

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL (ETSIAMN)



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

EVALUACIÓN DE RIESGO ASOCIADO A LA PRESENCIA DE METALES Y METALOIDES EN SETAS

TRABAJO FIN DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS
ALIMENTOS

Autora: Teresa Latorre Carrascosa

Tutor: Dr. Rafael José Gavara Clemente

Cotutoras académicas: Dra. Vicenta Devesa Pérez y Dra. Dinoraz Vélez Pacios

Cotutora externa colaboradora: Gabriela de Matuoka e Chiocchetti

CURSO 2017-2018

Valencia, julio 2018

EVALUACIÓN DE RIESGO ASOCIADO A LA PRESENCIA DE METALES Y METALOIDES EN SETAS

Autora: Teresa Latorre Carrascosa

Tutor: Dr. Rafael José Gavara Clemente

Cotutoras académicas: Dra. Vicenta Devesa i Pérez y Dra. Dinoraz Vélez Pacios

Cotutora externa colaboradora: Gabriela de Matuoka e Chiocchetti

Valencia, julio 2018

RESUMEN

Las setas se consideran alimentos saludables, ya que la energía que aportan es relativamente baja y proporcionan proteínas de alto valor nutricional, minerales, vitaminas y una diversidad de compuestos funcionales. Algunas especies de setas, sin embargo, pueden acumular elementos traza tóxicos, especialmente cadmio (Cd), mercurio (Hg), plomo (Pb) y arsénico (As). Los datos sobre estos elementos se han obtenido en muestras frescas, tal y como se adquieren en el mercado o se recolectan. Sin embargo, se carecen de datos sobre setas deshidratadas, cuyo consumo se ha incrementado en la última década. Además las setas se consumen normalmente tras un cocinado, que altera la composición de la muestra; sin embargo se desconoce como afecta a los contenidos de elementos tóxicos. Por otro lado, hay que tener en cuenta que los carbohidratos son los componentes mayoritarios de este alimento y que en la pared celular la mayor parte son carbohidratos no digeribles, resistentes a los enzimas presentes en el tracto gastrointestinal humano. Este hecho plantea la cuestión de si realmente los elementos traza tóxicos existentes en esta matriz son extraídos durante el proceso de digestión y están disponibles para su absorción intestinal, es decir, si están bioaccesibles.

El objetivo del presente estudio es determinar los contenidos de Hg, Cd, Pb y As en setas deshidratadas comercializadas en España, determinar el efecto del cocinado y evaluar la bioaccesibilidad de estos elementos en el producto listo para consumo. El análisis de todos estos parámetros permitirá realizar una evaluación de riesgo más realista, al incluir en esta estimación todos aquellos factores que pueden influir en la cantidad del tóxico que llega finalmente a la circulación sistémica y ejerce su efecto tóxico.

Los resultados obtenidos muestran que los contenidos de Hg en *Amanita ponderosa*, *Boletus edulis*, *Marasmius oreades* y *Tricholoma georgii*, así como los contenidos de Cd en *Amanita caesarea* y *Tricholoma georgii* superan los límites legislados. Este hecho indica que para algunas especies de setas deshidratadas existen problemas de seguridad en lo que a estos metales pesados se refiere. El cocinado sólo reduce de forma relevante los contenidos de As en las muestras analizadas. Los contenidos de Hg, Cd y Pb presentan reducciones inferiores al 20%. Sin embargo, para estos tres elementos la cantidad bioaccesible es inferior al 40%.

Los datos *in vitro* muestran que tanto el cocinado (para el As) como la digestión gastrointestinal (para el Hg, Cd y Pb) reducen las cantidades que cabría esperar que llegaran a la circulación sistémica tras la ingesta, si se considerase sólo los contenidos del alimento crudo. La influencia de estos factores debería confirmarse *in vivo*, para así demostrar que, aunque algunas de estas setas presentan valores por encima de los límites legislados, tras su procesado y digestión, la cantidad del tóxico que alcanza la circulación sistémica puede no ser relevante.

Palabras clave: setas, arsénico, cadmio, mercurio, plomo, cocinado, bioaccesibilidad

RISK ASSESSMENT ASSOCIATED WITH THE PRESENCE OF METALS AND METALLOIDS IN MUSHROOMS.

Author: Teresa Latorre Carrascosa

Supervisor: Dr. Rafael José Gavara Clemente

Academic co-supervisors: Dra. Vicenta Devesa i Pérez y Dra. Dinoraz Vélez Pacios

External collaborator supervisor: Gabriela de Matuoka e Chiocchetti

Valencia, julio 2018

ABSTRACT

Mushrooms are considered healthy foods, since the energy they provide is relatively low and they contain proteins of high nutritional value, minerals, vitamins and a variety of functional compounds. Some species of mushrooms, however, can accumulate toxic trace elements, especially cadmium (Cd), mercury (Hg), lead (Pb) and arsenic (As). The data on these elements have been obtained in fresh samples, as they are acquired in the market or collected. However, there is a lack of data on dehydrated mushrooms, whose consumption has increased in the last decade. In addition, mushrooms are consumed normally after cooking, which alters the composition of the sample; however, it is not well known how it affects the contents of toxic elements. On the other hand, it must be taken into account that carbohydrates are the main components of this food product and that in the cell wall most of them are non-digestible carbohydrates, resistant to the enzymes present in the human gastrointestinal tract. This fact raises the question of whether the trace elements in this matrix are actually extracted during the digestion process and are available for intestinal absorption, that is, if they are bioaccessible.

