y Discusión: Artículo 1.

Evaluation of nitrate contents in regulated and non-regulated leafy vegetables of high consumption in the Canary Islands, Spain: Risk assessment

“Evaluación del contenido de nitrato (regulado y no regulado) en vegetales de hoja de alto consumo en las Islas Canarias, España: Evaluación del Riesgo”.

Tabla 7: Concentraciones de NO₃ (nitrato) en los diferentes tipos de vegetales de hoja de alto consumo en Canarias (mg/kg peso fresco).

En la **Tabla 7** se muestra el estudio descriptivo de las concentraciones de NO₃ (nitrato) en los diferentes tipos de vegetales de hoja de alto consumo en Canarias (mg/kg peso fresco), regulados y no regulados.

En cuanto a los vegetales con un contenido máximo de nitratos regulado, es la rúcula la que tiene los niveles de nitratos más altos (3144.2 mg/kg). Esto coincide con diferentes estudios que han demostrado que este vegetal es uno de los que tienen mayor concentración de nitratos (Colla et al., 2018). Este vegetal es considerado como hiperacumulador de nitratos por estudios de Cavaiuolo et al., 2014, por tanto es el vegetal con los límites máximos más altos establecidos (7000 mg/kg para rúcula cosechada en invierno y 6000 mg/kg cosechados en verano) (Reglamento 915/2023).

Por el contrario, hay que destacar que ninguna de las muestras de rúcula analizadas en este estudio superó estos límites legales. Los niveles encontrados en la rúcula cultivada en Canarias son considerablemente más bajas (incluso casi la mitad) que los reportados en la mayoría de los estudios publicados (Guadagnin et al., 2005; Temme et al., 2010, 2011; Durazzo et al., 2013; Kmecl et al., 2019) y similares a los descritos para cultivos experimentales orientados a reducir el contenido de nitrato (Vernieri et al., 2006).

La razón de estas concentraciones relativamente bajas podría estar relacionada con el clima de las Islas Canarias, que suele ser seco y soleado. Se ha descrito que, en condiciones de baja intensidad de luz (es decir, días nublados o períodos de invierno), disminuyen las tasas de fotosíntesis y aumenta la acumulación de nitrato (Cavaiuolo et al., 2014). Esto parece ser corroborado por los niveles encontrados en el resto de los vegetales analizados en este estudio ya que la mayoría presentan niveles inferiores a los publicados por otros autores con muestras recolectadas en regiones con climas más fríos y estacionalidad más marcada.



5.1. Resultados y Discusión: Artículo 1.

Así, las espinacas cultivadas en Canarias presentaron un valor mediano de NO_3 de 1044.2 mg/kg, aunque hubo algunas muestras con un contenido superior al límite máximo permitido ($n = 7$), todas muestreadas en invierno. Sin embargo, el estudio realizado por Colla et al., 2018, muestra valores de concentración en espinacas mayores al obtenido en este estudio (2345 mg/kg) y tiene un alto porcentaje de muestras que superan los límites legales.

Algo similar ocurre con las diferentes variedades de lechuga analizadas, todas ellas cultivadas en Canarias. Una gran variedad de muestras de lechuga contenía niveles inferiores al LOQ ($n=18$, 13%) y ninguna superó el límite legal.

Sin embargo, en general, el promedio de concentración encontrada en las variedades de lechuga incluidas en este estudio fue un tercio de la media reportada en los estudios publicados hasta la fecha, 579 mg/kg (media de valores medianos de lechugas de este estudio) frente a 1694 mg/kg (Colla et al., 2018). Solo los estudios más antiguos informan niveles inferiores o similares de nitratos en lechuga a los descritos en este estudio (Maynard et al., 1976; Greenwood et al., 1986; Lyons et al., 1994; Fytianos et al., 1999).

Para los vegetales de hoja consumidos en Canarias, sin regulación del límite de nitrato, las concentraciones de nitrato encontradas eran bajas, o al menos no más altas que las descritas en otros estudios.

Así, las concentraciones de nitrato en los berros cultivados en el archipiélago eran de 2 a 6 veces inferiores a las descritas en otros estudios (Guadagnin et al., 2005; Thomson et al., 2007; Meamarbashi et al., 2014). Estos autores indican que el berro es una vegetal con una muy alta concentración de nitratos (Thomson et al., 2007; Meamarbashi et al., 2014). En una publicación del año 2017, se presenta una base de datos con el contenido de nitrato en vegetales, los autores describen los berros con un contenido mediano (IQR) de 1748 mg/kg (rango 1223–3806 mg/kg de 12 publicaciones) (Blekkenhorst et al., 2017).

Sin embargo, en los datos publicados por el grupo de expertos de la EFSA en 2008 (EFSA, 2008 a, b), el berro fue el cultivo con los niveles más bajos de nitratos de todos los vegetales estudiados, con un valor medio de sólo 12 mg/kg (EFSA, 2008b).



5.1. Resultados y Discusión: Artículo 1.

En esta investigación, hasta el 23% de las muestras de berros tenía niveles indetectables. En cambio, casi el 20% de las muestras tenían niveles >2500 mg/kg y cinco muestras tenían niveles >4000 mg/kg.

En el caso de las acelgas, no se mantuvo la misma tendencia, y los niveles de nitrato en las acelgas cultivadas en el archipiélago mostraron un nivel similar a la media de los trabajos publicados (1788,4 mg/kg vs 2275mg/kg) (Blekkenhorst et al., 2017; Colla et al., 2018).

Sin embargo, en el contenido de nitrato de la base de datos de vegetales mencionada anteriormente, los autores describen las acelgas con un contenido muy variable de (rango 23–3622 mg/kg) (Blekkenhorst et al., 2017).

Los resultados de acelgas en este estudio mostraron una distribución más homogénea, aunque se destaca que hasta un 12% de las muestras tenían concentraciones >3500 mg/kg.

5.1. Resultados y Discusión: Artículo 1.



Tabla 7. Concentraciones de NO₃ en los diferentes tipos de vegetales de hoja de alto consumo en Canarias (mg/kg peso fresco).

Vegetal	media	SD	mediana	P25-P75	Rango
Con contenido máximo en la UE					
Lechuga Romana	819.7	669.2	740.3	279.0 – 1054.0	0.0 – 3188.2
Lechuga Iceberg	607.5	427.0	515.7	280.2 – 751.0	0.0 – 1822.1
Cogollos	681.2	826.7	465.0	137.6 – 895.5	0.0 – 3077.3
Espinacas	1494.0	1440.1	1044.2	481.8 – 2453.0	0.0 – 6074.3
Ensaladas 4ª gama	720.0	677.3	595.0	274.4 – 1003.1	0.0 – 2561.1
Rúcula	3266.2	900.1	3144.2	2637.1 – 4130.2	1824.1 – 4677.2
Sin contenido máximo en la UE					
Berros	791.7	880.5	450.5	124.9 – 1335.2	0.0 – 4187.2
Acelgas	1750.2	1158.1	1788.4	879.0 – 2519.1	122.3 – 4362.2

5.1. Resultados y Discusión: Artículo 1.

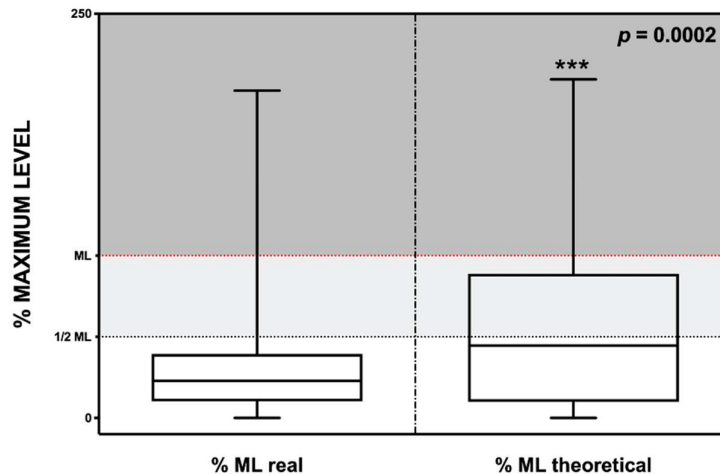


Figura 2. Porcentaje de muestras que superarían el contenido máximo de NO_3 (real vs teórico). Las líneas muestran las medianas, las cajas cubren los percentiles 25 a 75 y los valores mínimo y máximo se muestran al final de las barras.

En la Fig. 2, se representan los resultados gráficamente, expresándolos como porcentaje del nivel máximo de nitratos correspondiente a cada vegetal. Para comparar ambos grupos de plantas (reguladas y no reguladas), se ha aplicado un nivel máximo teórico a las plantas que no están legalmente regulados, que sería el mismo que el de los vegetales regulados a concentraciones similares en este estudio. Así, al berro, se le ha aplicado un nivel máximo teórico de 3000 mg/kg para el producto cosechado en verano y 4000 mg/kg para los cosechados en invierno. Estos son los límites que se establecen para la lechuga cultivada en exterior (Reglamento 915/2023), ya que presenta unas concentraciones similares a los berros en este estudio.

Asimismo, en el caso de las acelgas, se ha aplicado un nivel teórico de 3500 mg/kg, que es el establecido legalmente para las espinacas cuya concentración de nitratos es semejante al de la acelga, en este estudio.

Como puede verse, hasta un 17,4% de las acelgas y los berros habrían superado estos límites teóricos, lo que contrasta con el bajo porcentaje de incumplimientos de los niveles máximos en vegetales que sí están regulados (3.8% ($P = 0,0002$)).



5.1. Resultados y Discusión: Artículo 1.

Esto indicaría que, al establecer niveles máximos obliga a la aplicación de buenas prácticas agrícolas (Vernieri et al., 2006).

Se ha establecido que es probable que los límites actuales de nitrato sean superados, cuando el N total excede los 200 kg/ha, especialmente en ciertos cultivos como la rúcula o la espinaca (Kyriacou et al., 2019).

Esto también puede suceder en acelgas y probablemente en berros, ya que estos también se consideran altos acumuladores de nitratos. Por lo tanto, es posible que si existieran límites máximos para el contenido de nitratos en acelgas y berros, se establezcan cambios en las prácticas agrícolas para estos cultivos y disminuya la concentración de nitratos en los mismos.

Se ha descrito que los niveles de nitrato en vegetales de hoja varían según la época del año en que se cultivan. En general, la literatura señala que los niveles de otoño-invierno tienden ser mayor (Guadagnin et al., 2005; Temme et al., 2010; Brkic et al., 2017; Kyriacou et al., 2019; Salehzadeh et al., 2020). Este efecto es particularmente notable en el caso de la lechuga y la rúcula, y no tanto en otros cultivos. Tanto es así, que incluso la legislación establece diferencias en los límites de nitratos permitidos en lechuga y rúcula (Reglamento 915/2023), siendo la tolerancia mayor en invierno que en verano.

Incluso con las mejores prácticas agrícolas, a veces es complicado producir estas hortalizas con bajos niveles de nitratos (Aires et al., 2013; EFSA, 2008 a).

Tabla 8. Comparación de la concentración de NO₃ en los diferentes tipos de vegetales de hoja (mg/kg peso fresco) entre dos estaciones, verano vs invierno.

En esta tabla se puede ver que ninguno de los vegetales en este estudio presenta diferencias significativas en su contenido de nitrato en función de la estacionalidad. Sin embargo, cabe señalar que todas las hortalizas analizadas en este estudio han sido cultivadas en Canarias, y este archipiélago se caracteriza por tener un clima subtropical estable, con una oscilación térmica de 6 °C entre estaciones, y una temperatura media anual que oscila entre 18 y 24 °C (Lembrechts et al., 2020). Además, parece que la razón que las verduras acumulen más nitratos en invierno tiene que ver con la baja intensidad de la luz (Maynard et al., 1976).

5.1. Resultados y Discusión: Artículo 1.



Tabla 8. Comparación de la concentración de NO₃ en diferentes tipos de vegetales de hoja (mg/kg peso fresco) entre dos estaciones, verano vs. invierno.

Vegetal	Verano					Invierno					P
	media	SD	mediana	P25-P75	Rango	media	SD	mediana	P25-P75	Rango	
Con contenido máximo en la UE											
Lechuga Romana	770.2	609.7	799.0	465.9 – 918.9	0.0 – 3188.2	871.2	734.5	658.9	252.7 – 1572.3	0.0 – 2551.3	n.s.
Lechuga Iceberg	557.3	457.3	482.4	270.8 – 633.5	0.0 – 1822.3	663.2	396.1	669.0	368.5 – 807.1	98.3 – 1538.4	n.s.
Ensaladas 4ª gama	1756.1	1457.3	1578.2	392.0 – 2776.2	0.0 – 4424.2	1725.4	1402.3	1135.4	508.1 – 3048.2	84.6 – 4677.2	n.s.
Espinacas	1205.3	1154.1	937.4	531.4 – 1500.2	0.0 – 4802.1	1794.2	1660.2	1490.3	0.0 – 2666.3	0.0 – 6074.1	n.s.
Sin contenido máximo en la UE											
Berros	983.5	1227.3	364.5	74.0 – 1637.2	0.0 – 4187.1	783.7	564.1	676.0	293.2 – 1291.1	90.0 – 2051.1	n.s.
Acelgas	1525.2	1403.1	1092.0	189.0 – 2365.1	0.0 – 4260.0	1874.1	1005.0	1961.1	1458.1 – 2539.2	0.0 – 4362.1	n.s.



5.1. Resultados y Discusión: Artículo 1.

Tabla 9. Comparación de la concentración de NO_3 en los diferentes tipos de vegetales de hoja (mg/kg peso fresco) entre dos tipos de producción, convencional vs orgánica.

En cuanto al modo de producción, sólo fue posible comparar cuatro tipos de vegetales ya que eran los que estaban disponibles en el mercado en el momento del muestreo. Numerosos estudios han realizado comparativas entre cultivos orgánicos y convencionales sobre la acumulación de nitratos. Los resultados no son consistentes y dependen mucho del tipo de planta, la región geográfica, y, sobre todo, las prácticas agrícolas utilizadas en uno u otro modo de producción (Lima et al., 2012). Así, numerosos estudios indican que las verduras orgánicas tienen niveles de nitrato significativamente más bajos que convencionales (Merino et al., 2006; Koh et al., 2012; Nunez et al., 2015). Sin embargo, otros estudios no encuentran diferencias, o bien la relación es inversa (De Martin et al., 2003). Este último es lo que sucede en este estudio, ya que como se puede observar en la Tabla 9, los niveles de nitratos en tres de los cuatro vegetales estudiados son significativamente más altos en cultivo orgánico.

Esto es particularmente llamativo en el caso de las espinacas, cuyas concentraciones fueron 2.5 veces superiores, y en menor medida, en berros y acelgas.

Aunque la mayoría de los estudios indican que la agricultura orgánica produce verduras con concentraciones más bajas de nitrato, esto depende en gran medida del tipo de fertilizante utilizado en ambos modos de producción (Li et al., 2017). Los fertilizantes orgánicos generalmente aumentan el rendimiento y la calidad de las plantas, pero su aplicación excesiva o inadecuada puede causar graves perjuicios ambientales y riesgos como la contaminación por nitratos (Li et al., 2017).

Independientemente de lo anteriormente descrito, cabe señalar que los niveles de NO_3 encontrados en los cultivos ecológicos de este estudio son aún más bajos que los reportados en la mayoría de los estudios.

5.1. Resultados y Discusión: Artículo 1.



Tabla 9. Comparación de la concentración de NO₃ en diferentes tipos de vegetales de hoja (mg/kg peso fresco) entre dos tipos de producción, convencional vs. orgánica.

Vegetal	Producción Convencional					Producción Orgánica					P
	media	SD	mediana	P25-P75	Rango	media	SD	mediana	P25-P75	Rango	
<i>Con contenido máximo en la UE</i>											
Lechuga Iceberg	875.5	508.9	804.7	425.1 – 1397.2	354.2 – 1538.1	519.0	222.1	608.9	266.1 – 682.0	254.3 – 721.3	n.s.
Espinacas	1449.0	1455.2	1028.2	432.4 – 2119.2	0.0 – 6074.3	2510.2	2575.1	2510.2 *	2453.1 – 2567.2	2453.1 – 2567.2	0.0200
<i>Sin contenido máximo en la UE</i>											
Berros	746.5	893.8	409.0	118.9 – 1263.0	0.0 – 4187.2	1134.1	738.3	1374.1 *	199.8 – 1880.1	112.9 – 1953.3	0.0412
Acelgas	1568.0	1158.3	1605.2	540.7 – 2461.0	0.0 – 4260.3	2520.1	835.3	2268.1 *	2015.1 – 2763.1	1620.1 – 4362.2	0.0365



5.1. Resultados y Discusión: Artículo 1.

Tabla 10. Exposición diaria a NO₃ a través del consumo de cada uno de los vegetales de hoja, según patrón de consumo en Canarias. Se consideran las personas que consumen únicamente este vegetal y los resultados se expresan en mg/kg de peso corporal/día.

En **la Tabla 10** se resume la exposición a nitratos a través de consumo de cada tipo de vegetal de hoja para consumidores de percentil 50 y 97.5, para dos grupos de población (adultos y niños), tal y como recomienda la EFSA (EFSA, 2010 a).

Los resultados por debajo de la LOD (Límite de detección) fueron sustituidos por 0, y los resultados por debajo del LOQ (Límite de cuantificación) pero por encima del LOD fueron sustituidos por el LOD. Los cálculos que se presentan podrían ser sobreestimados, especialmente con respecto a la ingesta dietética de nitratos por el consumo de acelgas y espinacas, debido a que no se tiene en cuenta el posterior cocinado.

Para todas las estimaciones, se calcula el porcentaje de la IDA establecida para nitratos (3.7 mg/kg pc/día) (EFSA, 2008a) que representa la ingesta diaria a través del consumo de cada verdura.

Como se muestra en la Tabla 10, para los consumidores de percentil 50, la EDI de nitratos no supera el valor de la IDA de ninguno de los vegetales. Sin embargo, se confirma que todos ellos contribuyen significativamente a la exposición a este mineral.

Entre los vegetales estudiados, el que aporta más a la dieta de los adultos es la rúcula. Sin embargo, este resultado debe ser considerado con cautela, porque no hay datos disponibles sobre el consumo de esta hortaliza en esta región, y se han utilizado datos sobre lechuga para hacer la estimación.

En el caso de los niños, la estimación para las acelgas es llamativa, ya que aporta casi el 61% de la IDA de nitratos en aquellos niños que consumen este vegetal (percentil 50).

Además de la rúcula, también contribuye de manera relevante a la exposición a los nitratos, las acelgas, cuyo contenido máximo de nitratos no está limitado en la UE y es el principal contribuyente a la exposición a nitratos en este grupo de edad de la población canaria.

5.1. Resultados y Discusión: Artículo 1.



Tabla 10. Exposición diaria de NO₃ a través del consumo de cada vegetal de hoja, según patron de consumo en Canarias. Se considera las personas que consumen únicamente estos vegetales y los resultados se expresan en mg/kg de peso corporal/día.

Vegetal de hoja consumido	Adultos percentil 50			Adultos percentil 97.5		
	Consumo (g/día)	EDI	%ADI (media)	Consumo (g/día)	EDI	%ADI (media)
Con contenido máximo en la UE						
Lechuga Romana	33.7	0.42	12.44	170	2.12	62.77
Lechuga Iceberg		0.49	15.87		3.02	95.77
Cogollos		0.26	10.34		1.32	52.17
Ensaladas 4ª gama		0.33	10.93		1.69	55.13
Espinacas	41.79	0.73	28.12	200	3.48	134.57
Rúcula	33.7 ^a	1.83	49.46	170 ^a	9.25	250.00 ^a
Sin contenido máximo en la UE						
Berros	41.39	0.31	14.72	204	1.51	71.32
Acelgas	41.26	1.23	32.52	112	3.28	86.70

5.1. Resultados y Discusión: Artículo 1.



Vegetal de hoja consumido	Niños percentil 50			Niños percentil 97.5		
	Consumo (g/día)	EDI	%ADI (media)	Consumo (g/día)	EDI	%ADI (media)
Con contenido máximo en la UE						
Lechuga Romana	13.8	0.78	23.33	68	3.93	117.72
Lechuga Iceberg		0.93	29.76		5.64	179.58
Cogollos		0.49	19.39		2.47	97.81
Ensaladas 4ª gama		0.63	20.49		3.16	103.37
Espinacas	22.98	1.36	52.72	110	6.53	252.31
Rúcula	6.74 ^a	1.72	46.48	34 ^a	8.67	234.45 ^a
Sin contenido máximo en la UE						
Berros	22.76	0.53	27.62	112	2.82	133.72
Acelgas	18.15	2.31	60.97	48.4	6.15	162.55

^a No se dispone de datos de consumo de rúcula, por lo que se consideró un consumo similar, el de lechugas en adultos y el 50% del consumo de lechugas en niños, por lo que puede estar sobreestimado especialmente en el percentil 97.5.



5.1. Resultados y Discusión: Artículo 1.

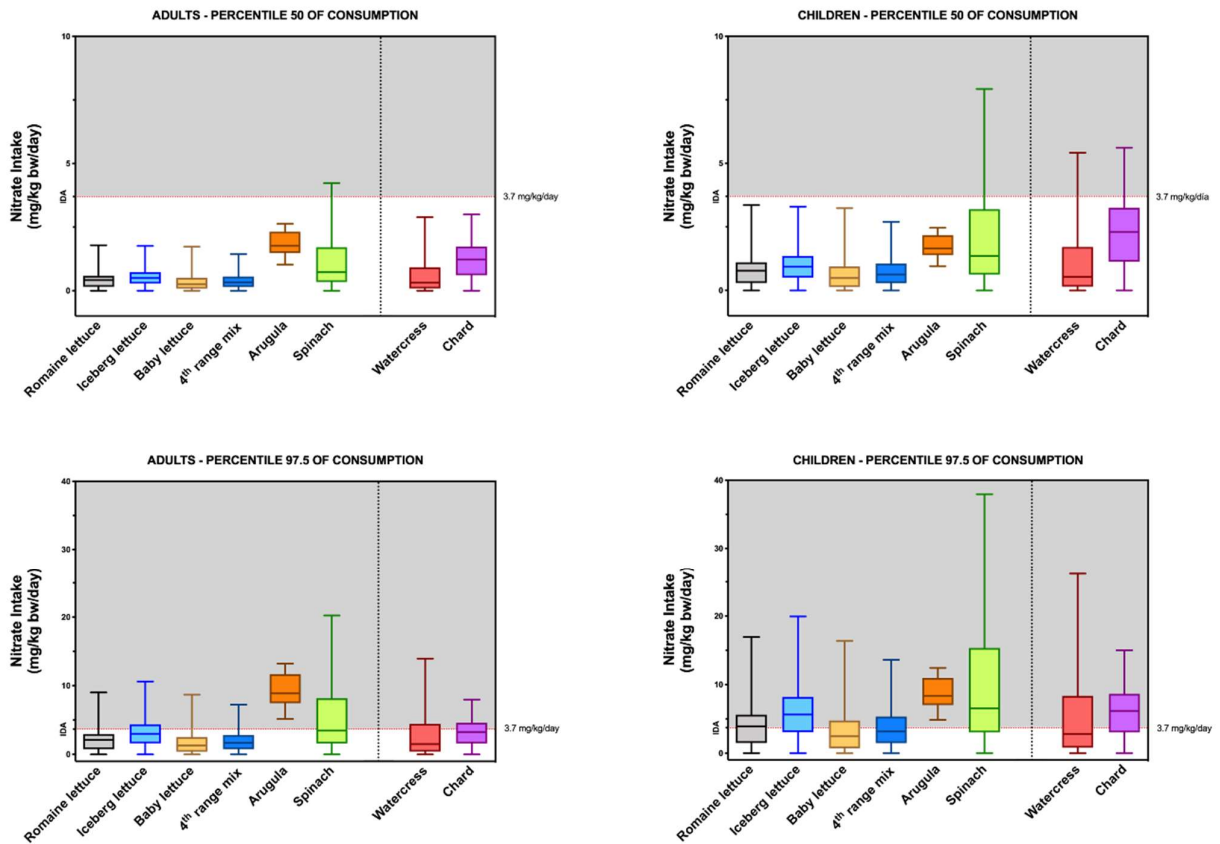


Figura 3. Gráficos de caja y bigotes de la distribución probabilística de la exposición a nitratos a través del consumo de los diferentes vegetales regulados y no regulados en adultos (paneles de la izquierda) y niños (paneles de la derecha). Los escenarios de exposición se muestran para consumidores medios (paneles superiores) y altos (percentil 97.5, paneles inferiores). Las líneas muestran las medianas, las cajas cubren los percentiles 25 a 75 y los valores mínimo y máximo se muestran al final de las barras.

La Figura 3 muestra la distribución de la exposición a nitratos, consumiendo cada vegetal y considerando los valores individuales en el análisis probabilístico. Los cálculos se realizaron con el sistema Monte Carlo para el modelado estocástico de la exposición dietética McNamara et al., 2003, utilizando el programa Excel (Microsoft 365, Redmond, EE. UU.). De acuerdo con este algoritmo, se calculan exposiciones múltiples, al azar, seleccionando datos de consumo de la base de datos (personas al azar) y multiplicándolo por una concentración de nitrato seleccionada al azar en las especies vegetales de la base de datos de concentración. El número de cálculos posibles fue



5.1. Resultados y Discusión: Artículo 1.

diferente para cada vegetal ya que los tamaños muestrales eran diferentes para cada uno de ellos. Así, las iteraciones de cálculo dependían del número de resultados de nitrato disponibles para cada vegetal y el número de encuestados en las encuestas nutricionales que varió de 4732 (consumo de rúcula en niños) a 30720 (consumo de berros en adultos). Los diferentes resultados posibles generados de forma iterativa se representaron en un gráfico de cajas y bigotes, que representan el rango de resultados obtenidos para cada hortaliza, en cada escenario de consumo (consumidores medios y altos), y tanto para adultos como para niños (Figura 3).

En adultos de percentil 97.5 no se supera el nivel máximo recomendado, excepto en el caso de la rúcula y, en menor medida, las espinacas. Sin embargo, esto es importante en los niños, ya que, en los grandes consumidores de hortalizas de hoja verde, la IDA de nitratos se superaría con el consumo de prácticamente todos los vegetales de hoja estudiados (Tabla 10 y Figura 3).

Estos resultados son consistentes con los evaluados por el grupo de expertos de la EFSA, que no descarta el riesgo en situaciones extremas, como aquellos en los que se combina un alto consumo de espinacas con la presencia de altos niveles de nitratos en espinacas (EFSA, 2010 b). Este grupo de expertos descartó que la lechuga represente un riesgo real para los niños muy pequeños, ya que apenas forma parte de su dieta. Sin embargo, en el caso de niños mayores, un consumo excesivo puede causar importantes efectos adversos para la salud.

Los resultados de este estudio indican que, aunque el consumo moderado de vegetales de hoja es muy recomendable, en los niños, se debe tener cuidado cuando se consumen grandes cantidades, incluyendo acelgas y berros, principalmente en la región geográfica de Canarias.

Finalmente, al tratarse de un estudio realizado en Canarias, es importante resaltar el papel de los berros en cuanto a su contribución al aporte de nitratos a la dieta. El consumo de este vegetal en Europa es prácticamente marginal ya que es una especie muy desconocida y poco cultivada. La mayoría de los consumidores también lo ingieren como ensaladas de 4ª gama. Sin embargo, en Canarias es el principal ingrediente de una de sus elaboraciones gastronómicas tradicionales más apreciadas: “potaje de berros”.



5.1. Resultados y Discusión: Artículo 1.

Además, el berro se consume en el archipiélago en muchas otras recetas, crudas o cocidas. Por lo tanto, en este territorio, es el vegetal de hoja verde de mayor consumo diario y con un mayor porcentaje de consumidores entre la población general (Serra et al., 2000). Como se describió anteriormente, su aporte de nitratos a la dieta canaria podría incluso superar la IDA en niños en el percentil alto de consumo, representando cerca de 15-28% de la IDA para consumidores promedio (adultos y niños).

Estos resultados son muy relevantes y las autoridades reguladoras de la Unión Europea deben tenerlos en cuenta por dos importantes razones:

En primer lugar, aunque los niveles de nitratos indicados en este estudio no son excesivamente altos (Tablas 7,8,9), debe tenerse en cuenta que el berro es considerado un vegetal hiperacumulador de nitratos, las condiciones climáticas de este territorio favorecen una baja acumulación de este mineral. Sin embargo, en los picos de consumo (principalmente en los meses más fríos del invierno) los berros cultivados fuera del archipiélago (importados), teniendo en cuenta las concentraciones reportadas en otros estudios (Guadagnin et al., 2005; Meamarbashi et al., 2014; Blekkenhorst et al., 2017), la exposición de los consumidores en Canarias podría ser hasta 10 veces mayor.

Por otra parte, cabe señalar que el berro ha obtenido la puntuación más alta en la escala de densidad de nutrientes, y ha sido clasificado como alimento de alta potencia (Di Noia et al., 2014). Esto podría provocar un aumento exponencial de su consumo en otras regiones distintas de Canarias, similar a lo que ha sucedido con la col rizada, la col china, la remolacha verde o la achicoria.

Por estos motivos, es necesario establecer límites máximos de nitratos tanto para los berros como para las acelgas, similares a los fijados para las espinacas. Es importante realizar estudios de estimación para las diferentes regiones ya que la IDA de 3,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pc /día estimada por la OMS puede no ser alcanzado o ser ampliamente superado, dependiendo del consumo y hábitos alimenticios de un área determinada (Gorenjak et al., 2012). Así, la ingestión de nitratos puede duplicar la IDA con la dieta tradicional en China (Zhong et al., 2002), cuadruplicarlo con la dieta tradicional en Japón (Sobko et al., 2010), o incluso ser seis veces mayor con el enfoque dietético para el tratamiento de la hipertensión en los Estados Unidos (Gorenjak et al., 2012).

El patrón de consumo del consumidor medio en Canarias daría una exposición a los nitratos similar a lo reportado para otros países europeos si solo se considera vegetales



5.1. Resultados y Discusión: Artículo 1.

regulados en la UE (alrededor del 20-48% de la IDA en consumidores medios, y alrededor del 80-120% de la IDA en consumidores intensivos) (Brkic et al., 2017; De Martin et al., 2003; Quijano et al., 2017; Temme et al., 2010, 2011). Sin embargo, cuando se incluyen berros y acelgas en la ecuación, el patrón de exposición en Canarias es claramente diferenciada de la de otras regiones europeas. Por ejemplo, el berro contribuiría solo con el 5,1% de la IDA en otras regiones de Europa (Gorenjak et al., 2012) mientras que en Canarias vegetal por sí solo podría dar lugar a una superación de la IDA.

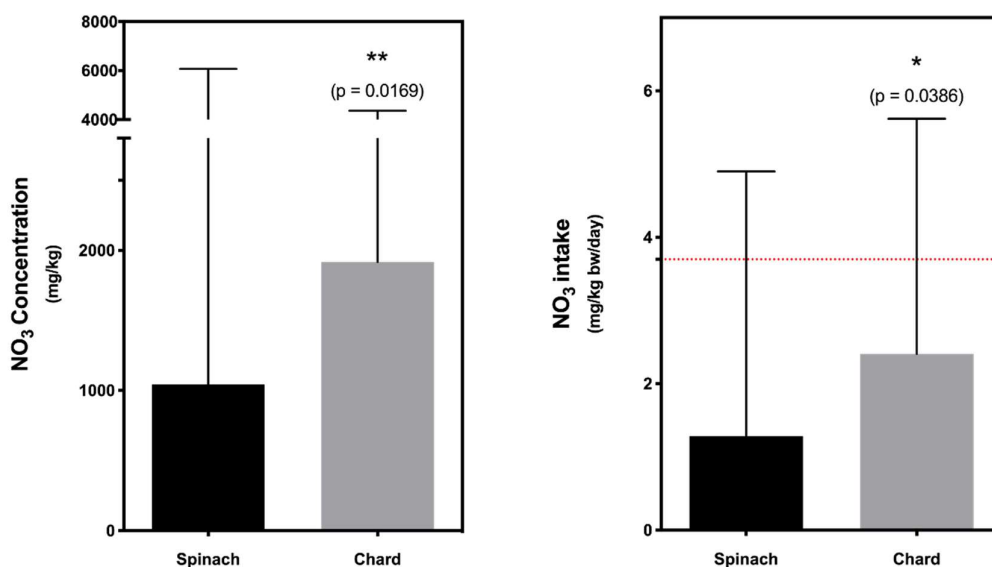


Figura 4. Comparación en el contenido de nitratos (izquierda) y exposición por consumo (derecha) entre dos vegetales de usos culinarios similares, una regulada en cuanto al contenido máximo de nitratos en la UE, la espinaca, y otra no regulada, la acelga.

En la Figura 4, tanto las concentraciones de nitrato como la ingesta dietética en niños canarios son significativamente mayor en el caso de una verdura sin límite máximo regulado (acelga) que en uno regulado con un consumo similar (espinacas). En el percentil alto de consumo (P97.5), que podría incluir, por ejemplo, ciertos vegetarianos estrictos (veganos), la exposición a nitratos a través del consumo de hortalizas de hoja aumenta considerablemente.

5.2. Resultados y Discusión: Artículo 2.



Human Exposure to Toxic Metals (Cd, Pb, Hg) and Nitrates (NO₃) from Seaweed Consumption

“Exposición humana a metales tóxicos (Cd, Pb, Hg) y nitratos (NO₃) por el consumo de algas”

El Cd destaca por sus altas concentraciones en algas asiáticas, especialmente en el alga Hijiki (1.196 mg/kg) y Nori (1.005 mg/kg) (Tabla 11). Según la EFSA (2009), los niveles de Cd en algunos mariscos son notables, principalmente en las ostras (0.2350 mg/kg), moluscos bivalvos (0.163 mg/kg) y lapas (0.180 mg/kg). Sin embargo, las concentraciones de Cd registradas en algunas muestras de algas marinas son más altas que los niveles medios de Cd en algunos pescados y mariscos informados por la EFSA.

En cuanto al Pb, las mayores concentraciones obtenidas también corresponden a algas de Países asiáticos, en este caso, alga Wakame (0.119 mg/kg) (Tabla 12).

El caso del Hg no es igual ya que el contenido promedio más alto se encontró en algas europeas, Arame (0.055 mg/kg) (Tabla 13).

5.2. Resultados y Discusión: Artículo 2.



Tabla 11. Concentraciones de Cadmio (Cd) ingestas estimadas (EDI) y contribución porcentual a los valores guía de las algas analizadas.

Origen	Especie	Concentración \pm SD (mg/kg)	EDI (μ g/día)	Contribución al TWI (%)
Asia	Hijiki	1.196 \pm 0.234	4.78	19.6
	Nori	1.005 \pm 0.897	4.02	16.4
	Kombu	0.417 \pm 0.484	1.67	6.82
	Wakame	0.753 \pm 0.463	3.01	12.3
Europa	Sea spaghetti	0.020 \pm 0.032	0.08	0.33
	Kombu	0.085 \pm 0.096	0.34	1.39
	Sea lettuce	<LOQ		
	Starry moss	<LOQ		
	Nori	0.011 \pm 0.00	0.044	0.18
	Wakame	0.070 \pm 0.096	0.28	1.14
	Arame	0.082 \pm 0.125	0.328	1.34
	Mixed salad	0.198 \pm 0.137	0.792	3.24

TWI: Ingesta tolerable semanal

5.2. Resultados y Discusión: Artículo 2.



Tabla 12. Concentraciones de Plomo (Pb), ingestas estimadas (EDI) y contribución porcentual a los valores guía de las algas analizadas.

Origen	Especie	Concentración \pm SD (mg/kg)	EDI (μ g/día)	Contribución al BMDL (%)	
				Pb (Np.)	Pb (Card.)
Asia	Hijiki	0.004 \pm 0.001	0.016	0.04	0.02
	Nori	0.018 \pm 0.019	0.072	0.17	0.07
	Kombu	0.071 \pm 0.070	0.284	0.66	0.28
	Wakame	0.119 \pm 0.071	0.476	1.10	0.46
Europa	Sea spaghetti	0.020 \pm 0.032	0.08	0.19	0.08
	Kombu	0.041 \pm 0.077	0.164	0.38	0.16
	Sea lettuce	<LOQ			
	Starry moss	<LOQ			
	Nori	0.011 \pm 0.00	0.044	0.10	0.04
	Wakame	0.007 \pm 0.007	0.028	0.06	0.03
	Arame	0.047 \pm 0.008	0.188	0.44	0.18
Mixed salad	0.016 \pm 0.013	0.064	0.15	0.06	

BMDL: nivel de dosis de referencia.

Np: nefrotoxicidad; Card: cardiotoxicidad.

5.2. Resultados y Discusión: Artículo 2.



Tabla 13. Concentraciones de Mercurio (Hg), ingestas estimadas (EDI) y contribución porcentual a los valores guía de las algas analizadas.

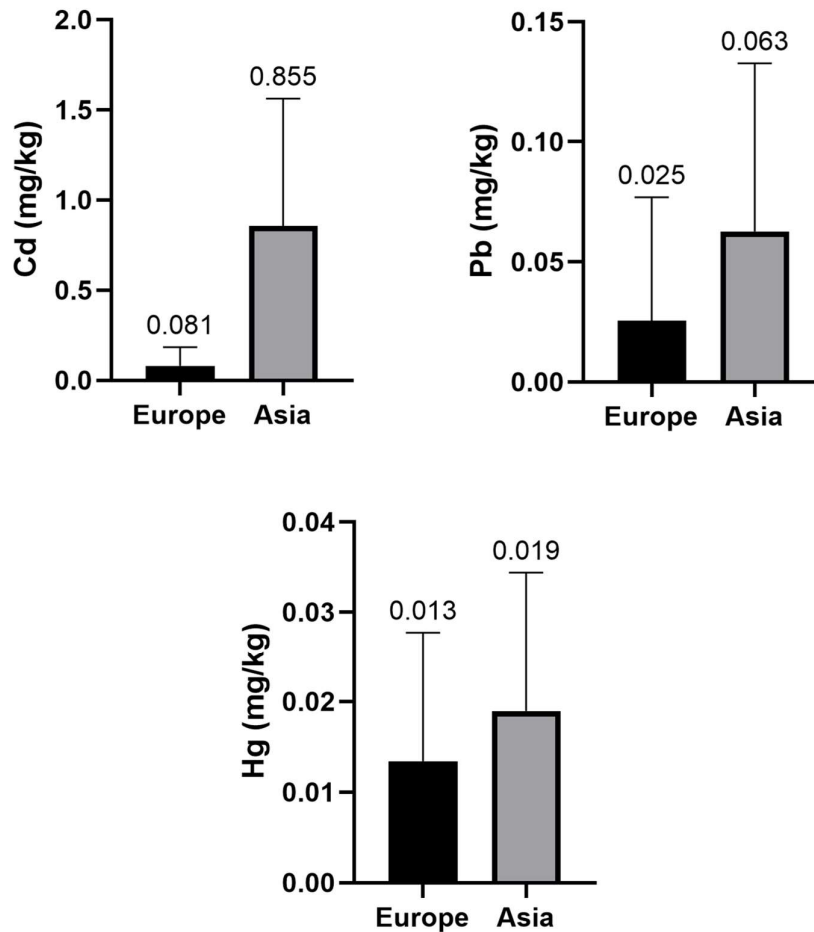
Origen	Especie	Concentración \pm SD (mg/kg)	EDI (μ g/día)	Contribución al TWI (%)	
				Hg (Org.)	Hg (Inorg.)
Asia	Hijiki	0.017 \pm 0.004	0.068	0.54	0.17
	Nori	0.010 \pm 0.004	0.04	0.31	0.10
	Kombu	0.054 \pm 0.017	0.216	1.70	0.55
	Wakame	0.021 \pm 0.01	0.084	0.66	0.21
Europa	Sea spaghetti	0.007 \pm 0.003	0.028	0.22	0.07
	Kombu	0.017 \pm 0.011	0.068	0.54	0.17
	Sea lettuce	<LOQ			
	Starry moss	0.003 \pm 0.00	0.012	0.09	0.03
	Nori	0.003 \pm 0.00	0.012	0.09	0.03
	Wakame	0.008 \pm 0.008	0.032	0.25	0.08
	Arame	0.055 \pm 0.003	0.22	1.73	0.56
	Mixed salad	0.004 \pm 0.005	0.016	0.13	0.04

TWI: ingesta tolerable semanal

Org.: mercurio orgánico; Inorg.: mercurio inorgánico



5.2. Resultados y Discusión: Artículo 2.



La **Figura 5** muestra la comparación del contenido de los tres metales analizados entre Europa y Asia. Puede verse claramente que, en todos los casos, las concentraciones de los tres metales tóxicos son más altas en Asia que en Europa (sin diferenciar entre especies). Además, el estudio estadístico reveló la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) en el contenido de estos metales entre ambos orígenes.