The objective of this study is to determine the contents of Hg, Cd, Pb and in dehydrated mushrooms marketed in Spain, determine the effect of cooking and evaluate the bioaccessibility of these metals/metalloids in the product ready for consumption. The analysis of all these parameters will permit a more realistic risk assessment, by including in this estimation all those factors that can influence the amount of the toxic element that finally reaches the systemic circulation and exerts its toxic effect.

The results show that the contents of Hg in *Amanita ponderosa*, *Boletus edulis*, *Marasmius oreades* and *Tricholoma georgii*, as well as the contents of Cd in *Amanita caesarea* and *Tricholoma georgii* exceed the legislated limits. This fact indicates that for some species of dehydrated mushrooms there are safety problems as far as these heavy metals are concerned. The cooking process only reduces significantly the contents of As in the samples analyzed. The contents of Hg, Cd and Pb have reductions lower than 20%. However, for these three elements the bioaccessible fraction is less than 40%.

The *in vitro* data show that both cooking (for As) and gastrointestinal digestion (for Hg, Cd and Pb) reduce the quantities that would be expected to reach the systemic circulation after ingestion, if only the contents of raw food were considered. The influence of these factors should be confirmed *in vivo*, in order to demonstrate that, although some of these mushrooms have values above the legislated limits, after processing and digestion, the amount of toxic element that reaches the systemic circulation may not be relevant.

Keywords: mushrooms, arsenic, cadmium, mercury, lead, cooking, bioaccessibility

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, me gustaría dar las gracias a mis directoras de este trabajo, Dra. Vicenta Devesa Pérez y Dra. Dinoraz Vélez Pacios por haberme dado la oportunidad de realizar el trabajo de fin de grado con ellas, y por la confianza y la ayuda prestada durante todos estos meses. Pero sobre todo por lo que he aprendido con ellas.

Agradecer también al IATA (Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos) por haberme permitido usar sus instalaciones.

A Dr. Rafael José Gavara Clemente por haberme ayudado durante estos meses.

A mis compañeros de laboratorio Gabi, Adrián, Mabel, Paloma, Alessandra y Maleles por la compañía inmejorable durante estos meses, por la ayuda prestada y por hacer que cada día hubiera un motivo por el que reír. Ha sido un enorme placer conocerlos.

A mis amigos Carlos, Maleles y Arantxa por apoyarme en todo momento.

Y por último, a toda mi familia, que es maravillosa. Gracias a mis padres por enseñarme todo lo que sé y ser mi mayor apoyo siempre. A mi hermana, Trini, y a mis abuelos. Sin vosotros todo esto no habría sido posible.

Muchas gracias a todos.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVO	3
3. MATERIALES Y MÉTODOS	3
3.1. Muestras de setas	3
3.2. Método estático de digestión gastrointestinal in vitro para la estimación de la bioaccesibilidad	4
3.3. Determinación de mercurio	5
3.4. Determinación de cadmio y plomo	6
3.5. Determinación de arsénico	6
3.6. Análisis estadístico	7
4. RESULTADOS	7
4.1. Contenidos en muestras de setas deshidratadas crudas	7
4.2. Contenidos en muestras cocinadas. Efecto del cocinado	9
4.3. Bioaccesibilidad de mercurio, arsénico, cadmio y plomo en muestras crudas y cocinadas	12
4.3.1. Contenidos bioaccesibles. Efecto del cocinado sobre la bioaccesibilidad	12
4.3.2. Influencia de los diferentes parámetros de la digestión sobre la bioaccesibilidad	13
5. DISCUSIÓN	16
6. CONCLUSIONES	18
7. REFERENCIAS	19

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Muestras de setas analizadas	3
Tabla 2. Condiciones instrumentales de la cuantificación de mercurio mediante CV-AFS	5
Tabla 3. Programa de temperatura del horno de grafito para la determinación de cadmio y plomo por GF-AAS	6
Tabla 4. Condiciones instrumentales de la cuantificación de arsénico mediante HG-AFS	7
Tabla 5. Contenidos de mercurio, cadmio, arsénico y plomo en setas deshidratadas crudas	8
Tabla 6. Ingestas de mercurio, cadmio, arsénico y plomo vehiculadas por las setas cocinadas	12
Tabla 7. Bioaccesibilidad de mercurio, cadmio y arsénico en setas crudas y cocinadas	13

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del protocolo de digestión gastrointestinal simulada aplicado	4
Figura 2. Contenidos de mercurio en setas crudas y cocinadas	9
Figura 3. Contenidos de cadmio en setas crudas y cocinadas	10
Figura 4. Contenidos de arsénico en setas crudas y cocinadas	10
Figura 5. Contenidos de plomo en setas crudas y cocinadas	11
Figura 6. Influencia del pH gástrico (6A) e intestinal (7B) en la bioaccesibilidad de cadmio y mercurio en setas	14
Figura 7. Influencia de las fibras insolubles en la bioaccesibilidad de cadmio y mercurio en setas	15

1. INTRODUCCIÓN

Los hábitos alimentarios saludables están cada día más extendidos en la población; hecho que ha aumentado considerablemente el consumo de determinados productos. Las setas constituyen uno de estos alimentos. El Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA) indica en su informe del consumo de alimentación en España del año 2014, que los hogares españoles han aumentado progresivamente el consumo de setas y champiñones frescos; un 23% en 2012 y un 6.7% en el primer trimestre del 2013 (MAGRAMA, 2014). El consumo en España está próximo al de otros países europeos; por ejemplo, en Polonia se estima una ingesta media de 6.4 g/día (Falandysz et al., 2003). Aunque no existen datos de consumo de setas deshidratadas, diferentes documentos muestran una tendencia similar a la de las setas frescas. Según informa el Centro para la Promoción de las Importaciones desde países en vías de desarrollo (CBI), el consumo europeo aparente de setas deshidratadas aumentó de €158 millones en 2010 a €177 millones en 2014, siendo los países más consumidores Francia, Italia y Alemania (CBI, 2016).

Las setas se consideran alimentos saludables, ya que la energía que aportan es relativamente baja, alrededor de 360-419 kcal/kg, y sin embargo proporcionan proteínas de un valor nutricional mayor que el resto de plantas y además son importantes fuentes de minerales (Kalač, 2013) y compuestos de alto valor biológico como ácidos grasos poliinsaturados, compuestos fenólicos, tocoferoles, ácido ascórbico y carotenoides (Reis et al., 2012). Adicionalmente hay que mencionar que se trata de alimentos considerados importantes fuentes de fibra dietaria. Esa fibra está constituida principalmente por fibra insoluble (quitina y β -glucanos), siendo la cantidad de fibra soluble normalmente inferior al 10% de la materia seca. Son, por tanto, alimentos que presentan numerosos compuestos bioactivos, algunos de los cuales son antibacterianos, activadores del sistema inmune y reductores del colesterol, entre otras propiedades (Valverde et al., 2015). Según indican estudios previos, el secado que se aplica a las setas para la obtención del alimento deshidratado no supone pérdidas importantes del valor nutricional del alimento. Reid et al. (2016) muestran como este proceso concentra significativamente las cantidades de compuestos fenólicos, carbohidratos y proteínas, debido a la pérdida de humedad.

Algunas especies de setas, sin embargo, pueden acumular altas concentraciones de ciertos metales (mercurio, cadmio, plomo) y metaloides (arsénico). Atendiendo a los datos reportados en la bibliografía, en numerosas ocasiones las concentraciones de estos elementos exceden los límites establecidos, aunque las setas procedan de zonas no contaminadas (Falandysz y Borovička, 2013). El mercurio y el cadmio han sido posiblemente los elementos traza tóxicos más ampliamente investigados, debido a que en general son los que presentan unas concentraciones mayores. Los estudios realizados han permitido conocer que las setas actúan como bioacumuladores de estos elementos tóxicos desde el suelo, con factores de bioconcentración [seta/suelo] que llegan a alcanzar valores de 210 para el mercurio (Falandysz et al., 2014) y 1400 para el cadmio (Melgar et al., 2016) respectivamente.

Los contenidos de cadmio y mercurio son principalmente dependientes de la especie de seta y del tipo de cultivo. Los contenidos de ambos metales son considerablemente más bajos en los hongos cultivados que en las mismas especies silvestres. Este hecho no se debe sólo a la diferente composición del sustrato y su nivel de contaminación, sino también a la edad del micelio, que puede existir durante varios años en la naturaleza, mientras que sólo existe durante varios meses en una planta de cultivo. Estos elementos se acumulan en el sombrero, que presenta normalmente contenidos superiores a los encontrados en el pie de la seta (Falandysz, 2014). Entre las setas comestibles recolectadas en áreas no contaminadas, los géneros *Boletus*, *Macrolepiota*, *Agaricus* y *Lepista* son los que presentan mayores concentraciones de mercurio. Habitualmente superan 1 mg/kg peso seco (ps) y se han descrito valores que alcanzan 20 mg/kg peso fresco (pf) (Kalač y Svoboda, 2000). Los escasos estudios de especiación han puesto de manifiesto que la forma inorgánica de mercurio es la predominante en este tipo de alimento (Ruiz de Cenzano et al., 2016). El género *Agaricus* es también el que presenta las concentraciones más elevadas de cadmio. Svoboda et al. (2000) analizan 25 especies de setas, encontrado para la mayoría de estas muestras valores entre 0.5-5 mg/kg ps, excepto para las del género *Agaricus*, cuyas concentraciones oscilan entre 5-50 mg/kg ps. Las concentraciones de mercurio y cadmio se elevan en zonas contaminadas. Collin-Hanssen et al. (2002) reportan en muestras de *Boletus*

edulis procedentes de las inmediaciones de una fundición de zinc contenidos de cadmio de hasta 126 mg/kg ps. Las muestras de setas de la especie *Suillus grevillei* cultivadas en un área contaminada por la emisión de la minería y el procesamiento de minerales presentan contenidos de 53 mg de mercurio/kg ps (Árvay et al., 2014).