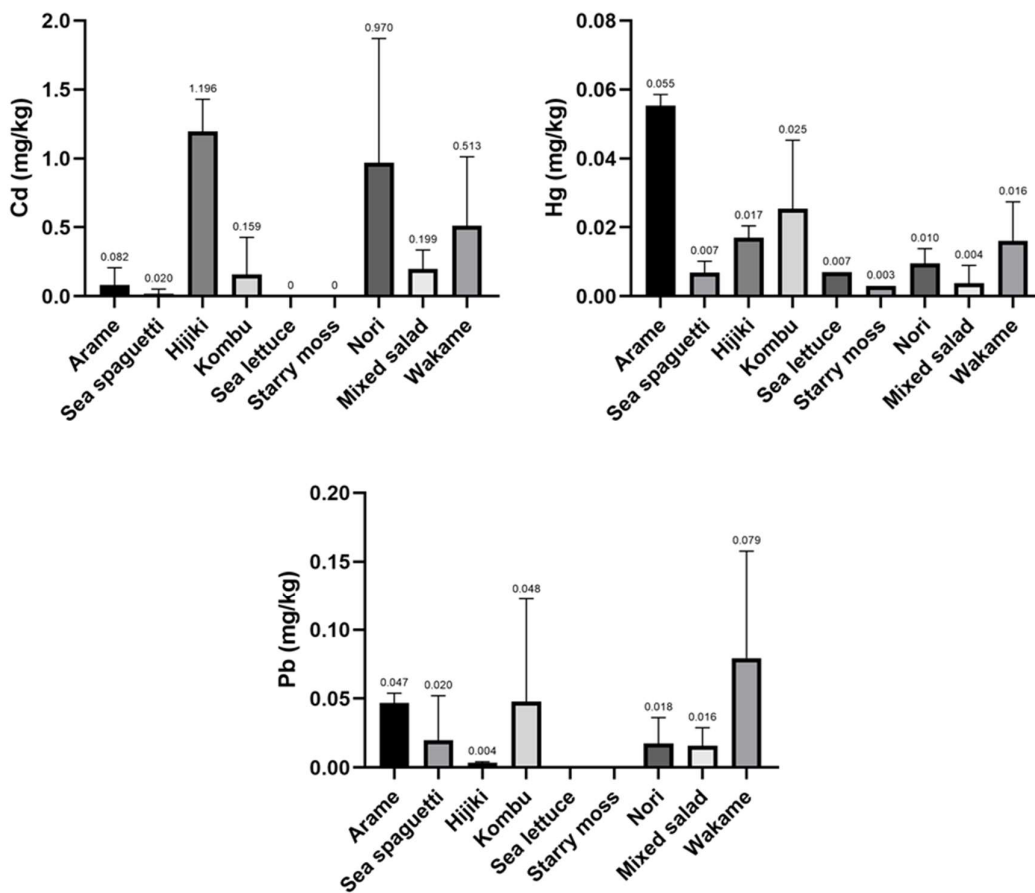
Las diferencias antes mencionadas en el contenido de metales tóxicos entre los distintos orígenes son debido a que, según diversos estudios, los altos niveles de contaminación en metales tóxicos existentes en las costas asiáticas influyen en la cantidad de estos metales en el ambiente donde crecen las algas. Niveles notablemente más altos de Cd,



5.2. Resultados y Discusión: Artículo 2.

Pb y Hg que los registrados en el presente estudio, han sido reportados en muchas áreas de la costa china (Chen et al., 2021).

La importación de algas comestibles de países asiáticos puede suponer un riesgo para la salud de consumidores en términos de contenido de metales tóxicos. El impacto ambiental de las industrias que emiten vertidos tóxicos en zonas de cultivo de algas como la costa de Palk Bay en India (Rajaram et al., 2020) o el Golfo de Kutch en India, (Chakraborty et al., 2014) es motivo de preocupación debido al aumento de los niveles de metales pesados en las algas. En muchos casos se ha cuantificado un aumento de los niveles de Cd y Pb en algas cultivadas en las costas de Palk Bay, presentando niveles de 4 mg Cd/kg peso húmedo (especies *Caulerpa racemosa*) o hasta 15 mg Pb/kg peso húmedo (especies *Caulerpa racemosa*).



5.2. Resultados y Discusión: Artículo 2.



La **Figura 6** muestra las concentraciones medias de metales tóxicos (Cd, Pb, Hg) en las diferentes especies de algas analizadas. Las diferencias encontradas en el contenido de metales se debe a las características intrínsecas de cada especie, siendo algunas más propensas a acumular algunos metales que otros. Asimismo, el estudio estadístico confirmó la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) en el contenido de Cd (Arame vs. Nori; Sea spaghetti versus Hijiki, Kombu, Nori, Mixed salads y Wakame; Hijiki vs Kombu, Mixed salads, y Wakame; Kombu contra Nori y Wakame; Nori vs Mixed salads y Wakame), en el contenido de Pb (Arame vs. Nori y Mixed salads; Sea spaghetti vs. Wakame; Hijiki vs. Wakame; Kombu contra Wakame; Nori vs. Wakame), y en el contenido de Hg (Arame vs. Sea spaghetti, Kombu, Nori, Mixed salads y Wakame; Sea spaghetti frente a Kombu, Hijiki y Wakame; Hijiki vs Nori y Mixed salads; Kombu vs Nori y Mixed salads; Nori vs Mixed salads y Wakame).

Un estudio realizado por Paz et al., 2019 informó un contenido de Cd en algas Wakame asiáticas de 1.11 mg/kg, similar al contenido de Cd encontrado en el presente estudio en algas Hijiki. En contraposición, las concentraciones de Pb registradas por Paz et al., 2019, fueron más altas que las encontradas en este estudio. Sin embargo, el contenido de Hg registrado en el presente trabajo es superior a los datos publicados por Paz et al., 2019.

El consumo recomendado de 4 g/día, según el fabricante, de algas Hijiki y Nori representan una contribución porcentual a la TWI de Cd (2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pc/semana) de 19.6% y 16.4%, respectivamente (Tabla 11). Aunque este porcentaje no supera el TWI, hay que tener en cuenta que es casi una cuarta parte de este valor máximo y que la dieta global puede tener una alta ingesta total de Cd.

El MoE, valor calculado por el NOAEL (0.01 mg/kg pc/día) (US EPA, 1998) es 2.1 (alga Hijiki) y 2.5 (alga Nori). Teniendo en cuenta este consumo y los valores de MoE, no hay riesgo para la salud.

El consumo de alga Wakame (4 g/día) es del 1.10% del BMDL de Pb fijado en 0.63 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pc/día (efectos nefrotóxicos) (Tabla 12) (EFSA, 2010). Este porcentaje no representa una contribución significativa a la ingesta dietética de Pb, y por lo tanto, los consumidores adultos no están en riesgo.

El valor MoE calculado considerando un BMDL₀₁ de 0.0015 mg/kg pc/día (EFSA, 2010) es 3.15 (consumo de algas Wakame). Este valor MoE indica bajo riesgo.

5.2. Resultados y Discusión: Artículo 2.



La contribución porcentual a la ingesta de Hg del consumo de 4 g/día es del 1.73% de la TWI de Hg orgánico (1.3 µg/kg pc/semana para metilmercurio) (Tabla 13) (EFSA, 2012). Por lo tanto, esto no representa un riesgo para la salud en los adultos. Según el NOAEL de 0.04 mg/kg pc/día de metilmercurio (EFSA, 2012), el MoE para el consumo de algas Arame es 182.

Tabla 14. Concentraciones de nitratos (mg/kg), desviación estándar (SD), ingestas diarias estimada (EDI) y contribución porcentual a la ADI en las algas analizadas.

Tal y como puede verse en la Tabla 14, la especie Nori tiene la mayor concentración de nitratos, con un valor medio de 3183 mg/kg y en muestras que dieron altas concentraciones el valor superaba los 8000 mg/kg.

Por otro lado, el alga Kombu tiene una concentración media de 3084 mg/kg con un valor máximo de 6400 mg/kg.

Cabe señalar que no existe una legislación que regule el contenido de nitratos en algas marinas. No obstante, el Reglamento (CE) nº 915/2023 en lo que respecta al contenido máximo de nitratos en los productos alimenticios, fijó un límite de entre 6000 y 7000 mg/kg para la rúcula.

Considerando el límite aplicable a la rúcula, cuyas concentraciones permitidas de nitratos son los más altos de todos los alimentos, algunas muestras de Kombu excederían este límite, y por lo tanto no sería apta para el consumo humano. No obstante, teniendo en cuenta el consumo recomendado por el fabricante de 4 g de alga Nori por día, la concentración media de 3183 mg/kg representaría un porcentaje contribución a la IDA de nitratos (3,7 mg/kg pc/día) del 5.02%.

Aunque esto no suponga un riesgo para la salud de los adultos, debe tenerse en cuenta que el almacenamiento y la cocción de algas puede conducir a la transformación de nitratos en nitritos, lo que plantea un riesgo para la salud de los consumidores.

Aunque las algas analizadas no suponen una ingesta elevada, es importante considerar otras fuentes de nitrato como el agua y otros alimentos vegetales. Un estudio realizado por Qasemi et al., 2018 informaron niveles de nitrato en agua de pozos y manantiales



5.2. Resultados y Discusión: Artículo 2.

de Azadshahr (noreste de Irán) de 1 a 51 mg/L. Quijano et al., 2017, estudió el contenido de nitratos en hortalizas comercializadas en Valencia (España), encontrando concentraciones de 40 mg/kg (zanahorias), 173.5 mg/kg (papas) y 1266.5 mg/kg (espinacas frescas).

Por todo lo anteriormente expuesto, es aconsejable moderar el consumo de las especies de algas que registraron mayores concentraciones de nitrato, especialmente en veganos o vegetarianos, y por personas que viven en áreas de altas concentraciones de nitrato en el suministro de agua.

5.2. Resultados y Discusión: Artículo 2.



Tabla 14. Concentraciones de nitratos (mg/kg), desviación estándar (SD), ingestas estimadas (EDI) y contribución porcentual a la ADI e las algas analizadas.

Especie	[NO ₃ ⁻] ± SD (mg/kg)	Máx. valor	Min. valor	EDI (mg/día)	Contribución al ADI (%)
Arame	<500	-	-	-	-
Sea spaghetti	<500	-	-	-	-
Hijiki	<500	-	-	-	-
Kombu	3084±2698	6400	<500	12.34	4.87
Sea lettuce	965±135			3.86	1.52
Mixed salad	1096±203	1239	952	4.38	1.73
Starry moss	<500	-	-	-	-
Nori	3183±2279	>8000	<500	12.73	5.02
Wakame	<500	-	-	-	-

ADI: Ingesta diaria aceptable

5.3. Resultados y Discusión: Artículo 3.



Evaluation of Essential, Toxic and Potentially Toxic Elements in Leafy Vegetables Grown in the Canary Islands

“Evaluación de elementos esenciales, tóxicos y potencialmente tóxicos en vegetales de hoja cultivadas en Canarias”

Estudio de elementos esenciales

En la **Tabla 15** se muestra la concentración (ng/g) de elementos esenciales en los vegetales de hoja muestreados. En esta tabla se indica que hay diferencias significativas para todos ellos ($p < 0,0001$).

El orden de vegetales de mayor concentración por elemento a menor concentración sería la siguiente:

Fe: Espinacas > Rúcula > Acelgas > Cogollos > Canónigos > Berros > Lechuga Romana > Lechuga Iceberg.

Zn: Espinacas > Berros > Rúcula > Canónigos > Acelgas > Cogollos > Lechuga Romana > Lechuga Iceberg.

Cu: Canónigos > Espinacas > Acelgas > Rúcula > Berros > Cogollos > Lechuga Romana > Lechuga Iceberg.

Se: Cogollos > Espinacas > Rúcula > Acelgas > Lechuga Romana > Canónigos > Berros > Lechuga Iceberg.

Mn: Acelgas > Espinacas > Canónigos > Berros > Rúcula > Cogollos > Lechuga Romana > Lechuga Iceberg.

Mo: Canónigos > Rúcula > Berros > Espinacas > Acelgas > Lechuga Romana > Cogollos > Lechuga Iceberg.

Co: Espinacas > Rúcula > Canónigos > Acelgas > Cogollos > Berros > Lechuga Romana > Lechuga Iceberg.

5.3. Resultados y Discusión: Artículo 3.



Las espinacas, las acelgas, la rúcula, los canónigos y los berros son las hortalizas de hoja con mayor concentración de elementos esenciales.

Cabe destacar la alta concentración de Fe y Zn en espinacas y rúcula, así como los altos niveles de Mn en acelgas.

Las espinacas, la rúcula, los canónigos y las acelgas fueron las que presentaron mayor concentración de Cu

La lechuga Iceberg presenta la concentración más baja de elementos esenciales, destacando las bajas concentraciones de Se, Mo y Co.

La lechuga iceberg y la romana son las hortalizas de hoja con las concentraciones más bajas de Fe, Zn y Cu.

Los niveles de Mo son notables en canónigos, rúcula y berros.

El Co está más presente en la rúcula y las espinacas.

Estos resultados son similares a los del estudio de Al Jassir et al., 2005 en el que también se encontró que Cu y Zn alcanzan niveles relevantes en vegetales de hojas verdes.

5.3. Resultados y Discusión: Artículo 3.



Tabla 15. Concentración (ng/g como mediana y rango intercuartil (P25-P75) de elementos esenciales en distintos tipos de vegetales de hoja.

Elementos	Lechuga Romana	Lechuga Iceberg	Cogollos de Lechuga	Rúcula	Espinacas	Canónigos	Berros	Acelgas
Fe	7456 (4105 – 21063)	2830 (2229 – 3448)	13052 (9957 – 25637)	30037 (7466 – 38580)	38743 (13124 – 76100)	12578 (10354 – 15465)	12777 (6849 – 24522)	18312 (10421 – 30064)
Zn	1890 (1234 – 2386)	1725 (1025 – 2041)	2454 (1964 – 3092)	3014 (1637 – 5607)	3748 (2535 – 9546)	2906 (1953 – 4421)	3733 (1969 – 5125)	2704 (2250 – 3268)
Cu	287.0 (196.9 – 523.6)	183.5 (128.9 – 308.5)	287.6 (211.0 – 399.0)	641.3 (175.4 – 1066)	698.1 (577.9 – 1328)	710.1 (417.3 – 908.0)	490.5 (204.5 – 739.0)	668.6 (557.3 – 887.8)
Se	9.3 (6.2 – 15.2)	5.0 (3.3 – 14.2)	18.5 (14.7 – 23.3)	11.4 (6.2 – 18.8)	17.0 (10.9 – 43.1)	8.0 (3.8 – 11.0)	5.3 (2.1 – 12.4)	11.0 (6.7 – 16.7)
Mn	1688.3 (981.3 – 3658.1)	1348.0 (1025.1 – 1774.3)	2486.1 (1949.8 – 3181.7)	2793.8 (1401.9 – 3166.3)	5313.0 (2607.4 – 8068.2)	4044.0 (2723.8 – 5055.2)	3491.7 (2542.1 – 5615.8)	8971.1 (3741.3 – 12918.1)
Mo	17.2 (6.8 – 56.8)	9.8 (3.1 – 21.9)	14.2 (5.8 – 18.2)	318.9 (24.5 – 697.7)	110.6 (81.5 – 160.7)	758.0 (275.8 – 1137.2)	118.6 (65.7 – 343.6)	61.6 (38.5 – 89.1)
Co	6.2 (3.8 – 10.6)	4.8 (1.6 – 13.6)	15.0 (11.5 – 19.4)	28.8 (8.1 – 48.1)	29.5 (16.4 – 57.9)	18.9 (12.8 – 24.3)	13.8 (7.3 – 27.2)	17.9 (11.3 – 26.5)



5.3. Resultados y Discusión: Artículo 3.

En la **Tabla 16** se muestra las exposiciones dietéticas a estos metales esenciales de los vegetales estudiados. Entre todos ellos, los berros y las espinacas son las principales fuentes dietéticas de elementos esenciales para adultos y niños canarios.

En consumidores adultos percentil 50 (Consumidores Medios, AC) el elemento que más se aporta, con el consumo de vegetales de hoja es el Fe, seguido del Mn y Zn (en igualdad de condiciones) y Cu. En contraposición, en este perfil de consumidores, el elemento que menos aporta a la dieta es el Se, Co y Mo.

En este escenario, el canónigo aporta hasta el 39% del DRV (Valor dietético de referencia) de Mo.

En adultos grandes consumidores, el elemento que más aporta, con el consumo de estos vegetales es el Fe, seguido del Mn y Zn en igualdad de condiciones (al igual que los de perfil medio). Hay que destacar el alto aporte de Mo a la dieta (en este escenario de consumidores) por parte de los canónigos (197% del DRV), también hay un alto consumo de Mo por la ingesta de rúcula (83% del DRV)

La espinaca y la rúcula pueden aportar hasta un 70% y un 46% del DRV del Fe, respectivamente. El aporte de Co de la espinaca es del 72% del DRV y de la rúcula este es del 59% del DRV.

En los niños destaca la contribución del Mo a los valores de ingesta de referencia por el consumo de canónigos (40% en AC; 201,9% en HC) y berros (21% en AC; 104% en HC). Además, en el caso de los niños en un escenario de alto consumo, el aporte de Fe por la ingesta de espinacas alcanza el 77% de la DRV, y por el consumo de berros, se aporta el 26% de la DRV. Esta situación observada para el Fe se observa también para el resto de los elementos esenciales, salvo el caso del Se en los berros. La espinaca también se identifica como una fuente importante de Co (78 % del DRV) y Mn (77 % del DRV) en niños que son grandes consumidores de vegetales de hoja.

Ellen et al., 1990 informaron resultados similares en espinacas. Estos autores señalaron que este vegetal es una fuente dietética relevante de Cu, Mn y Zn ya que su consumo aporta más del 10% del DRV de estos tres metales esenciales.

5.3. Resultados y Discusión: Artículo 3.



Tabla 16. Ingesta diaria estimada (EDI) ($\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$) calculada a partir de la mediana de concentraciones de elementos esenciales en vegetales de hoja consumidos por adultos y niños canarios, en dos escenarios de consumo (consumidor medio y alto).

Adultos (> 17 años) – 68.48 kg pc – ambos géneros																	
EDI ($\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$) ^a																	
Elementos	Valor dietético de referencia ^b (DRV)	Lechuga Romana		Lechuga Iceberg		Cogollos de Lechuga		Rúcula		Espinacas		Canónigos		Berros		Acelgas	
		AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC
Fe	160.63 °	3.652	18.420	1.386	6.993	6.393	32.250	14.710	74.220	23.530	112.600	6.161	31.080	7.761	37.890	10.980	29.810
Zn	175.23 °	0.926	4.670	0.845	4.263	1.202	6.064	1.476	7.447	2.276	10.890	1.423	7.180	2.267	11.070	1.622	4.402
Cu	18.98 °	0.141	0.709	0.090	0.453	0.141	0.711	0.314	1.585	0.424	2.029	0.348	1.755	0.298	1.454	0.401	1.088
Se	1.02 °	0.005	0.023	0.002	0.012	0.009	0.046	0.006	0.028	0.010	0.050	0.004	0.020	0.003	0.016	0.007	0.018
Mn	43.81 °	0.827	4.171	0.660	3.331	1.218	6.142	1.369	6.904	3.227	15.440	1.981	9.991	2.121	10.360	5.380	14.600
Mo	0.95 °	0.008	0.042	0.005	0.024	0.007	0.035	0.156	0.788	0.067	0.322	0.371	1.873	0.072	0.352	0.037	0.100
Co	0.12 °	0.003	0.015	0.002	0.012	0.007	0.037	0.014	0.071	0.018	0.086	0.009	0.047	0.008	0.041	0.011	0.029

5.3. Resultados y Discusión: Artículo 3.



Niños (7-12 años) – 34.48 kg pc – ambos géneros																	
EDI (µg/kg pc/día) ^a																	
Elementos	Valor dietético de referencia ^b (DRV)	Lechuga Romana		Lechuga Iceberg		Cogollos de Lechuga		Rúcula		Espinacas		Canónigos		Berros		Acelgas	
		AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC
Fe	160.63 ^c	2.915	14.700	1.106	5.581	5.103	25.740	5.872	29.620	25.820	123.600	2.459	12.400	8.434	41.500	9.639	25.710
Zn	108.06 ^c	0.739	3.727	0.674	3.402	0.960	4.840	0.589	2.972	2.498	11.960	0.568	2.866	2.464	12.130	1.424	3.796
Cu	14.60 ^c	0.112	0.566	0.072	0.362	0.112	0.567	0.125	0.632	0.465	2.227	0.139	0.700	0.324	1.593	0.352	0.939
Se	0.51 ^c	0.004	0.018	0.002	0.010	0.007	0.037	0.002	0.011	0.011	0.054	0.002	0.008	0.003	0.017	0.006	0.015
Mn	21.90 ^c	0.660	3.329	0.527	2.658	0.972	4.902	0.546	2.755	3.541	16.950	0.790	3.987	2.305	11.340	4.722	12.590
Mo	0.37 ^c	0.007	0.034	0.004	0.019	0.006	0.028	0.062	0.314	0.074	0.353	0.148	0.747	0.078	0.385	0.032	0.086
Co	0.12 ^c	0.002	0.012	0.002	0.010	0.006	0.030	0.006	0.028	0.020	0.094	0.004	0.019	0.009	0.045	0.009	0.025

^a Ha sido calculado considerando el consumo (g/día) de cada vegetal para población de niños y adultos canarios reportado por la Encuesta Nutricional de las Islas Canarias. (Serra et al., 2000).

^b A efectos comparativos, los DRVs se han expresado en µg/kg de peso corporal/día. Cuando se da un rango de valores diferentes para hombres y mujeres, se consideró el valor promedio.

^c Valor dietético de Referencia (DRV) EFSA 2016, 2021.

5.3. Resultados y Discusión: Artículo 3.

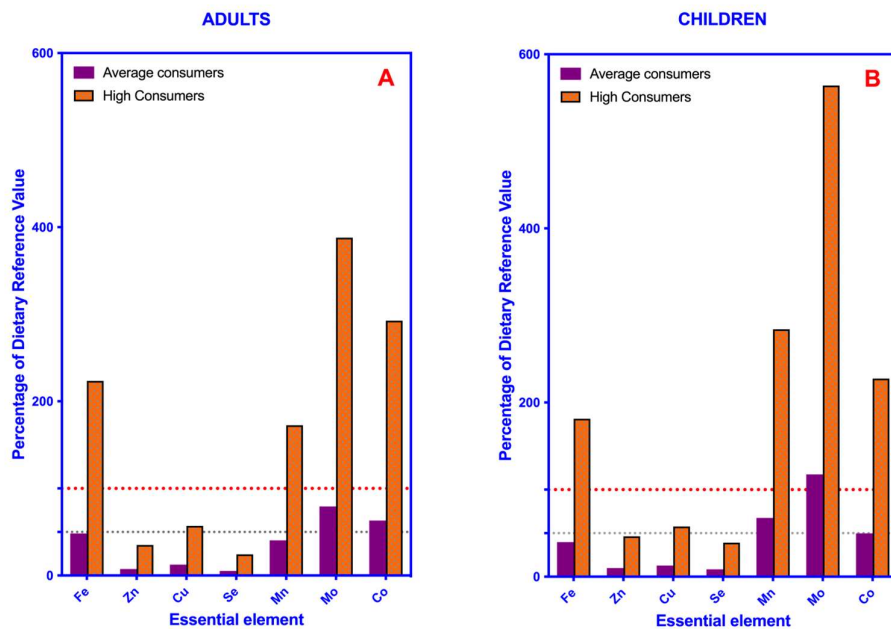


Figura 7. Gráfico de barras que muestra el porcentaje de los valores dietéticos de referencia (DRV) de elementos esenciales proporcionados por el consumo de vegetales de hoja verde en consumidores medios y altos. (A) Adultos, (B) Niños.

Las líneas punteadas rojas y grises indican el 100% y el 50% del DRV de cada elemento, respectivamente.

La figura 7 muestra la exposición a cada elemento del consumo diario de vegetales de hojas verdes en adultos y niños, para los dos escenarios de consumo considerados (AC y HC) y evalúa la contribución porcentual de la ingesta diaria de vegetales verdes al DRV (la línea discontinua línea representa el 100% del DVR). Fe, Mn, Mo y Co son los elementos que más contribuyen al DRV en altos consumidores (HC), tanto en niños como en adultos, superando el DRV en todos los casos. Para el resto de los elementos como Se, Cu y Zn, las contribuciones del consumo de vegetales de hoja a los DRV son considerables. En el caso de la población con un consumo medio de hortalizas de hoja (AC), el Mo que más aporta a la dieta, superando el DRV en el caso de los niños (AC).

Estos resultados confirman la importancia de monitorear la ingesta dietética de Mo de esta y otras fuentes dietéticas para evaluar los riesgos derivados (Lovegrove et al., 2017).



5.3. Resultados y Discusión: Artículo 3.

Estudio de elementos tóxicos

En la **Tabla 17** se muestra la concentración de elementos tóxicos (As, Cd, Hg y Pb) (ng/g) como mediana de elementos esenciales en los vegetales de hoja muestreados. En esta tabla se indica el rango intercuartílico (P25-P75).

El Cd es el elemento que aparece con mayor concentración, seguido del As y Pb. El Hg es el elemento tóxico con concentraciones más bajas en los vegetales.

Las espinacas son los vegetales de hoja más contaminados con estos elementos tóxicos, encontrando en el estudio diferencias significativas ($P < 0.0001$).

Los problemas ambientales derivados de la contaminación por metales y plaguicidas y sus interacciones sinérgicas y antagónicas, así como sus efectos tóxicos ya han sido informados por Alengebawy et al., 2021.

Mientras que los niveles más altos de Cd se detectaron en espinacas, lechuga romana y acelgas, los niveles más bajos de Cd se encontraron en canónigos.

Estos resultados son similares a los publicados previamente por Al Jasir et al., 2005 y AESAN, 2021, en los que la contaminación por Cd en estos vegetales alcanza niveles entre 10-100 $\mu\text{g}/\text{kg}$. En el estudio de Rubio et al., 2006 se encontró una concentración de Cd en vegetales de 13.62 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Sin embargo, las concentraciones encontradas por Ali et al., 2012 son superiores (4.13 $\mu\text{g}/\text{g}$ de Cd en espinacas) a las obtenidas en este estudio.

La concentración de Hg y As en estos vegetales es una concentración baja, siendo las más altas en Hg las lechugas romanas y cogollos (2.7 ng/g). El As en canónigos está en una concentración de 18.9 ng/g y en espinacas 8.0 ng/g. Esta situación es similar a la reportada por Martí-Cid et al., 2009 y la EFSA, 2012, donde la mayor concentración de Hg se observó en pescados y mariscos. En el estudio de Rubio et al., 2008, los niveles de Hg no fueron detectables en vegetales consumidos en Canarias.

La rúcula y las espinacas son los vegetales más contaminados con Pb. Las concentraciones obtenidas en este estudio son inferiores a los obtenidos en los estudios de EFSA, 2010 y Fernando et al., 2011, el cual reporta altos niveles de Pb en vegetales.



5.3. Resultados y Discusión: Artículo 3.

En contraposición a esto, los resultados de este estudio son superiores a los encontrados en el estudio de Rubio et al., 2005, donde detectaron niveles de 0.14 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en vegetales.

5.3. Resultados y Discusión: Artículo 3.



Tabla 17. Concentraciones (ng/g) como mediana y rango intercuartil (P25-P75) de elementos tóxicos en varios tipos de vegetales de hoja.

Elementos	Lechuga Romana	Lechuga Iceberg	Cogollos de Lechuga	Rúcula	Espinacas	Canónigos	Berros	Acelgas	P
As	1.6 (0.8 – 6.8)	0.5 (0.4 – 2.8)	3.9 (2.2 – 5.1)	7.2 (1.8 – 8.9)	8.0 (2.9 – 18.2)	18.9 (8.1 – 26.2)	6.7 (2.7 – 16.5)	4.9 (2.6 – 7.4)	< 0.0001
Cd	11.9 (5.3 – 22.6)	4.0 (1.7 – 8.6)	9.2 (2.5 – 36.6)	9.3 (4.3 – 16.7)	21.5 (11.9 – 39.7)	1.1 (0.9 – 2.9)	1.9 (1.1 – 5.1)	10.5 (4.7 – 17.9)	< 0.0001
Hg	2.7 (2.0 – 3.6)	2.3 (0.7 – 2.9)	2.7 (1.5 – 4.3)	2.3 (1.9 – 5.4)	1.7 (1.0 – 2.8)	2.2 (1.4 – 3.0)	1.0 (0.5 – 2.9)	1.4 (1.0 – 3.9)	< 0.0001
Pb	4.9 (1.9 – 10.6)	2.0 (1.2 – 12.2)	6.9 (3.4 – 9.5)	13.1 (10.0 – 18.9)	12.8 (6.0 – 31.7)	6.4 (4.6 – 8.2)	7.5 (3.3 – 14.7)	9.3 (5.8 – 16.4)	< 0.0001

5.3. Resultados y Discusión: Artículo 3.



En la **Tabla 18** se plantea la valoración de la exposición (para adultos y niños) a elementos tóxicos debido al consumo de vegetales de hoja producidas y consumidas en Canarias, utilizando valores de la mediana de concentraciones de cada elemento y el consumo diario de cada vegetal, para algunos consumidores (percentil 97.5) y consumidores medios (percentil 50).

Las ingestas de Pb, Cd, Hg y As procedentes del consumo de vegetales de hoja no muestran valores significativos.

Tanto para adultos como para niños, de consumo medio de vegetales de hoja no genera valores que contribuya de forma significativa a lo establecido como TRVs (Valores tóxicos de referencia). Sin embargo, los consumidores de perfil alto, el consumo de estos vegetales sí puede dar valores relevantes.

El consumo de espinacas por adultos HC es el que más contribuye a la ingesta de elementos tóxicos. Aporta un 8% del TRV de iAs. La lechuga romana contribuye en un 7% del TRV de MeHg y 3 % del TRV de Cd. Los berros aportan el 7% del TRV de iAs.

En los niños, en un escenario de alto consumo, se observa la misma tendencia que en los adultos. Las espinacas son las que más contribuyen a la exposición dietética de estos elementos tóxicos (8.3 %TRV de iAs), seguida de la lechuga romana (5% del TRV de MeHg y 2.4 % del TRV de Cd) y los berros (7.3 % del TRV iAs).

Resultados similares fueron informados por Zhu Huan et al., 2014, en el que la ingesta de AS, Cd, Hg y Pb a partir de vegetales suponía un riesgo bajo para la salud, aunque sugiere que el Cd debe tenerse en cuenta como un contaminante relevante en los vegetales. Esta misma consideración fue respaldada por la evaluación de riesgos de la exposición al Cd realizada por la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN, 2021).

5.3. Resultados y Discusión: Artículo 3.



Tabla 18. Ingesta diaria estimada (EDI) ($\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$) calculada a partir de la mediana de concentraciones de elementos tóxicos procedentes del consumo de vegetales de hoja en adultos y niños canarios, en dos escenarios de consumo (consumidor medio y alto).

Adultos (> 17 años) – 68.48 kg pc – ambos géneros																	
EDI ($\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$) ^a																	
Elementos	Valores Tóxicos de Referencia ^b	Lechuga Romana		Lechuga Iceberg		Cogollos de Lechuga		Rúcula		Espinacas		Canónigos		Berros		Acelgas	
		AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC
iAs ^c	0.30	0.001	0.004	0.000	0.001	0.002	0.010	0.004	0.018	0.005	0.023	0.009	0.044	0.004	0.020	0.003	0.011
Cd	1.00	0.006	0.029	0.002	0.010	0.004	0.023	0.005	0.023	0.013	0.062	0.001	0.003	0.001	0.006	0.006	0.021
MeHg ^d	0.10	0.001	0.007	0.001	0.006	0.001	0.007	0.001	0.006	0.001	0.005	0.001	0.005	0.001	0.003	0.001	0.004
Pb	6.00	0.002	0.012	0.001	0.005	0.003	0.017	0.006	0.032	0.008	0.037	0.003	0.016	0.005	0.022	0.006	0.022

5.3. Resultados y Discusión: Artículo 3.



Niños (7-12 años) – 34.48 kg pc – ambos géneros																	
EDI (µg/kg pc/día) ^a																	
Elementos	Valores Tóxicos de Referencia ^b	Lechuga Romana		Lechuga Iceberg		Cogollos de Lechuga		Rúcula		Espinacas		Canónigos		Berros		Acelgas	
		AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC
iAs ^c	0.30	0.001	0.003	0.000	0.001	0.002	0.008	0.001	0.007	0.005	0.025	0.004	0.018	0.004	0.022	0.003	0.009
Cd	1.00	0.005	0.024	0.002	0.008	0.004	0.018	0.002	0.009	0.014	0.068	0.000	0.001	0.001	0.006	0.006	0.019
MeHg ^d	0.10	0.001	0.005	0.001	0.004	0.001	0.005	0.000	0.002	0.001	0.005	0.000	0.002	0.001	0.003	0.001	0.003
Pb	6.00	0.002	0.010	0.001	0.004	0.003	0.014	0.003	0.013	0.009	0.041	0.001	0.006	0.005	0.024	0.005	0.017

^a Ha sido calculado considerando el consumo (g/día) de cada vegetal para población de niños y adultos canarios reportado por la Encuesta Nutricional de las Islas Canarias (Serra et al., 2000).

^b A efectos comparativos, los TRVs se han expresado en µg/kg de peso corporal/día. Cuando se da un rango de valores diferentes para hombres y mujeres, se consideró el valor promedio (EFSA, 2010; 2012).

^c Como referencia para calcular la exposición al arsénico inorgánico, se ha considerado el dictamen científico de la EFSA sobre el arsénico en los alimentos. Según esta opinión, la proporción de arsénico inorgánico en los vegetales es de hasta el 65% (EFSA, 2021).

^d Se ha establecido que el porcentaje de la forma metilo en los vegetales normalmente parece variar entre el 5% y el 30% (EFSA, 2012). Con el objetivo de un enfoque conservador, el EDI de MeHg se calculó considerando que el 20% del mercurio total en los vegetales de hoja está en forma de metilmercurio.

5.3. Resultados y Discusión: Artículo 3.

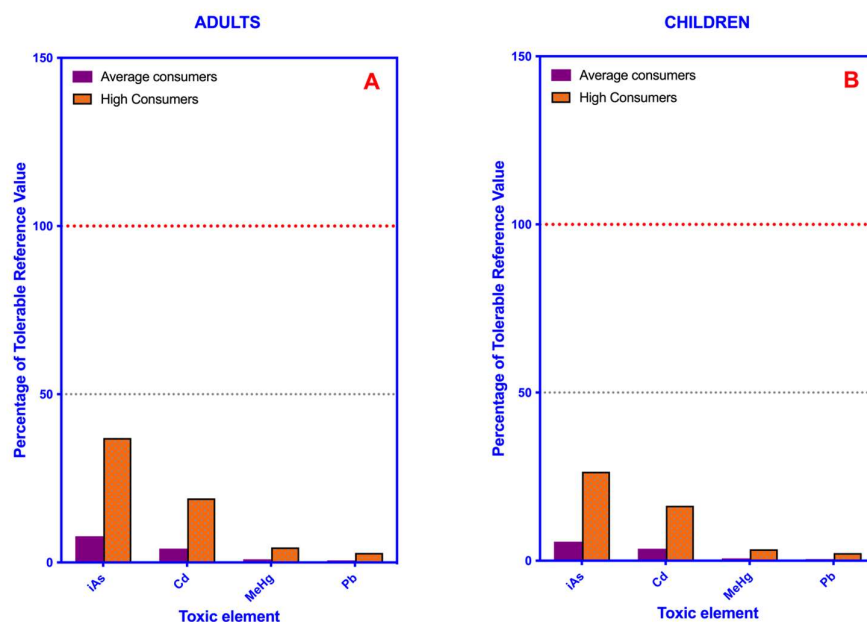


Figura 8. Gráfico de barras que muestra el porcentaje de los valores de ingesta diaria tolerable (IDT) o valores provisionales de ingesta semanal tolerable (PTWI) de elementos tóxicos proporcionados por el consumo de verduras de hoja verde en consumidores medios y altos. (A) Adultos, (B) Niños. Las líneas punteadas rojas y grises indican el 100% y el 50% del Valor de Referencia Tóxico de cada elemento, respectivamente

En la Figura 8, se muestra la exposición a elementos tóxicos por el consumo de vegetales de hoja, por parte de la población canaria es inferior a los TRV fijados para elementos tóxicos. Para ambos grupos de población, cabe destacar las ingestas dietéticas de iAs y Cd. El resto de los elementos no aparecen en concentraciones destacadas.

5.3. Resultados y Discusión: Artículo 3.



Estudio de elementos potencialmente tóxicos

En la **Tabla 19** se muestra las concentraciones de elementos potencialmente tóxicos en los diferentes vegetales analizados, incluyendo la suma de Tierras Raras (Sum REE) y la suma de elementos minoritarios (Sum ME).

Las espinacas, acelgas y la rúcula son los vegetales con mayor concentración de estos elementos, seguido de los berros.

Los elementos más abundantes de mayor a menor concentración son el Al en espinacas, Sr en acelgas y berros y el Ba en acelgas y rúcula.

Estos resultados están en la línea de los publicados previamente por Jiang et al.,2012, ya que estos autores encontraron que los niveles de TI en vegetales como la lechuga, acelga y pak choy excedían el nivel máximo permitido (0.5 mg/kg TI) por los estándares de calidad para alimentos en Alemania.

En cuanto a los datos sobre el Al, los resultados están en la línea de los informados previamente por la EFSA (2011) en los que las acelgas, las espinacas y las lechugas se identifican como vegetales de alto contenido en Al.

5.3. Resultados y Discusión: Artículo 3.



Tabla 19. Concentraciones (ng/g como mediana y rango intercuartil (P25-P75)) de elementos potencialmente tóxicos en varios tipos de vegetales de hoja.

Elementos	Lechuga Romana	Lechuga Iceberg	Cogollos de Lechuga	Rúcula	Espinacas	Canónigos	Berros	Acelgas	P
Ag	0.24 (0.16 – 0.32)	0.17 (0.12 – 0.37)	0.16 (0.12 – 0.33)	0.37 (0.24 – 0.58)	0.94 (0.48 – 2.2)	0.28 (0.22 – 0.34)	0.17 (0.10 – 0.38)	0.63 (0.42 – 1.5)	< 0.0001
Al	8831.2 (4413.9 – 26221.8)	1580.9 (1113.3 – 5807.3)	13671.2 (7967.4 – 20439.7)	32145.2 (10361.8 – 45383.9)	41946.8 (11517.1 – 83360.8)	14185.0 (6374.3 – 23873.0)	11810.9 (5583.1 – 29424.7)	17866.4 (9726.5 – 31310.9)	< 0.0001
Au	1.6 (0.9 – 2.7)	1.9 (0.8 – 2.3)	2.1 (0.3 – 3.4)	1.5 (0.5 – 3.2)	0.4 (0.3 – 0.5)	1.4 (0.8 – 1.9)	0.4 (0.2 – 1.1)	0.4 (0.2 – 0.9)	< 0.0001
Ba	253.9 (130.5 – 364.6)	299.0 (181.9 – 423.2)	431.8 (182.9 – 1098.3)	687.5 (293.0 – 1109.4)	511.2 (219.1 – 935.5)	490.0 (399.6 – 628.4)	198.3 (71.9 – 336.1)	1246.1 (334.3 – 2947.1)	< 0.0001
Be	0.40 (0.0 – 1.17)	0.0 (0.0 – 0.56)	0.0 (0.0 – 0.93)	0.23 (0.0 – 1.03)	2.85 (0.92 – 4.92)	1.24 (0.91 – 1.56)	0.91 (0.41 – 1.81)	1.42 (0.69 – 2.69)	< 0.0001
Cr	21.4 (10.7 – 37.1)	8.9 (7.2 – 20.3)	22.8 (16.4 – 45.5)	52.3 (13.6 – 176.9)	72.4 (29.5 – 133.2)	38.0 (28.9 – 82.3)	31.8 (14.8 – 61.6)	53.7 (29.1 – 66.4)	< 0.0001
Ni	39.4 (19.9 – 58.1)	60.4 (13.9 – 189.4)	49.1 (31.3 – 124.1)	59.3 (25.9 – 134.6)	85.7 (22.7 – 242.1)	40.4 (35.2 – 46.2)	33.3 (18.1 – 65.9)	56.5 (29.8 – 94.0)	0.0154
Sb	0.47 (0.26 – 0.88)	0.68 (0.23 – 1.46)	0.78 (0.51 – 16.08)	0.91 (0.42 – 1.38)	0.86 (0.68 – 2.72)	1.02 (0.88 – 1.22)	1.06 (0.69 – 1.89)	0.86 (0.54 – 1.47)	0.0015
Sn	4.4 (1.4 – 11.1)	1.1 (0.7 – 6.8)	3.3 (1.6 – 9.7)	27.9 (18.0 – 37.2)	13.1 (2.6 – 13.1)	1.7 (1.4 – 2.4)	2.7 (0.8 – 8.2)	3.4 (2.2 – 9.5)	< 0.0001

5.3. Resultados y Discusión: Artículo 3.



Elementos	Lechuga Romana	Lechuga Iceberg	Cogollos de Lechuga	Rúcula	Espinacas	Canónigos	Berros	Acelgas	P
Sr	1635.1 (1214.9 – 2763.2)	1917.1 (1068.7 – 3345.3)	1540.9 (1127.4 – 10787.2)	4355.1 (1343.9 – 8047.4)	4535 (2935.8 – 8392.6)	3964.5 (3166.7 – 5525.5)	5324.3 (3262.8 – 14408.2)	6510.7 (2833.9 – 9437.4)	< 0.0001
Th	0.6 (0.3 – 4.6)	0.1 (0.0 – 0.3)	2.3 (1.2 – 3.2)	3.4 (0.6 – 6.4)	6.4 (1.9 – 14.1)	2.2 (1.0 – 3.7)	1.8 (0.6 – 3.9)	2.6 (1.4 – 4.6)	< 0.0001
Tl	1.8 (1.3 – 2.8)	2.2 (1.0 – 2.7)	2.1 (0.8 – 3.1)	2.8 (1.7 – 5.4)	1.9 (1.2 – 2.8)	2.2 (1.6 – 2.6)	0.9 (0.6 – 1.9)	0.8 (0.6 – 1.3)	< 0.0001
U	0.3 (0.1 – 1.1)	0.1 (0.0 – 1.1)	0.9 (0.6 – 1.3)	1.8 (0.4 – 2.3)	2.1 (1.4 – 3.7)	7.9 (2.1 – 12.6)	1.1 (0.6 – 2.7)	1.6 (0.7 – 2.8)	< 0.0001
V	10.8 (5.2 – 41.7)	2.2 (1.6 – 9.7)	25.8 (19.9 – 50.0)	54.7 (12.4 – 70.7)	85.9 (24.5 – 154.0)	53.1 (19.9 – 91.9)	30.6 (15.6 – 61.2)	51.8 (24.1 – 82.1)	< 0.0001
Sum REE^a	20.6 (9.1 – 122.6)	4.0 (3.1 – 16.1)	81.2 (49.4 – 134.8)	132.5 (34.4 – 153.4)	259.5 (53.1 – 580.2)	62.9 (24.8 – 85.7)	53.4 (25.8 – 113.9)	110.8 (54.6 – 171.1)	< 0.0001
Sum ME^b	5.9 (3.7 – 35.3)	1.7 (1.3 – 3.5)	17.3 (11.4 – 24.0)	41.1 (10.7 – 50.4)	62.6 (17.9 – 112.2)	23.7 (85.3 – 36.9)	17.4 (7.8 – 31.5)	27.0 (12.8 – 43.9)	< 0.0001

^a Es la suma de concentraciones individuales de: Ce, Dy, Er, Eu, Ga, Gd, Ho, In, La, Lu, Nb, Nd, Pr, Sm, Ta, Tb, Tm, Y, Yb.

^b Es la suma de concentraciones individuales de: Au, Bi, Ga, In, Nb, Pt, Ta, Th, V.



5.3. Resultados y Discusión: Artículo 3.

La **Tabla 20** representa la exposición dietética estimada (EDI) de elementos potencialmente tóxicos, incluyendo la suma de Tierras Raras (Sum REE) y suma de elementos minoritarios (Sum ME) del consumo de diferentes vegetales de hoja producidas y comercializadas en Canarias.

Los elementos a partir de los cuales el consumo de vegetales de hoja representa un mayor aporte a los TRV tanto para adultos como para niños son TI, Al, Sr, Cr y Ba. Es importante destacar la contribución de SUM REE.

Cabe destacar, en adultos de perfil HC, el alto aporte a los TRV proporcionados por el consumo de rúcula (10 % del TRV de TI; 7.9 % del TRV de Al), lechuga iceberg (8.6 % de TRV de TI), canónigos (3% de la TRV de Cr), berros (3% de la TRV de Cr; 2.6% de la TRV de Sr) acelgas (3% de la TR de Cr; 1% del TRV de Ba).

La ingesta generada por el SUM REE procedente del consumo diario de rúcula alcanza el 0.5% del valor tóxico de referencia.

En el caso de los niños, la contribución del consumo diario de espinacas destaca tanto en los perfiles AC (12% de la TRV de Al; 8.6% de la TRV de TI; 7.1% de la TRV de Cr) como en los perfiles HC (13 % TRV de Al; 8.6% TRV de TI; 7.7% TRV de Cr). Este porcentaje alcanza el 4% de la TRV de Al en niños en el escenario HC de berros. La exposición dietética a Ba tras el consumo de acelgas contribuye en mayor medida a la TRV (0.9%) en los niños que siguen una dieta de alto consumo de vegetales de hoja. El aporte de Sr del berro (3% de la TRV) es mayor en los niños con perfil HC.

Los resultados de una investigación en el año 2017, en China, reportaron altas concentraciones de REE en vegetales de. Sin embargo, se estimó que el riesgo para la salud humana de su consumo es significativamente menor que la ingesta diaria aceptable de elementos de este grupo ($70 \mu\text{g kg}^{-1} \text{d}^{-1}$) (Zhuang et al., 2017).

En el estudio antes mencionado, se encontró que la espinaca genera la mayor ingesta de la SUM REE, pero solo representa el 1.2% y el 1.4% del valor de $70 \mu\text{g kg}^{-1} \text{d}^{-1}$ en los escenarios AC y HC, respectivamente.

La EFSA en el año 2020 informó de la escasa investigación sobre la toxicidad potencial de los REE y concluyó que es necesario el control de estos elementos en los alimentos de origen vegetal. Se ha demostrado que la exposición crónica a algunos de estos



5.3. Resultados y Discusión: Artículo 3.

elementos, incluso en dosis bajas, podría dar lugar a una amplia gama de efectos adversos para la salud, incluso en etapas tempranas de la vida, toxicidad del neurodesarrollo y alteraciones hepáticas. Algunos estudios sugieren que estos elementos podrían afectar negativamente al aprendizaje de los niños y de forma indirecta a la capacidad de memoria.

5.3. Resultados y Discusión: Artículo 3.



Tabla 20. Ingesta diaria estimada (EDI) ($\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$) calculada a partir de los valores de la mediana de concentraciones de elementos potencialmente tóxicos procedentes del consumo de vegetales de hoja en adultos y niños canarios, en dos escenarios de consumo (consumidor medio y alto).

Adultos (> 17 años) – 68.48 kg pc – ambos géneros																	
EDI ($\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$) ^a																	
Elementos	Valor Tóxico de Referencia ^b	Lechuga Romana		Lechuga Iceberg		Cogollos de Lechuga		Rúcula		Espinacas		Canónigos		Berros		Acelgas	
		AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC
Ag	5	<LOD	0.001	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.001	0.001	0.001	<LOD	0.001	<LOD	0.001	<LOD	0.001
Al	1000	4.325	21.820	0.774	3.906	6.696	33.780	15.750	79.430	25.480	27.960	6.948	35.050	7.174	35.020	10.710	29.080
Ba	200	0.124	0.627	0.146	0.739	0.212	1.067	0.337	1.699	0.311	0.341	0.240	1.211	0.121	0.588	0.747	2.029
Be	2	<LOD	0.001	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.001	0.002	0.002	0.001	0.003	0.001	0.003	0.001	0.002
Cr	3	0.010	0.053	0.004	0.022	0.011	0.056	0.026	0.130	0.044	0.048	0.019	0.094	0.019	0.094	0.032	0.087
Ni	20	0.019	0.097	0.030	0.149	0.024	0.121	0.029	0.146	0.052	0.057	0.020	0.100	0.020	0.099	0.034	0.092
Sb	0.4	<LOD	0.001	<LOD	0.002	<LOD	0.002	<LOD	0.002	0.001	0.001	<LOD	0.003	0.001	0.003	0.001	0.001

5.3. Resultados y Discusión: Artículo 3.



Sn	600	0.002	0.011	0.001	0.003	0.002	0.008	0.014	0.069	0.004	0.004	0.001	0.004	0.002	0.008	0.002	0.006
Sr	600	0.801	4.040	0.939	4.736	0.755	3.808	2.133	10.760	2.754	3.022	1.942	9.797	3.234	15.790	3.904	10.600
TI	0.07	0.001	0.004	0.001	0.006	0.001	0.005	0.001	0.007	0.001	0.001	0.001	0.005	0.001	0.003	<LOD	0.001
U	3	<LOD	0.001	<LOD	<LOD	<LOD	0.002	0.001	0.004	0.001	0.001	0.004	0.019	0.001	0.003	0.001	0.003
Sum REE ^c	61	0.010	0.051	0.002	0.010	0.040	0.201	0.065	0.327	0.158	0.173	0.031	0.155	0.032	0.159	0.066	0.180
Sum ME ^d	NA	0.003	0.015	0.001	0.004	0.008	0.043	0.020	0.101	0.020	0.042	0.012	0.059	0.011	0.052	0.016	0.044

5.3. Resultados y Discusión: Artículo 3.



Niños (7-12 años) – 34.48 kg pc – ambos géneros																	
EDI ($\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$) ^a																	
Elementos	Valor Tóxico de Referencia ^b	Lechuga Romana		Lechuga Iceberg		Cogollos de Lechuga		Rúcula		Espinacas		Canónigos		Berros		Acelgas	
		AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC
Ag	5	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,003	0,003	<LOD	<LOD	<LOD	0,001	<LOD	0,001
Al	1000	3.452	17.420	0.618	3.117	5.345	26.960	6.284	31.700	121.900	133.800	2.773	13.990	7.796	38.370	9.404	25.080
Ba	200	0.099	0.501	0.117	0.590	0.169	0.852	0.134	0.678	1.486	1.631	0.096	0.483	0.131	0.644	0.656	1.749
Be	2	<LOD	0.001	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.008	0.009	<LOD	0.001	0.001	0.003	0.001	0.002
Cr	3	0.008	0.042	0.004	0.018	0.009	0.045	0.010	0.052	0.210	0.231	0.007	0.037	0.021	0.103	0.028	0.075
Ni	20	0.015	0.078	0.024	0.119	0.019	0.097	0.012	0.058	0.249	0.273	0.008	0.040	0.022	0.108	0.030	0.079
Sb	0.4	<LOD	0.001	<LOD	0.001	<LOD	0.002	<LOD	0.001	0.002	0.003	<LOD	0.001	0.001	0.003	<LOD	0.001
Sn	600	0.002	0.009	<LOD	0.002	0.001	0.006	0.005	0.028	0.018	0.020	<LOD	0.002	0.002	0.009	0.002	0.005
Sr	600	0.639	3.225	0.749	3.780	0.603	3.039	0.851	4.294	13.180	14.470	0.775	3.910	3.515	17.300	3.427	9.138

5.3. Resultados y Discusión: Artículo 3.



TI	0.07	0.001	0.003	0.001	0.004	0.001	0.004	0.001	0.003	0.006	0.006	<LOD	0.002	0.001	0.003	<LOD	0.001
U	3	<LOD	0.001	<LOD	<LOD	<LOD	0.002	<LOD	0.002	0.006	0.007	0.002	0.008	0.001	0.004	0.001	0.002
Sum REE ^c	61	0.008	0.041	0.002	0.008	0.032	0.160	0.026	0.131	0.754	0.828	0.012	0.062	0.035	0.174	0.058	0.156
Sum ME ^d	NA	0.002	0.012	0.001	0.003	0.007	0.034	0.008	0.040	0.008	0.200	0.005	0.023	0.011	0.057	0.014	0.038

^a Ha sido calculado considerando el consumo (g/día) de cada vegetal para población de niños y adultos canarios reportado por la Encuesta Nutricional de las Islas Canarias. (Serra et al., 2000).

^b A efectos comparativos, los TRVs se han expresado en µg/kg de peso corporal/día establecido por EFSA 2020. Para Sum REE, los TRV son los establecidos por la EPA, 2021.

^c Es la suma de concentraciones individuales de: Ce, Dy, Er, Eu, Ga, Gd, Ho, In, La, Lu, Nb, Nd, Pr, Sm, Ta, Tb, Tm, Y, Yb.

^d Es la suma de concentraciones individuales de: Au, Bi, Ga, In, Nb, Pt, Ta, Th, V.

5.3. Resultados y Discusión: Artículo 3.

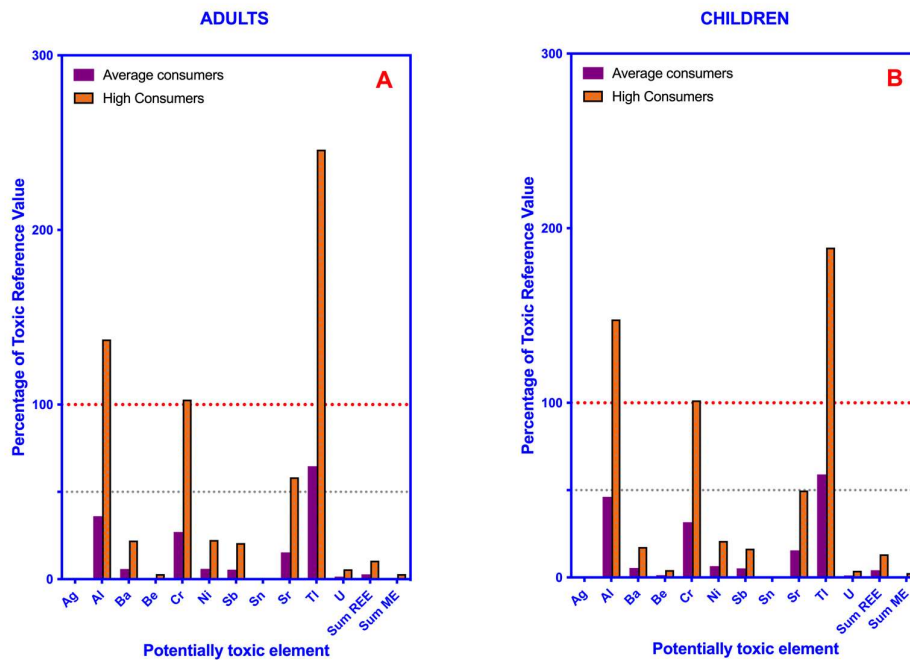


Figura 9. Gráfico de barras que muestra el porcentaje de los valores de ingesta diaria tolerable (IDT) o los valores provisionales de ingesta semanal tolerable (PTWI) de elementos potencialmente tóxicos, elementos de tierras raras y elementos minoritarios proporcionados por el consumo de vegetales de hoja verde en consumidores medios y altos. (A) Adultos, (B) Niños.

Las líneas punteadas rojas y grises indican el 100% y el 50% del valor de referencia de cada elemento, respectivamente

En la **Figura 9** se puede observar que el consumo de hortalizas de hoja puede implicar una exposición preocupante de Al, Cr, y especialmente Tl, en grandes consumidores, tanto en niños como en adultos.



6. Publicaciones



6.1. Artículo 1: objetivos 1, 2.

Evaluation of nitrate contents in regulated and non-regulated leafy vegetables of high consumption in the Canary Islands, Spain: Risk assessment.

“Evaluación del contenido de nitrato (regulado y no regulado) en vegetales de hoja de alto consumo en las Islas Canarias, España: Evaluación del Riesgo”.



Evaluation of nitrate contents in regulated and non-regulated leafy vegetables of high consumption in the Canary Islands, Spain: Risk assessment

Verónica Martín León^a, Octavio P. Luzardo^{a,b,c,*}

^a Public Health Laboratory of Las Palmas, Canary Health Service, Las Palmas de Gran Canaria, 35004, Spain

^b Toxicology Unit, Research Institute of Biomedical and Health Sciences (IUIBS), Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Paseo Blas Cabrera S/n, 35016, Las Palmas de Gran Canaria, Spain

^c Spanish Biomedical Research Center in Physiopathology of Obesity and Nutrition (CIBERObsn), Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Watercress
Chard
Intake estimation
Spinach
Rocket
Arugula

ABSTRACT

The nitrate content of the most consumed green leafy vegetables in the European Region of the Canary Islands was determined. The sampling included chard and watercress, which are not regulated but highly consumed in this region. The levels of nitrates in organic vegetables were significantly higher than those of conventional cultivation. However, no seasonal differences were observed, and overall nitrate levels were lower than those reported in other studies. Median nitrate levels in the analyzed vegetables were: lettuce (3 varieties) = 573.7 mg/kg; ready-to-eat salad mixes = 595.0 mg/kg; spinach = 1044.2 mg/kg; arugula = 3144.2 mg/kg; watercress = 450.5 mg/kg; and chard = 1788.4 mg/kg. In general, the nitrate levels of watercress and chard were significantly higher than those of regulated vegetables with similar culinary uses. The average per capita daily intake of nitrates through regulated vegetables was 17.5–32.5% of acceptable daily intake (ADI). On the contrary, the consumption of unregulated vegetables in this archipelago represents a similar, or even higher, percentage of ADI (23.6–44.3%). We, therefore, consider that the establishment of maximum limits of nitrate by the EU regulatory authorities would be appropriate for chard and watercress and similar to those set for spinach.

1. Introduction

Despite the presence of nitrate sources in water or in animal products in which additives E250 and E251 are used, it is estimated that around 80% of the nitrate in people's diets derives from vegetable consumption (Habermeyer et al., 2015; Hord et al., 2009; Karwowska and Kononiuk, 2020) as plants require bioavailable nitrogen to carry out photosynthesis that determines plant growth and development. (Habermeyer et al., 2015; Tegeder and Masclaux-Daubresse, 2018). Plants take this element from the soil where it is naturally found, in the form of nitrates which are part of mineral deposits, or nitrites formed by soil microorganisms from the degradation of organic matter (Hakeem et al., 2017; Tegeder and Masclaux-Daubresse, 2018). Under certain circumstances, vegetables tend to accumulate nitrates, when the uptake of the nitrate ion exceeds its reduction and subsequent assimilation (Hakeem et al., 2017). However, this accumulation depends on numerous factors such as the

composition of the soil where the plant grows (Beule et al., 2019; Hakeem et al., 2017), the type of crop production (Meng et al., 2017; Tegeder and Masclaux-Daubresse, 2018), the type of fertilization used (Ahmed et al., 2017; Li and Zhang, 2020), or the season of the year and the environmental conditions in which the crop grows (Anglade et al., 2018). Nitrate content can differ in plant species and varieties (Tang et al., 2018; Tegeder and Masclaux-Daubresse, 2018). Therefore, the consumer is exposed to nitrates differently depending on the consumption of the different vegetables (Salehzadeh et al., 2020). In this sense, the leafy vegetables stand out. On the one hand, because they are plant species that in many cases are good nitrate accumulators due to their rapid growth, and on the other, because nitrates tend to accumulate mainly in the leaves and this is the edible part of these vegetables (Iammarino et al., 2014; Kmecl et al., 2019; Quijano et al., 2017; Salehzadeh et al., 2020).

Exposure to dietary nitrate is not inherently harmful as there is a

* Corresponding author. Toxicology Unit, Clinical Sciences Department, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Paseo Blas Cabrera Felipe s/n, 35016, Las Palmas, Spain.

E-mail address: octavio.perez@ulpgc.cs (O.P. Luzardo).

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111812>

Received 6 May 2020; Received in revised form 1 October 2020; Accepted 7 October 2020

Available online 13 October 2020

0278-6915/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.



certain risk-benefit ratio that must be considered (Cunningham, 2013; Habermeyer et al., 2015; Karwowska and Kononiuk, 2020). For example, numerous studies have identified dietary nitrates as good nitric oxide (NO) donors (Kobayashi et al., 2015), which has been related to a beneficial effect on the cardiovascular system (Bondonno et al., 2016; Jackson et al., 2017; Lovegrove et al., 2017), effective in lowering blood pressure (Hobbs et al., 2013), platelet aggregation (Apostoli et al., 2014), atherosclerosis (Ramms and Gordts, 2016), stroke incidence (Habermeyer et al., 2015; Liu et al., 2019), or protecting the vascular endothelium against ischemia-reperfusion damage (Yang et al., 2017). Benefits have also been observed at a metabolic level, which are also probably in relation to the increase in the formation and bioavailability of NO. Thus, dietary nitrates promote increased insulin and glucose tolerance (Khalifi et al., 2015), prevent insulin resistance and vascular endothelial dysfunction (Kobayashi et al., 2015), influence lipid profiles with an efficient decrease in triglycerides (Zand et al., 2011), or are related to increased muscle power (Jones et al., 2018), among others. However, despite all these benefits, excessive nitrate exposure can also have adverse effects, as it can serve as a reactant with amines and/or amides in the formation of N-nitroso compounds, which are proven carcinogens (IARC, 1978). For this reason, the International Agency for Research on Cancer (IARC) classifies nitrates and nitrites as "probably carcinogenic to humans" (Group 2A) under certain conditions (IARC, 2010). Thus, numerous studies relate excessive exposure to nitrates with an increase incidence of various types of cancer (gastric, colorectal, esophageal, thyroid, renal, mammary) (Bondonno et al., 2016; Karwowska and Kononiuk, 2020; Kobayashi et al., 2015; Song et al., 2015; Xie et al., 2016). However, it should be noted that the formation of N-nitroso compounds may be inhibited by protective components present at high levels in most vegetables (vitamin C and polyphenols), and it is hypothesized that the consumption nitrate-rich vegetables would not result in endogenous nitrosation. In any case, regardless of cancer, exposure to high levels of nitrates is also related to other pathologies, such as hypothyroidism or methemoglobinemia, especially in children (Cunningham, 2013; Karwowska and Kononiuk, 2020; Kobayashi et al., 2015).

Due to these proven or potential mechanisms of toxicity, international food safety organizations have attempted to establish a cut-off point for the toxic effects of nitrates. On this basis, both the World Health Organization (WHO) and the European Food Safety Authority (EFSA) have set an acceptable daily intake (ADI) of 3.7 mg/kg bw/day (JECFA, 1998). Maximum limits have also been established for the nitrate content of certain foods, as these are considered particularly problematic because they tend to contain high concentrations of nitrates, along with high consumption, or directly affect a particularly vulnerable population. These specific foods are spinach, lettuce, arugula, and cereals and cereal-based foods for infants and toddlers (EC, 2006).

Regulations would force farmers to implement protective measures in agricultural practices so that products do not exceed legal limits and can be marketed. However, there are certain vegetables which are not explicitly regulated and whose nitrate content can be very high, and their consumption considerable in certain regions. It should be noted that the leafy vegetables most consumed at the European level are mainly lettuce and spinach, so the EFSA statement was based only on these (EC, 2006). On the contrary, in Spain there is a significant consumption of chard, which within the EU is almost exclusive to our country (AESAN, 2011). Furthermore, within Spain there are regions where, due to culinary tradition, other highly nitrate-rich vegetables are also consumed, as is the case of watercress (*Nasturtium officinale*) in the Canary Islands. In this archipelago, the consumption of chard and watercress is as high as that of spinach and lettuce (AECOSAN, 2011, 2014a, b; Serra Majem et al., 2000). Currently, there is no maximum limit of nitrates established in either chard or watercress at the European level.

This study was designed to determine the level of nitrates in green

leafy vegetables grown in the Canary Islands, including those widely consumed by the population of this European region. Thus, sampling included both vegetables for which there are permitted maximum levels and those for which these values are not defined. The samples were acquired, taking into account the seasonal pattern and also the production mode. The final objective of this study was to estimate the contribution of each type of vegetable to the intake of nitrates by the Canarian population, as well as to carry out an assessment of the risk associated with the consumption of vegetables whose maximum nitrate content is regulated compared to that associated with those unregulated vegetables.

2. Material and methods

2.1. Chemicals and reagents

All chemicals used were of analytical grade or equivalent. Sodium nitrate (purity 99%), disodium tetraborate decahydrate, and dibasic sodium phosphate were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). LC-MS grade methanol and potassium dihydrogen phosphate were purchased from Panreac Química (Barcelona, Spain). Solid-phase extraction C18 cartridges (6 ml, 500 mg) were obtained from Waters (Massachusetts, USA). Solutions were prepared with purified water from a Milli-Q Plus System (Millipore, Bedford, MA, USA).

2.2. Sampling

In this research, we studied a total of 297 samples of leafy vegetables, according to the consumption pattern in the Canary Islands (AECOSAN, 2011, 2014a, b; Serra Majem et al., 2000). Sampling was divided equally between the two recommended periods for the sampling of leafy vegetables, that is, the winter period (produce harvested from October 1 to March 31) and the summer period (produce harvested from April 1 to September 30), and whenever available, organically produced vegetables were also purchased. In this way, we acquired 60 samples of watercress (24 ecological and 36 conventional); 45 samples of chard (17 organic and 28 conventional); 53 samples of romaine lettuce (all conventional production); 38 samples of iceberg lettuce (12 organic and 26 conventional); 15 samples of baby lettuce (6 organic and 9 conventional); 22 samples of salad mixes (also named "ready-to-eat salads" or "4th range salads", all from conventional production); 14 arugula samples (all from conventional production); and 50 samples of spinach (17 organic and 33 conventional). The sampling of all the vegetables was carried out among the large supermarkets, which supply most of the Canarian population. In the case of organic agricultural samples, they were purchased from establishments specialized in organic products. The sampling was planned according to the criteria established in Commission Regulation (EC) No. 1832/2006, establishing the sampling and analysis methods for the official control of nitrate content in certain food products. Upon arrival at the laboratory, the samples were examined and cleaned of possible dirt with a damp paper towel, and the inedible or damaged external leaves were removed. After cleaning, the samples were frozen. The maximum storage period before analysis never exceeded 6 weeks.

2.3. Nitrate extraction

All analytical procedure for the determination of nitrates in leafy vegetables followed the Official Method EN 12014-4:2005 and were performed at Las Palmas Public Health Laboratory, which is accredited following the ISO/IEC 17025 standard.

A 100 g portion of the sample (edible part of vegetable) was homogenized using a laboratory grinder (Kniftec 1095, Foss, Hillerød, Denmark). 2.5 ± 0.2 g of homogenized sample was mixed with 25 ml ultrapure water at 70 °C and 1.25 ml of a saturated solution of disodium tetraborate. After mixing, the samples were boiled for 15 min in a

thermostated bath (Precistern 6000141, Selecta, Madrid, Spain). After cooling, ultrapure water was added to the mixture up to a weight of 61.5 g and centrifuged at 4500 rpm for 15 min (Macrotronic BL centrifuge, Selecta, Madrid, Spain). The supernatant was subjected to a clean-up step using C18 cartridges that were pre-conditioned with 5 ml methanol. The purified extracts were diluted 1:1 with ultrapure water prior to chromatographic analysis. For plants for which, based on previous laboratory experience, a high concentration of nitrates was expected (>625 mg/kg) a 1:20 dilution with ultrapure water was applied to match the measurement range. All dilutions were registered in the "sample set" table of the computer software. Before placing the samples in the chromatographic vials, the extracts were filtered through 0.2 μm \times 47 mm syringe filters (VWR, Pennsylvania, USA). The chromatographic analyses were performed on the day of the extraction.

2.4. Instrumental quantification of nitrates

The extracts were subjected to chromatographic analyses for the quantitative determination of nitrates using a Waters 2695 system (Waters corporation, Massachusetts, USA) consisting of a binary pump, a photodiode Array (PDA) detector and a Rheodyne injection valve with a 25 μl injection loop. The system was interfaced to a personal computer for instrumentation control, data acquisition, and processing, equipped with the chromatographic software (Empower™, Waters). An IC-Pak anion column (50 mm \times 4.6 mm inner diameter, particle size 10 μm) was used for all chromatographic separations. The volume of the injection was 10 μl . The mobile phases consisted of 0.05 M phosphate buffer (A), and ultrapure water (B) and were set in an isocratic mode (1:1) at a flow rate of 1.0 ml/min at a constant temperature of 25 °C. The PDA detector was programmed at a fixed wavelength of 210 nm. The total run time was 20 min. Nitrate retention time was 11.51 min. The limit of quantification was 5 mg/kg. The relative uncertainty of the measurement within the entire validated range was <14%. Nitrate recoveries in leafy vegetables were between 96.7 and 105.4%. The method was accredited by the Spanish National Accreditation Body (ENAC), and the laboratory has successfully participated in the intercomparison exercises among accredited laboratories.

2.5. Dietary intake estimates and health risk assessment

To estimate the intake of nitrate, the consumption of each type of leafy vegetable by the Canarian population (kg/day) (Serra Majem et al., 2000) was multiplied by the median value of nitrate (mg/kg fresh weight) in that type of vegetable, and the results were expressed in mg/kg body weight/day. Both average consumers and high consumers (those in the 97.5th percentile (P97.5)) were considered, and the estimations were done for two age groups: adults (>17 years) and children (7–12 years). For the estimation of the risk-benefit ratio, the values of estimated daily intake (EDI) of nitrates for each scenario (average and high consumers) and age group were compared with the acceptable daily intake (ADI) of 3.7 mg/kg bw/day (EC, 2006), which is equivalent to 251.6 mg for a 68 kg adult, and 81.4 mg for a 22 kg child.

2.6. Statistical analyses

Statistical analyses have been carried out with the GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software, CA, USA). The distribution of the nitrate concentration series for each type of plant was evaluated using the Kolmogorov-Smirnov test, and the result indicated that they did not adjust to a normal distribution, therefore the results, apart from mean \pm deviation standard, have been expressed in terms of the median and the interquartile range. The comparison of the nitrate content in the crops produced under different agricultural systems (organic and conventional) or grown in different seasons of the year was made using the Mann-Whitney *U* test. A probability value (*P*) less than 0.05 has been considered statistically significant.

3. Results and DISCUSSION

3.1. Nitrate content in the leafy vegetables

In Table 1, we show the descriptive study of the concentration of nitrates found in regulated and non-regulated leafy vegetables of high consumption in the Canary Islands (Spain), considering the complete series.

As for the plants with the maximum content of nitrates regulated, arugula stands out as the one with the highest levels (median = 3144.2 mg/kg). This seems logical since different studies have shown that this vegetable is one of those with the highest concentrations of nitrates (Colla et al., 2018). Arugula is considered a hyper-accumulator of nitrates (Cavaiuolo and Ferrante, 2014), and is, therefore, the vegetable with the highest maximum limits set (7000 mg/kg for arugula harvested in winter, and 6000 mg/kg harvested in summer). On the contrary, we must emphasize that none of the samples analyzed in this study exceeded these legal limits. The levels found in arugula grown in the Canary Islands are considerably lower (even almost half) than those reported in most published studies (Durazzo et al., 2013; Guadagnin et al., 2005; Kmecl et al., 2019; Temme et al., 2010; Temme et al., 2011) and similar to those described for crops grown under experimental conditions to reduce nitrate content (Vernieri et al., 2006). The reason for these relatively low concentrations could be related to the climate of these islands, which is usually dry and sunny. It has been described that, at low light intensity conditions (i.e., cloudy days or winter periods), photosynthesis rates decrease, and nitrate accumulation increases (Cavaiuolo and Ferrante, 2014). This seems to be corroborated by the levels found in the rest of the vegetables analyzed in this study since most of them present lower levels than those published by other authors with samples collected in regions with colder climates and more marked seasonality. Thus, spinach grown in the Canary Islands presented a median value of NO_3 of 1044.2 mg/kg, although there were some samples with a content higher than the maximum permitted limit ($n = 7$, all sampled in winter). However, the average of the many studies that reported nitrate values in spinach is more than double (2345 mg/kg), and, in general, the percentage of samples that exceed the legal limit is also higher (Colla et al., 2018). Something similar occurs with the different varieties of lettuce analyzed, all grown in the Canary Islands (like the rest of the vegetables in this study). A great variability was observed between samples and varieties of lettuce. Also, a significant number of samples had undetectable nitrate levels (<LOQ, $n = 18$; 13%), and none exceeded the legal limit. However, overall, the average concentration found in the varieties of lettuce included in this study was one-third of the average reported in the studies published to date (579 mg/kg vs 1694 mg/kg) (Colla et al., 2018). Only older studies report lower or similar levels of nitrates in lettuce to those described in this study (Fytianos and Zarogiannis, 1999; Greenwood et al., 1986; Lyons et al., 1994; Maynard et al., 1976). For leafy vegetables that are consumed in the Canary Islands, but which do not have the regulated nitrate limit, the nitrate levels were also lower, or at least not higher, than those described in other studies. Thus, the nitrate levels of watercress grown in the archipelago were 2–6 times lower than those described in the independent studies that have been studied to date (Guadagnin et al., 2005; Meamarbashi and Alipour, 2014; Thomson et al., 2007). These authors indicate that watercress is a vegetable with a high to a very high concentration of nitrates (Meamarbashi and Alipour, 2014; Thomson et al., 2007), and in a recent publication in which a nitrate content of vegetables database is presented, the authors describe watercress as having a median (IQR) content of 1748 mg/kg (range 1223–3806 mg/kg from 12 publications) (Blekkenhorst et al., 2017). However, surprisingly, in the data published by the EFSA expert group in 2008, watercress was the crop with the lowest nitrate levels of all the vegetables studied, with a median value of only 12 mg/kg (EFSA, 2008b). As mentioned above, there are not too many studies on watercress, but this crop appears to have highly variable nitrate

Table 1
Concentrations of NO₃ in the different types of leafy vegetables of high consumption in the Canary Islands (mg/kg fresh weight).

Vegetable	mean	SD	median	P25- P75	Range
With maximum content set in the EU					
Romaine lettuce	819.7	669.2	740.3	279.0-1054.0	0.0-3188.2
Iceberg lettuce	607.5	427.0	515.7	280.2-751.0	0.0-1822.1
Baby lettuce	681.2	826.7	465.0	137.6-895.5	0.0-3077.3
Spinach	1494.0	1440.1	1044.2	481.8-2453.0	0.0-6074.3
Salad mixes (fourth range salad)	720.0	677.3	595.0	274.4-1003.1	0.0-2561.1
Arugula (rocket)	3266.2	900.1	3144.2	2637.1-4130.2	1824.1-4677.2
No Maximum Content set in the EU					
Watercress	791.7	880.5	450.5	124.9-1335.2	0.0-4187.2
Chard	1750.2	1158.1	1788.4	879.0-2519.1	122.3-4362.2

concentrations. In our research, for example, up to 23% of the samples had virtually undetectable levels. However, in contrast, almost 20% of the samples had levels >2500 mg/kg and five samples had levels >4000 mg/kg. In the case of chard, the same trend was not maintained, and nitrate levels in chard grown in the archipelago showed a nitrate level similar to the average of the published works (1788.4 mg/kg vs 2275 mg/kg) (Blekkenhorst et al., 2017; Colla et al., 2018). However, in the nitrate content of vegetables database mentioned above, the authors describe Swiss chard as having a highly variable contents of nitrate (range 23–3622 mg/kg from 13 publications) (Blekkenhorst et al., 2017). In the case of this vegetable, our results showed a more homogeneous distribution, although we highlight that up to 12% of the samples had concentrations >3500 mg/kg.

In Fig. 1, we have represented the results graphically, expressing them as a percentage of the maximum level of nitrates corresponding to each vegetable. To compare both groups of plants (regulated and unregulated), we have applied a theoretical maximum level to plants that are not legally regulated, which would be the same as the regulated plants that in our series had similar concentrations of nitrates. Thus, for watercress, we have applied a theoretical maximum level of 3000 mg/kg for the product harvested in summer and 4000 mg/kg for those harvested in winter. These are the limits for open-grown lettuce (EC, 2006), which is the regulated crop with the most similar concentrations to watercress in our study. Similarly, in the case of chard, we have applied a theoretical maximum level of 3500 mg/kg, which is that of spinach,

which is also the regulated product that most resembles chard in terms of nitrate concentration. As can be seen, up to 17.4% of the chard and watercress would have exceeded these theoretical limits, which contrasts with the low percentage of violations of the maximum levels in the effectively regulated vegetables, which only amounts to 3.8% ($P = 0.0002$). This would indicate that, when setting maximum levels, lettuce, spinach, or arugula producers would apply good agricultural practices so that their products do not exceed them (Vernieri et al., 2006). It has been established that current nitrate limits are likely to be violated when total N exceeds 200 kg/ha, especially in certain crops, such as arugula or spinach (Kyriacou et al., 2019). This is also possible in chard and probably in watercress, as these are also considered high accumulators of nitrates. Therefore, it is possible that if maximum limits for nitrate content in chard and watercress were established, changes in agricultural practices for these crops would be introduced and concentrations would decrease.

The levels of many leafy vegetables have been described as varying, according to the season of the year in which they are grown. In general, the literature is consistent in indicating that autumn-winter levels tend to be higher (Brkic et al., 2017; Guadagnin et al., 2005; Kyriacou et al., 2019; Salehzadeh et al., 2020; Temme et al., 2010). This effect is particularly noticeable in the case of lettuce and arugula, and not so marked for other crops. So much so, that even the legislation establishes differences in the limits of nitrates allowed in lettuce and arugula (EC, 2006), the tolerance being higher in winter than in summer. This is

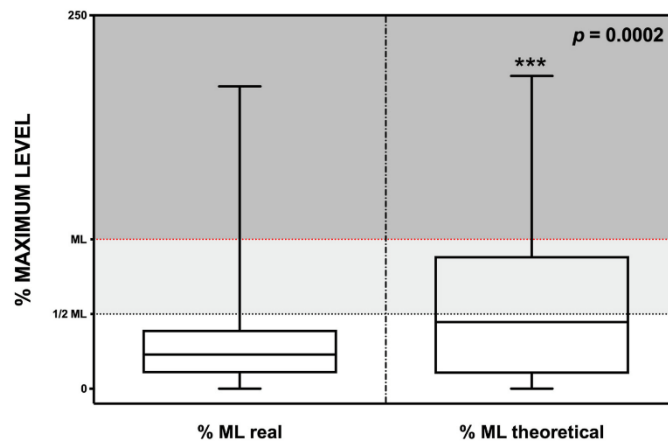


Fig. 1. Percentage of samples that would exceed the maximum content of NO₃ (real vs. theoretical). The lines show the medians, the boxes cover the 25th to 75th percentiles, and the minimal and maximal values are shown by the ends of the bars.

because, even with the best agricultural practices, it is sometimes complicated to produce these vegetables with low nitrate levels (Aires et al., 2013; EFSA, 2008a). However, as shown in Table 2, none of the vegetables in this study presented significant differences in their nitrate concentration as a function of seasonality. However, it should be noted that all the vegetables analyzed in this study have been grown in the Canary Islands, and this archipelago is characterized by having a very stable subtropical climate, with a thermal oscillation of 6 °C between seasons, and an annual average temperature ranging between 18 and 24 °C (Lembrechts et al., 2020). Furthermore, it seems that the reason for vegetables accumulate more nitrates in winter has to do with low light intensity (Maynard et al., 1976). However, the Canary Islands is the region in Europe with the highest number of annual sunshine hours (>4600), and the average number of sunshine hours per day in the winter months (October–March, 5.8 h/day) is not too far from the average number of hours of sunshine in summer days (April–September, 8.1 h/day). These differences in light activity may not be sufficiently marked to influence significant differences in the seasonal accumulation of nitrates in vegetables grown in the archipelago.

As regards the mode of production, we were only able to compare four types of vegetables because they were the ones available on the market at the time of sampling (Table 3). Numerous studies have carried out comparative research between organic and conventional crops regarding nitrate accumulation. The results are not consistent and depend a lot on the type of plant, the geographical region of the vegetables, and above all, the agricultural practices used in one or another mode of production (Lima et al., 2012). Thus, numerous studies indicate that organic vegetables have significantly lower nitrate levels than conventional ones (Koh et al., 2012; Merino et al., 2006; Nunez de Gonzalez et al., 2015). However, other studies do not find differences, or find the relation to be inverse (De Martin and Restani, 2003). The latter is our case since, as can be seen in Table 3, nitrate levels in three of the four vegetables studied were significantly higher in organic cultivation. This is particularly surprising in the case of spinach, whose concentrations were 2.5 times higher, and to a lesser extent, in watercress and chard. Although most studies indicate that organic agriculture produces vegetables with lower nitrate concentrations, this largely depends on the type of fertilizer used in both modes of production (Li and Zhang, 2020). Organic fertilizers generally increase yield and quality of plants, but their excessive or inadequate application can cause serious environmental risks such as nitrate pollution (Li and Zhang, 2020). However, it should be noted that the NO₃ levels found in the organic crops included in this study are still lower than those reported in most of the available studies.

3.2. Estimated daily intake of nitrates through the consumption of leafy vegetables and risk assessment

In Table 4 we have summarised the exposure to nitrates through consumption of each type of leafy vegetable for average and 95th percentile consumers, and for two population groups (adults and children), as recommended by the EFSA (EFSA, 2010a). As the number of

data below the LOQ in our series was very low, we did not consider providing the range with a lower bound (where all results below the LOQ were substituted by 0), and an upper bound (where all results below the LOQ were substituted by that LOQ) (EFSA, 2010a). For simplicity, we only employed the middle-bound approach (namely estimated daily intake (EDI) in Table 4), where the results below the LOD were substituted by 0, and the results below the LOQ but above the LOD were substituted by the LOD). It should be borne in mind that some of these vegetables (spinach and chard) are partly consumed in cooked form, and that it has been estimated that cooking can reduce the nitrate content of the vegetable by up to 50%. However, as we have made the determinations on fresh uncooked vegetables, and since most of them are consumed fresh, we have ignored the effect of cooking. In other words, the calculations that we present could be somewhat over-estimated, especially regarding the dietary intake of nitrates from the consumption of chard and spinach. For all estimates, we calculated the percentage of the ADI set for nitrates (3.7 mg/kg bw/day) (EFSA, 2008a) which represents the daily intake through consumption of each vegetable (Table 4). We also calculated the distribution of nitrate exposure by consuming each plant, considering the individual values in the probabilistic analysis. Calculations were made using the Monte Carlo system for stochastic modeling of dietary exposure (McNamara et al., 2003), using the Excel program (Microsoft 365, Redmond, USA). According to this algorithm, multiple exposures are calculated, randomly selecting consumption data from the database (random people) and multiplying it by a randomly selected nitrate concentration in the vegetable species from the concentration database. The number of possible calculations was different for each vegetable since the sample sizes were different for each of them. Thus, the calculation iterations depended on the number of nitrate results available for each vegetable and the number of respondents to the nutritional surveys and ranged from 4732 (consumption of arugula in children) to 30720 (consumption of watercress in adults) calculations. The different possible results generated in an iterative way were represented graphically in box and whiskers graphs representing the range of results obtained for each vegetable, in each consumption scenario (average and high consumers), and both for adults and children (Fig. 2).