La evaluación de los contenidos de arsénico en setas no ha sido tan extensa. El valor más alto (224 mg/kg ps) ha sido hallado en *Laccaria vinaceoavellanea* recolectada en China (Zhang et al., 2015). Asumiendo una humedad del 90% en setas (Falandysz et al., 2014), este valor equivaldría a 22.4 mg/kg producto, un contenido muy superior a los hallados frecuentemente en otros organismos terrestres y acuáticos, incluso de origen marino. Estos niveles son habituales en el género *Laccaria*, como muestran los datos obtenidos para *Laccaria amethystina* de distintas procedencias (77-206 mg/kg ps) (Larsen et al., 1998; Slekovec e Irgolic, 1996; Vetter, 2004; Zhang et al., 2015). Se ha sugerido que factores como el tamaño y longevidad de los ejemplares recolectados, parte de la seta analizada (sombrero o pie), niveles de arsénico en el suelo y propiedades del mismo (Slekovec e Irgolic, 1996) son determinantes en el contenido de arsénico en la seta. Los factores de bioconcentración no son tan elevados como los evidenciados para mercurio y cadmio, incluso en muchos casos son inferiores a la unidad (Slekovec e Irgolic, 1996). Los datos de la especiación han revelado que en este tipo de producto vegetal pueden existir una amplia variedad de formas arsenicales orgánicas e inorgánicas (Nearing et al., 2014). La forma inorgánica, la más tóxica de las presentes en alimentos, puede llegar a constituir la especie mayoritaria (Llorente-Mirandes et al., 2014; Nearing et al., 2014).

El plomo se ha considerado el tercer metal pesado en orden de abundancia en las setas después del mercurio y el cadmio. Los parámetros que rigen la acumulación de este metal en las setas son los mismos que los descritos para el resto de elementos traza tóxicos. Los estudios de hace una o dos décadas demostraron claramente la relación entre las concentraciones de plomo en setas y la contaminación del suelo debida al tráfico, existiendo una relación directa entre estos parámetros (Jorhem y Sundstrom, 1995). Los datos obtenidos en los últimos estudios sobre contenidos de plomo en setas muestran valores más bajos, normalmente inferiores a 4 mg/kg ps (Seyfferth et al., 2016; Keles et al., 2017). Kalač y Svoboda (2000) identifica las especies *Lycoperdon perlatum*, *Macrolepiota rhacodes* y *Lepista nuda* como grandes acumuladoras de este metal.

Todos los datos expuestos con anterioridad hacen referencia a setas frescas, no existiendo datos sobre los contenidos de estos elementos traza en muestras de setas deshidratadas. Los análisis de componentes mayoritarios no indican importantes pérdidas durante el secado, sino más bien de una concentración de los nutrientes. Por tanto, el deshidratado podría conllevar la concentración de los metales y metaloides acumulados por la planta. Es por tanto necesario realizar una evaluación detallada de los contenidos de los elementos traza tóxicos más reportados en el producto fresco para determinar el riesgo derivado del consumo de setas deshidratadas.

Por otro lado, la evaluación del riesgo asociado a la ingesta de estas setas se ha llevado a cabo en base a los contenidos de estos elementos en el alimento tal y como se comercializa. Sin embargo, se ha evidenciado que, tras el cocinado, estos contenidos pueden disminuir considerablemente (Cibulka et al., 1999; Svoboda et al., 2002). Los escasos estudios al respecto indican una disminución del mercurio, plomo y cadmio en muestras hervidas o con tratamientos a temperaturas similares a las de la fritura. Por ello, es necesario evaluar los contenidos de las setas deshidratadas también tras ser sometidas al proceso habitual de cocción con el fin de realizar una evaluación más realista del riesgo.

Finalmente, hay que tener en cuenta que los carbohidratos constituyen los nutrientes mayoritarios en setas (35-70% ps) y que en la pared celular la mayor parte son carbohidratos no digeribles, resistentes a los enzimas digestivos humanos (Cheung, 2013). Este hecho plantea la cuestión de si realmente los elementos traza tóxicos existentes en esta matriz son extraídos durante el proceso de digestión y están disponibles para su absorción intestinal, es decir si están bioaccesibles. Los estudios de bioaccesibilidad de metales/metaloides en setas se limitan a un trabajo realizado por Sun et al. (2012), en el que se pone de manifiesto que sólo un 50% del Cd presente en la seta cocinada está disponible para la absorción. Además de la resistencia a los enzimas, la baja bioaccesibilidad en setas puede deberse a otros componentes que se liberan de la matriz durante la digestión y que pueden reducir la solubilidad del metal/metaloides por la formación de complejos insolubles. El efecto de los

componentes de la dieta sobre la bioaccesibilidad de elementos traza tóxicos se ha puesto de manifiesto previamente en algunos productos alimentarios (Jadán-Piedra et al., 2016). Es necesario, por tanto, llevar a cabo estudios al respecto para incrementar el conocimiento existente y determinar si realmente es necesario incluir estos aspectos (tránsito del alimento por el lumen y componentes de la dieta) en las evaluaciones del riesgo asociado a la ingesta de este producto alimentario.

2. OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo es evaluar el riesgo asociado a la ingesta de mercurio, cadmio, plomo y arsénico a través de setas deshidratadas comercializadas en España. Para alcanzar este objetivo general se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluación de los contenidos de mercurio, cadmio, plomo y arsénico en setas deshidratadas y comparación con las legislaciones existentes.
2. Evaluación de los contenidos de mercurio, cadmio, plomo y arsénico en setas deshidratadas tras el cocinado para determinar el efecto del mismo sobre el riesgo asociado y evaluar las ingestas derivadas del consumo.
3. Evaluación la cantidad de mercurio, cadmio, plomo y arsénico disponible para la absorción tras la digestión (bioaccesibilidad) de las setas deshidratadas para determinar el papel de este proceso en el riesgo del producto alimentario y evaluar los factores que pueden influir en su bioaccesibilidad.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Muestras de setas

Se analizaron muestras de setas deshidratadas (n=37) de 11 especies diferentes adquiridas en establecimientos de España (Tabla 1). Las especies que presentaron los contenidos más elevados de los elementos traza tóxicos de interés se seleccionaron para determinar el efecto del cocinado y evaluar la bioaccesibilidad.

Nombre científico	Nombre común
<i>Amanita caesarea</i>	Huevo de rey
<i>Amanita ponderosa</i>	Gurumelo
<i>Boletus edulis</i>	Hongo seco o Boletó
<i>Canthaerellus lutescens</i>	Angula de monte amarilla
<i>Canthaerellus tubaeformis</i>	Angula de monte marrón
<i>Hydnum repandum</i>	Pie de mouton
<i>Lactarius deliciosus</i>	Niscaló
<i>Lentinula edodes</i>	Shiitake
<i>Lepiota procera</i>	Parasol
<i>Marasmius oreades</i>	Senderuela
<i>Tricholoma georgii</i>	Perretxico

Tabla 1. Muestras de setas analizadas.

Las muestras de setas deshidratadas se dividieron en dos porciones. La porción destinada al análisis del producto crudo se homogenizó y se almacenó a 4 °C hasta el momento de su análisis. En la porción destinada a ser cocinada se aplicó el tratamiento culinario indicado por el fabricante (introducción del producto en agua caliente durante 8-10 minutos) sin la adición de ingredientes. Tras su homogenización se almacenó a -20 °C hasta el momento del análisis.

3.2. Método estático de digestión gastrointestinal *in vitro* para la estimación de la bioaccesibilidad

El método *in vitro* empleado es un modelo estático descrito previamente por Jadán-Piedra et al. (2016) que simula las etapas gástrica e intestinal del proceso de digestión gastrointestinal humana (Figura 1).

Etapa gástrica. Las muestras se pesaron en erlenmeyers (1 g de muestra de seta deshidratada cruda o 2 g de muestra cocinada) y se adicionaron 90 mL de agua desionizada. La mezcla se homogeneizó mediante agitación mecánica. Se ajustó el pH a 2 con HCl (Merck) y se llevó el peso de la mezcla hasta 100 g con agua desionizada. Posteriormente se adicionó pepsina porcina (Sigma, actividad enzimática 944 U/mg de proteína). Para ello, se preparó una disolución de pepsina al 10% (m/v) en HCl 0.1 mol/L y se adicionó al erlenmeyer el volumen necesario para proporcionar 2 mg pepsina/100 g de disolución. Finalmente, los erlenmeyers se cubrieron con parafilm y se llevaron a 37 °C durante 2 h con una agitación de 120 rpm.

Etapa intestinal. Una vez finalizada la etapa gástrica, se ajustó el pH a 6.5 mediante la adición de NH₃ (Scharlau). Se adicionó pancreatina porcina (Sigma, actividad equivalente a 4X especificaciones de Farmacopea de EEUU/mg de pancreatina) y extracto biliar porcino (Sigma, glicina y taurina conjugadas con ácido desoxicólico y otras sales biliares). Se preparó una disolución de pancreatina porcina al 0.4% (m/v) y extracto biliar porcino al 2.5% (m/v) en NH₄CO₃ 0.1 mol/L y se adicionó la cantidad necesaria para proporcionar 0.25 mg de pancreatina y 1.5 mg de extracto biliar por 100 g de disolución. La mezcla se incubó nuevamente en agitación (120 rpm, 2 h, 37 °C). Una vez finalizada la etapa intestinal, se transfirió el volumen del matraz a frascos de centrifuga con capacidad de 250 mL y se separó el sobrenadante por centrifugación (10000 rpm, 20 min, 4 °C).