As shown in Table 4, for average consumers, the EDI of nitrates does not exceed the ADI value of any of the vegetables. However, it is confirmed that all of them contribute significantly to the exposure to this mineral. Among the vegetables studied, the one that contributes the most to the diet of adults is arugula. However, this result should be considered with caution, because no data are available on consumption of this vegetable in this region, and data on lettuce have been used to make the estimate. In the case of children, the estimate for chard is striking, as it contributes almost 61% of the ADI and of the nitrates in those children that consume this vegetable (50th percentile). Although the arugula is also a relevant contributor to nitrate exposure, chard - whose maximum content of nitrates is not limited in the EU - is the major contributor to nitrate exposure in this age group of the Canary population (Table 4). When we examine the probabilistic distribution of the exposure (Fig. 2), no relevant risk is observed either. However, it should

Table 2
Comparison of the concentration of NO₃ in the different types of leafy vegetables (mg/kg fresh weight) between two seasons, summer vs. winter.

Vegetal	Summer					Winter					P
	mean	SD	median	P25–P75	Range	mean	SD	median	P25–P75	Range	
With maximum content set in the EU											
Romaine lettuce	770.2	609.7	799.0	465.9–918.9	0.0–3188.2	871.2	734.5	658.9	252.7–1572.3	0.0–2551.3	n.s.
Iceberg lettuce	557.3	457.3	482.4	270.8–633.5	0.0–1822.3	663.2	396.1	669.0	368.5–807.1	98.3–1538.4	n.s.
Salad mix (fourth range salad)	1756.1	1457.3	1578.2	392.0–2776.2	0.0–4424.2	1725.4	1402.3	1135.4	508.1–3048.2	84.6–4677.2	n.s.
Spinach	1205.3	1154.1	937.4	531.4–1500.2	0.0–4802.1	1794.2	1660.2	1490.3	0.0–2666.3	0.0–6074.1	n.s.
No Maximum Content set in the EU											
Watercress	983.5	1227.3	364.5	74.0–1637.2	0.0–4187.1	783.7	564.1	676.0	293.2–1291.1	90.0–2051.1	n.s.
Chard	1525.2	1403.1	1092.0	189.0–2365.1	0.0–4260.0	1874.1	1005.0	1961.1	1458.1–2539.2	0.0–4362.1	n.s.

Table 3

Comparison of the concentration of NO₃ in the different types of leafy vegetables (mg/kg fresh weight) between two types of production, conventional vs. organic.

Vegetable	Conventional					Organic					P
	mean	SD	median	P25–P75	Range	mean	SD	median	P25–P75	Range	
With maximum content set in the EU											
Iceberg lettuce	875.5	508.9	804.7	425.1–1397.2	354.2–1538.1	519.0	222.1	608.9	266.1–682.0	254.3–721.3	n.s.
Spinach	1449.0	1455.2	1028.2	432.4–2119.2	0.0–6074.3	2510.2	2575.1	2510.2 *	2453.1–2567.2	2453.1–2567.2	0.0200
No Maximum Content set in the EU											
Watercress	746.5	893.8	409.0	118.9–1263.0	0.0–4187.2	1134.1	738.3	1374.1 *	199.8–1880.1	112.9–1953.3	0.0412
Chard	1568.0	1158.3	1605.2	540.7–2461.0	0.0–4260.3	2520.1	835.3	2268.1 *	2015.1–2763.1	1620.1–4362.2	0.0365

Table 4

Daily exposure to NO₃ through the consumption of each of the leafy vegetables, according to the consumption pattern in the Canary Islands. Only people who consume this vegetable are considered and the results are expressed in mg/kg body weight/day.

Leafy vegetable consumed	Adults - consumers percentile 50			Adults - consumers percentile 97.5			
	Consumption (g/day)	EDI	% ADI (mean)	Consumption (g/day)	EDI	% ADI (mean)	
With maximum content set in the EU							
Romaine lettuce		33.7	0.42	12.44	170	2.12	62.77
Iceberg lettuce			0.49	15.87		3.02	95.77
Baby lettuce			0.26	10.34		1.32	52.17
Salad mix (fourth range salad)			0.33	10.93		1.69	55.13
Spinach		41.79	0.73	28.12	200	3.48	134.57
Arugula (rocket)		33.7 ^a	1.83	49.46	170 ^b	9.25	250.00 ^b
No Maximum Content set in the EU							
Watercress		41.39	0.31	14.72	204	1.51	71.32
Chard		41.26	1.23	32.52	112	3.28	86.70
Children - consumers percentile 50							
Leafy vegetable consumed	Consumption (g/day)	EDI	% ADI (mean)	Consumption (g/day)	EDI	% ADI (mean)	
With maximum content set in the EU							
Romaine lettuce		13.48	0.78	23.33	68	3.93	117.72
Iceberg lettuce			0.93	29.76		5.64	179.58
Baby lettuce			0.49	19.39		2.47	97.81
Salad mix (fourth range salad)			0.63	20.49		3.16	103.37
Spinach		22.98	1.36	52.72	110	6.53	252.31
Arugula (rocket)		6.74 ^a	1.72	46.48	34 ^a	8.67	234.45 ^a
No Maximum Content set in the EU							
Watercress		22.76	0.53	27.62	112	2.82	133.72
Chard		18.15	2.31	60.97	48.4	6.15	162.55

^a Since no data regarding arugula intake are available, it was considered similar to that of lettuce intake in adults, and 50% of lettuce consumption in children, although this consumption is probably overestimated, especially in percentile 97.5.

be noted that a percentage of the possible iterations indicate that the ADI has been exceeded in the case of consumption of spinach in adults (1.67%, 432 iterations) and in the case of spinach (8.32%, 1004 iterations) and chard (17.54%, 1821 iterations). The latter is striking, since, as can be seen in Fig. 3, both nitrate concentrations and dietary intake in Canarian children is significantly higher in the case of a vegetable with no regulated maximum limit (chard) than in one regulated for similar consumption (spinach).

At the high percentile of consumption (P97.5), which could include, for example, certain strict vegetarians (vegans), exposure to nitrates through the consumption of leafy vegetables increases considerably. Even so, in adults, the maximum recommended level is not exceeded, except in the case of arugula and, to a lesser extent, spinach. However, this is of particular concern in children, since in large consumers of green leafy vegetables, the ADI of nitrates would be exceeded with the consumption of virtually all the leafy vegetables studied (Table 4 and Fig. 2). These results are consistent with those evaluated by the EFSA expert group, which does not rule out the risk in extreme situations, such as those where a high consumption of spinach is combined with the presence of high levels of nitrates in spinach (EFSA, 2010b). The expert group ruled out that lettuce poses a real risk for very young children

since it is hardly part of their diet. However, in the case of older children, excessive consumption can cause important adverse health effects. Our results indicate that, although moderate consumption of leafy vegetables is highly recommended for children, care must be taken when large amounts are provided, including chard and watercress in the case of Canarian children.

Finally, as this is a study carried out in the Canary Islands, we consider important to highlight the role of watercress in terms of its contribution to the supply of nitrates to the diet. The consumption of this vegetable in Europe is practically marginal since it is a very unknown and little cultivated vegetable. Most consumers also eat it inadvertently mixed with other vegetables in pre-prepared convenience salads (ready-to-eat or 4th range salads). However, in the Canary Islands, it is the main ingredient of one of its most appreciated traditional gastronomic elaborations: watercress stew. In addition, watercress is consumed in the archipelago in many other recipes, raw or cooked. Therefore, in this territory, it is the green leafy vegetable with the highest daily consumption and with a higher percentage of consumers among the general population (Serra Majem et al., 2000). As we have described above, their contribution of nitrates to the Canarian diet could even exceed the ADI in children in the high percentile of consumption, representing about

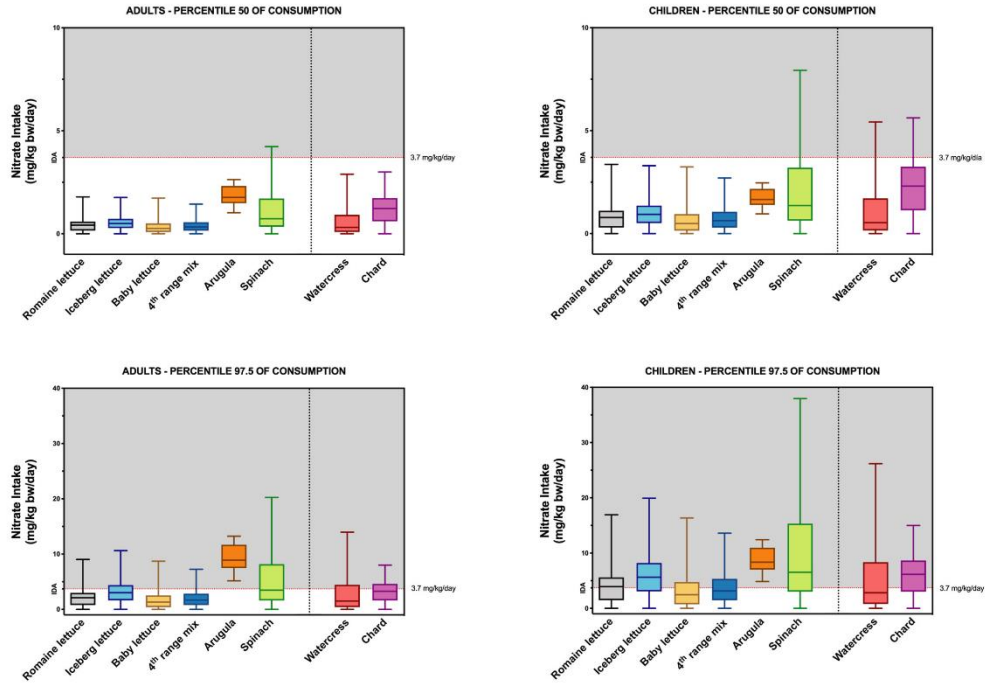


Fig. 2. Box and whiskers graphs showing the probabilistic distribution of the exposure to nitrates through the consumption of the different regulated and unregulated vegetables in adults (left panels) and children (right panels). The exposure scenarios are shown for average (upper panels) and high consumers (97.5 percentile, lower panels). The lines show the medians, the boxes cover the 25th to 75th percentiles, and the minimal and maximal values are shown by the ends of the bars.

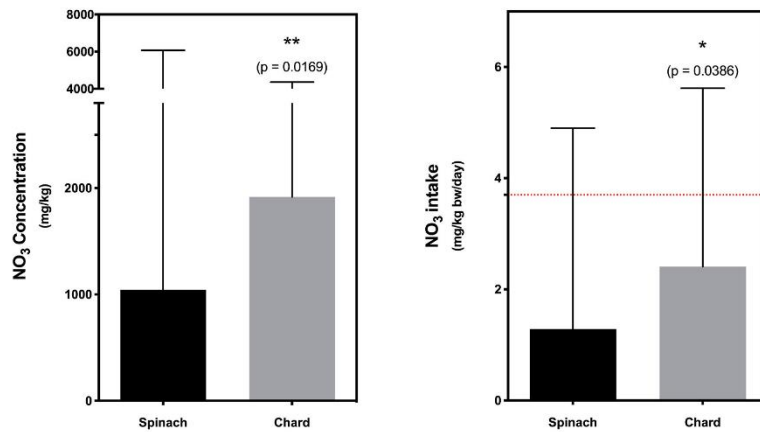


Fig. 3. Comparison in the nitrate content (left) and exposure through consumption (right) between two vegetables of similar culinary uses, one regulated regarding the maximum content of nitrates in the EU, spinach, and other that is unregulated, the chard.



15–28% of the ADI for average consumers (adults and children). We consider that these results are very relevant and that the European regulatory authorities should take them into account for two important reasons. Firstly, although the nitrate levels indicated in this study are not excessively high (Tables 1–3), it should be noted that watercress is considered a hyper-accumulating of nitrates vegetable. The watercress analyzed in this study were grown in the Canary Islands. As already discussed, the weather conditions of this territory favour a low accumulation of this mineral. However, at the peaks of consumption (mainly in the coldest months of winter), watercress grown out of the archipelago is imported. In this case, taking into account the concentrations reported in other studies (Blekkenhorst et al., 2017; Guadagnin et al., 2005; Meamarbashi and Alipour, 2014), the exposure of consumers in the Canary Islands could be up to 10 times higher, and risk situations could occur as the ADI would be largely exceeded. On the other hand, it should be noted that watercress has obtained the highest score on the nutrient density scale, and it has been classified as high potency food (Di Noia, 2014). This could cause an exponential increase of its consumption in other regions other than the Canary Islands, similar to what has happened with kale, Chinese cabbage, beet green, or chicory. For all these reasons, we consider it appropriate to set maximum nitrate limits for both watercress and chard, similar to those set for spinach.

It is important to carry out estimation studies for the different regions since the ADI of 3.7 µg/kg/day estimated by the WHO may either not be reached or be widely exceeded, depending on the food consumption habits of a certain area (Gorenjak and Cencic, 2012). Thus, the ingestion of nitrates can double the ADI with the traditional diet in China (Zhong et al., 2002), quadruple it with the traditional diet in Japan (Sobko et al., 2010), or even be six-fold higher with the dietary approach for the treatment of hypertension in the United States (Gorenjak and Cencic, 2012). In our case, the consumption pattern of the average consumer in the Canary Islands would give us an exposure to nitrates similar to that reported for other European countries if we only considered vegetables regulated in the EU (around 20–48% of the ADI in average consumers, and around 80–120% of the ADI in intensive consumers) (Brkic et al., 2017; De Martin and Restani, 2003; Quijano et al., 2017; Temme et al., 2010; Temme et al., 2011). However, when we include watercress and chard in the equation, the exposure pattern in the Canary Islands is already clearly distinguished from that of other European regions, since for example, watercress would contribute only 5.1% of the ADI in European regions (Gorenjak and Cencic, 2012), while as we have previously presented, in the Canary Islands this vegetable alone could lead to the ADI being widely exceeded.

4. Conclusions

Our results indicate that leafy vegetables grown in the Canary Islands have moderate nitrate levels, considerably lower than those reported in most of the studies. There were also no seasonal differences in the nitrate content of these vegetables. Both the relatively low concentrations and the lack of differentiation between summer and winter could be due to the stable climate and high sun exposure in this region. Several of the organic vegetables grown in the Canary Islands, contrary to what is usually reported, had higher levels than those of the conventional crop. This might be related to the inadequate use of organic fertilizers by farmers in the archipelago. The levels found in two vegetables with no maximum limit of nitrates, watercress, and chard should be highlighted. These vegetables are widely consumed in the Canary Islands, and according to our results, they can contribute significantly to global exposure, even more than other vegetables that are regulated. For this reason, we believe that it would be appropriate for EU regulatory authorities to consider setting maximum nitrate limits for chard and watercress, which could be similar to those set for spinach.

CRediT authorship contribution statement

Verónica Martín León: Literature research, Laboratory work, Formal analysis, Statistical analysis. **Octavio P. Luzardo:** Guarantor of integrity of the entire study, Literature research.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

- Aecosan, 2011. ENIDE: national survey of dietary intake (2009-2010). Results on consumption data. In: Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Gobierno de España.
- Aecosan, 2014a. ENALIA 2 survey. National Food Survey in the adult, elderly and pregnant population (2012-2014). Results on consumption data. In: Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Gobierno de España.
- Aecosan, 2014b. ENALIA survey. National food survey of children and adolescents (2012-2014). In: Results on consumption data. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Gobierno de España.
- Aesan, 2011. Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) in relation to the risk assessment of infants and young children's exposure to nitrates resulting from the consumption of chard in Spain. *Revista del Comité Científico AESAN* 1–24.
- Ahmed, M., Rauf, M., Mukhtar, Z., Saeed, N.A., 2017. Excessive use of nitrogenous fertilizers: an unawareness causing serious threats to environment and human health. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 24, 26983–26987.
- Aires, A., Carvalho, R., Rosa, E.A., Saavedra, M.J., 2013. Effects of agriculture production systems on nitrate and nitrite accumulation on baby-leaf salads. *Food Sci. Nutr.* 1, 3–7.
- Anglade, J., Medina, M.R., Billen, G., Garnier, J., 2018. Organic market gardening around the Paris agglomeration: agro environmental performance and capacity to meet urban requirements. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 25, 23373–23382.
- Apostoli, G.L., Solomon, A., Smallwood, M.J., Winyard, P.G., Emerson, M., 2014. Role of inorganic nitrate and nitrite in driving nitric oxide-eGMP-mediated inhibition of platelet aggregation in vitro and in vivo. *J. Thromb. Haemostasis* 12, 1880–1889.
- Beule, L., Corre, M.D., Schmidt, M., Gobel, L., Veldkamp, E., Karlovsky, P., 2019. Conversion of monoculture cropland and open grassland to agroforestry alters the abundance of soil bacteria, fungi and soil-N-cycling genes. *PLoS One* 14, e0218779.
- Blekkenhorst, L.C., Prince, R.L., Ward, N.C., Croft, K.D., Lewis, J.R., Devine, A., Shinde, S., Woodman, R.J., Hodgson, J.M., Bondano, C.P., 2017. Development of a reference database for assessing dietary nitrate in vegetables. *Mol. Nutr. Food Res.* 61, 1600982.
- Bondano, C.P., Croft, K.D., Hodgson, J.M., 2016. Dietary nitrate, nitric oxide, and cardiovascular health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 56, 2036–2052.
- Brkic, D., Bosmir, J., Bevardi, M., Boskovic, A.G., Milos, S., Lasic, D., Krivohlavck, A., Racz, A., Cuić, A.M., Trstenjak, N.U., 2017. Nitrate in leafy green vegetables and estimated intake. *Afr. J. Tradit. Complementary Altern. Med.* 14, 31–41.
- Cavaiuolo, M., Ferrante, A., 2014. Nitrates and glucosinolates as strong determinants of the nutritional quality in rocket leafy salads. *Nutrients* 6, 1519–1538.
- Colla, G., Kim, H. J., Kyriacou, M.C., Roupael, Y., 2018. Nitrate in fruits and vegetables. *Sci. Hortic.* 237, 221–238.
- Cunningham, E., 2013. Dietary nitrates and nitrites harmful? Helpful? Or paradox? *J. Acad. Nutr. Diet.* 113, 1268.
- De Martin, S., Restani, P., 2003. Determination of nitrates by a novel ion chromatographic method: occurrence in leafy vegetables (organic and conventional) and exposure assessment for Italian consumers. *Food Addit. Contam.* 20, 787–792.
- Di Noia, J., 2014. Defining powerhouse fruits and vegetables: a nutrient density approach. *Prev. Chronic Dis.* 11, E95.
- Durazzo, A., Azzini, E., Luzzi, M.C., Raguzzini, A., Pizzala, R., Maiami, G., 2013. Italian Wild Rocket [*Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC.]. Influence of agricultural practices on antioxidant molecules and on cytotoxicity and antiproliferative effects. *Agriculture* 3, 285–298.
- Ec, 2006. Commission regulation (EU) No 1258/2011 of 2 December 2011 amending regulation (EC) No 1831/2006 as Regards Maximum Levels for Nitrates in Foodstuffs. *Off J Eur Union.* L320/315.
- EFSA, 2008a. Nitrate in vegetables - scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. *The EFSA Journal* 689, 1–79.
- EFSA, 2008b. Polycyclic aromatic hydrocarbons in food. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. *The EFSA Journal* 724, 1–114.
- EFSA, 2010a. Management of left-censored data in dietary exposure assessment of chemical substances. *EFSA Journal* 8, 1–96.
- EFSA, 2010b. Statement on possible public health risks for infants and young children from the presence of nitrates in leafy vegetables. *The EFSA Journal* 8, 1935.
- Fytianos, K., Zorogiannis, P., 1999. Nitrate and nitrite accumulation in fresh vegetables from Greece. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 62, 187–192.
- Gorenjak, A.H., Cencic, A., 2012. Nitrate in vegetables and their impact on human health. A review. *Acta Aliment.* 42.



- Greenwood, D.J., Ncetson, J.J., Draycott, A., 1986. Quantitative relationships for the dependence of growth rate of arable crops on their nitrogen content, dry weight and aerial environment. *Plant Soil* 91, 281–301.
- Guadagnin, S.G., Rath, S., Reyes, F.G., 2005. Evaluation of the nitrate content in leaf vegetables produced through different agricultural systems. *Food Addit. Contam.* 22, 1203–1208.
- Hahermeyer, M., Roth, A., Guth, S., Diel, P., Engel, K.H., Epe, B., Fürst, P., Heinz, V., Humpf, H.U., Jost, H.G., Knorr, D., de Kok, T., Kulling, S., Lampen, A., Marko, D., Reckemmer, G., Rietjens, I., Stadler, R.H., Viethe, S., Vogel, R., Steinberg, P., Eisenbrand, G., 2015. Nitrate and nitrite in the diet: how to assess their benefit and risk for human health. *Mol. Nutr. Food Res.* 59, 106–128.
- Hakeem, K.R., Sabir, M., Öztürk, M., Akhtar, M.S., Ibrahim, F.H., 2017. Nitrate and nitrogen oxides: sources, health effects and their remediation. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 242, 183–217.
- Hobbs, D.A., George, T.W., Lovegrove, J.A., 2013. The effects of dietary nitrate on blood pressure and endothelial function: a review of human intervention studies. *Nutr. Res. Rev.* 26, 210–222.
- Hord, N.G., Tang, Y., Bryan, N.S., 2009. Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits. *Am. J. Clin. Nutr.* 90, 1–10.
- Iannarino, M., Di Taranto, A., Cristiano, M., 2014. Monitoring of nitrites and nitrates levels in leafy vegetables (spinach and lettuce): a contribution to risk assessment. *J. Sci. Food Agric.* 94, 773–778.
- IARC, 1978. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Some N-Nitroso Compounds. World Health Organization, Lyon, pp. 1–350. Available at: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol1-42/mcn017.pdf>.
- IARC, 2010. Ingested nitrate and nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. IARC (Int. Agency Res. Cancer) Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 94, 1–464.
- Jackson, J., Patterson, A.J., MacDonald-Wicks, L., McEvoy, M., 2017. The role of inorganic nitrate and nitrite in CVD. *Nutr. Res. Rev.* 30, 247–264.
- JECFA, 1998. Joint FAO/WHO expert committee on food additives. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. In: WHO Food Additives Series 40. World Health Organization.
- Jones, A.M., Thompson, C., Wylie, L.J., Vanhatalo, A., 2018. Dietary nitrate and physical performance. *Annu. Rev. Nutr.* 38, 303–328.
- Karwowska, M., Kononik, A., 2020. Nitrates/nitrites in food risk for nitrosative stress and benefits. *Antioxidants* 9.
- Khalifi, S., RahimiPour, A., Jeddi, S., Ghanbari, M., Kazerouni, F., Ghasemi, A., 2015. Dietary nitrate improves glucose tolerance and lipid profile in an animal model of hyperglycemia. *Nitric Oxide* 44, 24–30.
- Knež, V., Žnidarčič, D., Franic, M., Bui, S.G., 2019. Nitrate and nitrite contamination of vegetables in the Slovenian market. *Food Addit. Contam. Part B Surveill* 12, 216–223.
- Kohayashi, J., Ohtake, K., Uchida, H., 2015. NO-rich diet for lifestyle-related diseases. *Nutrients* 7, 4911–4937.
- Koh, E., Charoensaprasert, S., Mitchell, A.E., 2012. Effect of organic and conventional cropping systems on ascorbic acid, vitamin C, flavonoids, nitrate, and oxalate in 27 varieties of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *J. Agric. Food Chem.* 60, 3144–3150.
- Kyriacou, M.C., Soteriou, G.A., Colla, G., Roupahad, Y., 2019. The occurrence of nitrate and nitrite in Mediterranean fresh salad vegetables and its modulation by preharvest practices and postharvest conditions. *Food Chem.* 285, 468–477.
- Lembrechts, J.J., Aalto, J., Ashcroft, M.B., De Frenne, P., Kopecky, M., Lenoir, J., Luoto, M., Macleau, L.M.D., Rouspard, O., Fuentes-Lillo, E., Garcia, R.A., Pellissier, L., Pitteloud, C., Alatalo, J.M., Smith, S.W., Björk, R.G., Muffler, L., Cesarz, S., Göttschall, F., Backes, A.R., Okello, J., Urban, J., Plichta, R., Svatek, M., Phartyal, S.S., Wipf, S., Eisenhauer, N., Púscas, M., Dan Turtureanu, P., Varlagin, A., Dimarco, R.D., Jümp, A.S., Randall, K., Dorrepaal, E., Larson, K., Walz, J., Vitale, L., Svoboda, M., Finger Higgins, R., Halbritter, A.H., Curasi, S.R., Klupar, I., Koontz, A., Pearce, W.D., Simpson, E., Stenkovski, M., Graac, B.J., Vedel Sorensen, M., Hoyer, T. T., Fernandez Calzado, M.R., Lorite, J., Carbognani, M., Tomaselli, M., Forte, T.G.W., Petraglia, A., Haesen, S., Somers, B., Van Meerbeek, K., Björkman, M.P., Hylander, K., Merinero, S., Gharun, M., Buchmann, N., Dolezal, J., Matula, R., Thomas, A.D., Bailey, J.J., Ghosni, D., Kazakis, G., de Pablo, M.A., Kempainen, J., Niittynen, P., Rew, L., Seipel, T., Larson, C., Speed, J.D.M., Ardo, J., Cannone, N., Guggelmin, M., Malfasi, F., Bader, M.Y., Canessa, R., Stanisci, A., Kreyling, J., Schmeddes, J., Treuber, F., Aschero, V., Ciliak, M., Malis, F., De Smedt, P., Govaert, S., Meussen, C., Vangansbeke, P., Gignani, K., Lamrecht, A., Pauli, H., Steinbauer, K., Winkler, M., Ueyama, M., Nunez, M.A., Ursu, T.M., Haider, S., Wedegartner, R.E.M., Smiljanic, M., Trouillier, M., Wilmking, M., Almaan, J., Bruna, J., Hederova, I., Macek, M., Man, M., Wild, J., Virtoz, P., Partel, M., Baranco, P., Kanka, R., Kollar, J., Palaj, A., Barros, A., Mazzolari, A.C., Bauters, M., Boeckx, P., Benito Alonso, J.J., Zeng, S., Di Cecco, V., Sitkova, Z., Tielborger, K., van den Brink, L., Weigel, R., Homeier, J., Dahlberg, C.J., Medinets, S., Medinets, V., De Boeck, H.J., Portillo Estrada, M., Verryckt, L.T., Milbau, A., Daskalova, G.N., Thomas, H.J.D., Myers-Smith, I.H., Blonder, B., Stephan, J.G., Descombes, P., Zellweger, F., Frei, B., Iliescu, B., Andrews, C., Dick, J., Siebicke, L., Rocha, A., Senior, R.A., Rixen, C., Jimenez, J.J., Boike, J., Pauchard, A., Scholten, T., Scheffers, B., Klings, D., Basham, E.W., Zhang, J., Zhang, Z., Geron, C., Fazioglu, F., Candan, O., Sallo Bravo, J., Hrbacek, F., Laska, K., Cremonese, E., Haase, P., Moyano, F.E., Rossi, C., Nijls, J., 2020. SoilTemp: a global database of near-surface temperature. *Global Change Biol.* <https://doi.org/10.1111/gcb.15123>.
- Li, H., Zhang, Y., 2020. Abnormal ratio of nitrate to ammonium nitrogen fertilizers in China. *J. Agric. Food Chem.* 68, 701–702.
- Lima, G.P., Teixeira da Silva, J.A., Bernilard, A.B., Pirozzi, D.C., Fleuri, L.F., Vianello, F., 2012. Organic and conventional fertilisation procedures on the nitrate, antioxidants and pesticide content in parts of vegetables. *Food Addit. Contam. Part B Surveill* 5, 188–193.
- Lin, A.H., Bondonno, C.P., Russell, J., Flood, V.M., Lewis, J.R., Croft, K.D., Woodman, R. J., Lin, W.H., Kiley, A., Wong, G., Mitchell, P., Hodgson, J.M., Blekkenhorst, L.C., 2019. Relationship of dietary nitrate intake from vegetables with cardiovascular disease mortality: a prospective study in a cohort of older Australians. *Eur. J. Nutr.* 58, 2741–2753.
- Lovegrove, J.A., Stainer, A., Hobbs, D.A., 2017. Role of flavonoids and nitrates in cardiovascular health. *Proc. Nutr. Soc.* 1–13.
- Lyons, D.I., Rayment, G.E., Nobbs, P.F., McCallum, I.F., 1994. Nitrate and nitrite in fresh vegetables from Queensland. *J. Sci. Food Agric.* 64, 279–281.
- Maynard, D.N., Barker, A.V., Minotti, P.L., Peck, N.H., 1976. Nitrate accumulation in vegetables. *Adv. Agron.* 28, 71–118.
- McNamara, C., Naddy, B., Rohan, D., Sexton, J., 2003. Design, development and validation of software for modelling dietary exposure to food chemicals and nutrients. *Food Addit. Contam.* 20 (Suppl. 1), S8–S26.
- Meambarbashi, A., Alipour, M., 2014. Moderate dose of watercress and red radish does not reduce oxygen consumption during graded exhaustive exercise. *Avicenna J Phytomed* 4, 267–272.
- Meng, F., Qiao, Y., Wu, W., Smith, P., Scott, S., 2017. Environmental impacts and production performances of organic agriculture in China: a monetary valuation. *J. Environ. Manag.* 188, 49–57.
- Merino, L., Darnérod, P.O., Edberg, U., Aman, P., Castillo, M.D., 2006. Levels of nitrate in Swedish lettuce and spinach over the past 10 years. *Food Addit. Contam.* 23, 1283–1289.
- Núñez de González, M.T., Osburn, W.N., Hardin, M.D., Longmecker, M., Garg, H.K., Bryan, N.S., Keeton, J.T., 2015. A survey of nitrate and nitrite concentrations in conventional and organic labeled raw vegetables at retail. *J. Food Sci.* 80, C942–C949.
- Quijano, I., Yusa, V., Font, G., McAllister, C., Torres, C., Pardo, O., 2017. Risk assessment and monitoring programme of nitrates through vegetables in the Region of Valencia (Spain). *Food Chem. Toxicol.* 100, 42–49.
- Ramms, B., Gordts, P.L., 2016. Dietary nitrate struggles in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 245, 71–73.
- Salehzadeh, H., Maleki, A., Rezaee, R., Shahmoradi, B., Ponnet, K., 2020. The nitrate content of fresh and cooked vegetables and their health-related risks. *PLoS One* 15, e0227551.
- Serra Majem, L., Armas Navarro, A., Ribas Barba, L., 2000. Food consumption and food sources of energy and nutrients in Canary Islands (1997–98). *Arch. Latinoam. Nutr.* 50, 23–33.
- Sobko, T., Marcus, C., Govoni, M., Kamiya, S., 2010. Dietary nitrate in Japanese traditional foods lowers diastolic blood pressure in healthy volunteers. *Nitric Oxide* 22, 136–140.
- Song, P., Wu, L., Guan, W., 2015. Dietary nitrates, nitrites, and nitrosamines intake and the risk of gastric cancer: a meta-analysis. *Nutrients* 7, 9872–9895.
- Tang, L., Luo, W.J., He, Z.L., Gurajala, H.K., Hamid, Y., Khan, K.Y., Yang, X.F., 2018. Variations in cadmium and nitrate co-accumulation among water spinach genotypes and implications for screening safe genotypes for human consumption. *J. Zhejiang Univ. - Sci. B* 19, 147–158.
- Tegeer, M., Masclau Daubresse, C., 2018. Source and sink mechanisms of nitrogen transport and use. *New Phytol.* 217, 35–53.
- Temme, E., Huybrechts, I., Vandevijvere, S., De Henauw, S., Leveque, A., Kornitzer, M., De Backer, G., Van Oyen, H., 2010. Energy and macronutrient intakes in Belgium: results from the first national food consumption survey. *Br. J. Nutr.* 103, 1823–1829.
- Temme, E.H., Vandevijvere, S., Vinx, C., Huybrechts, I., Goeyens, L., Van Oyen, H., 2011. Average daily nitrate and nitrite intake in the Belgian population older than 15 years. *Food Addit. Contam. Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 28, 1193–1204.
- Thomson, B.M., Nokes, C.J., Cressey, P.J., 2007. Intake and risk assessment of nitrate and nitrite from New Zealand foods and drinking water. *Food Addit. Contam.* 24, 113–121.
- Venieri, P., Borghesi, E., Tognoni, F., Serra, G., Ferrante, A., Piaggini, A., 2006. Use of biostimulants for reducing nutrient solution concentration in floating system. *Acta Hort.* 718, 477–484.
- Xie, L., Mo, M., Jia, H.X., Liang, F., Yuan, J., Zhu, J., 2016. Association between dietary nitrate and nitrite intake and site-specific cancer risk: evidence from observational studies. *Oncotarget* 7, 56915–56932.
- Yang, T., Zhang, X.M., Tarnawski, I., Peleli, M., Zhuge, Z., Terrando, N., Harris, R.A., Olofsson, P.S., Larsson, E., Persson, A.E.G., Lundberg, J.O., Weitzberg, E., Carlstrom, M., 2017. Dietary nitrate attenuates renal ischemia reperfusion injuries by modulation of immune responses and reduction of oxidative stress. *Redox Biol* 13, 320–330.
- Zand, J., Lanza, F., Garg, H.K., Bryan, N.S., 2011. All-natural nitrite and nitrate containing dietary supplement promotes nitric oxide production and reduces triglycerides in humans. *Nutr. Res.* 31, 262–269.
- Zhong, W., Hu, C., Wang, M., 2002. Nitrate and nitrite in vegetables from north China: content and intake. *Food Addit. Contam.* 19, 1125–1129.



6.2. Artículo 2: objetivos 3, 4.

**Human Exposure to Toxic Metals (Cd, Pb, Hg) and Nitrates
(NO₃⁻) from Seaweed Consumption**

**“Exposición humana a metales tóxicos (Cd, Pb, Hg) y nitratos (NO₃)
por el consumo de algas”**

Article

Human Exposure to Toxic Metals (Cd, Pb, Hg) and Nitrates (NO₃⁻) from Seaweed Consumption

Verónica Martín-León¹, Soraya Paz^{2,*}, Prospero A. D'Eufemia^{2,3}, Juan J. Plasencia², Gianni Sagratini⁴, Gianmarco Marcantoni^{2,4}, Mercedes Navarro-Romero¹, Ángel J. Gutiérrez², Arturo Hardisson² and Carmen Rubio-Armendáriz²

¹ Public Health Laboratory of Las Palmas (Laboratorio de Salud Pública), Canary Health Service (Servicio Canario de Salud), 35004 Las Palmas de Gran Canaria, Spain; cmarleov@gobiernodecanarias.org (V.M.-L.); mnavrom@gobiernodecanarias.org (M.N.-R.)

² Department of Toxicology, Universidad de La Laguna, 38200 La Laguna, Spain; prosperoantonello.deufemia@studenti.unibas.it (P.A.D.); alu0100888843@ull.edu.es (J.J.P.); gianmarco.marcantoni@studenti.unicam.it (G.M.); ajguti@ull.edu.es (Á.J.G.); atorre@ull.edu.es (A.H.); crubio@ull.edu.es (C.R.-A.)

³ Dipartimento di Scienze (DiSU), University of Basilicata, 85100 Potenza, Italy

⁴ Scuola di Scienze del Farmaco e dei Prodotti della Salute, Università di Camerino, 62032 Camerino, Italy; gianni.sagratini@unicam.it

* Correspondence: spazmont@ull.edu.es; Tel.: +34-634-541-612



Citation: Martín-León, V.; Paz, S.; D'Eufemia, P.A.; Plasencia, J.J.; Sagratini, G.; Marcantoni, G.; Navarro-Romero, M.; Gutiérrez, Á.J.; Hardisson, A.; Rubio-Armendáriz, C. Human Exposure to Toxic Metals (Cd, Pb, Hg) and Nitrates (NO₃⁻) from Seaweed Consumption. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 6934. <https://doi.org/10.3390/app11156934>

Academic Editor: Andrea Salvo

Received: 12 July 2021

Accepted: 21 July 2021

Published: 28 July 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Seaweed is now considered a functional food with a high nutritional value in Western countries, and the consumption of different species of edible algae has grown exponentially in recent decades. However, anthropogenic pressure on the seas has increased the presence of pollutants such as toxic metals and nitrates that can accumulate in algae. It is necessary to know the levels of these contaminants and the dietary exposure from the consumption of edible algae. The content of toxic metals (Cd, Pb, Hg) and nitrates (NO₃⁻) was determined in 72 samples of edible algae marketed in the Canary Islands (Spain). Cd stands out in the Asian algae hijiki (1.196 mg/kg) and nori (1.005 mg/kg). Pb stands out in the Asian wakame seaweed (0.119 mg/kg). The highest mean concentration of Hg was in European arame algae (0.055 mg/kg). Some samples of the nori seaweed had NO₃⁻ concentrations of >8000 mg/kg. Considering the consumption recommended by the manufacturer of 4 g/day, the maximum admissible intake values are not exceeded, and, consequently, this does not pose a risk to health. However, in the case of Cd, Pb, Hg, and NO₃⁻, legislation is necessary to regulate their content in edible algae.

Keywords: seaweeds; cadmium; lead; mercury; nitrates; dietary intake; risk assessment

1. Introduction

The consumption of seaweed has long been part of the traditional diet in Asia and is currently growing in popularity in the Western world. According to the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), algae production in Europe accounts for 10% of global production [1–3]. Edible algae can be classified into four main large groups: blue, red, brown, and green algae.

Algae stand out for their vitamin B₁₂, omega-3 fatty acids, selenium, iodine, and fiber content [4]. However, in addition to high-value nutrients, they are capable of transferring toxic metals such as cadmium (Cd), lead (Pb), or mercury (Hg) to the consumer. These elements of toxicological relevance are present in marine waters as pollutants, which are characterized by their bioaccumulation in the trophic chain, or nitrates (NO₃⁻) from both natural sources (nitrogen cycle) and anthropogenic sources (fertilizers, intensive livestock, wastewater, etc.) [5–7].

Cd is a metal that induces tissue damage due to oxidative stress. It is nephrotoxic as it damages the renal tubule; it can cause deterioration of mitochondrial function, and

because of its divalent nature, it can compete with essential elements such as Zn [8,9]. The consumption of marine products such as algae, fish, or shellfish is an important source of exposure to Cd [10,11]. The European Food Safety Authority (EFSA) has set a tolerable weekly intake (TWI) for Cd of 2.5 µg/kg person/week [10].

Pb is one of the most toxic metals known; it is considered carcinogenic (Group 2B) for humans [12]. In adults, it causes cardiovascular, central nervous system, kidney, and fertility problems [13]. It is found in high concentrations in fruits, vegetables, and cereals as a result of the deposition of atmospheric Pb [14,15]. EFSA has established a benchmark dose (BMDL) value referring to the organospecific toxicity of Pb of 0.63 µg/kg body weight (bw)/day (nephrotoxic effects) and 1.5 µg/kg bw/day (cardiovascular effects) [16].

Hg can be found in the form of different chemical compounds of toxicological relevance [17]. Methylmercury compounds can cause brain damage, psychological disorders, deafness, loss of vision and motor skills, etc. Inorganic mercury compounds can damage the kidneys, liver, and brain [18]. EFSA has set TWI values of 4 µg/kg bw/week (inorganic Hg) and 1.3 µg/kg bw/week (methylmercury) [18].

Nitrates (NO_3^-) are found naturally in the environment. However, the concentration of these anions has increased as a result of human activity (use of fertilizers, intensive livestock farming, household waste, etc.). Nitrates, once in the body, can be reduced to nitrites by bacterial action and can then promote the formation of N-nitroso compounds, classified as carcinogens by the International Agency for Research on Cancer (IARC) [19]. Nitrates and nitrites are classified by IARC as “probable human carcinogens” (Group 2A) under certain conditions [20].

Scientific evidence associates a high exposure to nitrates with an increase in the incidence of gastric, colorectal, esophageal, thyroid, and kidney cancer, among others [6,21]. Likewise, especially in the case of children, a high intake of these anions is related to blue baby syndrome or methemoglobinemia [6,22].

Algae are autotrophic organisms that perform photosynthesis; that is, by their very nature, they use nitrogen and its derivatives for their biological cycles. Therefore, these organisms concentrate higher concentrations of nitrates. Despite this, algae are a food that, to date, has not been assigned legal nitrate limits, and this poses a risk for consumers.

The World Health Organization (WHO) and EFSA set an acceptable daily intake (ADI) of 3.7 mg/kg bw/day for nitrates [23], which remains in force today, despite recent re-evaluations by EFSA [24,25].

Bearing in mind the above, there is a clear need to determine the content of toxic metals (Cd, Pb, Hg) and nitrates in the different species of edible algae marketed in Europe in order to evaluate the contribution of their consumption to permitted intakes and thereby determine the safety of these products.

2. Material and Methods

All chemicals and materials used were of analytical quality or equivalent and were the following: hydrogen peroxide (H_2O_2) (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany), nitric acid (HNO_3) of 65% purity (Sigma Aldrich, Germany), sodium nitrate (NaNO_3) (99% purity) (Panreac, Spain), disodium tetraborate ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany), dibasic phosphate (Na_2HPO_4) (Merck, Darmstadt, Germany), LC-MS grade methanol (CH_3OH) (Panreac, Barcelona, Spain), potassium dihydrogen phosphate ($\text{H}_2\text{KO}_4\text{P}$) (Panreac, Spain), and C18 solid-phase extraction cartridges (6 mL, 500 mg) (Waters, Milford, MA, USA). The solutions were prepared with purified water from a Milli-Q Plus system (Millipore, Burlington, MA, USA).

2.1. Samples

A total of 72 samples of edible algae (green, brown, and red) marketed in Tenerife (Canary Islands) and acquired in different commercial areas between the months of January and December 2020 were analyzed (Table 1).

The samples were stored at room temperature and in their original containers until treatment. The analyzed algae belong to the species *Eisenia bicyclis* (Arame), *Laminaria ochroleuca* (Kombu), *Undaria pinnatifida* (Wakame), *Gracilaria* (Agar agar), *Sargassum fusiforme* (Hijiki), *Porphyra* (Nori), *Himanthalia elongata* (Sea spaghetti), *Ulva Lactuca* (Sea lettuce), *Mastocarpus stellatus* (Starry moss), and mixed salad.

In the case of the determination of nitrates, the sampling was planned according to the criteria established in Regulation (EC) No. 1882/2006 of the Commission, which sets out the sampling requirements and analytical methods for the official control of the content of nitrates in certain food products [26].

Table 1. Characteristics of the analyzed algae samples.

Species	Common Name	Type	No. Samples	Origin
<i>Gracilaria</i>	Agar agar	Red	3	Unknown
			5	Galicia (Spain, EU)
<i>Undaria pinnatifida</i>	Wakame	Brown	4	Japan (Non-EU)
			3	Unknown
			13	Galicia (Spain, EU)
<i>Laminaria ochroleuca</i>	Kombu	Brown	3	Japan (Non-EU)
			3	Unknown
			3	Unknown
<i>Sargassum fusiforme</i>	Hijiki	Brown	3	Japan (Non-EU)
			5	Korea (Non-EU)
<i>Porphyra</i>	Nori	Red	3	Japan (Non-EU)
			4	Galicia (Spain, EU)
			4	Japan (Non-EU)
<i>Himanthalia elongata</i>	Sea spaghetti	Brown	7	Galicia (Spain, EU)
<i>Ulva Lactuca</i>	Sea lettuce	Green	4	Galicia (Spain, EU)
<i>Mastocarpus stellatus</i>	Starry moss	Red	4	Galicia (Spain, EU)
-	Mixed salad	Brown and red	4	Galicia (Spain, EU)

2.2. Treatment and Determination of Toxic Metals

One gram of each previously homogenized sample was introduced into Teflon digestion vessels (GO for Smart Vent, Anton Parr, Austria) and made up to 65% with 2 mL of hydrogen peroxide (H₂O₂) (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) and 4 mL of nitric acid (HNO₃) (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany). The Teflon digestion vessels were closed, and the digestion was started in a microwave oven (Multiwave GO Plus, Anton Parr, Austria), applying the digestion program shown in Table 2. Three replicates were made for each analyzed sample.

Table 2. Instrumental conditions of the microwave digestion process.

No.	Ramp (min)	Temperature (°C)	Time (min)
1	15'00"	50	5'00"
2	5'00"	60	4'00"
3	5'00"	70	3'00"
4	3'00"	90	2'00"
5	20'00"	180	10'00"

Temperature limit: 200 °C. Cooling limit: 50 °C.

After digestion, the samples were transferred to a 10 mL volumetric flask and filled up to the mark with Milli-Q quality distilled water. The samples were then deposited in airtight jars with labeled lids for measurement.

The analytical method was atomic absorption spectrophotometry (AAS) [27]. AAS is an analytical method approved in Commission Regulation 333/2007 (EC) of 28 March 2007, which sets out the sampling and analysis methods for the official control of the levels of lead, cadmium, mercury, inorganic tin, 3-MCPDF, and benzo (a)pyrene in food products [28], which was later modified by Regulation 836/2011 [29].

The determination of Cd and Pb was performed with an atomic absorption spectrophotometer (AS-800, PerkinElmer, Waltham, MA, USA) with a graphite chamber (HGA-800, Perkin Elmer, USA) (GF-AAS). The Hg determination was carried out with a cold vapor atomic absorption spectrophotometer (AS-800, PerkinElmer, Waltham, MA, USA) (CV-AAS) with a flow injection system (FIMS-400, PerkinElmer, Waltham, MA, USA). The instrumental wavelengths (nm) were Cd (228.8), Pb (283.3), and Hg (253.7). The instrumental limits of quantification (LOQ) of the method were Cd (0.020 mg/kg), Pb (0.040 mg/kg), and Hg (0.10 mg/kg). Table 3 shows the instrumental conditions for the determinations of Cd, Pb, and Hg.

Table 3. Instrumental conditions of the graphite chamber for the determination of Cd and Pb and of the cold vapor for the determination of Hg.

	Step	Temp. (°C)	Ramp time (min)	Hold time (min)	Internal Flow	Gas type
Cd	1	110	10	20	250	Normal
	2	130	15	30	250	
	3	700	10	20	250	
	4	1500	0	5	0	
	5	2450	1	3	250	
Pb	1	110	1	30	250	Normal
	2	130	15	30	250	
	3	700	10	20	250	
	4	1500	0	5	0	
	5	2450	1	3	250	
Read step: 4; Injection temp. (°C): 20						
Volume: 20 µL		Diluent volume: 0 µL		Diluent location: 131		
	Time (s)	Pump 1 speed	Pump 2 speed	Valve position		
Hg	15	100	120	Fill		
	11	100	120			
	15	0	120	Inject		

The quality control of the method to ensure the precision and accuracy of the analytical procedure was based on the recovery study with certified reference material under reproducible conditions. The reference material used was as follows: Cd and Pb (BCR-279 Sea Lettuce, British Certified Reference) and Hg (NIST SRM 1577 BL, National Institute of Standards and Technology; BCR-278 R MT). In all cases, recovery percentages greater than 95% were obtained.

2.3. Treatment and Determination of Nitrates

The entire analytical procedure for the determination of nitrates in algae was performed according to the official method EN 12014-4: 2005 and was carried out at the Public Health Laboratory of Las Palmas de Gran Canaria, which is accredited with the

ISO/IEC 17,025 standard. The method is accredited by the Spanish National Accreditation Entity (ENAC).

A 100 g portion of the sample (edible part) was homogenized using a laboratory grinder (Knifetec 1095, Foss, Hillerød, Denmark), after which 2.5 ± 0.2 g of homogenized sample were mixed with 25 mL of ultrapure water at 70 °C and 1.25 mL of a saturated solution of disodium tetraborate. After mixing, the samples were boiled for 15 min in a thermostatted bath (Precistern 6000141, Selecta, Madrid, Spain). After cooling, ultrapure water was added to the mixture to a weight of 61.5 g and then centrifuged at 4500 rpm for 15 min (Macrotronic BL centrifuge, Selecta, Madrid, Spain). The supernatant was cleaned using C18 cartridges that were preconditioned with 5 mL of methanol.

The purified extracts were diluted 1:1 with ultrapure water before chromatographic analysis. Based on previous laboratory experience, the samples that were expected to have a high nitrate concentration (>625 mg/kg) were diluted at 1:20 with ultrapure water to match the measurement range.

Before placing the samples in the chromatography vials, the extracts were filtered through $0.2 \mu\text{m} \times 47$ mm syringe filters (VWR, Radnor, PA, USA). Chromatographic analysis was performed on the day of extraction [7].

The extracts were subjected to chromatographic analysis for quantitative determination using a Waters 2695 system (Waters Corporation, Milford, MA, USA), consisting of a binary pump, a photodiode array detector (PDA), and a Rheodyne injection valve with an injection loop of 25 μL . The system was interconnected to a personal computer for instrumentation control, data acquisition, and processing and equipped with chromatographic software (Empower™, Waters). The chromatographic column was an anion IC-Pak (50 mm \times 4.6 mm ID, 10 μm particle size). The injection volume was 10 μL . The mobile phases consisted of 0.05 M phosphate buffer (A) and ultrapure water (B) and were performed in an isocratic mode, 1.0 mL/min at a constant temperature (25 °C).

The PDA detector was programmed to a fixed wavelength of 210 nm. The nitrate retention time was 11.51 min, and the limit of quantification was 500 mg/kg. The relative measurement uncertainty within the entire validated range was 14%. The nitrate recovery percentage was 96.7–105.4% (low range: 500 mg/kg, 96.7%; mid-range I: 2000 mg/kg, 105.4%; mid-range II: 5000 mg/kg, 105.3%; high range: 8000 mg/kg, 103.2%).

2.4. Statistical Analysis

The computer software GraphPad 8.4.3 (GraphPad, San Diego, CA, USA) was used to perform the statistical analysis of the results.

A set of tests were applied to verify the normality of the analyzed data (Anderson–Darling, D’Agostino and Pearson, Shapiro–Wilk, and Kolmogorov–Smirnov). Once the aforementioned tests were applied, the data obtained were checked to see whether they followed a normal distribution; if they did not, non-parametric tests were applied, in this case, the Mann–Whitney test (two-tailed). Significant differences are considered when the value of $p < 0.05$.

2.5. Calculation of Dietary Intake

The evaluation of dietary intake is based on the previous calculation of the estimated daily intake (EDI) (Equation (1)). Its percentage contribution is then obtained taking the reference values of tolerable daily/weekly intake [30–32].

$$\text{EDI} = \frac{\text{Nitrate or Metal concentration (mg/kg)}}{\text{Mean consumption (kg/day)}} \quad (1)$$

The mean average consumption of dehydrated seaweed, as stated by the manufacturers, is set at 4 g/day [33]. The mean average weight of a Spanish adult is 68.48 kg [34].

$$\text{Contribution}(\%) = \frac{\text{EDI} \left(\frac{\text{mg}}{\text{day}} \right)}{\text{Reference value} \left(\frac{\text{mg}}{\text{day}} \right)} \times 100 \quad (2)$$

2.6. Calculation of the MoE

The Margin of Exposure (MoE) was calculated (Equation (3)) to determine the margin of exposure for non-carcinogenic effects. “E” is the exposure level, given by the amount of toxic metal or nitrate ingested (mg/day). NOAEL is the No Observed Adverse Effect Level. The BMDL is the Benchmark Dose Level.

$$\text{MoE} = \frac{\text{NOAEL or BMDL}}{E} \quad (3)$$

3. Results and Discussion

3.1. Concentration and Dietary Intake of Toxic Metals (Cd, Pb, Hg)

Tables 4–6 show the mean concentrations (mg/kg dry weight/dw), standard deviations (SD), and the dietary intake assessment of the toxic metals (Cd, Pb, Hg) in the analyzed algae.

Table 4. Cadmium concentrations, estimated intake (EDI), and percentage contribution to the guideline value of the analyzed algae.

Origin	Species	Concentration ± SD (mg/kg)	EDI (µg/day)	Contribution to TWI (%)
Asia	<i>Hijiki</i>	1.196 ± 0.234	4.78	19.6
	<i>Nori</i>	1.005 ± 0.897	4.02	16.4
	<i>Kombu</i>	0.417 ± 0.484	1.67	6.82
	<i>Wakame</i>	0.753 ± 0.463	3.01	12.3
Europe	<i>Sea spaghetti</i>	0.020 ± 0.032	0.08	0.33
	<i>Kombu</i>	0.085 ± 0.096	0.34	1.39
	<i>Sea lettuce</i>	<LOQ	-	-
	<i>Starry moss</i>	<LOQ	-	-
	<i>Nori</i>	0.011 ± 0.00	0.044	0.18
	<i>Wakame</i>	0.070 ± 0.096	0.28	1.14
	<i>Arame</i>	0.082 ± 0.125	0.328	1.34
	<i>Mixed salad</i>	0.198 ± 0.137	0.792	3.24

TWI, tolerable weekly intake.

Table 5. Lead concentrations, estimated intake (EDI), and percentage contribution to the guideline value of the analyzed algae.

Origin	Species	Concentration ± SD (mg/kg)	EDI (µg/day)	Contribution to BMDL (%)	
				Pb (Np.)	Pb (Card.)
Asia	<i>Hijiki</i>	0.004 ± 0.001	0.016	0.04	0.02
	<i>Nori</i>	0.018 ± 0.019	0.072	0.17	0.07
	<i>Kombu</i>	0.071 ± 0.070	0.284	0.66	0.28
	<i>Wakame</i>	0.119 ± 0.071	0.476	1.10	0.46
Europe	<i>Sea spaghetti</i>	0.020 ± 0.032	0.08	0.19	0.08
	<i>Kombu</i>	0.041 ± 0.077	0.164	0.38	0.16
	<i>Sea lettuce</i>	<LOQ	-	-	-
	<i>Starry moss</i>	<LOQ	-	-	-
	<i>Nori</i>	0.011 ± 0.00	0.044	0.10	0.04
	<i>Wakame</i>	0.007 ± 0.007	0.028	0.06	0.03
	<i>Arame</i>	0.047 ± 0.008	0.188	0.44	0.18
	<i>Mixed salad</i>	0.016 ± 0.013	0.064	0.15	0.06

Np., nephrotoxicity; Card., cardiotoxicity; BMDL, benchmark dose level.

Table 6. Mercury concentrations, estimated intake (EDI), and percentage contribution to the guideline value of the analyzed algae.

Origin	Species	Concentration ± SD (mg/kg)	EDI (µg/day)	Contribution to TWI (%)	
				Hg (Org.)	Hg (Inorg.)
Asia	<i>Hijiki</i>	0.017 ± 0.004	0.068	0.54	0.17
	<i>Nori</i>	0.010 ± 0.004	0.04	0.31	0.10
	<i>Kombu</i>	0.054 ± 0.017	0.216	1.70	0.55
	<i>Wakame</i>	0.021 ± 0.01	0.084	0.66	0.21
Europe	<i>Sea spaghetti</i>	0.007 ± 0.003	0.028	0.22	0.07
	<i>Kombu</i>	0.017 ± 0.011	0.068	0.54	0.17
	<i>Sea lettuce</i>	<LOQ			
	<i>Starry moss</i>	0.003 ± 0.00	0.012	0.09	0.03
	<i>Nori</i>	0.003 ± 0.00	0.012	0.09	0.03
	<i>Wakame</i>	0.008 ± 0.008	0.032	0.25	0.08
	<i>Arame</i>	0.055 ± 0.003	0.22	1.73	0.56
	<i>Mixed salad</i>	0.004 ± 0.005	0.016	0.13	0.04

Org., organic mercury; Inorg., inorganic mercury; TWI, tolerable weekly intake.

Cd is noteworthy for its high concentrations, and its content in Asian algae is worth mentioning, especially in hijiki (1.196 mg/kg) and nori (1.005 mg/kg) (Table 4). According to the EFSA, the Cd levels in some seafoods are remarkable. The levels of Cd in oysters (0.2350 mg/kg), bivalve mollusks (0.163 mg/kg), and limpets (0.180 mg/kg) stand out [10]. However, the Cd concentrations recorded in some seaweed samples are higher than the average Cd levels in some seafoods reported by EFSA.

Regarding Pb, the highest concentrations obtained also correspond to algae from Asian countries, in this case, wakame algae (0.119 mg/kg) (Table 5). The case of Hg is not the same since the highest mean average content was found in European algae, arame algae (0.055 mg/kg) (Table 6).

Figure 1 shows the comparison of the content of the three analyzed metals between Europe and Asia. It can clearly be seen that, in all cases, the concentrations of the three toxic metals are higher in Asia than in Europe (without differentiating between species). In addition, the statistical study revealed the existence of significant differences ($p < 0.05$) in the content of these metals between both origins.

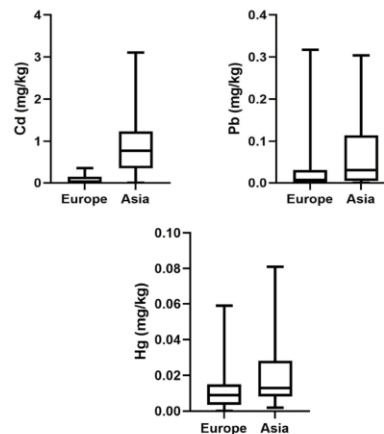


Figure 1. Comparison of the toxic metal content (Cd, Pb, Hg) between origins (Europe vs. Asia).

The above-mentioned differences in the content of toxic metals between origins are due to the fact that, according to various studies, the high levels of contamination in toxic metals existing in the Asian coasts influence the quantity of these toxic metals in the environment where the algae grow. Notably higher levels of Cd, Pb, and Hg than those recorded in the present study have been reported in many areas of the Chinese coast [35].

The import of edible algae from Asian countries may pose a risk to the health of consumers in terms of toxic metal content. The environmental impact of toxic industrial discharges in algae cultivation areas such as the coast of Palk Bay in India [36] or the Gulf of Kutch in India [37] is of concern due to the increase in levels of heavy metals in algae. In many cases, an increase in Cd and Pb levels has been quantified in algae cultivated on the shores of Palk Bay, presenting levels of 4 mg Cd/kg dw (*Caulerpa racemosa* species) or up to 15 mg Pb/kg dw (*Caulerpa racemosa* species).

Figure 2 shows the mean concentrations of toxic metals (Cd, Pb, Hg) in the different species of analyzed algae. The differences found in the metal content between species are due to the intrinsic features of each species, with some species being more prone to accumulating some metals than others. Similarly, the statistical study confirmed the existence of significant differences ($p < 0.05$) in the content of Cd (aramé vs. nori; sea spaghetti vs. hijiki, kombu, nori, mixed salad, and wakame; hijiki vs. kombu, mixed salad, and wakame; kombu vs. nori and wakame; nori vs. mixed salad and wakame), in the Pb content (aramé vs. nori and mixed salad; sea spaghetti vs. wakame; hijiki vs. wakame; kombu vs. wakame; nori vs. wakame), and in the Hg content (aramé vs. sea spaghetti, kombu, nori, mixed salad, and wakame; sea spaghetti vs. kombu, hijiki, and wakame; hijiki vs. nori and mixed salad; kombu vs. nori and mixed salad; nori vs. mixed salad and wakame).

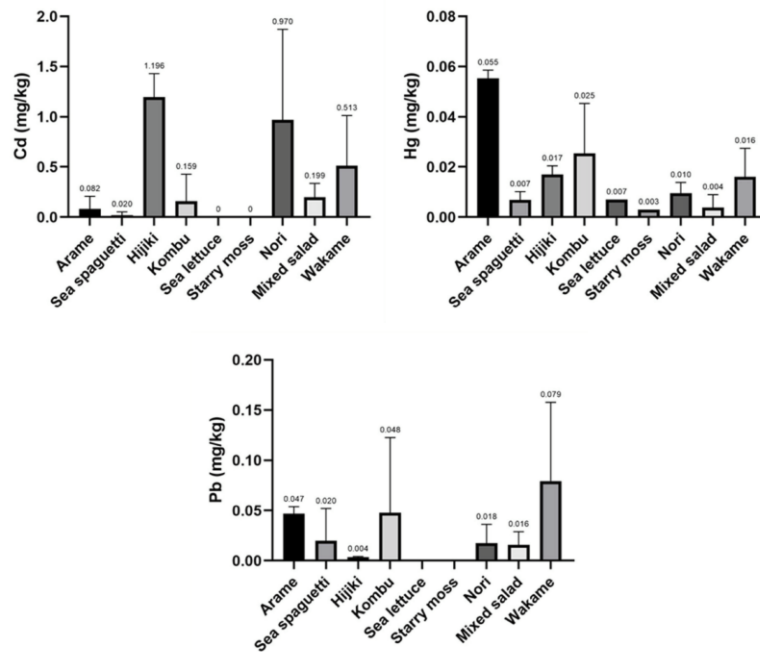


Figure 2. Comparison of the toxic metal content (Cd, Pb, Hg) in the different species of analyzed algae.

A study conducted by Paz et al. [27] reported a Cd content in Asian wakame algae of 1.11 mg/kg, similar to the Cd content found in the present study in hijiki algae. In contrast, the Pb concentrations recorded by Paz et al. [27] were higher than those found in the study here. However, the Hg content recorded in the present work is higher than the data published by Paz et al. [27].

The recommended consumption of 4 g/day, according to the manufacturer on the packaging, of hijiki and nori algae accounts for a percentage contribution to the TWI of Cd (2.5 µg/kg bw/week) of 19.6% and 16.4%, respectively (Table 4). Although this percentage does not exceed the TWI, it should be borne in mind that it is nearly a quarter of this maximum value and that the global diet may have a high total intake of Cd. The MoE value calculated by the NOAEL (0.01 mg/kg bw/day) [38] is 2.1 (hijiki algae) and 2.5 (nori algae). Considering this consumption and the MoE values, there is no risk.

The consumption of wakame algae (4 g/day) is 1.10% of the BMDL of Pb set at 0.63 µg/kg bw/day (nephrotoxic effects) (Table 5) [16]. This percentage does not represent a significant contribution to the dietary intake of Pb, and therefore, adult consumers are not at risk. The MoE value calculated considering a BMDL₀₁ of 0.0015 mg/kg bw/day [16] is 3.15 (wakame algae consumption). This MoE value indicates low risk.

The percentage contribution to Hg intake from the consumption of 4 g/day is 1.73% of the TWI of organic Hg (1.3 µg/kg bw/week for methylmercury) (Table 6) [18]. Therefore, this does not pose a risk to the health of adults. According to the NOAEL of 0.04 mg/kg bw/day of methylmercury [18], the MoE for the consumption of arame algae is 182.

3.2. Nitrate Concentrations (NO₃⁻) and Dietary Intake

Table 7 shows the mean nitrate concentrations in the analyzed algae as well as the estimated daily intake values and their percentage contribution to the ADI value set by EFSA in 2017 [24,25].

Table 7. Concentration of nitrates (mg/kg), standard deviations (SD), estimated daily intake, and contribution to the ADI of the analyzed algae.

Species	[NO ₃ ⁻] ± SD (mg/kg)	Max. Value	Min. Value	EDI (mg/day)	Contribution to ADI (%)
<i>Arame</i>	<500	-	-	-	-
<i>Sea spaghetti</i>	<500	-	-	-	-
<i>Hijiki</i>	<500	-	-	-	-
<i>Kombu</i>	3084 ± 2698	6400	<500	12.34	4.87
<i>Sea lettuce</i>	965 ± 135	-	-	3.86	1.52
<i>Mixed salad</i>	1096 ± 203	1239	952	4.38	1.73
<i>Starry moss</i>	<500	-	-	-	-
<i>Nori</i>	3183 ± 2279	>8000	<500	12.73	5.02
<i>Wakame</i>	<500	-	-	-	-

ADI, acceptable daily intake.

The nori species has the highest concentration of nitrates, with a mean value of 3183 mg/kg and with larger samples >8000 mg/kg. On the other hand, kombu seaweed has a mean concentration of 3084 mg/kg with a maximum value of 6400 mg/kg.

It should be noted that there is no legislation regulating the content of nitrates in seaweed. However, Commission Regulation (EU) No. 1258/2011 of 2 December 2011, which modified Regulation (EC) No. 1881/2006 with regard to the maximum content of nitrates in food products, set a limit of between 6000 and 7000 mg/kg for rocket or arugula [39]. Considering the limit applicable to arugula, whose permitted concentrations of nitrates are the highest of all foods, some kombu samples would exceed this limit, and therefore would not be suitable for human consumption.

However, taking into account the manufacturer's recommended consumption of 4 g of nori algae per day, the mean concentration of 3183 mg/kg would represent a percentage contribution to the ADI of nitrates (3.7 mg/kg bw/day) of 5.02%. Although this would

not pose a risk to adult health, it should be borne in mind that the storage and the cooking process of algae, etc. can lead to the transformation of nitrates into nitrites, thus posing a risk to the consumers' health.

Although the algae analyzed do not suppose a high intake, the importance of taking into account other nitrate sources such as water and other vegetable foods should be noted. A study carried out by Qasemi et al. [40] reported nitrate levels in water from wells and springs of Azadshahr (northeastern Iran) of 1 up to 51 mg/L. Quijano et al. [41] determined the nitrate content in vegetables marketed in Valencia (Spain), finding concentrations of 40 mg/kg (carrots), 173.5 mg/kg (potatoes), and 1266.5 mg/kg (fresh spinach). It is advisable to moderate the consumption of the algae species that recorded the highest nitrate concentrations, especially in vegans or vegetarians, and by people living in areas of high concentrations of nitrate in the water supply.

4. Conclusions

Seaweed is becoming an increasingly important food in the diet of Western countries due to its nutritional profile. However, these organisms absorb and accumulate toxic metals such as Cd, Pb, and Hg or anions that, ingested in high concentrations, can trigger adverse effects, such as in the case of nitrates.

Asian algae have higher concentrations of Cd, Pb, and Hg than European algae. The Asian hijiki and nori algae are noteworthy for their Cd content. Some samples of nori algae presented NO_3^- concentrations above 8000 mg/kg. However, considering the consumption recommended by the manufacturers (4 mg/day), the maximum allowable intake values are not exceeded, nor are those set for toxic metals and nitrates. However, in the case of Cd, Pb, Hg, and NO_3^- , legislation should be put in place to regulate their contents in edible algae, especially considering that the origin of the algae can affect their toxic metal and nitrate content. Monitoring studies should be conducted periodically to detect species or origins which could pose a risk from a toxicological point of view and to recommend avoiding their consumption. Similarly, the relevant authorities are urged to legislate for maximum levels of contaminants in these products to ensure their quality and food safety.

Author Contributions: Conceptualization, V.M.-L., M.N.-R., A.H. and C.R.-A.; Data curation, S.P.; Formal analysis, P.A.D., J.J.P. and G.M.; Investigation, V.M.-L., S.P., P.A.D., J.J.P., G.M. and Á.J.G.; Methodology, V.M.-L., S.P., M.N.-R., A.H. and C.R.-A.; Resources, P.A.D., J.J.P., G.M., Á.J.G. and A.H.; Supervision, G.S., A.H. and C.R.-A.; Validation, V.M.-L. and M.N.-R.; Writing—original draft, S.P., G.S. and C.R.-A.; Writing—review and editing, S.P., G.S., Á.J.G. and C.R.-A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Bouga, M.; Combet, E. Emergence of seaweed and seaweed-containing foods in the UK: Focus on labeling, iodine content, toxicity and nutrition. *Proc. Nutr. Soc.* **2015**, *74*. [[CrossRef](#)]
2. McHugh, D. *A Guide to the Seaweed Industry*; FAO, Fisheries and Aquaculture Department: Rome, Italy, 2003.
3. Organic Monitor. *The Organic Market of Sea Vegetables, Final Report*; Organic Monitor: London, UK, 2014; pp. 1–36.
4. MacArtain, P.; Gill, C.I.; Brooks, M.; Campbell, R.; Rowland, I.R. Nutritional Value of Edible Seaweeds. *Nutr. Rev.* **2008**, *65*, 535–543. [[CrossRef](#)]
5. Boroujerdnia, M.; Ansari, N.A.; Dehcordie, F.S. Effect of Cultivars, Harvesting Time and Level of Nitrogen Fertilizer on Nitrate and Nitrite Content, Yield in Romaine Lettuce. *Asian J. Plant Sci.* **2007**, *6*, 550–553. [[CrossRef](#)]
6. Karwowska, M.; Kononiuk, A. Nitrates/Nitrites in Food—Risk for Nitrosative Stress and Benefits. *Antioxidants* **2020**, *9*, 241. [[CrossRef](#)]

7. León, V.M.; Luzardo, O.P. Evaluation of nitrate contents in regulated and non-regulated leafy vegetables of high consumption in the Canary Islands, Spain: Risk assessment. *Food Chem. Toxicol.* **2020**, *146*, 111812. [CrossRef] [PubMed]
8. Bernhoft, R.A. Cadmium Toxicity and Treatment. *Sci. World J.* **2013**, *2013*, 394652. [CrossRef] [PubMed]
9. Moulis, J.-M.; Thévenod, F. New perspectives in cadmium toxicity: An introduction. *BioMetals* **2010**, *23*, 763–768. [CrossRef]
10. EFSA (European Food Safety Authority). Cadmium in food-Scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *EFSA J.* **2009**, *980*, 1–139. [CrossRef]
11. Rubio, C.; Hardisson, A.; Reguera, J.; Revert, C.; Lafuente, M.; González-Iglesias, T. Cadmium dietary intake in the Canary Islands, Spain. *Environ. Res.* **2006**, *100*, 123–129. [CrossRef] [PubMed]
12. ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Case Studies in Environmental Medicine (CSEM). Lead Toxicity. Available online: https://www.atsdr.cdc.gov/csem/lead/docs/CSEM-Lead_toxicity_508.pdf (accessed on 7 June 2021).
13. Kumar, A.; Cabral-Pinto, M.M.S.; Chaturvedi, A.K.; Shabnam, A.A.; Subrahmanyam, G.; Mondal, R.; Gupta, D.K.; Malyan, S.K.; Kumar, S.S.; Khan, S.A.; et al. Lead Toxicity: Health Hazards, Influence on Food Chain, and Sustainable Remediation Approaches. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*, 2179. [CrossRef]
14. Nordberg, G.; Fowler, B.; Nordberg, M.; Friberg, L. *Handbook on the Toxicology of Metals*, 3rd ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2007.
15. Rubio, C.; Gutiérrez, A.J.; Martín-Izquierdo, R.E.; Revert, C.; Lozano, G.; Hardisson, A. El plomo como contaminante alimentario. *Rev. Toxicol.* **2004**, *21*, 72–80.
16. EFSA (European Food Safety Authority). Scientific opinion on lead in food. EFSA Panel on Contaminants in the foodchain (CONTAM). *EFSA J.* **2010**, *8*, 1570. [CrossRef]
17. Carocci, A.; Rovito, N.; Sinicropi, M.S.; Genchi, G. Mercury toxicity and neurodegenerative effects. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **2014**, 1–18. [CrossRef]
18. EFSA (European Food Safety Authority). Scientific Opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food. *EFSA J.* **2012**, *10*, 2985. [CrossRef]
19. IARC (International Agency of Research in Cancer). IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Some N-Nitroso Compounds. Available online: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol1-42/mono17.pdf> (accessed on 7 June 2021).
20. IARC (International Agency of Research in Cancer). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Ingested Nitrate and Nitrite and Cyanobacterial Peptide Toxins. Available online: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol94/index.php> (accessed on 7 June 2021).
21. AECOSAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria, Consumo y Nutrición). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a la evaluación del riesgo de la exposición de la población española a cadmio por consumo de alimentos. *Rev. Com. Científico* **2011**, *14*, 65–88.
22. Kobayashi, J.; Ohtake, K.; Uchida, H. NO-Rich Diet for Lifestyle-Related Diseases. *Nutrients* **2015**, *7*, 4911–4937. [CrossRef] [PubMed]
23. JECFA. Joint FAO/WHO expert committee on food additives. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. In *WHO Food Additives Series 40*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 1998.
24. EFSA (European Food Safety Authority). Re-evaluation of potassium nitrite (E 249) and sodium nitrite (E 250) as food additives. *EFSA J.* **2017**, *15*, 4786. [CrossRef]
25. EFSA (European Food Safety Authority). Re-evaluation of sodium nitrate (E 251) and potassium nitrate (E 252) as food additives. *EFSA J.* **2017**, *15*, 4787. [CrossRef]
26. EC (European Commission). COMMISSION REGULATION (EC) No 1882/2006 of 19 December 2006 laying down methods of sampling and analysis for the official control of the levels of nitrates in certain foodstuffs. *Off. J. Euro. Union* **2006**, *L364/25*. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0025:0031:EN:PDF> (accessed on 7 June 2021).
27. Paz, S.; Rubio, C.; Frías, I.; Gutiérrez, J.; González-Weller, D.; Martín, V.; Revert, C.; Hardisson, A. Toxic metals (Al, Cd, Pb and Hg) in the most consumed edible seaweeds in Europe. *Chemosphere* **2019**, *218*, 879–884. [CrossRef]
28. EC (European Commission). Commission Regulation 333/2007 (CE) of March 28, 2007, which establishes the sampling and analysis methods for the official control of the levels of lead, cadmium, mercury, inorganic tin, 3-MCPD and benzo (a) pyrene in food products. *Off. J. Euro. Union* **2007**, *L88/29*. Available online: <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/dbc694be-f15d-4e5d-bd09-cdf37f5100c0/language-en> (accessed on 7 June 2021).
29. EC (European Commission). Commission Regulation 836/2011 of August 19, 2011 amending Commission Regulation 333/2007 (EC) of March 28, 2007, which used the sampling and analysis methods for official control levels of lead, cadmium, mercury, inorganic tin, 3-MCPD and benzo (a) pyrene in food products. *Off. J. Euro. Union* **2011**, *L215/9*. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:215:0009:0016:EN:PDF>.
30. Padrón, P.; Paz, S.; Rubio, C.; Gutiérrez, J.; González-Weller, D.; Hardisson, A. Trace Element Levels in Vegetable Sausages and Burgers Determined by ICP-OES. *Biol. Trace Element Res.* **2019**, *194*, 616–626. [CrossRef]
31. Rubio-Armendáriz, C.; Paz, S.; Gutiérrez, Á.J.; Gomes Furtado, V.; González-Weller, D.; Revert, C.; Hardisson, A. Toxic Metals in Cereals in Cape Verde: Risk Assessment Evaluation. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 3833. [CrossRef] [PubMed]

32. Paz, S.; Rubio, C.; Gutiérrez, A.J.; González-Weller, D.; Hardisson, A. Dietary Intake of Essential Elements (Na, K, Mg, Ca, Mn, Zn, Fe, Cu, Mo, Co) from Tofu Consumption. *Biol. Trace Element Res.* **2020**, *199*, 382–388. [[CrossRef](#)]
33. Zava, T.T.; Zava, D.T. Assessment of Japanese iodine intake based on seaweed consumption in Japan: A literature-based analysis. *Thyroid. Res.* **2011**, *4*, 1–7. [[CrossRef](#)]
34. AECOSAN (Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición). *Modelo de Dieta Española Para la Determinación de la Exposición del Consumidor a Sustancias Químicas*; Ministerio de Sanidad y Consumo: Madrid, Spain, 2006.
35. Chen, Y.; Liu, Y.-T.; Wang, F.-H.; Wen, D.; Yang, H.; Zhao, X.-L. An Investigation of Toxic Metal Levels (Pb, Cd, Cr, As, Hg) in Dried Porphyra and Laminaria Collected from Coastal Cities, China. *Biol. Trace Element Res.* **2021**, 1–11. [[CrossRef](#)]
36. Rajaram, R.; Rameshkumar, S.; Anandkumar, A. Health risk assessment and potentiality of green seaweeds on bioaccumulation of trace elements along the Palk Bay coast, Southeastern India. *Mar. Pollut. Bull.* **2020**, *154*, 111069. [[CrossRef](#)]
37. Chakraborty, S.; Bhattacharya, T.; Singh, G.; Maity, J.P. Benthic macroalgae as biological indicators of heavy metal pollution in the marine environments: A biomonitoring approach for pollution assessment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2014**, *100*, 61–68. [[CrossRef](#)]
38. US EPA. *Cadmium (CASRN 7440-43-9). Integrated Risk Information System. Document 0141*; U.S. Environmental Protection Agency: Washington, DC, USA, 1998.
39. EC (European Commission). COMMISSION REGULATION (EU) No 1258/2011 of 2 December 2011 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for nitrates in foodstuffs. *Off. J. Euro. Union* **2011**, *L320/1*, 1–3.
40. Qasemi, M.; Farhang, M.; Biglari, H.; Afsharnia, M.; Ojrati, A.; Khani, F.; Samiee, M.; Zarei, A. Health risk assessments due to nitrate levels in drinking water in villages of Azadshahr, northeastern Iran. *Environ. Earth Sci.* **2018**, *77*, 782. [[CrossRef](#)]
41. Quijano, L.; Yusà, V.; Font, G.; McAllister, C.; Torres, C.; Pardo, O. Risk assessment and monitoring programme of nitrates through vegetables in the Region of Valencia (Spain). *Food Chem. Toxicol.* **2017**, *100*, 42–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]








6.3. Artículo 3: objetivos 5, 6.

**Evaluation of essential, toxic and potentially toxic elements in
leafy vegetables grown in the Canary Islands**

“Evaluación de elementos esenciales, tóxicos y potencialmente
tóxicos en vegetales de hoja cultivadas en Canarias”

Article

Evaluation of Essential, Toxic and Potentially Toxic Elements in Leafy Vegetables Grown in the Canary Islands

Verónica Martín-León ¹, Carmen Rubio ^{2,*}, Ángel Rodríguez-Hernández ³, Manuel Zumbado ^{3,4} ,
Andrea Acosta-Dacal ³ , Luis Alberto Henríquez-Hernández ^{3,4} , Luis D. Boada ^{3,4} ,
María del Mar Travieso-Aja ³ and Octavio P. Luzardo ^{3,4,*} 

- ¹ Public Health Laboratory of Las Palmas, Canary Islands Government Health Service, 35004 Las Palmas de Gran Canaria, Spain; vemartinleon@hotmail.com
² Toxicology Department, Universidad de La Laguna, S/C de Tenerife, 38071 La Laguna, Spain
³ Toxicology Unit, Research Institute of Biomedical and Health Sciences (IUIBS), Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Paseo Blas Cabrera s/n, 35016 Las Palmas de Gran Canaria, Spain
⁴ Spanish Biomedical Research Center in Physiopathology of Obesity and Nutrition (CIBEROBn), 28029 Madrid, Spain
* Correspondence: crubio@ull.edu.es (C.R.); octavio.perez@ulpgc.es (O.P.L.); Tel.: +34-615-422-540 (C.R.); +34-928-451-424 (O.P.L.)



Citation: Martín-León, V.; Rubio, C.; Rodríguez-Hernández, Á.; Zumbado, M.; Acosta-Dacal, A.; Henríquez-Hernández, L.A.; Boada, L.D.; Travieso-Aja, M.d.M.; Luzardo, O.P. Evaluation of Essential, Toxic and Potentially Toxic Elements in Leafy Vegetables Grown in the Canary Islands. *Toxicos* **2023**, *11*, 442. <https://doi.org/10.3390/toxicos11050442>

Academic Editors: Bernard Salles and Isabelle P. Oswald

Received: 29 March 2023
Revised: 21 April 2023
Accepted: 4 May 2023
Published: 7 May 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Forty-seven elements in leafy green vegetables were studied to estimate the daily intakes from this food category in different scenarios (average and high consumers) and age groups of the Canary Islands population. The contribution of the consumption of each type of vegetable to the reference intakes of essential, toxic and potentially toxic elements was assessed and the risk–benefit ratio was evaluated. The leafy vegetables that provide the highest levels of elements are spinach, arugula, watercress and chard. While spinach, chard, arugula, lettuce sprouts and watercress were the leafy vegetables with the highest concentrations of essential elements (38,743 ng/g of Fe in spinach, 3733 ng/g of Zn in watercress), the high levels of Mn in chard, spinach and watercress are noteworthy. Among the toxic elements, Cd is the element with the highest concentration, followed by As and Pb. The vegetable with the highest concentration of potentially toxic elements (Al, Ag, Be, Cr, Ni, Sr and V) is spinach. In average adult consumers, while the greatest contribution of essential elements comes from arugula, spinach and watercress, insignificant dietary intakes of potentially toxic metals are observed. Toxic metal intakes from the consumption of leafy vegetables in the Canary Islands do not show significant values, so the consumption of these foods does not pose a health risk. In conclusion, the consumption of leafy vegetables provides significant levels of some essential elements (Fe, Mn, Mo, Co and Se), but also of some potentially toxic elements (Al, Cr and Tl). A high consumer of leafy vegetables would see their daily nutritional needs regarding Fe, Mn, Mo, and Co covered, although they are also exposed to moderately worrying levels of Tl. To monitor the safety of dietary exposure to these metals, total diet studies on those elements with dietary exposures above the reference values derived from the consumption of this food category, mainly Tl, are recommended.

Keywords: essential elements; potentially toxic elements (PTE); rare-earth elements (REE); minor elements (ME); heavy metals; lead; cadmium; mercury; arsenic; dietary exposure; toxicological risk

1. Introduction

Green leafy vegetables are common components of the human diet, as they are sources of fiber, vitamins and essential elements [1]. The latter (iron (Fe), zinc (Zn), copper (Cu), selenium (Se), manganese (Mn), molybdenum (Mo), and cobalt (Co)) are considered essential elements for life because an insufficient intake causes functional deficiencies, which are reversible if the element returns to adequate concentrations, and their effect cannot be replaced by any other element. Although these elements account for only 0.02% of the total

body weight, they play an important role as they are essential for the maintenance of good health and the prevention of disease [2–4].