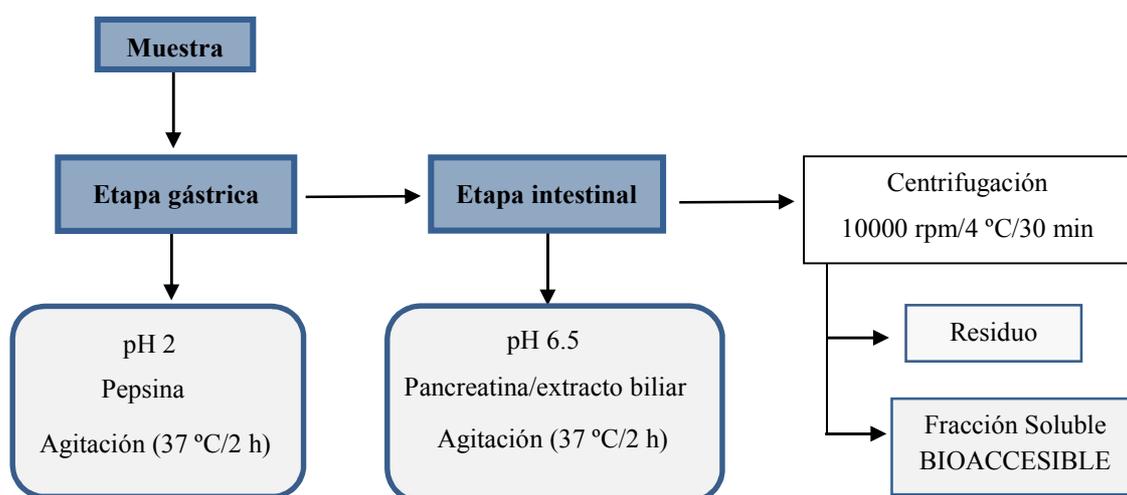


Figura 1. Esquema del protocolo de digestión gastrointestinal simulada aplicado.

En la fracción soluble obtenida tras la etapa intestinal se cuantificó mercurio, cadmio, arsénico y plomo aplicando las metodologías descritas en los apartados 3.3 a 3.5. La bioaccesibilidad, porcentaje del elemento solubilizado respecto al existente en la muestra, se calculó utilizando la siguiente expresión:

$$\text{Bioaccesibilidad (\%)} = [S/C] \times 100$$

donde S es el contenido del elemento solubilizado durante la digestión; C es el contenido del elemento en la muestra.

Debido a la baja bioaccesibilidad encontrada para el mercurio, cadmio y plomo se evaluaron diferentes parámetros para determinar la posible causa de estos resultados.

A) Parámetros de la digestión gastrointestinal. Se evaluó el efecto que cambios en parámetros de la digestión tiene sobre la bioaccesibilidad. A nivel gástrico, se evaluó la influencia del pH gástrico (2, 3 y 4) y la concentración de pepsina (0, 0.001, 0.002, 0.004, 0.008 y 0.013 g/g de muestra). De los parámetros de la digestión intestinal, se analizó el efecto del pH (4.5, 6 y 7.5) y la concentración de sales biliares (3, 10, 300 mg/g de muestra).

B) Componentes de la matriz. Se ensayó el efecto de las fibras insolubles mayoritarias en setas; la quitina (Santa Cruz Biotechnology) y el β -glucano (Sigma). Estos compuestos, a una concentración de 100 mg/L, se añadieron a disoluciones estándar de mercurio y cadmio (1 mg/L, volumen final 20 mL) y el conjunto se sometió a la digestión gastrointestinal simulada siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

3.3. Determinación de mercurio

Para la determinación de mercurio se aplicó una digestión asistida por horno microondas (modelo MARS, CEM) y una posterior cuantificación por generación de vapor frío acoplada a espectrometría de fluorescencia atómica (CV-AFS, modelo 10.025 Millenium Merlin, PS Analytical).

La muestra de seta cruda o cocinada (0.25 g y 0.5 g respectivamente) o la fracción bioaccesible (4 mL) se colocaron en un reactor de teflón. Posteriormente se adicionaron 4 mL de HNO₃ 14 mol/L (Merck) y 1 mL de H₂O₂ (30% v/v, Prolabo). Los reactores fueron irradiados en el horno microondas a 800 W de potencia (180 °C/15 min). Tras el proceso de digestión, los digeridos se dejaron reposar 12 h con el fin de eliminar los vapores nitrosos. Posteriormente la disolución se llevó a un volumen final de 10 mL con agua desionizada. En la tabla 2 se detallan las condiciones instrumentales utilizadas para la cuantificación de mercurio mediante CV-AFS.

Muestra	Flujo 9 mL/min
Disolución reductora	SnCl ₂ 2% (m/v) en HCl 1.8 mol/L. Flujo 4.5 mL/min
Disolución ácida	HCl 0.6 mol/L. Flujo 9 mL/min
Gas transportador	Argón. Flujo 100 L/min
Gas de secado	Aire. Flujo 0.3 L/min
Tiempo de espera	15 s
Tiempo de medida	40 s
Tiempo de retorno	60 s
Rango de amplificación	100
Filtro	32

Tabla 2. Condiciones instrumentales de la cuantificación de mercurio mediante CV-AFS.