Nevertheless, the safety of leafy green vegetables is a concern, since these vegetables have been shown to accumulate toxic metals (cadmium (Cd), lead (Pb), arsenic (As) and mercury (Hg)) to a greater extent than other vegetables [5]. Thus, the consumption of leafy vegetables has been identified as a relevant source of human Cd [6–10], Pb [7,8,10–13], As [11], and Hg [10,12,14,15]. Previous dietary exposure studies [16,17] in the Canary Islands showed that total adult Cd and Pb dietary intakes were 0.16 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ and 72.8 $\mu\text{g}/\text{day}$, respectively, below the reference intake limits set by EFSA and not posing a health risk for consumers.

In addition, leafy green vegetables may generate health risks due to their occurrence of other potentially toxic elements (PTE) such as Ag (silver), Al (aluminum), Ba (barium), Be (beryllium), Cr (chrome), Ni (nickel), Sb (antimony), Sn (tin), Sr (strontium), Tl (thallium), U (uranium), rare-earth elements (REEs) such as Ce (cerium), Dy (dysprosium), Er (erbium), Eu (europium), Ga (gallium), Gd (gadolinium), Ho (holmium), In (indium), La (lanthanum), Lu (lutetium), Nb (niobium), Pr (praseodymium), Sm (samarium), Ta (tantalum), Tb (terbium), Tm (thulium), Y (yttrium), Yb (ytterbium) and minor elements (MEs) such as Au (gold), Bi (bismuth), Pt (platinum), Th (thorium), V (vanadium). These PTE, REEs and MEs are of increasing concern as emerging environmental contaminants [18,19]. A study conducted by González-Weller et al. [20] estimated the total intake of Al by the Canary population (10 mg/day for a person weighing 70 kg), evaluating this exposure as lower than the tolerable weekly intake (1 mg/kg/week) established by the EFSA [21]. A recent study detected the presence of REEs in vegetables in China and leafy vegetables showed the highest concentrations. Nevertheless, the risk to human health from their consumption was estimated to be significantly lower than the reference intake values [22–25].

Multiple factors can increase the accumulation of toxic and potentially toxic elements in the environment and crops, such as the intensive use of agrochemicals, application of sewage sludge to croplands, atmospheric deposition [26,27], and electronic products discarded as part of the electronic waste (e-waste), among others. Between 60 and 64 elements from the periodic table are used in the manufacture of a cell phone, while a computer contains more than thirty elements. In general, almost 60% of the weight of an electronic device is due to the presence of metals [18]. Because of this, a list of 50 “essential elements” for the technology industry has recently been compiled, including the previously mentioned classical heavy metals and trace elements, as well as REEs, precious metals and other elements, some of which are extremely scarce in the earth’s crust [18]. Many of these elements are included in the list of priority pollutants prepared by the Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) [28].

These new “essential elements” for industry are now being studied in terms of their toxicity, as it has been observed that their presence in living beings has been increasing in recent years [19,23–25,29–33]. Their toxic actions include cell damage, interference with enzymes, proteins and macromolecules, damage to cell organelles, and even carcinogenesis, according to available epidemiological and experimental studies [34]. For the REEs group, different adverse health effects have been reported [35], such as an association with cell proliferation [36], alterations in estrogenic differentiation [37], the promotion of lipid peroxidation [38], formation of reactive oxygen species [39] and decrease in hemoglobin content [19].

In Spain, in addition to lettuce and spinach, which are the most consumed leafy green vegetables at the European level, there is a significant consumption of chard, which, within the EU, is almost exclusive to Spain [40]. Furthermore, within Spain, there are regions in which, due to culinary traditions, other green leafy vegetables are also consumed in extremely high quantities. This is the case for the Canary Islands, where large quantities of watercress (*Nasturtium officinale*) are consumed according to the ENCA, the nutritional survey for the Canary Islands [41]. In the Canary Islands, the consumption of chard and watercress is as high as that of spinach and lettuce [41–43].

The Canary Islands are one of the so-called outermost territories of the EU due to their remoteness from continental Europe. For this reason, highly perishable products such as green leafy vegetables are mostly produced in the region, and only a small amount of the total consumed quantity is imported from continental Spain [40].

As mentioned, multiple factors can increase this accumulation of essential, toxic and potentially toxic elements in leafy vegetables [26,27]. In the Canary Islands, there are several of these circumstances. On the one hand, this region has one of the highest uses of pesticides in Europe. According to calculations, in 2001, the Canary Islands used 12 times more pesticides per hectare than the rest of Spain [44], and the situation has not improved 20 years later [45]. Some previous studies [46] have already highlighted the interactions and correlations between heavy metals and pesticides in this food category. In addition to the application of agrochemicals or other practices that could increase the number of elements in the croplands, Saharan dust intrusion (called “calima”) occurs frequently throughout the year in this archipelago. Although few studies are available, it has been reported that Saharan dust, and general particulate matter (P10, P25), can carry large amounts of some elements [47,48], including REEs [19,48,49]. Therefore, a plausible hypothesis is that frequent “calima” arrivals to the Canary Islands could influence the content of all these elements in locally grown vegetables.

This novel study was designed to a) determine the levels of essential, toxic and potentially toxic elements in one food category (leafy green vegetables) grown in the Canary Islands, b) assess the dietary exposure to these elements from this food group, and c) estimate, for the Canary Islands population, the contribution and risk–benefit ratio of the consumption of each type of leafy vegetable according to the reference intakes of these essential, toxic and potentially toxic elements.

2. Materials and Methods

2.1. Sampling

A total of 244 samples of leafy vegetables were studied. The samples were acquired from large supermarkets located on the island of Gran Canaria but representative of the whole archipelago market, since these points of sale are also located on the other seven islands (Figure 1). Sampling took place in two periods: from April 2016 to September 2016 (winter season) and from October 2016 to March 2017 (summer season).

Sampling considered the consumption patterns of the Canary Island population [41,43], and included 56 samples of watercress (*Nasturtium officinale*); 42 samples of chard (*Beta vulgaris*); 36 samples of romaine lettuce (*Lactuca sativa. longitolia*); 22 samples of iceberg lettuce (*Lactuca sativa*); 18 samples of baby lettuce; 16 samples of arugula (*Eruca vesicaria*); 30 samples of spinach (*Spinacia oleracea*); and 24 samples of lamb’s lettuce. Upon arrival at the laboratory, the samples were examined and cleaned of dirt with a damp paper towel, and inedible or damaged outer leaves were removed. After cleaning, the samples were frozen. The maximum storage period before analysis never exceeded six weeks.

2.2. Elements Analyzed and Analytical Procedure

Essential elements, toxic elements and a set of other elements, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US-ATSDR) priority list elements, REEs and other minority elements (ME) were studied. In total, 47 elements (Fe, Zn, Cu, Se, Mn, Mo, Co, Cd, Pb, As, iAs, Hg, MeHg, Ag, Al, Ba, Be, Cr, Ni, Sb, Sn, Sr, Tl, U, Ce, Dy, Er, Eu, Ga, Gd, Ho, In, La, Lu, Nb, Pr, Sm, Ta, Tb, Tm, Y, Yb, Au, Bi, Pt, Th, V) were investigated in leafy green vegetables.

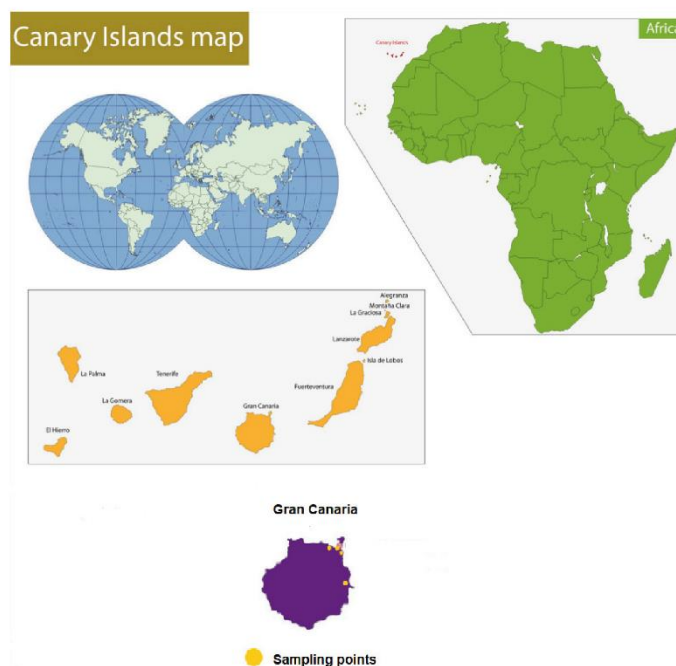


Figure 1. Canary Islands location and sampling points.

All samples (ready-to-eat leafy vegetables) were ground and homogenized manually using a metal-free Teflon mortar until a homogeneous mass was formed. Three digests (extractions) were performed in parallel. Acid digestion of the homogenized samples was performed using a microwave digester (Ethos Up, Milestone SRL, Sorisole, Italy). For this purpose, 500 mg of vegetable homogenate was weighed (wet weight) into the digestion vessels and 50 μL of the internal standard solution (Sc, Ge, Rh and Ir were added at a stock concentration of 20 mg/mL each) (CPA Chem, Stara Zagora, Bulgaria), 2.5 mL of concentrated HNO_3 (65%) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) and 7.5 mL of Mili-Q water (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) were added to each sample. The digester was programmed in three stages at 1800 W of power: a first stage of 5 min at 100 $^\circ\text{C}$, followed by a 5 min stage at 150 $^\circ\text{C}$, followed by a third stage of 15 min at 200 $^\circ\text{C}$. After cooling, the complete digests (extractions) were transferred to conical-bottom polypropylene tubes and diluted to 15 mL with Mili-Q water (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Finally, an aliquot of each sample was taken for analysis. Reagent blanks were prepared similarly to the samples, and every 10 samples were included in the analytical batch.

For instrumental analyses, an Agilent 7900 ICP-MS (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) equipped with standard nickel cones and a crossflow nebulizer with a make-up gas port ($\times 400$ nebulizer, Saville Corporation, MN, USA) was used for all measurements. All data were acquired and processed with Agilent MassHunter data analysis software (version 4.2). ICP-MS was optimized daily using a tuning solution consisting of a mixture of Cs, Co, Li, Mg, Tl and Y (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA).

The entire procedure was validated prior to its use. Pure standards of all elements were acquired in acid solution (5% HNO_3 , 100 mg/L, CPA Chem, Stara Zagora, Bulgaria). Calibration curves were performed in the range from 0.005 ng/mL to 20 ng/mL for REEs

and Mes, in the range from 0.01 ng/mL to 100 ng/mL for the toxic elements in the ATSDR listing, and from 2 ng/mL to 70 µg/mL for the essential elements. The recoveries obtained ranged from 84 to 117%. Linear calibration curves were found for all elements (regression coefficients ≥ 0.995). Instrumental LODs and LOQs were calculated as the concentration of the element that produced a signal three and ten times higher, respectively, than that of the averaged blanks. Sample LOQs were calculated by multiplying the instrumental LOQ by the dilution factor applied to the sample during the digestion procedure (1:10 *v:v*).

2.3. Dietary Exposure Assessment

In order to assess the dietary intakes of every element from these leafy vegetables, the total consumption of each of the green leafy vegetables by the population of the Canary Islands [41,43] was considered and multiplied by the median values of each element (ng/g fresh weight) in each type of vegetable, and divided by the average body weight of the Canarian population (Equation (1)). Estimates were made for two age groups: adults (>17 years and body weight 68.48 kg) and children (7 to 12 years and body weight 34.48 kg) and two consumption scenarios: high consumers (HC, 97.5th percentile) and average consumers (AC, 50th percentile). The individual intakes obtained for each type of leafy green vegetable were added to assess the overall intake of each element from this food category.

$$EDI = \frac{\text{Median Leafy vegetable consumption for the Canary Island population (g)} \times \text{Element median in that very same leafy vegetable} \left(\frac{\text{ng}}{\text{g}}\right)}{\text{Body Weight (kg)}} \quad (1)$$

EDI = Estimated Daily Intake

Body weight for Canary Islands adults: 68.48 kg [31]

Body weight for Canary Islands children: 34.48 kg [31]

The estimated daily intake (EDI) values of each element for each scenario and age group were evaluated according to the reference values and the risk–benefit ratio was characterized.

As dietary reference values (DRV, in the case of essential elements), the population reference intake values (PRI) reported by the European Food Safety Authority (EFSA) were used [50,51]. According to the European standard, the PRI is the equivalent of the Recommended Dietary Allowances (RDA) in the United States, i.e., the level of daily dietary intake of a nutrient that is considered sufficient to meet the needs of 97.5% of healthy individuals in each life stage and sex group. In those elements where no PRI was set by EFSA, the Adequate Intake (AI) value was used as the reference value. The AI is the amount established to be somewhat less than adequate for all members of the population group. For those essential elements where the EDI exceeded the PRI or AI, the Tolerable Upper Daily Intake Level (UL) was also considered. The UL is the maximum total chronic intake level of a nutrient from all sources that is considered unlikely to pose a risk of adverse health effects in humans [50–52].

As Toxic Reference Values (TRVs), the Tolerable Daily Intake (TDI) values were used for As, Pb, Cd and Hg [53–56]. Although, in this work, arsenic speciation was not performed, the EFSA scientific opinion of arsenic in foods was taken as a reference to assess the inorganic arsenic intake from leafy vegetables. According to EFSA, the proportion of inorganic arsenic in vegetables is up to 65% of the total As [56]. It was not possible to perform mercury speciation, but as it has been reported that the percentage of the methyl form in vegetables normally seems to vary between 5% and 30%, a conservative approach was considered for the mercury exposure assessment and 20% of the total mercury in the leafy vegetables was considered to be in the form of methylmercury [55].

In the case of REEs (Ce, Dy, Er, Eu, Ga, Gd, Ho, In, La, Lu, Nb, Nd, Pr, Sm, Ta, Tb, Tm, Y, Yb) and ME (Au, Bi, Ga, In, Nb, Pt, Ta, Th, and V), official TRVs have not been established to date. However, some authors have proposed an allowable daily intake of 61 µg/kg body weight (bw) for rare-earth oxides [22,57]. This proposal was based on human health studies

in REE in mining areas and on animal experimental results. The aforementioned value was considered as the TRV in the exposure assessment of these REEs and MEs.

2.4. Statistical Analysis

All statistical analyses were performed with GraphPad Prism v9.2 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The distribution of the variables included in the study was evaluated using the Kolmogorov–Smirnov test. The concentration of most of the contaminants detected did not follow a normal distribution, so the results are expressed in terms of median and range. For this same reason, nonparametric tests were used to check for statistical differences between groups, as these evaluate the median rather than the mean, which is appropriate given the relatively high number of undetected values in some groups. Homogeneity of variance (homoscedasticity) was previously tested using Levene’s test. The Kruskal–Wallis and Mann–Whitney U tests were used as nonparametric tests for overall and pairwise comparisons, respectively. However, as an additional check, pairwise comparisons were also performed using Student’s t-test after logarithmic transformation of the data. A P-value of less than 0.05 (two-tailed) was considered statistically significant. Data below the LOQ but above the LOD were assigned a random value between these two limits. Data below the LOD were considered undetected. Probability levels of <0.05 (two-tailed) were considered statistically significant.

3. Results and Discussion

3.1. Essential Elements

Table 1 shows the concentration of essential elements in the sampled leafy vegetable. There are significant differences for all of them ($p < 0.0001$).

Spinach, chard, arugula, lettuce sprouts and watercress are the leafy vegetables with the highest concentration of essential elements. It is worth noting the high concentration of Fe and Zn in spinach and arugula, as well as the high levels of Mn in chard. Romaine lettuce has the lowest concentration of essential elements, highlighting the low concentrations of Se, Mo and Co. Iceberg and romaine lettuce are the leafy vegetables with the lowest concentrations of Fe, Zn and Cu. Spinach, arugula, lamb’s lettuce and chard were those with the highest concentration of Cu. Se was found in higher concentrations in lettuce and spinach sprouts and lower concentrations in watercress and iceberg lettuce. In the case of Mn, it is worth highlighting the high concentrations found in chard, spinach and watercress and the low concentrations found in romaine lettuce and iceberg lettuce. Mo levels are noteworthy in lamb’s lettuce, arugula and watercress. Co is more present in arugula and spinach. These results are similar to those in the study by Al Jassir et al. [9], in which Cu and Zn were also found to reach relevant levels in green leafy vegetables.

The dietary exposures to these essential metals from these vegetables are shown in Table 2. Among all the studied leafy vegetables, watercress and spinach are the main dietary sources of essential elements for Canary Islands adults and children.

In adult 50th percentile consumers (average consumers (AC)) the greatest contribution of essential elements comes from arugula, spinach, watercress, chard, and lamb’s lettuce. In this scenario, lamb’s lettuce contributes up to 39% of the DRV of Mo.

In adult high consumers, spinach contributes the most to the essential elements reference values, followed by arugula and watercress. Regarding Fe, spinach and arugula can contribute up to 70% and 46% of the DRV, respectively. There is also a high intake of Mo from arugula (83% of the DRV) and lamb’s lettuce (197% of the DRV). The contribution of Co from spinach is 72% of the DRV, and from arugula this is 59% of the DRV.

Table 1. Concentrations (ng/g as median and interquartile range (P25–P75) of essential elements in several types of leafy vegetables.

Element	Romaine Lettuce	Iceberg Lettuce	Baby Lettuce	Arugula (Rocket)	Spinach	Lamb’s Lettuce	Watercress	Swiss Chard
Fe	7456 (4105–21,063)	2830 (2229–3448)	13,052 (9957–25,637)	30,037 (7466–38,580)	38,743 (13,124–76,100)	12,578 (10,354–15,465)	12,777 (6849–24,522)	18,312 (10,421–30,064)
Zn	1890 (1234–2386)	1725 (1025–2041)	2454 (1964–3092)	3014 (1637–5607)	3748 (2535–9546)	2906 (1953–4421)	3733 (1969–5125)	2704 (2250–3268)
Cu	287.0 (196.9–523.6)	183.5 (128.9–308.5)	287.6 (211.0–399.0)	641.3 (175.4–1066)	698.1 (577.9–1328)	710.1 (417.3–908.0)	490.5 (204.5–739.0)	668.6 (557.3–887.8)
Se	9.3 (6.2–15.2)	5.0 (3.3–14.2)	18.5 (14.7–23.3)	11.4 (6.2–18.8)	17.0 (10.9–43.1)	8.0 (3.8–11.0)	5.3 (2.1–12.4)	11.0 (6.7–16.7)
Mn	1688.3 (981.3–3658.1)	1348.0 (1025.1–1774.3)	2486.1 (1949.8–3181.7)	2793.8 (1401.9–3166.3)	5313.0 (2607.4–8068.2)	4044.0 (2723.8–5055.2)	3491.7 (2542.1–5615.8)	8971.1 (3741.3–12,918.1)
Mo	17.2 (6.8–56.8)	9.8 (3.1–21.9)	14.2 (5.8–18.2)	318.9 (24.5–697.7)	110.6 (81.5–160.7)	758.0 (275.8–1137.2)	118.6 (65.7–343.6)	61.6 (38.5–89.1)
Co	6.2 (3.8–10.6)	4.8 (1.6–13.6)	15.0 (11.5–19.4)	28.8 (8.1–48.1)	29.5 (16.4–57.9)	18.9 (12.8–24.3)	13.8 (7.3–27.2)	17.9 (11.3–26.5)

Table 2. Estimated daily intake (EDI) ($\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{day}$ calculated from the median values) of essential elements from the consumption of leafy vegetables in Canarian adults and children and two consumption scenarios (average and high consumers).

Adults (>17 y.o.)—68.48 kg bw—Both Genders																	
EDI ($\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{Day}$) ^a																	
Element	Dietary Reference Value ^b	Romaine Lettuce		Iceberg Lettuce		Baby Lettuce		Arugula (Rocket)		Spinach		Lamb’s Lettuce		Watercress		Swiss Chard	
		AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC
Fe	160.63 ^c	3.652	18.420	1.386	6.993	6.393	32.250	14.710	74.220	23.530	112.600	6.161	31.080	7.761	37.890	10.980	29.810
Zn	175.23 ^c	0.926	4.670	0.845	4.263	1.202	6.064	1.476	7.447	2.276	10.890	1.423	7.180	2.267	11.070	1.622	4.402
Cu	18.98 ^c	0.141	0.709	0.090	0.453	0.141	0.711	0.314	1.585	0.424	2.029	0.348	1.755	0.298	1.454	0.401	1.088
Se	1.02 ^c	0.005	0.023	0.002	0.012	0.009	0.046	0.006	0.028	0.010	0.050	0.004	0.020	0.003	0.016	0.007	0.018
Mn	43.81 ^c	0.827	4.171	0.660	3.331	1.218	6.142	1.369	6.904	3.227	15.440	1.981	9.991	2.121	10.360	5.380	14.600
Mo	0.95 ^c	0.008	0.042	0.005	0.024	0.007	0.035	0.156	0.788	0.067	0.322	0.371	1.873	0.072	0.352	0.037	0.100
Co	0.12 ^c	0.003	0.015	0.002	0.012	0.007	0.037	0.014	0.071	0.018	0.086	0.009	0.047	0.008	0.041	0.011	0.029

Children (7–12 y.o.)—34.48 kg bw—Both Genders																	
EDI ($\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{Day}$) ^a																	
Element	Dietary Reference Value ^b	Romaine Lettuce		Iceberg Lettuce		Baby Lettuce		Arugula (Rocket)		Spinach		Lamb’s Lettuce		Watercress		Swiss Chard	
		AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC
Fe	160.63 ^c	2.915	14.700	1.106	5.581	5.103	25.740	5.872	29.620	25.820	123.600	2.459	12.400	8.434	41.500	9.639	25.710
Zn	108.06 ^c	0.739	3.727	0.674	3.402	0.960	4.840	0.589	2.972	2.498	11.960	0.568	2.866	2.464	12.130	1.424	3.796
Cu	14.60 ^c	0.112	0.566	0.072	0.362	0.112	0.567	0.125	0.632	0.465	2.227	0.139	0.700	0.324	1.593	0.352	0.939
Se	0.51 ^c	0.004	0.018	0.002	0.010	0.007	0.037	0.002	0.011	0.011	0.054	0.002	0.008	0.003	0.017	0.006	0.015
Mn	21.90 ^c	0.660	3.329	0.527	2.658	0.972	4.902	0.546	2.755	3.541	16.950	0.790	3.987	2.305	11.340	4.722	12.590
Mo	0.37 ^c	0.007	0.034	0.004	0.019	0.006	0.028	0.062	0.314	0.074	0.353	0.148	0.747	0.078	0.385	0.032	0.086
Co	0.12 ^c	0.002	0.012	0.002	0.010	0.006	0.030	0.006	0.028	0.020	0.094	0.004	0.019	0.009	0.045	0.009	0.025

^a This was calculated considering the consumption (in g/day) of each of the vegetables for the P50 of the children and adult Canary population reported by the Nutritional Survey of the Canary Islands [41]. ^b For comparative purposes, the DRVs are expressed in $\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{day}$. When a range of different values for males and females is given, the average value was considered. ^c Dietary Reference Value (DRV) EFSA [50,51].

In children, the contribution of Mo to the reference intake values is noteworthy because of the consumption of lamb’s lettuce (40% in AC; 201.9% in HC) and watercress (21% in AC; 104% in HC). These results confirm the importance of monitoring the dietary intake of Mo from this and other dietary sources to assess the derived risks [58]. Furthermore, in the case of children who are high consumers of leafy vegetables, while the contribution of Fe from the consumption of spinach reaches 77% of the DRV, the contribution of Fe, is also observed for the rest of the essential elements, except for the case of Se in watercress. Spinach is also identified as an important source of Co (78% of the DRV) and Mn (77% of the DRV) in children who are high consumers of leafy vegetables. Similar results for spinach have previously been reported by Ellen et al. [59]. These authors pointed to this vegetable being a relevant dietary source of Cu, Mn and Zn, since its consumption provides more than 10% of the DRV of these three essential metals.

Figure 2 shows the exposure to each element from the daily consumption of leafy green vegetables in adults and children and for the two consumption scenarios considered (AC and HC) and evaluates the percentage contribution of the daily intake of green vegetables to the DRV (the dashed line represents 100% of the DVR). Fe, Mn, Mo and Co are the elements from which the consumption of leafy vegetables contributes the most to the DRV in high consumers (HC), in both children and adults, exceeding the DRV in all cases. For the rest of the elements, such as Se, Cu and Zn, the contributions of leafy vegetable consumption to the DRVs are considerable. In the case of the population with an average consumption of leafy vegetables (AC), Mo contributes the most to the diet, exceeding the DRV in the case of children (AC).

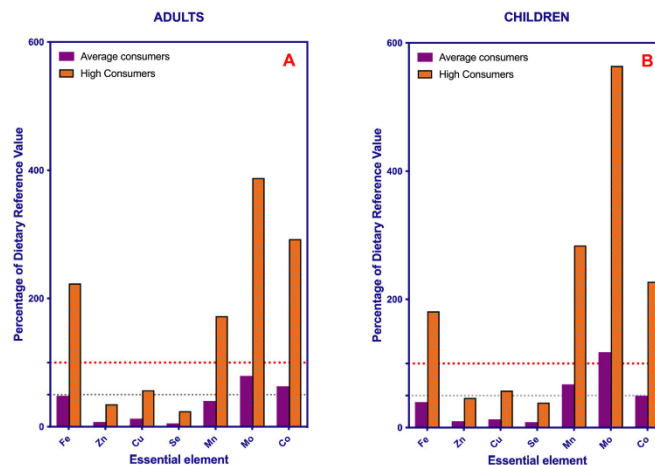


Figure 2. Bar plot showing the percentage of the dietary reference values (DRV) of essential elements provided by the consumption of leafy green vegetables in average and high consumers. (A) Adults. (B) Children. Red and gray dotted lines indicate 100% and 50% of the DRV of each element, respectively.

3.2. Toxic Elements

Table 3 shows the concentration of the detected toxic elements (As, Cd, Hg and Pb) in the different vegetables. Cd is the element that appears in the highest concentration, followed by As and Pb. As suspected, Hg is the toxic metal with the lowest concentrations in vegetables. Spinach is the most contaminated leafy vegetable with these toxic metals and significant differences ($p < 0.0001$) were detected. Environmental problems from metal

and pesticide contamination, their synergistic and antagonistic interactions, as well as their combined toxic effects, have been reported by Alengebawy et al. [46].

Table 3. Concentrations (ng/g) as median and interquartile range (P25–P75) of toxic elements in several types of leafy vegetables.

Element	Romaine Lettuce	Iceberg Lettuce	Baby Lettuce	Arugula (Rocket)	Spinach	Lamb's Lettuce	Watercress	Swiss Chard	<i>p</i>
As	1.6 (0.8–6.8)	0.5 (0.4–2.8)	3.9 (2.2–5.1)	7.2 (1.8–8.9)	8.0 (2.9–18.2)	18.9 (8.1–26.2)	6.7 (2.7–16.5)	4.9 (2.6–7.4)	<0.0001
Cd	11.9 (5.3–22.6)	4.0 (1.7–8.6)	9.2 (2.5–36.6)	9.3 (4.3–16.7)	21.5 (11.9–39.7)	1.1 (0.9–2.9)	1.9 (1.1–5.1)	10.5 (4.7–17.9)	<0.0001
Hg	2.7 (2.0–3.6)	2.3 (0.7–2.9)	2.7 (1.5–4.3)	2.3 (1.9–5.4)	1.7 (1.0–2.8)	2.2 (1.4–3.0)	1.0 (0.5–2.9)	1.4 (1.0–3.9)	<0.0001
Pb	4.9 (1.9–10.6)	2.0 (1.2–12.2)	6.9 (3.4–9.5)	13.1 (10.0–18.9)	12.8 (6.0–31.7)	6.4 (4.6–8.2)	7.5 (3.3–14.7)	9.3 (5.8–16.4)	<0.0001

While the highest levels of Cd were detected in spinach, romaine lettuce and chard, the lowest levels of Cd were found in lamb's lettuce. These results are like those previously published by Al Jasir et al. [9] and AESAN [60], in which Cd contamination in these leafy vegetables reaches levels between 10 and 100 µg/kg and the results of the study by Rubio et al. 2006 [16], where Cd was found at levels of 13.62 µg/kg in vegetables. However, the results here are lower than those reported by Mohamed et al. [27], who observed a concentration of 4.13 µg/g of Cd in spinach.

The concentration of Hg and As is low in all the analyzed vegetables, with the highest being Hg in romaine lettuce and sprouts (2.7 ng/g) and As in lamb's lettuce (18.9 ng/g) and spinach (8.0 ng/g). This situation is similar to that reported by EFSA [55], where the highest Hg concentration was observed in fish and shellfish, and to the study conducted by Martí-Cid et al [61]. In the study by Rubio et al [62], Hg levels in vegetables consumed in the Canary Islands were not detectable.

Arugula and spinach are the most contaminated with Pb. These results are lower than those obtained in the studies conducted by Guerra et al. [13], who reported high levels of Pb in vegetables, and those carried out by EFSA [53]. In contrast to the above, the results of the present study are higher than those found in the study by Rubio et al., 2005 [17], where Pb was detected at a level of 0.14 µg/kg in vegetables.

Table 4 shows the exposure assessment (for adults and children) of potentially toxic elements (PTE) from the consumption of different leafy vegetables produced and consumed in the Canary Islands using the median values of each element and the daily consumption of each vegetable, for high consumers (HC) (percentile 97.5th) and average consumers (AC) (percentile 50th). Lead, cadmium, mercury and arsenic intakes from the consumption of leafy vegetables in the Canary Islands do not show significant values, so the consumption of these vegetables does not pose a health risk. It can be concluded that, in the scenario of average consumption of leafy vegetables, Canary adults have insignificant intakes of toxic metals.

Table 4. Estimated daily intake (EDI) ($\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{day}$ calculated from the median values) of toxic elements from the consumption of leafy vegetables in Canarian adults and children and two consumption scenarios (average and high consumers).

Adults (>17 y.o.)—68.48 kg bw—Both Genders																	
Element	Toxic Reference Value ^b	Romaine Lettuce		Iceberg Lettuce		Baby Lettuce		Arugula (Rocket)		Spinach		Lamb's Lettuce		Watercress		Swiss Chard	
		AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC
		iAs ^c	0.30	0.001	0.004	0.000	0.001	0.002	0.010	0.004	0.018	0.005	0.023	0.009	0.044	0.004	0.020
Cd	1.00	0.006	0.029	0.002	0.010	0.004	0.023	0.005	0.023	0.013	0.062	0.001	0.003	0.001	0.006	0.006	0.021
MeHg ^d	0.10	0.001	0.007	0.001	0.006	0.001	0.007	0.001	0.006	0.001	0.005	0.001	0.005	0.001	0.003	0.001	0.004
Pb	6.00	0.002	0.012	0.001	0.005	0.003	0.017	0.006	0.032	0.008	0.037	0.003	0.016	0.005	0.022	0.006	0.022

Children (7–12 y.o.)—34.48 kg bw—Both Genders																	
Element	Toxic Reference Value ^a	Romaine Lettuce		Iceberg Lettuce		Baby Lettuce		Arugula (Rocket)		Spinach		Lamb's Lettuce		Watercress		Swiss Chard	
		AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC
		iAs ^c	0.30	0.001	0.003	0.000	0.001	0.002	0.008	0.001	0.007	0.005	0.025	0.004	0.018	0.004	0.022
Cd	1.00	0.005	0.024	0.002	0.008	0.004	0.018	0.002	0.009	0.014	0.068	0.000	0.001	0.001	0.006	0.006	0.019
MeHg ^d	0.10	0.001	0.005	0.001	0.004	0.001	0.005	0.000	0.002	0.001	0.005	0.000	0.002	0.001	0.003	0.001	0.003
Pb	6.00	0.002	0.010	0.001	0.004	0.003	0.014	0.003	0.013	0.009	0.041	0.001	0.006	0.005	0.024	0.005	0.017

^a The EDI was calculated considering the consumption (in g/day) of each of the vegetables for the P50 of the Canary population in both adults and children according to the data in the Nutritional Survey of the Canary Islands [41]. ^b For comparative purposes, the TRVs are expressed in $\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{day}$. When a range of different values for males and females is given, the EFSA average value was considered [53,54]. ^c As a reference to calculate the inorganic arsenic exposure, the EFSA scientific opinion of arsenic in foods [59] was considered. According to this opinion, the proportion of inorganic arsenic in vegetables ranges up to 65% [56]. ^d It has been established that the percentage of the methyl form in vegetables normally seems to vary between 5% and 30% [55]. With the aim of a conservative approach, the EDI of MeHg was calculated considering that 20% of the total mercury in the leafy vegetables is in the form of methylmercury.

For both adults and children, the average consumption of green leafy vegetables does not generate EDI values that could be considered significant contributions to the established TRVs. However, the high consumption of these leafy vegetables generates relevant EDIs. In the case of HC adults, spinach consumption contributed the highest reference values of toxic elements (7.7% of the TRV of iAs), followed by romaine lettuce (7% of the TRV of MeHg and 2.9% of the TRV of Cd) and watercress (6.7% of the TRV of iAs). In children exposed to a scenario of high consumption of leafy vegetables, the same trend is observed as in adults. Spinach contributes the most to the toxic elements' dietary exposure (8.3% of the TRV of iAs), followed by romaine lettuce (5% of the TRV of MeHg and 2.4% of the TRV of Cd) and watercress (7.3% of the TRV of iAs).

These results are similar to those reported by Zhu Huan et al. [10], in which the intake of As, Cd, Hg and Pb from vegetables poses a low risk to health but suggests that Cd should be taken into account as a relevant contaminant in vegetables. This same consideration was supported by the risk assessment of Cd exposure conducted by the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) [60].

As can be seen in Figure 3, the exposure to toxic metals from the consumption of leafy vegetables by the Canary population is much lower than the TRVs set for these toxic elements. For both population groups, the dietary intakes of iAs and Cd are worth noting. The rest of the elements do not appear in prominent concentrations.

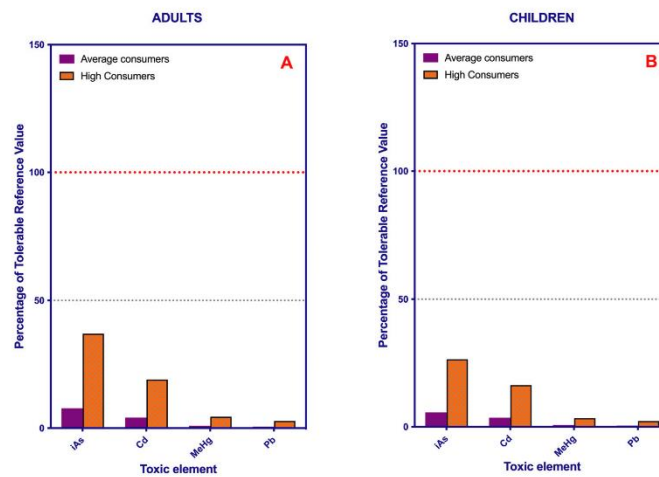


Figure 3. Bar plot showing the percentage of the tolerable daily intake values (TDI) or provisional tolerable weekly intake values (PTWI) of highly toxic elements provided by the consumption of leafy green vegetables in average and high consumers. (A) Adults. (B) Children. Red and gray dotted lines indicate 100% and 50% of the Toxic Reference Value of each element, respectively.

3.3. Potentially Toxic Elements (PTE)

Table 5 shows the concentrations of potentially toxic elements (PTE) in the different analyzed vegetables including the sum of Rare Earth Elements (Sum REE) and the sum of minority elements (Sum ME). Spinach and arugula are the vegetables with the highest concentrations of these elements, followed by watercress and chard. The most abundant elements from highest to lowest concentrations are Al in spinach, Sr in chard and watercress, and Ba in arugula.

Table 5. Concentrations (ng/g as median and interquartile range (P25–P75)) of potentially toxic elements in several types of leafy vegetables.

Element	Romaine Lettuce	Iceberg Lettuce	Baby Lettuce	Arugula (Rocket)	Spinach	Lamb's Lettuce	Watercress	Swiss Chard	<i>p</i>
Ag	0.24 (0.16–0.32)	0.17 (0.12–0.37)	0.16 (0.12–0.33)	0.37 (0.24–0.58)	0.94 (0.48–2.2)	0.28 (0.22–0.34)	0.17 (0.10–0.38)	0.63 (0.42–1.5)	<0.0001
Al	8831.2 (4413.9–26,221.8)	1580.9 (1113.3–5807.3)	13,671.2 (7967.4–20,439.7)	32,145.2 (10,361.8–45,383.9)	41,946.8 (11,517.1–83,360.8)	14,185.0 (6374.3–23,873.0)	11,810.9 (5583.1–29,424.7)	17,866.4 (9726.5–31,310.9)	<0.0001
Au	1.6 (0.9–2.7)	1.9 (0.8–2.3)	2.1 (0.3–3.4)	1.5 (0.5–3.2)	0.4 (0.3–0.5)	1.4 (0.8–1.9)	0.4 (0.2–1.1)	0.4 (0.2–0.9)	<0.0001
Ba	253.9 (130.5–364.6)	299.0 (181.9–423.2)	431.8 (182.9–1098.3)	687.5 (293.0–1109.4)	511.2 (219.1–935.5)	490.0 (399.6–628.4)	198.3 (71.9–336.1)	1246.1 (334.3–2947.1)	<0.0001
Be	0.40 (0.0–1.17)	0.0 (0.0–0.56)	0.0 (0.0–0.93)	0.23 (0.0–1.03)	2.85 (0.92–4.92)	1.24 (0.91–1.56)	0.91 (0.41–1.81)	1.42 (0.69–2.69)	<0.0001
Cr	21.4 (10.7–37.1)	8.9 (7.2–20.3)	22.8 (16.4–45.5)	52.3 (13.6–176.9)	72.4 (29.5–133.2)	38.0 (28.9–82.3)	31.8 (14.8–61.6)	53.7 (29.1–66.4)	<0.0001
Ni	39.4 (19.9–58.1)	60.4 (13.9–189.4)	49.1 (31.3–124.1)	59.3 (25.9–134.6)	85.7 (22.7–242.1)	40.4 (35.2–46.2)	33.3 (18.1–65.9)	56.5 (29.8–94.0)	0.0154
Sb	0.47 (0.26–0.88)	0.68 (0.23–1.46)	0.78 (0.51–16.08)	0.91 (0.42–1.38)	0.86 (0.68–2.72)	1.02 (0.88–1.22)	1.06 (0.69–1.89)	0.86 (0.54–1.47)	0.0015
Sn	4.4 (1.4–11.1)	1.1 (0.7–6.8)	3.3 (1.6–9.7)	27.9 (18.0–37.2)	13.1 (2.6–13.1)	1.7 (1.4–2.4)	2.7 (0.8–8.2)	3.4 (2.2–9.5)	<0.0001
Sr	1635.1 (1214.9–2763.2)	1917.1 (1068.7–3345.3)	1540.9 (1127.4–10,787.2)	4355.1 (1343.9–8047.4)	4535 (2935.8–8392.6)	3964.5 (3166.7–5525.5)	5324.3 (3262.8–14,408.2)	6510.7 (2833.9–9437.4)	<0.0001
Th	0.6 (0.3–4.6)	0.1 (0.0–0.3)	2.3 (1.2–3.2)	3.4 (0.6–6.4)	6.4 (1.9–14.1)	2.2 (1.0–3.7)	1.8 (0.6–3.9)	2.6 (1.4–4.6)	<0.0001
Tl	1.8 (1.3–2.8)	2.2 (1.0–2.7)	2.1 (0.8–3.1)	2.8 (1.7–5.4)	1.9 (1.2–2.8)	2.2 (1.6–2.6)	0.9 (0.6–1.9)	0.8 (0.6–1.3)	<0.0001
U	0.3 (0.1–1.1)	0.1 (0.0–1.1)	0.9 (0.6–1.3)	1.8 (0.4–2.3)	2.1 (1.4–3.7)	7.9 (2.1–12.6)	1.1 (0.6–2.7)	1.6 (0.7–2.8)	<0.0001

Table 5. *Cont.*

Element	Romaine Lettuce	Iceberg Lettuce	Baby Lettuce	Arugula (Rocket)	Spinach	Lamb's Lettuce	Watercress	Swiss Chard	<i>p</i>
V	10.8 (5.2–41.7)	2.2 (1.6–9.7)	25.8 (19.9–50.0)	54.7 (12.4–70.7)	85.9 (24.5–154.0)	53.1 (19.9–91.9)	30.6 (15.6–61.2)	51.8 (24.1–82.1)	<0.0001
Sum REE ^a	20.6 (9.1–122.6)	4.0 (3.1–16.1)	81.2 (49.4–134.8)	132.5 (34.4–153.4)	259.5 (53.1–580.2)	62.9 (24.8–85.7)	53.4 (25.8–113.9)	110.8 (54.6–171.1)	<0.0001
Sum ME ^b	5.9 (3.7–35.3)	1.7 (1.3–3.5)	17.3 (11.4–24.0)	41.1 (10.7–50.4)	62.6 (17.9–112.2)	23.7 (85.3–36.9)	17.4 (7.8–31.5)	27.0 (12.8–43.9)	<0.0001

^a This is the sum of the individual concentrations of Ce, Dy, Er, Eu, Ga, Gd, Ho, In, La, Lu, Nb, Nd, Pr, Sm, Ta, Tb, Tm, Y and Yb. ^b This is the sum of the individual concentrations of Au, Bi, Ga, In, Nb, Pt, Ta, Th, and V.

These results are in line with those previously published by Ding Guo Jiang et al. [29]. However, they are different from those reported by Liu et al. [23], since these authors found that the Tl levels in vegetables such as lettuce, chard and pak choy exceeded the maximum permitted level (0.5 mg Tl/kg) of the environmental quality standards for food in Germany. Regarding the data on Al, the results are in line with those previously reported by EFSA [21], in which chard, spinach and lettuce are identified as vegetables with a high Al content.

Table 6 shows the estimated dietary exposure (EDI) of potentially toxic elements, including the sum of Rare Earth Elements (Sum REE) and the sum of minority elements (Sum ME) from the consumption of different leafy vegetables produced and marketed in the Canary Islands.

The elements from which the consumption of leafy vegetables represents a greater contribution to the TRVs for both adults and children are Tl, Al, Sr, Cr and Ba. It is important to highlight the contribution of SUM REE. The high consumption of leafy vegetables (HC scenario) in adults is worth mentioning for the contributions to the TRVs provided by arugula consumption (10% of the TRV of Tl; 7.9% of the TRV of Al), iceberg lettuce intake (8.6% of the TRV of Tl), lamb's lettuce ingestion (3% of the TRV of Cr), consumption of watercress (3% of the TRV of Cr; 2.6% of the TRV of Sr) and daily chard intake (3% of the TRV of Cr; 1% of the TRV of Ba). The intake generated by the SUM REE from the daily consumption of arugula reaches 0.5% of the toxic reference value.

In the case of children, the contribution from the daily consumption of spinach stands out in both AC profiles (12% of the TRV of Al; 8.6% of the TRV of Tl; 7.1% of the TRV of Cr) and HC profiles (13% TRV of Al; 8.6% TRV of Tl; 7.7% TRV of Cr). This percentage reaches 4% of the TRV of Al in children in the HC scenario of watercress. The dietary exposure to Ba after the consumption of chard makes a greater contribution to the TRV (0.9%) in children following a diet with an HC of leafy vegetables. The Sr contribution from watercress (3% of the TRV) is greater in children with an HC profile.

A recent work investigated the presence of REEs in vegetables in China and leafy vegetables and reported high concentrations. Nevertheless, the risk to human health from their consumption was estimated to be significantly lower than the acceptable daily intake for elements in this group ($70 \mu\text{g kg}^{-1} \text{d}^{-1}$) [22]. In the aforementioned study, spinach was found to generate the highest intake of the SUM REE, but only accounts for 1.2% and 1.4% of the value of $70 \mu\text{g kg}^{-1} \text{d}^{-1}$ in the AC and HC scenarios, respectively.

EFSA 2020 [63] reported the scarce research on the potential toxicity of REEs and concluded that the control of these elements in foods of plant origin is necessary. It has been demonstrated that chronic exposure to some of these elements, even at low doses, could lead to a wide range of adverse health effects, even in the early stages of life, such as neurotoxicity, neurodevelopmental toxicity and hepatic alterations. There have been studies suggesting that some of these elements might negatively affect children's spatial learning and indirectly affect memory.

As can be seen in Figure 4, the consumption of leafy vegetables may involve a worrying exposure to Al, Cr, and especially Tl, in high consumers, in both children or adults.

Table 6. Estimated daily intake (EDI) ($\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/day calculated from the median values) of potentially toxic elements from the consumption of the several types of leafy vegetables in Canarian adults and children and two consumption scenarios (average and high consumers).

Adults (>17 y.o.)—68.48 kg bw—Both Genders																	
EDI ($\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/day) ^a																	
Element	Toxic Reference Value ^b	Romaine Lettuce		Iceberg Lettuce		Baby Lettuce		Arugula (Rocket)		Spinach		Lamb's Lettuce		Watercress		Swiss Chard	
		AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC
Ag	5	<LOD	0.001	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.001	0.001	0.001	<LOD	0.001	<LOD	0.001	<LOD	0.001
Al	1000	4.325	21.820	0.774	3.906	6.696	33.780	15.750	79.430	25.480	27960	6.948	35.050	7.174	35.020	10.710	29.080
Ba	200	0.124	0.627	0.146	0.739	0.212	1.067	0.337	1.699	0.311	0.341	0.240	1.211	0.121	0.588	0.747	2.029
Be	2	<LOD	0.001	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.001	0.002	0.002	0.001	0.003	0.001	0.003	0.001	0.002
Cr	3	0.010	0.053	0.004	0.022	0.011	0.056	0.026	0.130	0.044	0.048	0.019	0.094	0.019	0.094	0.032	0.087
Ni	20	0.019	0.097	0.030	0.149	0.024	0.121	0.029	0.146	0.052	0.057	0.020	0.100	0.020	0.099	0.034	0.092
Sb	0.4	<LOD	0.001	<LOD	0.002	<LOD	0.002	<LOD	0.002	0.001	0.001	<LOD	0.003	0.001	0.003	0.001	0.001
Sn	600	0.002	0.011	0.001	0.003	0.002	0.008	0.014	0.069	0.004	0.004	0.001	0.004	0.002	0.008	0.002	0.006
Sr	600	0.801	4.040	0.939	4.736	0.755	3.808	2.133	10.760	2.754	3.022	1.942	9.797	3.234	15.790	3.904	10.600
Tl	0.07	0.001	0.004	0.001	0.006	0.001	0.005	0.001	0.007	0.001	0.001	0.001	0.005	0.001	0.003	<LOD	0.001
U	3	<LOD	0.001	<LOD	<LOD	<LOD	0.002	0.001	0.004	0.001	0.001	0.004	0.019	0.001	0.003	0.001	0.003
Sum REE ^c	61	0.010	0.051	0.002	0.010	0.040	0.201	0.065	0.327	0.158	0.173	0.031	0.155	0.032	0.159	0.066	0.180
Sum ME ^d	NA	0.003	0.015	0.001	0.004	0.008	0.043	0.020	0.101	0.020	0.042	0.012	0.059	0.011	0.052	0.016	0.044

Table 6. Cont.

Element	Toxic Reference Value ^b	Children (7–12 y.o.)—34.48 kg bw—Both Genders EDI (µg/kg bw/Day) ^a															
		Romaine Lettuce		Iceberg Lettuce		Baby Lettuce		Arugula (Rocket)		Spinach		Lamb’s Lettuce		Watercress		Swiss Chard	
		AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC	AC	HC
Ag	5	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.003	0.003	<LOD	<LOD	<LOD	0.001	<LOD	0.001
Al	1000	3.452	17.420	0.618	3.117	5.345	26.960	6.284	31.700	121.900	133.800	2.773	13.990	7.796	38.370	9.404	25.080
Ba	200	0.099	0.501	0.117	0.590	0.169	0.852	0.134	0.678	1.486	1.631	0.096	0.483	0.131	0.644	0.656	1.749
Be	2	<LOD	0.001	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.008	0.009	<LOD	0.001	0.001	0.003	0.001	0.002
Cr	3	0.008	0.042	0.004	0.018	0.009	0.045	0.010	0.052	0.210	0.231	0.007	0.037	0.021	0.103	0.028	0.075
Ni	20	0.015	0.078	0.024	0.119	0.019	0.097	0.012	0.058	0.249	0.273	0.008	0.040	0.022	0.108	0.030	0.079
Sb	0.4	<LOD	0.001	<LOD	0.001	<LOD	0.002	<LOD	0.001	0.002	0.003	<LOD	0.001	0.001	0.003	<LOD	0.001
Sn	600	0.002	0.009	<LOD	0.002	0.001	0.006	0.005	0.028	0.018	0.020	<LOD	0.002	0.002	0.009	0.002	0.005
Sr	600	0.639	3.225	0.749	3.780	0.603	3.039	0.851	4.294	13.180	14.470	0.775	3.910	3.515	17.300	3.427	9.138
Tl	0.07	0.001	0.003	0.001	0.004	0.001	0.004	0.001	0.003	0.006	0.006	<LOD	0.002	0.001	0.003	<LOD	0.001
U	3	<LOD	0.001	<LOD	<LOD	<LOD	0.002	<LOD	0.002	0.006	0.007	0.002	0.008	0.001	0.004	0.001	0.002
Sum REE ^c	61	0.008	0.041	0.002	0.008	0.032	0.160	0.026	0.131	0.754	0.828	0.012	0.062	0.035	0.174	0.058	0.156
Sum ME ^d	NA	0.002	0.012	0.001	0.003	0.007	0.034	0.008	0.040	0.008	0.200	0.005	0.023	0.011	0.057	0.014	0.038

^a The EDI was calculated considering the consumption (in g/day) of each of the vegetables for the P50 of the Canary population in both adults and children according to the data in the Nutritional Survey of the Canary Islands [41]. ^b For comparative purposes, the TRVs are expressed in µg/kg bw/day, established by EFSA [63]. For Sum REE, the TRVs are those set by EPA [57]. ^c This is the sum of the individual concentrations of Ce, Dy, Er, Eu, Ga, Gd, Ho, In, La, Lu, Nb, Nd, Pr, Sm, Ta, Tb, Tm, Y and Yb. ^d This is the sum of the individual concentrations of Au, Bi, Ga, In, Nb, Pt, Ta, Th, and V.

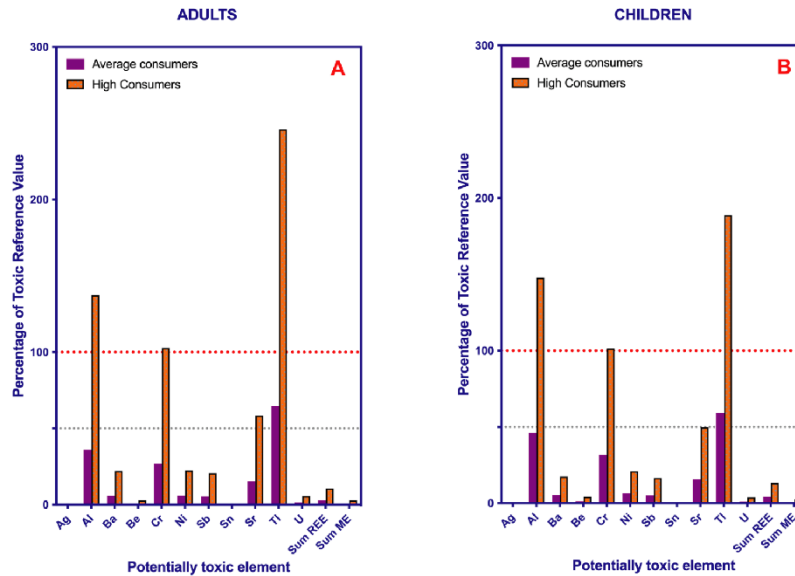


Figure 4. Bar plot showing the percentage of the tolerable daily intake values (TDI) or provisional tolerable weekly intake values (PTWI) of potentially toxic elements, rare-earth elements and minority elements from the consumption of leafy green vegetables in average and high consumers. (A) Adults. (B) Children. Red and gray dotted lines indicate 100% and 50% of the reference value of each element, respectively.

4. Conclusions

The consumption of leafy vegetables provides significant levels of some essential elements (Fe, Mn, Mo, Co and Se), but also of some potentially toxic elements (Al, Cr and Tl), although the levels of toxic elements are insignificant (As, Cd, Pb and Hg). Leafy vegetables with the highest levels of elements are spinach, rucola, watercress and chard. According to the dietary model of the Canary Islands, high consumers of leafy vegetables in this archipelago would meet their daily nutritional requirements of Fe, Mn, Mo and Co, but this population would be exposed to a very moderate risk derived from their exposure to Tl, Al and Cr. Total diet studies on those elements with dietary exposures above the reference values derived from the consumption of this food category, mainly Tl, are recommended.

Author Contributions: Conceptualization, V.M.-L. and O.P.L.; methodology, Á.R.-H. and M.Z.; software, L.A.H.-H., V.M.-L., C.R. and A.A.-D.; validation, Á.R.-H., M.Z., V.M.-L. and O.P.L.; formal analysis, Á.R.-H., A.A.-D., M.Z. and V.M.-L.; investigation, V.M.-L., C.R., M.d.M.T.-A. and O.P.L.; resources, L.D.B. and O.P.L.; data curation, L.A.H.-H. and L.D.B.; writing—original draft preparation, C.R., V.M.-L. and O.P.L.; writing—review and editing, V.M.-L., M.d.M.T.-A., L.D.B. and O.P.L.; supervision, M.Z. and O.P.L.; project administration, O.P.L.; funding acquisition, L.D.B. and O.P.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was partially funded by the Catalina Ruiz research staff training aid program of the Regional Ministry of Economy, Knowledge and Employment of the Canary Islands Government and by the European Social Fund granted to the University of Las Palmas de Gran Canaria via a post-doctoral grant to the author Andrea Acosta-Dacal (APCR2022010003).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: These are data available at the University of Las Palmas de Gran Canaria.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Watson, R.R. *Handbook of Fertility: Nutrition, Diet, Lifestyle and Reproductive Health*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2015; pp. 1–435.
2. Platel, K.; Srinivasan, K. Bioavailability of Micronutrients from Plant Foods: An Update. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2016**, *56*, 1608–1619. [[CrossRef](#)]
3. Gupta, N.; Yadav, K.K.; Kumar, V.; Kumar, S.; Chadd, R.P.; Kumar, A. Trace elements in soil-vegetables interface: Translocation, bioaccumulation, toxicity and amelioration—A review. *Sci. Total. Environ.* **2019**, *651*, 2927–2942. [[CrossRef](#)]
4. Wada, O. What are Trace Elements?—Their deficiency and excess states. *Jpn. Med. Assoc. J.* **2004**, *47*, 351–358.
5. Salehipour, M.; Ghorbani, H.; Kheirabadi, H.; Afyuni, M. Health Risks from Heavy Metals via Consumption of Cereals and Vegetables in Isfahan Province, Iran. *Hum. Ecol. Risk Assess. Int. J.* **2015**, *21*, 1920–1935. [[CrossRef](#)]
6. Huang, Y.; He, C.; Shen, C.; Guo, J.; Mubeen, S.; Yuan, J.; Yang, Z. Toxicity of cadmium and its health risks from leafy vegetable consumption. *Food Funct.* **2017**, *8*, 1373–1401. [[CrossRef](#)]
7. Rehman, Z.U.; Khan, S.; Brusseau, M.L.; Shah, M.T. Lead and cadmium contamination and exposure risk assessment via consumption of vegetables grown in agricultural soils of five-selected regions of Pakistan. *Chemosphere* **2017**, *168*, 1589–1596. [[CrossRef](#)]
8. McBride, M.B.; Simon, T.; Tam, G.; Wharton, S. Lead and Arsenic Uptake by Leafy Vegetables Grown on Contaminated Soils: Effects of Mineral and Organic Amendments. *Water, Air, Soil Pollut.* **2013**, *224*, 1378. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Al Jassir, M.S.; Shaker, A.; Khaliq, M.A. Deposition of heavy metals on green leafy vegetables sold on roadsides of Riyadh City, Saudi Arabia. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2005**, *75*, 1020–1027. [[CrossRef](#)]
10. Huang, Z.; Pan, X.-D.; Wu, P.-G.; Han, J.-L.; Chen, Q. Heavy metals in vegetables and the health risk to population in Zhejiang, China. *Food Control* **2014**, *36*, 248–252. [[CrossRef](#)]
11. McBride, M.B.; Shayler, H.A.; Spliethoff, H.M.; Mitchell, R.G.; Marquez-Bravo, L.G.; Ferenz, G.S.; Russell-Anelli, J.M.; Casey, L.; Bachman, S. Concentrations of lead, cadmium and barium in urban garden-grown vegetables: The impact of soil variables. *Environ. Pollut.* **2014**, *194*, 254–261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Ghasemidehkordi, B.; Malekirad, A.A.; Nazem, H.; Fazilati, M.; Salavati, H.; Shariatifar, N.; Rezaei, M.; Fakhri, Y.; Khaneghah, A.M. Concentration of lead and mercury in collected vegetables and herbs from Markazi province, Iran: A non-carcinogenic risk assessment. *Food Chem. Toxicol.* **2018**, *113*, 204–210. [[CrossRef](#)]
13. Guerra, F.; Trevizam, A.R.; Muraoka, T.; Marcante, N.C.; Canniatti-Brazaca, S.G. Heavy metals in vegetables and potential risk for human health. *Sci. Agric.* **2012**, *69*, 54–60. [[CrossRef](#)]
14. Yang, B.; Gao, Y.; Zhang, C.; Zheng, X.; Li, B. Mercury accumulation and transformation of main leaf vegetable crops in Cambosol and Ferrosol soil in China. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2019**, *27*, 391–398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. De Temmerman, L.; Waegeneers, N.; Claeys, N.; Roekens, E. Comparison of concentrations of mercury in ambient air to its accumulation by leafy vegetables: An important step in terrestrial food chain analysis. *Environ. Pollut.* **2009**, *157*, 1337–1341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Rubio, C.; Hardisson, A.; Reguera, J.I.; Revert, C.; Lafuente, M.A.; González-Iglesias, T. Cadmium dietary intake in the Canary Islands, Spain. *Environ. Res.* **2006**, *100*, 123–129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Rubio, C.; González-Iglesias, T.; Revert, C.; Reguera, J.I.; Gutiérrez, A.J.; Hardisson, A. Lead dietary intake in a Spanish population (Canary Islands). *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 6543–6549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Tansel, B. From electronic consumer products to e-wastes: Global outlook, waste quantities, recycling challenges. *Environ. Int.* **2017**, *98*, 35–45. [[CrossRef](#)]
19. Henríquez-Hernández, L.A.; Boada, L.D.; Carranza, C.; Pérez-Arellano, J.L.; González-Antuña, A.; Camacho, M.; Almeida-González, M.; Zumbado, M.; Luzardo, O.P. Blood levels of toxic metals and rare earth elements commonly found in e-waste may exert subtle effects on hemoglobin concentration in sub-Saharan immigrants. *Environ. Int.* **2017**, *109*, 20–28. [[CrossRef](#)]
20. González-Weller, D.; Gutiérrez, A.J.; Rubio, C.; Revert, C.; Hardisson, A. Dietary intake of aluminum in a Spanish population (Canary Islands). *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 10452–10457. [[CrossRef](#)]
21. Aguilar, F.; Autrup, H.; Barlow, S.; Castle, L.; Crebelli, R.; Dekant, W.; Engel, K.-H.; Gontard, N.; Gott, D.; Grilli, S.; et al. Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Food Contact Materials on a request from European commission on Safety of aluminium from dietary intake. *EFSA J.* **2008**, *754*, 1–34.
22. Zhuang, M.; Zhao, J.; Li, S.; Liu, D.; Wang, K.; Xiao, P.; Yu, L.; Jiang, Y.; Song, J.; Zhou, J.; et al. Concentrations and health risk assessment of rare earth elements in vegetables from mining area in Shandong, China. *Chemosphere* **2017**, *168*, 578–582. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Liu, J.; Luo, X.; Wang, J.; Xiao, T.; Chen, D.; Sheng, G.; Yin, M.; Lippold, H.; Wang, C.; Chen, Y. Thallium contamination in arable soils and vegetables around a steel plant—A newly-found significant source of Tl pollution in South China. *Environ. Pollut.* **2017**, *224*, 445–453. [[CrossRef](#)]

24. Li, X.; Chen, Z.; Chen, Z.; Zhang, Y. A human health risk assessment of rare earth elements in soil and vegetables from a mining area in Fujian Province, Southeast China. *Chemosphere* **2013**, *93*, 1240–1246. [CrossRef] [PubMed]
25. Shi, Z.; Yong, L.; Liu, Z.; Wang, Y.; Sui, H.; Mao, W.; Zhang, L.; Li, Y.; Liu, J.; Wei, S.; et al. Risk assessment of rare earth elements in fruits and vegetables from mining areas in China. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2022**, *29*, 48694–48703. [CrossRef] [PubMed]
26. Radwan, M.A.; Salama, A.K. Market basket survey for some heavy metals in Egyptian fruits and vegetables. *Food Chem. Toxicol.* **2006**, *44*, 1273–1278. [CrossRef]
27. Ali, M.H.H.; Al-Qahtani, K.M. Assessment of some heavy metals in vegetables, cereals and fruits in Saudi Arabian markets. *Egypt. J. Aquat. Res.* **2012**, *38*, 31–37. [CrossRef]
28. ATSDR Substance Priority List | ATSDR. Available online: <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html#2019spl> (accessed on 18 August 2021).
29. Jiang, D.G.; Yang, J.; Zhang, S.; Yang, D.J. A Survey of 16 Rare Earth Elements in the Major Foods in China. *Biomed. Environ. Sci.* **2012**, *25*, 267–271. [CrossRef]
30. Amyot, M.; Clayden, M.G.; MacMillan, G.A.; Perron, T.; Arscott-Gauvin, A. Fate and Trophic Transfer of Rare Earth Elements in Temperate Lake Food Webs. *Environ. Sci. Technol.* **2017**, *51*, 6009–6017. [CrossRef]
31. González-Antuña, A.; Camacho, M.; Henríquez-Hernández, L.A.; Boada, L.D.; Almeida-González, M.; Zumbado, M.; Luzardo, O.P. Simultaneous quantification of 49 elements associated to e-waste in human blood by ICP-MS for routine analysis. *MethodsX* **2017**, *4*, 328–334. [CrossRef]
32. Cabrera-Rodríguez, R.; Luzardo, O.P.; Almeida-González, M.; Boada, L.D.; Zumbado, M.; Henríquez-Hernández, L.A. Database of persistent organic pollutants in umbilical cord blood: Concentration of organochlorine pesticides, PCBs, BDEs and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Data Br.* **2020**, *28*, 104918. [CrossRef]
33. Henríquez-Hernández, L.A.; Romero, D.; González-Antuña, A.; Gonzalez-Alzaga, B.; Zumbado, M.; Boada, L.D.; Hernández, A.F.; López-Flores, I.; Luzardo, O.P.; Lacasaña, M. Biomonitoring of 45 inorganic elements measured in plasma from Spanish subjects: A cross-sectional study in Andalusian population. *Sci. Total Environ.* **2020**, *706*, 135750. [CrossRef]
34. Tchounwou, P.B.; Yedjou, C.G.; Patlolla, A.K.; Sutton, D.J. Heavy Metals Toxicity and the Environment. *EXS* **2012**, *101*, 133. [CrossRef] [PubMed]
35. Pagano, G.; Guida, M.; Tommasi, F.; Oral, R. Health effects and toxicity mechanisms of rare earth elements—Knowledge gaps and research prospects. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2015**, *115*, 40–48. [CrossRef]
36. Jenkins, W.; Perone, P.; Walker, K.; Bhagavathula, N.; Aslam, M.N.; DaSilva, M.; Dame, M.K.; Varani, J. Fibroblast Response to Lanthanoid Metal Ion Stimulation: Potential Contribution to Fibrotic Tissue Injury. *Biol. Trace Elem. Res.* **2011**, *144*, 621. [CrossRef]
37. Liu, D.; Zhang, J.; Wang, G.; Liu, X.; Wang, S.; Yang, M. The Dual-Effects of LaCl₃ on the Proliferation, Osteogenic Differentiation, and Mineralization of MC3T3-E1 Cells. *Biol. Trace Elem. Res.* **2012**, *150*, 433–440. [CrossRef]
38. Rico, C.M.; Morales, M.I.; McCreary, R.; Castillo-Michel, H.; Barrios, A.C.; Hong, J.; Tafoya, A.; Lee, W.-Y.; Varela-Ramirez, A.; Peralta-Videa, J.R.; et al. Cerium Oxide Nanoparticles Modify the Antioxidative Stress Enzyme Activities and Macromolecule Composition in Rice Seedlings. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 14110–14118. [CrossRef]
39. Rodea-Palomares, I.; Gonzalo, S.; Santiago-Morales, J.; Leganés, F.; García-Calvo, E.; Rosal, R.; Fernández-Piñas, F. An insight into the mechanisms of nanoceria toxicity in aquatic photosynthetic organisms. *Aquat. Toxicol.* **2012**, *122–123*, 133–143. [CrossRef] [PubMed]
40. Martín León, V.; Luzardo, O.P. Evaluation of nitrate contents in regulated and non-regulated leafy vegetables of high consumption in the Canary Islands, Spain: Risk assessment. *Food Chem. Toxicol.* **2020**, *146*, 111812. [CrossRef]
41. Serra Majem, L.; Armas Navarro, A.; Ribas Barba, L. Food consumption and food sources of energy and nutrients in Canary Islands (1997–1998). *Arch. Latinoam. Nutr.* **2000**, *50*, 23–33. [PubMed]
42. AECOSAN ENIDE: National Survey of Dietary Intake (2009–2010). Results on Consumption Data 2011. Available online: <https://www.sanidad.gob.es/estadEstudios/estadisticas/encuestaNacional/encuesta2011.htm> (accessed on 3 May 2023).
43. López-Sobaler, A.M.; Aparicio, A.; Rubio, J.; Marcos, V.; Sanchidrián, R.; Santos, S.; Pérez-Farinós, N.; Dal-Re, M.Á.; Villar-Villalba, C.; Yusta-Boyo, M.J.; et al. Adequacy of usual macronutrient intake and macronutrient distribution in children and adolescents in Spain: A National Dietary Survey on the Child and Adolescent Population, ENALIA 2013–2014. *Eur. J. Nutr.* **2019**, *58*, 705–719. [CrossRef]
44. Diaz-Diaz, R.; Loague, K. Assessing the potential for pesticide leaching for the pine forest areas of Tenerife. *Environ. Toxicol. Chem.* **2001**, *20*, 1958–1967. [CrossRef]
45. González, P.A.; Parga-Dans, E.; Luzardo, O.P. Big sales, no carrots: Assessment of pesticide policy in Spain. *Crop. Prot.* **2021**, *141*, 105428. [CrossRef]
46. Alengebawy, A.; Abdelkhalek, S.T.; Qureshi, S.R.; Wang, M.Q. Heavy Metals and Pesticides Toxicity in Agricultural Soil and Plants: Ecological Risks and Human Health Implications. *Toxics* **2021**, *9*, 42. [CrossRef] [PubMed]
47. Remoundaki, E.; Bourliva, A.; Kokkalis, P.; Mamouri, R.E.; Papayannis, A.; Grigoratos, T.; Samara, C.; Tsezos, M. PM10 composition during an intense Saharan dust transport event over Athens (Greece). *Sci. Total Environ.* **2011**, *409*, 4361–4372. [CrossRef] [PubMed]
48. Bozlaker, A.; Prospero, J.M.; Fraser, M.P.; Chellam, S. Quantifying the Contribution of Long-Range Saharan Dust Transport on Particulate Matter Concentrations in Houston, Texas, Using Detailed Elemental Analysis. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 10179–10187. [CrossRef] [PubMed]

49. Henriquez-Hernández, L.A.; González-Antuña, A.; Boada, L.D.; Carranza, C.; Pérez-Arellano, J.L.; Almeida-González, M.; Camacho, M.; Zumbado, M.; Fernández-Fuertes, F.; Tapia-Martín, M.; et al. Pattern of blood concentrations of 47 elements in two populations from the same geographical area but with different geological origin and lifestyles: Canary Islands (Spain) vs. Morocco. *Sci. Total Environ.* **2018**, *636*, 709–716. [CrossRef]
50. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA). EFSA Scientific Opinion on principles for deriving and applying Dietary Reference Values. *EFSA J.* **2016**, *8*, 1458. [CrossRef]
51. EFSA Valores Nutricionales de Referencia | European Food Safety Authority. Available online: <https://www.efsa.europa.eu/es/topics/topic/dietary-reference-values> (accessed on 27 August 2021).
52. EFSA Scientific Committee on Food; Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. *Tolerable Upper Intake Levels for Vitamins and Minerals*; European Food Safety Authority: Palma, Italy, 2006.
53. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific Opinion on Lead in Food. *EFSA J.* **2010**, *8*, 1570. [CrossRef]
54. EFSA European Food Safety Authority. Cadmium dietary exposure in the European population. *EFSA J.* **2012**, *10*, 2551. [CrossRef]
55. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific Opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food. *EFSA J.* **2012**, *10*, 2985. [CrossRef]
56. EFSA (European Food Safety, Authority); Arcella, D.; Cascio, C.; Gómez Ruiz, J.Á. Scientific report on the chronic dietary exposure to inorganic arsenic. *EFSA J.* **2021**, *19*, 6380. [CrossRef]
57. EPA “IRIS Assessments | IRIS | US EPA”. Available online: https://iris.epa.gov/AtoZ/?list_type=alpha (accessed on 27 August 2021).
58. Pipoyan, D.; Beglaryan, M.; Stepanyan, S.; Merendino, N. Dietary Exposure Assessment of Potentially Toxic Trace Elements in Fruits and Vegetables Sold in Town of Kapan, Armenia. *Biol. Trace Elem. Res.* **2019**, *190*, 234–241. [CrossRef] [PubMed]
59. Ellen, G.; van Loon, J.W.; Tolsma, K. Heavy metals in vegetables grown in The Netherlands and in domestic and imported fruits. *Z. Leb. Unters.* **1990**, *190*, 34–39. [CrossRef] [PubMed]
60. AESAN-2021-003, Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en Relación a la Evaluación del Riesgo de la Exposición de la Población Española a Cadmio a Través de la Dieta. Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) in Relation to the Evaluation of the Risk of Exposure of the Spanish Population to Cadmium through the Diet. Available online: https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/todos_informes.htm (accessed on 3 May 2023).
61. Martí-Cid, R.; Perelló, G.; Domingo, J.L. Dietary exposure to metals by individuals living near a hazardous waste incinerator in Catalonia, Spain: Temporal trend. *Biol. Trace Elem. Res.* **2009**, *131*, 245–254. [CrossRef]
62. Rubio, C.; Gutiérrez, A.; Burgos, A.; Hardisson, A. Total dietary intake of mercury in the Canary Islands, Spain. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control. Exp. Risk Assess* **2008**, *25*, 946–952. [CrossRef] [PubMed]
63. National Food Institute-Technical University of Denmark; Doulgeridou, A.; Amlund, H.; Sloth, J.J.; Hansen, M. Review of Potentially Toxic Rare Earth Elements, Thallium and Tellurium in Plant-based Foods. *EFSA J.* **2020**, *18*, e181101. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



7. Conclusiones



1

Según los resultados obtenidos en este estudio, los vegetales de hoja cultivados en Canarias tienen niveles moderados de nitratos. Estos niveles son considerablemente más bajos que los reportados en la mayoría de los estudios.

Respecto al patrón estacional, no hubo diferencias en el contenido de nitrato.

Las concentraciones relativamente bajas y la falta de diferenciación de concentración entre verano e invierno podría deberse a las condiciones climáticas del Archipiélago Canario, caracterizado por un clima estable y una alta exposición a la luz solar.

Algunos de los vegetales de agricultura ecológica cultivados en Canarias, al contrario de lo que generalmente reportan otros estudios, tenían niveles más altos de nitratos comparados con los del cultivo convencional. Esto podría estar relacionado con el uso inadecuado de fertilizantes orgánicos.

2

Es de destacar los niveles encontrados en dos vegetales sin regulación legal, los berros y acelgas. Estos vegetales son muy consumidos en Canarias, y según los resultados de este estudio, pueden contribuir significativamente a la exposición global, incluso más que otras verduras que están reguladas. Por esta razón se considera apropiado una regulación por las autoridades de la Unión Europea para establecer unos límites máximos de residuos de nitratos en acelgas y berros, que podría ser similar a los fijados para las espinacas.

3

Las algas se están convirtiendo en un alimento cada vez más importante en la dieta de los países occidentales por su perfil nutricional. Sin embargo, los datos de este estudio confirman que estos organismos absorben y acumulan metales tóxicos como Cd, Pb y



Hg o nitratos que, al ser ingeridos en altas concentraciones, pueden desencadenar reacciones adversas, como es el caso de los nitratos.

Las algas asiáticas tienen concentraciones más altas de Cd, Pb y Hg que las algas europeas. Las especies asiáticas Hijiki y Nori destacan por su contenido en Cd y algunas muestras de algas Nori analizadas presentaron concentraciones de nitratos superiores a 8000 mg/kg.

4

Considerando el consumo recomendado por los fabricantes (4 mg/día), el nivel máximo encontrado de metales y nitratos no superan los valores de ingesta. Sin embargo, debe establecerse una legislación que regule su contenido en algas comestibles, especialmente considerando el origen, ya que puede afectar a su contenido de metales tóxicos y nitratos.

Se deberían realizar estudios de seguimiento periódico para detectar especies u orígenes que puedan suponer un riesgo desde el punto de vista toxicológico y permita hacer recomendaciones de consumo.

De igual forma, se insta a las autoridades correspondientes a legislar niveles máximos de contaminantes en estos productos para garantizar su calidad y seguridad alimentaria.

5

En el estudio de los vegetales de hoja se puede ver que los niveles más altos de elementos analizados están presentes en las espinacas, la rúcula, los berros y las acelgas.

6

El consumo de los vegetales de hoja estudiados aporta niveles significativos de algunos elementos esenciales (Fe, Mn, Mo, Co y Se) y elementos potencialmente tóxicos (Al, Cr



y Tl), aunque los niveles de elementos tóxicos son insignificantes (As, Cd, Pb y Hg). Según el modelo alimentario de Canarias, los grandes consumidores de hortalizas de hoja en este archipiélago tendrían cubiertos sus requerimientos nutricionales diarios de Fe, Mn, Mo y Co, pero al mismo tiempo esta población estaría expuesta a un riesgo muy moderado derivado de su exposición a Tl, Al y Cr.

Por ello se recomienda estudios de dieta total sobre aquellos elementos con exposiciones dietéticas superiores a los valores de referencia derivados del consumo de esta categoría de alimentos, principalmente el Tl.

7

Los resultados de esta Tesis doctoral aportan datos relevantes de elementos tóxicos y potencialmente tóxicos existentes en vegetales de hoja y algas. Mientras que para muchas de estas sustancias químicas hay límites claramente establecidos y estudios de toxicidad, para ciertos elementos y vegetales no hay estudios al respecto. Es por ello que se considera adecuado realizar estudios más amplios en cuanto a la exposición a estos elementos potencialmente tóxicos y regular los límites máximos permitidos (de aquellos elementos considerados tóxicos y nitratos) pero sin regulación en ciertos vegetales de hoja.



8. Referencias Bibliográficas

8. Referencias Bibliográficas

AECOSAN, **2006**. Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. Modelo de Dieta Española Para la Determinación de la Exposición del Consumidor a sustancias Químicas; Ministerio de Sanidad y Consumo: Madrid, España.

AECOSAN, **2011**. ENIDE: Encuesta nacional de ingesta dietética (2009-2010). Resultados de datos de consumo. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Gobierno de España.

AECOSAN, **2014**. Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. (ENALIA) Encuesta Nacional de Consumo de Alimentos en la Población Infantil y Adolescente.

http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/Informe_ENALIA2014_FINAL.pdf.

AESAN, **2009**. Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe del Comité Científico de la AESAN relativo a la evaluación del riesgo asociado a la posible presencia de arsénico en algas destinadas al consumo humano.

AESAN, **2010**. Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe del Comité Científico de la AESAN en relación a los niveles de mercurio establecidos para los productos de la pesca.

AESAN, **2011**. Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe del Comité Científico de la AESAN en relación a la Evaluación del Riesgo de la Exposición de Lactantes y Niños de corta edad a nitratos por consumo de Acelgas. <http://www.aecosan.msssi.gob.es>

AESAN-2021-003, Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición en relación con la evaluación del riesgo de la exposición de la población española a cadmio a través de la dieta.

AESAN, **2023**. Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. http://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/metales_pesados.htm (acceso 31/03/2023).

Ahmed, M., Rauf, M., Mukhtar, Z., Saeed, N.A., **2017**. Excessive use of nitrogenous fertilizers: an unawareness causing serious threats to environment and human health. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 24, 26983–26987.

8. Referencias Bibliográficas

Aires, A., Carvalho, R., Rosa, E.A., Saavedra, M.J., **2013**. Effects of agriculture production systems on nitrate and nitrite accumulation on baby-leaf salads. *Food Sci. Nutr.* 1, 3–7.

Al Jassir MS, Shaker A, Khaliq MA. Deposition of heavy metals on green leafy vegetables sold on roadsides of Riyadh City, Saudi Arabia. *Bull Environ Contam Toxicol.* **2005**. Nov; 75 (5):1020-7. doi: 10.1007/s00128-005-0851-4. PMID: 16400593.

Alengebawy A, Abdelkhalek ST, Qureshi SR, Wang MQ. Heavy Metals and Pesticides Toxicity in Agricultural Soil and Plants: Ecological Risks and Human Health Implications. *Toxics.* **2021**. Feb 25;9(3):42. doi: 10.3390/toxics9030042. PMID: 33668829; PMCID: PMC7996329.

Ali, M.H.H.; Al-Qahtani, K.M. Assessment of some heavy metals in vegetables, cereals and fruits in Saudi Arabian markets. *Egypt. J. Aquat. Res.* **2012**, 38, 31–37, doi: 10.1016/J.EJAR. 2012.08.002.

Alonso González, P.; Parga-Dans, E.; Pérez Luzardo, O. Big sales, no carrots: Assessment of pesticide policy in Spain. *Crop Prot.* **2021**, 141, 105428.

Amyot, M.; Clayden, M.G.; MacMillan, G.A.; Perron, T.; Arscott-Gauvin, A. Fate and Trophic Transfer of Rare Earth Elements in Temperate Lake Food Webs. *Environ. Sci. Technol.* **2017**, 51, 6009–6017, doi: 10.1021/ACS.EST.7B00739.

Apostoli, G.L., Solomon, A., Smallwood, M.J., Winyard, P.G., Emerson, M., **2014**. Role of inorganic nitrate and nitrite in driving nitric oxide-cGMP-mediated inhibition of platelet aggregation in vitro and in vivo. *J. Thromb. Haemostasis* 12, 1880–1889.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Case Studies in Environmental Medicine (CSEM). Lead Toxicity. Available online: https://www.atsdr.cdc.gov/csem/lead/docs/CSEM-Lead_toxicity_508.pdf (accessed on 7 June **2021**).

ATSDR Substance Priority List | ATSDR Available online: <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html#2019spl> (accessed on Aug 18, **2021**).

Bernhoft, R.A. Cadmium Toxicity and Treatment. *Sci. World J.* **2013**, 2013, 394652.

8. Referencias Bibliográficas

- Beule, L., Corre, M.D., Schmidt, M., Gobel, L., Veldkamp, E., Karlovsky, P., **2019**. Conversion of monoculture cropland and open grassland to agroforestry alters the abundance of soil bacteria, fungi and soil-N-cycling genes. *PLoS One* 14, e0218779.
- Blekkenhorst, L.C., Prince, R.L., Ward, N.C., Croft, K.D., Lewis, J.R., Devine, A., Shinde, S., Woodman, R.J., Hodgson, J.M., Bondonno, C.P., **2017**. Development of a reference database for assessing dietary nitrate in vegetables. *Mol. Nutr. Food Res.* 61, 1600982.
- Bondonno, C.P., Croft, K.D., Hodgson, J.M., **2016**. Dietary nitrate, nitric oxide, and cardiovascular health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 56, 2036–2052.
- Boroujerdnia, M.; Ansari, N.A.; Dehcordie, F.S. Effect of Cultivars, Harvesting Time and Level of Nitrogen Fertilizer on Nitrate and Nitrite Content, Yield in Romaine Lettuce. *Asian J. Plant Sci.* **2007**, 6, 550–553.
- Bottex, B.; Lou, J.; Dorne, C.M.; Carlander, D.; Benford, D.; Hildegard. Risk/benefit health assessment of food - Food fortification and nitrate in vegetables. *Trends in Food Science & Technology.* **2008**, 19, S113-S119.
- Bouga, M.; Combet, E. Emergence of seaweed and seaweed-containing foods in the UK: Focus on labeling, iodine content, toxicity and nutrition. *Proc. Nutr. Soc.* **2015**, 74.
- Bozlaker, A.; Prospero, J.M.; Fraser, M.P.; Chellam, S. Quantifying the Contribution of Long-Range Saharan Dust Transport on Particulate Matter Concentrations in Houston, Texas, Using Detailed Elemental Analysis. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, 47, 10179–10187, doi:10.1021/ES4015663.
- Brambilla, G.; Martelli, A. Genotoxic and carcinogenic risk to humans of drug-nitrite interaction products. *Mutagenesis Research.* **2007**, 635, 17-52.
- Brkic, D., Bosnir, J., Bevardi, M., Boskovic, A.G., Milos, S., Lasic, D., Krivohlavek, A., Racz, A., Cuic, A.M., Trstenjak, N.U., **2017**. Nitrate in leafy green vegetables and estimated intake. *Afr. J. Tradit., Complementary Altern. Med.* 14, 31–41.
- Brzóska MM, Moniuszko-Jakoniuk J. Interactions between cadmium and zinc in the organism. *Food Chem Toxicol.* **2001** Oct; 39(10):967-80. doi: 10.1016/s0278-6915(01)00048-5. PMID: 11524135.