La cuantificación de mercurio se llevó a cabo frente a una curva de calibrado de mercurio en el rango de concentración de 0.05-2 ng/mL. Para el control de calidad de la cuantificación se utilizó una muestra líquida certificada para su contenido en mercurio ($40.8 \pm 1.2 \mu\text{g/L}$; RTC QCI1014 distribuida por LGC Standards).

3.4. Determinación de cadmio y plomo

Las muestras de setas se digirieron por horno microondas en las condiciones descritas anteriormente para el análisis de mercurio (apartado 3.3). La cuantificación posterior se realizó empleando un espectrómetro de absorción atómica con horno de grafito (GF-AAS, modelo AAnalyst 600, Perkin-Elmer) equipado con un automuestreador (modelo AS-800), corrección de fondo por efecto Zeeman longitudinal, tubos pirolíticos con calentamiento transversal y plataforma L'vov integrada. Se utilizaron lámparas de descarga sin electrodos y longitudes de onda de 228.8 nm para el cadmio y 283.3 nm para el plomo. Como modificador de matriz se utilizó una disolución de 0.067 mg $\text{H}_2\text{PO}_4\text{NH}_4$ (Merck) y 0.003 mg $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ (Merck) en 10 μL HNO_3 1% (v/v) para ambos elementos. El programa de temperaturas utilizado en el horno de grafito se muestra en la tabla 3.

La cuantificación se llevó a cabo frente a una curva de calibrado en el rango de concentración de 0.5-2 ng/mL para el cadmio y de 1-10 ng/mL para el plomo. El control de calidad de la cuantificación se realizó a través del análisis de la muestra líquida EnvironMAT (EP-H-2) certificada para su contenido en cadmio (0.079 mg/L) y plomo (0.26 mg/L).

ETAPA	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Tiempo de Permanencia (s)	Flujo Argón (mL/min)
Secado	110	1	30	250
Secado	130	15	30	250
Mineralización	70	10	30	250
Atomización	1500	0	5	0
Limpieza	2450	1	3	050

Tabla 3. Programa de temperatura del horno de grafito para la determinación de cadmio y plomo por GF-AAS.

3.5. Determinación de arsénico

El análisis de arsénico se realizó mediante mineralización de las muestras por vía seca y posterior cuantificación por espectrofotometría de fluorescencia atómica con generación de hidruros (HG-AFS, modelo 10.044 Excalibur; PSA).

Para la mineralización, se adicionaron a la muestra (1 g de setas crudas, 2 g de setas cocinadas o 10 mL de fracción bioaccesible), 1 mL de agente de mineralización [$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 20% m/v (Panreac) + MgO 2% m/v (Merck)] y 5 mL de HNO_3 7 mol/L (Merck). La mezcla se evaporó a sequedad en un baño de arena (Raypa) y posteriormente se mineralizó en un horno mufla (Heraeus), aplicando un ciclo temperatura-tiempo en el que tras una subida paulatina de la temperatura (50 °C/h), las muestras se mantuvieron 12 h a 450 °C. Las cenizas blancas obtenidas tras la mineralización se disolvieron en HCl 6 mol/L (Merck) y en una disolución reductora [5% m/v KI (Panreac) y 5% m/v ácido ascórbico (Merck)]. La proporción de reductor con respecto al volumen final de disolución fue de 1:5. Posteriormente, la disolución se filtró a través de papel Whatman No. 1 y se llevó a volumen final con

HCl 6 mol/L. Las condiciones instrumentales para la cuantificación de arsénico mediante HG-AFS se describen en la tabla 4.

La cuantificación se llevó a cabo frente a una curva de calibrado en el rango de concentración de 0.1-2 ng/mL. El control de calidad de la cuantificación de arsénico se realizó a través del análisis de la muestra líquida EnvironMAT (EP-H-2) con un contenido certificado de 0.159 mg/L.

Muestra	9 mL/min
Disolución reductora	NaBH ₄ 1.2% (m/v) en NaOH 0.1 mol/L (m/v). Flujo 4 mL/min
Disolución ácida	HCl 4.5 mol/L. Flujo 9 mL/min
Gas transportador	Argón. Flujo 300 mL/min
Gas de secado	Aire. Flujo 2.5 L/min
Corriente primaria	27.5 mA
Corriente de estímulo	35.0 mA
Tiempo de demora	10 s
Tiempo de medida	20 s
Tiempo de retorno	40 s

Tabla 4. Condiciones instrumentales de la cuantificación de arsénico mediante HG-AFS.