8. Referencias Bibliográficas

Cabrera-Rodríguez, R.; Luzardo, O.P.; Almeida-González, M.; Boada, L.D.; Zumbado, M.; Henríquez-Hernández, L.A. Database of persistent organic pollutants in umbilical cord blood: Concentration of organochlorine pesticides, PCBs, BDEs and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Data Br.* **2020**, *28*, doi: 10.1016/j.dib.2019.104918.

Carocci, A.; Rovito, N.; Sinicropi, M.S.; Genchi, G. Mercury toxicity and neurodegenerative effects. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **2014**, 1–18.

Cavaiuolo, M., Ferrante, A., **2014**. Nitrates and glucosinolates as strong determinants of the nutritional quality in rocket leafy salads. *Nutrients* *6*, 1519–1538.

Chakraborty, S.; Bhattacharya, T.; Singh, G.; Maity, J.P. Benthic macroalgae as biological indicators of heavy metal pollution in the marine environments: A biomonitoring approach for pollution assessment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2014**, *100*, 61–68.

Chen Y, Liu YT, Wang FH, Wen D, Yang H, Zhao XL. An Investigation of Toxic Metal Levels (Pb, Cd, Cr, As, Hg) in Dried Porphyra and Laminaria Collected from Coastal Cities, China. *Biol Trace Elem Res.* 2021. Oct;199(10):3987-3997. doi: 10.1007/s12011-020-02509-w. Epub **2021** Jan 6. PMID: 33405084.

Colla, G., Kim, H.-J., Kyriacou, M.C., Roupheal, Y., **2018**. Nitrate in fruits and vegetables. *Sci. Hortic.* *237*, 221–238.

Coni E, Baldini M, Stacchini P, Zanasi F. Cadmium intake with diet in Italy: a pilot study. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis.* **1992** Sep;6(3):175-81. PMID: 1483036.

Cunningham, E., **2013**. Dietary nitrates and nitrites-harmful? Helpful? Or paradox? *J. Acad. Nutr. Diet.* *113*, 1268.

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

De Temmerman, L.; Waegeneers, N.; Claeys, N.; Roekens, E. Comparison of concentrations of mercury in ambient air to its accumulation by leafy vegetables: An important step in terrestrial food chain analysis. *Environ. Pollut.* **2009**, *157*, 1337–1341, doi: 10.1016/J.ENVPOL. 2008.11.035.

Diaz-Diaz, R.; Loague, K. Assessing the potential for pesticide leaching for the pine forest areas of Tenerife. *Environ. Toxicol. Chem.* **2001**, *20*, 1958–1967,

8. Referencias Bibliográficas

doi:10.1002/ETC.5620200914.

Di Noia, J., **2014**. Defining powerhouse fruits and vegetables: a nutrient density approach. *Prev. Chronic Dis.* 11, E95.

Directiva 2008/50/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de mayo de 2008, relativa a la calidad del aire ambiente y una atmósfera más limpia en Europa.

Durazzo, A., Azzini, E., Lazz`e, M.C., Raguzzini, A., Pizzala, R., Maiani, G., **2013**. Italian Wild Rocket [*Diplotaxis Tenuifolia* (L.) DC.]. Influence of agricultural practices on antioxidant molecules and on cytotoxicity and antiproliferative effects. *Agriculture* 3, 285–298

EFSA, **2006**. Scientific Committee on Food Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies TOLERABLE UPPER INTAKE LEVELS FOR VITAMINS AND MINERALS European Food Safety Authority.

EFSA, **2008a**. Nitrate in vegetables - scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. *The EFSA Journal* 689, 1–79.

EFSA, **2008b**. Polycyclic aromatic hydrocarbons in food. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. *The EFSA Journal* 724, 1–114.

EFSA **2009** (European Food Safety Authority). Cadmium in food-Scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *EFSA J.* 980, 1–139.

EFSA, **2010a**. Management of left-censored data in dietary exposure assessment of chemical substances. *EFSA journal* 8, 1–96.

EFSA, **2010b**. Statement on possible public health risks for infants and young children from the presence of nitrates in leafy vegetables. *The EFSA Journal* 8, 1935.

EFSA, **2010** (European Food Safety Authority). Scientific opinion on lead in food. EFSA Panel on Contaminants in the foodchain (CONTAM). *EFSA J.* 8, 1570.

EFSA, **2011** (European Food Safety Authority). Statement on the Evaluation on a New Study Related to the bioavailability of aluminium in food. *EFSA J.* 9:2157.

EFSA, **2012** (European Food Safety Authority). Cadmium dietary exposure in the European population. *EFSA J.* 10 (1):2551.

8. Referencias Bibliográficas

EFSA, **2012** (European Food Safety Authority). Scientific Opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food. *EFSA J.* 10, 2985.

EFSA, **2014** (European Food Safety Authority). Scientific Opinion on health benefits of seafood (fish and shellfish) consumption in relation to health risks associated with exposure to methylmercury. *EFSA J.* 12 (7):3761.

EFSA, **2015** (European Food Safety Authority). Statement on the benefits of fish/seafood consumption compared to the risks of methylmercury in fish/seafood. *EFSA J.* 13:3982.

EFSA, **2016**. Scientific Opinion on principles for deriving and applying Dietary Reference Values. *EFSA J.* 8, doi:10.2903/J. EFSA.2010.1458.

EFSA, **2017** (European Food Safety Authority). Re-evaluation of potassium nitrite (E249) and sodium nitrite (E250) as food additives. *EFSA J.* 15, 4786.

EFSA, **2017** (European Food Safety Authority). Re-evaluation of sodium nitrate (E251) and potassium nitrate (E252) as food additives. *EFSA J.* 15, 4787.

EFSA, **2020**. Review of Potentially Toxic Rare Earth Elements, Thallium and Tellurium in Plant-based Foods. *EFSA J.* 2020 Nov 26;18 (Suppl 1): e181101. doi: 10.2903/J.efsa.2020.e181101. PMID: 33294040; PMCID: PMC7691615.

EFSA (European Food Safety Authority), Arcella, D, Cascio, C and Gómez Ruiz, JÁ, **2021**. Scientific report on the chronic dietary exposure to inorganic arsenic. *EFSA Journal* 2021;19(1):6380, 50 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6380>

EFSA, **2021**. Valores nutricionales de referencia | European Food Safety Authority Available online: <https://www.efsa.europa.eu/es/topics/topic/dietary-reference-values> (accessed on Aug 27, **2021**).

Ellen G, van Loon JW, Tolsma K. Heavy metals in vegetables grown in The Netherlands and in domestic and imported fruits. *Z Lebensm Unters Forsch.* **1990** Jan;190(1):34-9. doi: 10.1007/BF01188261. PMID: 2301199.

EPA “IRIS Assements | IRIS | US EPA” Available online: https://iris.epa.gov/AtoZ/?list_type=alpha (accessed on Aug 27, 2021).

8. Referencias Bibliográficas

FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. The global status of seaweed production, trade and utilization. Globefish Res Program 124:120.

FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. FAO. <http://www.fao.org>. (acceso 19 de Marzo de **2020**).

Fernando Guerra, Anderson Ricardo Trevizam, Takashi Muraoka, Nericlemes Chaves Marcante, Solange Guidolin Canniatti-Brazaca. Heavy metals in vegetables and potencial risk for human health. *Scientia Agricola*. June 01, **2011**.

Fytianos, K., Zarogiannis, P., **1999**. Nitrate and nitrite accumulation in fresh vegetables from Greece. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 62, 187–192.

Gangolli, S.D.; Van den Brandt, P.A.; Feron, V.J.; Janzowsky, C.; Koeman, J.H.; Speijers, G.J.; Spiegelhalder, B.; Walker, R.; Wisnok, JS. Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. *Eur J Pharmacol.* **1994**, 292, 1-38.

Ghasemidehkordi, B.; Malekirad, A.A.; Nazem, H.; Fazilati, M.; Salavati, H.; Shariatifar, N.; Rezaei, M.; Fakhri, Y.; Mousavi Khaneghah, A. Concentration of lead and mercury in collected vegetables and herbs from Markazi province, Iran: a non-carcinogenic risk assessment. *Food Chem. Toxicol.* **2018**, 113, 204–210, doi: 10.1016/J.FCT.2018.01.048.

González-Antuña, A.; Camacho, M.; Henríquez-Hernández, L.A.; Boada, L.D.; Almeida-González, M.; Zumbado, M.; Luzardo, O.P. Simultaneous quantification of 49 elements associated to e-waste in human blood by ICP-MS for routine analysis. *MethodsX* **2017**, 4, doi: 10.1016/j.mex.2017.10.001.

Gorenjak, A.H., Cencic, A., **2012**. Nitrate in vegetables and their impact on human health. A review. *Acta Alimen.* 42.

Greenwood, D.J., Neeteson, J.J., Draycott, A., **1986**. Quantitative relationships for the dependence of growth rate of arable crops on their nitrogen content, dry weight and aerial environment. *Plant Soil* 91, 281–301.

Guadagnin, S.G., Rath, S., Reyes, F.G., **2005**. Evaluation of the nitrate content in leaf vegetables produced through different agricultural systems. *Food Addit. Contam.* 22, 1203–1208.

8. Referencias Bibliográficas

Gupta, N.; Yadav, K.K.; Kumar, V.; Kumar, S.; Chadd, R.P.; Kumar, A. Trace elements in soil-vegetables interface: Translocation, bioaccumulation, toxicity and amelioration - A review. *Sci. Total Environ.* **2019**, *651*, 2927–2942, doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2018.10.047.

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

Hakeem, K.R., Sabir, M., Ozturk, M., Akhtar, M.S., Ibrahim, F.H., **2017**. Nitrate and nitrogen oxides: sources, health effects and their remediation. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* *242*, 183–217.

Hardisson, A.; Revert, C.; González-Weller, D.; Gutiérrez, A.J.; Paz, S.; Rubio, C.. Aluminium exposure through the diet. *J. Food Sci Nutr* **2017**,*3*:019.

Henríquez-Hernández, L.A.; Boada, L.D.; Carranza, C.; Pérez-Arellano, J.L.; González-Antuña, A.; Camacho, M.; Almeida-González, M.; Zumbado, M.; Luzardo, O.P. Blood levels of toxic metals and rare earth elements commonly found in e-waste may exert subtle effects on hemoglobin concentration in sub-Saharan immigrants. *Environ. Int.* **2017**, *109*, doi: 10.1016/j.envint.2017.08.023.

Henríquez-Hernández, L.A.; González-Antuña, A.; Boada, L.D.; Carranza, C.; Pérez-Arellano, J.L.; Almeida-González, M.; Camacho, M.; Zumbado, M.; Fernández-Fuertes, F.; Tapia-Martín, M.; et al. Pattern of blood concentrations of 47 elements in two populations from the same geographical area but with different geological origin and lifestyles: Canary Islands (Spain) vs. Morocco. *Sci. Total Environ.* **2018**, *636*, doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.04.311.

Henríquez-Hernández, L.A.; Romero, D.; González-Antuña, A.; Gonzalez-Alzaga, B.; Zumbado, M.; Boada, L.D.; Hernández, A.F.; López-Flores, I.; Luzardo, O.P.; Lacasaña, M. Biomonitoring of 45 inorganic elements measured in plasma from Spanish subjects: A cross-sectional study in Andalusian population. *Sci. Total Environ.* **2020**, *706*, 135750, doi:10.1016/J.SCITOTENV.2019.135750.

Herrera, E. Bioquímica. Aspectos estructurales y vías metabólicas, Segunda.,Vol. I. Mc Graw-Hill: Madrid, **1996**.

8. Referencias Bibliográficas

Hobbs, D.A., George, T.W., Lovegrove, J.A., **2013**. The effects of dietary nitrate on blood pressure and endothelial function: a review of human intervention studies. *Nutr. Res. Rev.* 26, 210–222.

Hord, N.G., Tang, Y., Bryan, N.S., **2009**. Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits. *Am. J. Clin. Nutr.* 90, 1–10.

Huang, Y.; He, C.; Shen, C.; Guo, J.; Mubeen, S.; Yuan, J.; Yang, Z. Toxicity of cadmium and its health risks from leafy vegetable consumption. *Food Funct.* **2017**, 8, 1373–1401, doi:10.1039/C6FO01580H.

Hui, L.; Fu, Y.; Yu, J.; Hong, L. Accumulation and Primary Metabolism of Nitrate in Lettuce (*Lactuca Sativa* L. Var. Youmaicai) Grown Under Three Different Light Sources. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*; Philadelphia. **2016**, Tomo 47, No. 17, 1994-2002.

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

IARC, **1987**. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk to Humans. Vol 1-42. ISBN-13. Arsenic and Arsenic compounds (Group 1).

IARC, **1978**. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Some N-Nitroso Compounds. World Health Organization, Lyon, pp. 1–350. Available at: http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol1-42/mon_o17.pdf.

IARC, **2006**. International Agency for Research on Cancer. Inorganic and Organic Lead Compounds. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 87

IARC, **2010**. Ingested nitrate and nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. IARC (Int. Agency Res. Cancer) Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 94, 1–464.

IARC, **2020**. International Agency for Research on Cancer. Agents classified by the IARC monographs. Volumens 1-125.

I, R.-P.; S, G.; J, S.-M.; F, L.; E, G.-C.; R, R.; F, F.-P. An insight into the mechanisms of nanoceria toxicity in aquatic photosynthetic organisms. *Aquat. Toxicol.* **2012**, 122–123, 133–143, doi:10.1016/J.AQUATOX.2012.06.005

8. Referencias Bibliográficas

Jackson, J., Patterson, A.J., MacDonald-Wicks, L., McEvoy, M., **2017**. The role of inorganic nitrate and nitrite in CVD. *Nutr. Res. Rev.* 30, 247–264.

JECFA, **1998**. Joint FAO/WHO expert committee on food additives. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. In: WHO Food Additives Series 40. World Health Organization.

JECFA, **2002**. Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios. JECFA. Nitrate and nitrite. Evaluation of Certain Food Additives. Fifty-ninth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Technical Report. Series 913. TRS 913.

Jenkins, W.; Perone, P.; Walker, K.; Bhagavathula, N.; Aslam, M.N.; DaSilva, M.; Dame, M.K.; Varani, J. Fibroblast Response to Lanthanoid Metal Ion Stimulation: Potential Contribution to Fibrotic Tissue Injury. *Biol. Trace Elem. Res.* **2011**, 144, 621, doi:10.1007/S12011-011-9041-X.

Jiang, D.G.; Yang, J.; Zhang, S.; Yang, D.J. A Survey of 16 Rare Earth Elements in the Major Foods in China. *Biomed. Environ. Sci.* **2012**, 25, 267–271, doi:10.3967/0895-3988.2012.03.003.

Jones, A.M., Thompson, C., Wylie, L.J., Vanhatalo, A., **2018**. Dietary nitrate and physical performance. *Annu. Rev. Nutr.* 38, 303–328.

Karwowska, M.; Kononiuk, A. Nitrates/Nitrites in Food—Risk for Nitrosative Stress and Benefits. *Antioxidants* **2020**, 9, 241. *Appl. Sci.* 2021, 11, 6934 11 of 12

Khalifi, S., Rahimipour, A., Jeddi, S., Ghanbari, M., Kazerouni, F., Ghasemi, A., **2015**. Dietary nitrate improves glucose tolerance and lipid profile in an animal model of hyperglycemia. *Nitric Oxide* 44, 24–30.

Kmecl, V., Znidarcic, D., Franic, M., Ban, S.G., **2019**. Nitrate and nitrite contamination of vegetables in the Slovenian market. *Food Addit. Contam. Part B Surveill* 12, 216–223.

Knobeloch, L.; Salna, B.; Hogan, A.; Postle, J.; Anderson, H. Blue babies and nitrate-contaminated well water. *Environ Health Perspect.* **2000**, 108, 675–678 .

Kobayashi, J., Ohtake, K., Uchida, H., **2015**. NO-rich diet for lifestyle-related diseases. *Nutrients* 7, 4911–4937.

8. Referencias Bibliográficas

Koh, E., Charoenprasert, S., Mitchell, A.E., **2012**. Effect of organic and conventional cropping systems on ascorbic acid, vitamin C, flavonoids, nitrate, and oxalate in 27 varieties of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *J. Agric. Food Chem.* 60, 3144–3150.

Kolmogorov. Sulla determinazione empirica di una legge di distribuzione. *G. Ist. Ital. Attuari.* 4, **1933**, 83–91.

Kumar, A.; Cabral-Pinto, M.M.S.; Chaturvedi, A.K.; Shabnam, A.A.; Subrahmanyam, G.; Mondal, R.; Gupta, D.K.; Malyan, S.K.; Kumar, S.S.; Khan, S.A.; et al. Lead Toxicity: Health Hazards, Influence on Food Chain, and Sustainable Remediation Approaches. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, 17, 2179.

Kyriacou, M.C., Soteriou, G.A., Colla, G., Roupheal, Y., **2019**. The occurrence of nitrate and nitrite in Mediterranean fresh salad vegetables and its modulation by preharvest practices and postharvest conditions. *Food Chem.* 285, 468–477.

Lembrechts, J.J., Aalto, J., Ashcroft, M.B., De Frenne, P., Kopecky, M., Lenoir, J., Luoto, M., Maclean, I.M.D., Roupsard, O., Fuentes-Lillo, E., Garcia, R.A., Pellissier, L., Pitteloud, C., Alatalo, J.M., Smith, S.W., Bjork, R.G., Muffler, L., Cesarz, S., Gottschall, F., Backes, A.R., Okello, J., Urban, J., Plichta, R., Svatek, M., Phartyal, S.S., Wipf, S., Eisenhauer, N., Puscas, M., Dan Turtureanu, P., Varlagin, A., Dimarco, R.D., Jump, A.S., Randall, K., Dorrepaal, E., Larson, K., Walz, J., Vitale, L., Svoboda, M., Finger Higgens, R., Halbritter, A.H., Curasi, S.R., Klupar, I., Koontz, A., Pearse, W.D., Simpson, E., Stemkovski, M., Graae, B.J., Vedel Sorensen, M., Hoyer, T. T., Fernandez Calzado, M.R., Lorite, J., Carbognani, M., Tomaselli, M., Forte, T.G.W., Petraglia, A., Haesen, S., Somers, B., Van Meerbeek, K., Bjorkman, M.P., Hylander, K., Merinero, S., Gharun, M., Buchmann, N., Dolezal, J., Matula, R., Thomas, A.D., Bailey, J.J., Ghosn, D., Kazakis, G., de Pablo, M.A., Kemppinen, J., Niittynen, P., Rew, L., Seipel, T., Larson, C., Speed, J.D.M., Ardo, J., Cannone, N., Guglielmin, M., Malfasi, F., Bader, M.Y., Canessa, R., Stanisci, A., Kreyling, J., Schmeddes, J., Teuber, L., Aschero, V., Ciliak, M., Malis, F., De Smedt, P., Govaert, S., Meeussen, C., Vangansbeke, P., Gigauri, K., Lamprecht, A., Pauli, H., Steinbauer, K., Winkler, M., Ueyama, M., Nunez, M.A., Ursu, T.M., Haider, S., Wedegartner, R.E.M., Smiljanic, M., Trouillier, M., Wilmking, M., Altman, J., Bruna, J., Hederova, L., Macek, M., Man, M., Wild, J., Vittoz, P., Partel, M., Barancok, P., Kanka, R., Kollar, J., Palaj, A., Barros, A., Mazzolari, A.C., Bauters, M., Boeckx, P., Benito Alonso, J.L., Zong, S., Di Cecco, V., Sitkova, Z., Tielborger, K., van den Brink, L., Weigel, R., Homeier, J., Dahlberg, C.J., Medinets, S., Medinets, V., De Boeck, H.J., Portillo-Estrada, M., Verryck, L.T., Milbau, A., Daskalova, G.N., Thomas, H.J.D., Myers-Smith,

8. Referencias Bibliográficas

I.H., Blonder, B., Stephan, J.G., Descombes, P., Zellweger, F., Frei, E.R., Heinesch, B., Andrews, C., Dick, J., Siebicke, L., Rocha, A., Senior, R.A., Rixen, C., Jimenez, J.J., Boike, J., Pauchard, A., Scholten, T., Scheffers, B., Klings, D., Basham, E.W., Zhang, J., Zhang, Z., Geron, C., Fazlioglu, F., Candan, O., Sallo Bravo, J., Hrbacek, F., Laska, K., Cremonese, E., Haase, P., Moyano, F.E., Rossi, C., Nijs, I., **2020**. SoilTemp: a global database of near-surface temperature. *Global Change Biol.* <https://doi.org/10.1111/gcb.15123>.

León, V.M.; Luzardo, O.P. Evaluation of nitrate contents in regulated and non-regulated leafy vegetables of high consumption in the Canary Islands, Spain: Risk assessment. *Food Chem. Toxicol.* **2020**, 146, 111812.

Li, H., Zhang, Y., **2020**. Abnormal ratio of nitrate to ammonium nitrogen fertilizers in China. *J. Agric. Food Chem.* 68, 701–702.

Li, S.; Li, J.; Zhang, B.; Li, D.; Li, G.; Li, Y. Effect of different organic fertilizers application on growth and environmental risk of nitrate under a vegetable field. *Sci Rep.* **2017**, 7(1),17020.

Lima, G.P., Teixeira da Silva, J.A., Bernhard, A.B., Pirozzi, D.C., Fleuri, L.F., Vianello, F., **2012**. Organic and conventional fertilisation procedures on the nitrate, antioxidants and pesticide content in parts of vegetables. *Food Addit. Contam. Part B Surveill* 5, 188–193.

Liu, D.; Zhang, J.; Wang, G.; Liu, X.; Wang, S.; Yang, M. The Dual-Effects of LaCl₃ on the Proliferation, Osteogenic Differentiation, and Mineralization of MC3T3-E1 Cells. *Biol. Trace Elem. Res.* 2012 1501 **2012**, 150, 433–440, doi:10.1007/S12011-012-9486-6.

Liu J, Luo X, Wang J, Xiao T, Chen D, Sheng G, Yin M, Lippold H, Wang C, Chen Y. Thallium contamination in arable soils and vegetables around a steel plant-A newly-found significant source of Tl pollution in South China. *Environ Pollut.* 2017 May; 224:445-453. doi: 10.1016/j.envpol.2017.02.025. Epub **2017** Feb 21. PMID: 28233568.

Li X, Chen Z, Chen Z, Zhang Y. A human health risk assessment of rare earth elements in soil and vegetables from a mining area in Fujian Province, Southeast China. *Chemosphere.* **2013** Oct; 93(6):1240-6. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.06.085. Epub 2013 Jul 25. PMID: 23891580.

8. Referencias Bibliográficas

- Lovegrove, J.A., Stainer, A., Hobbs, D.A., **2017**. Role of flavonoids and nitrates in cardiovascular health. *Proc. Nutr. Soc.* 1–13.
- Lundberg, J.O.; Weitzberg, E.; Gladwin, M.T. The nitrate nitrite nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, **2008**, 7, 156-167.
- Lyons, D.J., Rayment, G.E., Nobbs, P.E., McCallum, L.E., **1994**. Nitrate and nitrite in fresh vegetables from queensland. *J. Sci. Food Agric.* 64, 279–28.
- MacArtain, P.; Gill, C.I.; Brooks, M.; Campbell, R.; Rowland, I.R. Nutritional Value of Edible Seaweeds. *Nutr. Rev.* **2008**, 65, 535–543.
- Magee, P.N.; Barnes, J.M. Some toxic properties of dimethylnitrosamine. *Br J Ind Med.* **1954**, 11, 167-174.
- Martí-Cid R, Perelló G, Domingo JL. Dietary exposure to metals by individuals living near a hazardous waste incinerator in Catalonia, Spain: temporal trend. *Biol Trace Elem Res.* **2009** Dec;131(3):245-54. doi: 10.1007/s12011-009-8368-z. Epub 2009 Apr 28. PMID: 19399373.
- Matallana, M.C.; Martínez-Tomé, M.J.; Torija, M.E. Nitrate and nitrite content in organically cultivated vegetables. *Food Additives Contaminants: Part B. Vol. 3. No.1.*
- Maynard, D.N., Barker, A.V., Minotti, P.L., Peck, N.H., **1976**. Nitrate accumulation in vegetables. *Adv. Agron.* 28, 71–118.
- McBride, M.B.; Shayler, H.A.; Spliethoff, H.M.; Mitchell, R.G.; Marquez-Bravo, L.G.; Ferenz, G.S.; Russell-Anelli, J.M.; Casey, L.; Bachman, S. Concentrations of lead, cadmium and barium in urban garden-grown vegetables: The impact of soil variables. *Environ. Pollut.* **2014**, 194, 254–261, doi: 10.1016/J.ENVPOL.2014.07.036.
- McBride, M.B.; Simon, T.; Tam, G.; Wharton, S. Lead and Arsenic Uptake by Leafy Vegetables Grown on Contaminated Soils: Effects of Mineral and Organic Amendments. *Water. Air. Soil Pollut.* **2013**, 224, 607–255, doi:10.1007/S11270-012-1378-Z.
- McHugh, D. A Guide to the Seaweed Industry; FAO, Fisheries and Aquaculture Department: Rome, Italy, **2003**.

8. Referencias Bibliográficas

McNamara, C., Naddy, B., Rohan, D., Sexton, J., **2003**. Design, development and validation of software for modelling dietary exposure to food chemicals and nutrients. *Food Addit. Contam.* 20 (Suppl. 1), S8–S26.

Meamarbashi, A., Alipour, M., **2014**. Moderate dose of watercress and red radish does not reduce oxygen consumption during graded exhaustive exercise. *Avicenna J Phytomed* 4, 267–272.

Meng, F., Qiao, Y., Wu, W., Smith, P., Scott, S., **2017**. Environmental impacts and production performances of organic agriculture in China: a monetary valuation. *J. Environ. Manag.* 188, 49–57.

Merino, L., Darnerud, P.O., Edberg, U., Aman, P., Castillo, M.D., **2006**. Levels of nitrate in Swedish lettuce and spinach over the past 10 years. *Food Addit. Contam.* 23, 1283–1289.

Moulis, J.-M.; Thévenod, F. New perspectives in cadmium toxicity: An introduction. *BioMetals* **2010**, 23, 763–768. 119.

Nordberg, M.; Friberg, L. *Handbook on the Toxicology of Metals*, 3rd ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, **2007**.

Nunez de Gonzalez, M.T., Osburn, W.N., Hardin, M.D., Longnecker, M., Garg, H.K., Bryan, N.S., Keeton, J.T., **2015**. A survey of nitrate and nitrite concentrations in conventional and organic-labeled raw vegetables at retail. *J. Food Sci.* 80, C942–C949.

Organic Monitor. *The Organic Market of Sea Vegetables, Final Report*; Organic Monitor: London, UK, **2014**; pp. 1–36.

Pagano, G.; Guida, M.; Tommasi, F.; Oral, R. Health effects and toxicity mechanisms of rare earth elements—Knowledge gaps and research prospects. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2015**, 115, 40–48, doi: 10.1016/J.ECOENV.2015.01.030.

Paz, S.; Rubio, C.; Frías, I.; Gutiérrez, J.; González-Weller, D.; Martín, V.; Revert, C.; Hardisson, A. Toxic metals (Al, Cd, Pb and Hg) in the most consumed edible seaweeds in Europe. *Chemosphere* **2019**, 218, 879–884.

Platel, K.; Srinivasan, K. Bioavailability of Micronutrients from Plant Foods: An Update. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.781011> **2016**, 56, 1608–1619, doi:10.1080/10408398.2013.781011.

8. Referencias Bibliográficas

Pussemier, L.; Larondelle, Y.; Van Peteghem, C.; Huyghebaert, A.; Chemical Safety of conventionally and organically. *Food Control*. **2006**, *17*, 14-21.

Qasemi, M.; Farhang, M.; Biglari, H.; Afsharnia, M.; Ojrati, A.; Khani, F.; Samiee, M.; Zarei, A. Health risk assessments due to nitrate levels in drinking water in villages of Azadshahr, northeastern Iran. *Environ. Earth Sci.* **2018**, *77*, 782.

Quijano, L., Yusa, V., Font, G., McAllister, C., Torres, C., Pardo, O., **2017**. Risk assessment and monitoring programme of nitrates through vegetables in the Region of Valencia (Spain). *Food Chem. Toxicol.* *100*, 42–49.

Radwan, M.A.; Salama, A.K. Market basket survey for some heavy metals in Egyptian fruits and vegetables. *Food Chem. Toxicol.* **2006**, *44*, 1273–1278, doi: 10.1016/J.FCT.2006.02.004.

Rajaram, R.; Rameshkumar, S.; Anandkumar, A. Health risk assessment and potentiality of green seaweeds on bioaccumulation of trace elements along the Palk Bay coast, Southeastern India. *Mar. Pollut. Bull.* **2020**, *154*, 111069.

Ramms, B., Gordts, P.L., **2016**. Dietary nitrate struggles in atherosclerosis. *Atherosclerosis* *245*, 71–73.

Real Decreto 3/2023, de 10 de enero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano, su control y suministro.

Recomendación (UE) 2014/193 de la Comisión, de 4 de abril de **2014**, sobre la reducción de la presencia de cadmio en los productos alimenticios.

Recomendación (UE) 2018/464 de la Comisión, de 19 de marzo de **2018**, relativa al control de metales y yodo en las algas marinas, las plantas halófilas y los productos a base de algas marinas.

Reglamento (CE) nº 1882/2006 de la Comisión de 19 de diciembre de **2006** por el que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de nitratos en ciertos productos alimenticios.

Reglamento (CE) 333/2007 de la Comisión de 28 de marzo de **2007**, por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los niveles de plomo, cadmio, mercurio, estaño inorgánico, 3-MCPD y benzo (a) pireno en los productos alimenticios.

8. Referencias Bibliográficas

Reglamento (UE) 915/2023 de la Comisión de 25 de abril de **2023** relativo a los límites máximos de determinados contaminantes en los alimentos y por el que se deroga el Reglamento (CE) nº 1881/2006 de la Comisión de 19 de diciembre de 2006.

Rehman, Z.U.; Khan, S.; Brusseau, M.L.; Shah, M.T. Lead and cadmium contamination and exposure risk assessment via consumption of vegetables grown in agricultural soils of five-selected regions of Pakistan. *Chemosphere* **2017**, *168*, 1589–1596, doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2016.11.152.

Remoundaki, E.; Bourliva, A.; Kokkalis, P.; Mamouri, R.E.; Papayannis, A.; Grigoratos, T.; Samara, C.; Tsezos, M. PM10 composition during an intense Saharan dust transport event over Athens (Greece). *Sci. Total Environ.* **2011**, *409*, 4361–4372, doi:10.1016/J.SCITOTENV.2011.06.026.

Rico, C.M.; Morales, M.I.; McCreary, R.; Castillo-Michel, H.; Barrios, A.C.; Hong, J.; Tafuya, A.; Lee, W.-Y.; Varela-Ramirez, A.; Peralta-Videa, J.R.; et al. Cerium Oxide Nanoparticles Modify the Antioxidative Stress Enzyme Activities and Macromolecule Composition in Rice Seedlings. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 14110–14118, doi:10.1021/ES4033887.

Rubio-Armendáriz C, Paz S, Gutiérrez AJ, Gomes Furtado V, González-Weller D, Revert C, Hardisson A. Toxic Metals in Cereals in Cape Verde: Risk Assessment Evaluation. *Int J Environ Res Public Health.* **2021** Apr 6;18 (7):3833.

Rubio, C.; Dominik-Jakubier, M.; Gutiérrez, A.J.; Paz, S.; González-Weller, D.; Hardisson, A. Dietary exposure to trace elements (B, Ba, Li, Ni, Sr, and V) and toxic metals (Al, Cd, and Pb) from the consumption of commercial preparations of *Spirulina platensis*. *Env. Science and Pollution Research* **2021**, *28*:22146-22155.

Rubio C, González-Iglesias T, Revert C, Reguera JI, Gutiérrez AJ, Hardisson A. Lead dietary intake in a Spanish population (Canary Islands). *J Agric Food Chem.* **2005** Aug 10;53(16):6543-9. doi: 10.1021/jf058027v. PMID: 16076147.

Rubio C, Gutiérrez A, Burgos A, Hardisson A. Total dietary intake of mercury in the Canary Islands, Spain. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* **2008** Aug;25(8):946-52. doi: 10.1080/02652030801993597. PMID: 18629690.

Rubio, C.; Gutiérrez, A.J.; Martín-Izquierdo, R.E.; Revert, C.; Lozano, G.; Hardisson, A. El plomo como contaminante alimentario. *Rev. Toxicol.* **2004**, *21*, 72–80.

8. Referencias Bibliográficas

Rubio, C.; Hardisson, A.; Reguera, J.; Revert, C.; Lafuente, M.; González-Iglesias, T. Cadmium dietary intake in the Canary Islands, Spain. *Environ. Res.* **2006**, 100, 123–129.

Salehipour, M.; Ghorbani, H.; Kheirabadi, H.; Afyuni, M. Health Risks from Heavy Metals via Consumption of Cereals and Vegetables in Isfahan Province, Iran. <http://dx.doi.org/10.1080/10807039.2014.1002292> **2015**, 21, 1920–1935, doi:10.1080/10807039.2014.1002292.

Salehzadeh, H., Maleki, A., Rezaee, R., Shahmoradi, B., Ponnet, K., **2020**. The nitrate content of fresh and cooked vegetables and their health-related risks. *PloS One* 15, e0227551.

Santamaria, P.; Antonio Elia, A.; Serio, F.; Todaro, E. A survey of nitrate and oxalate content in fresh vegetables. *J Sci Food Agric.* **1999**, 79, 1882-1888.

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

Satarug S, Haswell-Elkins MR, Moore MR. Safe levels of cadmium intake to prevent renal toxicity in human subjects. *Br J Nutr.* **2000** Dec;84(6):791-802. PMID: 11177195.

Schuphan, W. Nutritional value of crops as influenced by organic and inorganic fertilizer treatments. Results of 12 years' experiments with vegetables (1960-1972). *Qual. Plant Nutr. XXIII.* **1974**, 4, 333-358.

Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Food Contact Materials on a request from European commission on Safety of aluminium from dietary intake. *The EFSA Journal* (**2008**) 754, 1–34.

Scoop. Report of experts participating in Task 3.2.11. March**2004**. Assessment of the dietary exposure to arsenic, cadmium, lead and mercury of the population of the EU Member States.

Serra Majem, L., Armas Navarro, A., Ribas Barba, L., **2000**. [Food consumption and food sources of energy and nutrients in Canary Islands (1997-98)]. *Arch. Latinoam. Nutr.* 50, 23–33.

Shahlaei, A.; Ansari, N.A.; Dehkordie, F.S. Evaluation of nitrate and nitrite content of Iran southern (Ahwaz) vegetables during winter and spring of 2006. *Asian J Plant Sci.* **2007**, 6(8), 1197-1203.

8. Referencias Bibliográficas

Shi Z, Yong L, Liu Z, Wang Y, Sui H, Mao W, Zhang L, Li Y, Liu J, Wei S, Song Y. Risk assessment of rare earth elements in fruits and vegetables from mining areas in China. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2022 Jul;29(32):48694-48703. doi: 10.1007/s11356-022-19080-7. Epub **2022** Feb 23. PMID: 35195864.

Sobko, T., Marcus, C., Govoni, M., Kamiya, S., **2010**. Dietary nitrate in Japanese traditional foods lowers diastolic blood pressure in healthy volunteers. *Nitric Oxide* 22, 136–140.

Soni RA, Sudhakar K, Rana RS (**2017**) *Spirulina - From growth to nutritional product: A review*. *Trends Food Sci Technol* 69:157-171.

Tamme, T.; Reinik, M.; Roasto, M.; Meremäe, K.; Kiis, A. Nitrate in leafy vegetables, culinary herbs, and cucumber grown under cover in Estonia: content and intake. *Food Additives Contaminants. Part B*. **2010**, 3(2), 108-113.

Tang, L., Luo, W.J., He, Z.L., Gurajala, H.K., Hamid, Y., Khan, K.Y., Yang, X.E., **2018**. Variations in cadmium and nitrate co-accumulation among water spinach genotypes and implications for screening safe genotypes for human consumption. *J. Zhejiang Univ. - Sci. B* 19, 147–158.

Tegeder, M., Masclaux-Daubresse, C., **2018**. Source and sink mechanisms of nitrogen transport and use. *New Phytol*. 217, 35–53.

Temme, E., Huybrechts, I., Vandevijvere, S., De Henauw, S., Leveque, A., Kornitzer, M., De Backer, G., Van Oyen, H., **2010**. Energy and macronutrient intakes in Belgium: results from the first national food consumption survey. *Br. J. Nutr.* 103, 1823–1829.

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

Tchounwou, P.B.; Yedjou, C.G.; Patlolla, A.K.; Sutton, D.J. Heavy Metals Toxicity and the Environment. *EXS* **2012**, 101, 133, doi:10.1007/978-3-7643-8340-4_6.

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

US EPA. Cadmium (CASRN 7440-43-9). Integrated Risk Information System. Document

8. Referencias Bibliográficas

0141; U.S. Environmental Protection Agency: Washington, DC, USA, **1998**

Vahter M, Berglund M, Nermell B, Akesson A. Bioavailability of cadmium from shellfish and mixed diet in women. *Toxicol Appl Pharmacol.* **1996** Feb;136(2):332-41. doi: 10.1006/taap.1996.0040. PMID: 8619241.

Van Grinsven, H.J.; Ward, M.H.; Benjamin, N.; De Kok, T.M. Does the evidence about health risks associated with nitrate ingestion warrant an increase of the nitrate standard for drinking water?. *Environ Hlth: Glob Access Sci Source.* **2006**, 5(26). <http://www.ehjournal.net/content/5/1/26> (acceso 11 de enero de 2020).

Vernieri, P., Borghesi, E., Tognoni, F., Serra, G., Ferrante, A., Piaggese, A., **2006**. Use of biostimulants for reducing nutrient solution concentration in floating system. *Acta Hortic.* 718, 477–484.

Wada, O. What are Trace Elements? — Their deficiency and excess states —. *undefined* **2004**.

Wai, C.S; Jeff, C.H; Tran; Katherine, S.K.; Tong; Melva, Y.Y. Food Additives Ho and Constance H.Y. Chan. Nitrate and nitrite levels in commonly consumed vegetables in Hong Kong. *Contaminants: Part B: Surveillance.* **2011**, 4(1), 34-41.

Watson, R.R. Handbook of Fertility: Nutrition, Diet, Lifestyle and Reproductive Health. *Handb. Fertil. Nutr. Diet, Lifestyle Reprod. Heal.* **2015**, 1–435, doi:10.1016/C2013-0-19077-0.

Woese, K.; Lange, D.; Boess, C.; Bögl, K.W. A Comparison of Organically and Conventionally Grown Foods. Results of a Review of the Relevant Literature. *J Sci Food Agric.* **1997**, 74, 281-293.

Yang, B.; Gao, Y.; Zhang, C.; Zheng, X.; Li, B. Mercury accumulation and transformation of main leaf vegetable crops in Cambosol and Ferrosol soil in China. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2019** 27(1), 2019, 27, 391–398, doi:10.1007/S11356-019-06798-0.

Yang, T., Zhang, X.M., Tarnawski, L., Peleli, M., Zhuge, Z., Terrando, N., Harris, R.A., Olofsson, P.S., Larsson, E., Persson, A.E.G., Lundberg, J.O., Weitzberg, E., Carlstrom, M., **2017**. Dietary nitrate attenuates renal ischemia-reperfusion injuries by modulation of immune responses and reduction of oxidative stress. *Redox Biol* 13, 320–330.

8. Referencias Bibliográficas

Zand, J., Lanza, F., Garg, H.K., Bryan, N.S., **2011**. All-natural nitrite and nitrate containing dietary supplement promotes nitric oxide production and reduces triglycerides in humans. *Nutr. Res.* 31, 262–269.

Zava TT, Zava DT. Assessment of Japanese iodine intake based on seaweed consumption in Japan: A literature-bases analysis. *Thyroid Res.* **2011** Oct 5; 4:14.

Zhong, W., Hu, C., Wang, M., **2002**. Nitrate and nitrite in vegetables from north China: content and intake. *Food Addit. Contam.* 19, 1125–1129.

Zhuang, M.; Zhao, J.; Li, S.; Liu, D.; Wang, K.; Xiao, P.; Yu, L.; Jiang, Y.; Song, J.; Zhou, J.; et al. Concentrations and health risk assessment of rare earth elements in vegetables from mining area in Shandong, China. *Chemosphere* **2017**, *168*, 578–582, doi: 10.1016/J.CHEMOSPHERE.2016.11.023.

Huang, Xiao-Dong Pan, Ping-Gu Wu, Jian-Long Han, Qing Chen, Heavy metals in vegetables and the health risk to population in Zhejiang, China, *Food Control*, Volume 36, Issue 1, **2014**, Pages 248-252, ISSN 0956-7135, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.036>.

FOTO CONTRAPORTADA: Cultivo de Algas, obtenido del
www.nationalgeographic.com.es