3.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó aplicando la prueba t-student o el análisis de la varianza de un factor o de dos factores (ANOVA) con comparaciones múltiples post hoc mediante la prueba de Fisher HSD (SigmaPlot, versión 13). Las diferencias se consideraron significativas para $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1. Contenidos en muestras de setas deshidratadas crudas

La tabla 5 muestra los contenidos de mercurio, cadmio, arsénico y plomo de las setas deshidratadas crudas. En general, los elementos traza tóxicos con mayores contenidos son el mercurio (0.003-10.3 mg/kg; mediana: 0.53 mg/kg) y el cadmio (0.13-4.5 mg/kg; mediana: 0.47 mg/kg). Los contenidos de mercurio más elevados se han hallado en *Amanita ponderosa* (7.2-10.3 mg/kg), seguidos de *Tricholoma georgii* (3.4-4.3 mg/kg) y *Boletus edulis* (0.9-1.8 mg/kg). Estas dos últimas especies de setas son también las que presentan los contenidos más elevados de Cd [*Tricholoma georgii* (0.9-2.8 mg/kg), *Boletus edulis* (0.7-1.3 mg/kg)], junto con *Amanita caesarea* (0.9-4.5 mg/kg). Algunos de estos contenidos superan los límites propuestos por las legislaciones vigentes en algunos países (ver discusión).

Los contenidos de arsénico oscilan entre 0.02-1.0 mg/kg (mediana: 0.25 mg/kg), y los de plomo entre 0.034-1.9 mg/kg (mediana: 0.18 mg/kg), siendo para ambos elementos las concentraciones de todas las muestras analizadas inferiores a los límites legislados. Hay que destacar, sin embargo, los valores hallados en algunas muestras que pueden considerarse elevados para tratarse de elementos tóxicos. Así, 7 de las 32 muestras evaluadas superan 0.5 mg As/kg y 2 de ellas presentan valores

superiores a 1 mg Pb/kg, que podrían suponer algún tipo de riesgo para consumidores extremos, aun presentando valores dentro de los límites legislados.

Seta	Hg	Cd	As	Pb
<i>Amanita caesarea</i>	327 ± 40	850 ± 99	478 ± 74	185 ± 6
	164 ± 27	4528 ± 62	706 ± 74	1298 ± 221
	924 ± 22	3704 ± 0.2	275 ± 16	307 ± 22
<i>Amanita ponderosa</i>	10252 ± 856	256 ± 10	40 ± 4	64 ± 0.4
	8194 ± 583	283 ± 23	294 ± 11	83 ± 4
	7195 ± 646	476 ± 17	411 ± 3	44 ± 3
<i>Boletus edulis</i>	953 ± 14	1313 ± 52	94 ± 8	94 ± 1
	1838 ± 27	756 ± 29	219 ± 3	114 ± 16
	1417 ± 140	1182 ± 305	141 ± 9	1942 ± 49
<i>Cantharellus lutescens</i>	21 ± 2	240 ± 9	89 ± 8	383 ± 32
	36 ± 3	605 ± 22	176 ± 13	354 ± 28
	3 ± 0.2	622 ± 17	214 ± 4	645 ± 35
<i>Cantharellus tubaeformis</i>	170 ± 2	194 ± 9	134 ± 17	604 ± 88
	164 ± 12	499 ± 14	70 ± 1	269 ± 15
	160 ± 8	554 ± 16	25 ± 2	219 ± 29
<i>Hydnum repandum</i>	1164 ± 101	182 ± 15	542 ± 58	149 ± 17
	523 ± 42	243 ± 8	1009 ± 19	176 ± 8
	522 ± 14	131 ± 5	320 ± 9	194 ± 20
<i>Lactarius deliciosus</i>	273 ± 6	132 ± 7	509 ± 35	139 ± 8
	95 ± 43	463 ± 7	488 ± 12	77 ± 5
<i>Lentinula edodes</i>	19 ± 2	392 ± 30	260 ± 21	82 ± 17
	8 ± 1	326 ± 4	78 ± 6	34 ± 7
	11 ± 4	419 ± 1	117 ± 11	67 ± 18
<i>Lepiota procera</i>	100 ± 11	49 ± 1	333 ± 37	62 ± 10
	575 ± 5	485 ± 41	303 ± 3	169 ± 30
	544 ± 19	1394 ± 54	201 ± 19	290 ± 30
<i>Marasmius oreades</i>	775 ± 77	296 ± 16	602 ± 25	237 ± 17
	1708 ± 125	343 ± 30	153 ± 12	517 ± 7
	1658 ± 25	286 ± 8	563 ± 4	520 ± 4
<i>Tricholoma georgii</i>	4264 ± 145	1645 ± 82	245 ± 14	106 ± 10
	3447 ± 102	855 ± 11	233 ± 16	65 ± 3
	3513 ± 203	2815 ± 290	557 ± 3	556 ± 6

Tabla 5. Contenidos de mercurio, cadmio, arsénico y plomo en setas deshidratadas crudas. Valores expresados como µg/kg peso producto (media ± SD, n=3).

4.2. Contenidos en muestras cocinadas. Efecto del cocinado

Para evaluar el efecto del cocinado en los contenidos de estos metales/metaloides se seleccionaron las especies que presentaban unos mayores contenidos de los elementos, especialmente de mercurio y cadmio: *A. caesarea*, *A. ponderosa*, *B. edulis*, *M. oreades*, *T. georgii*. La comparación se ha realizado en peso seco (figuras 2-5). Los datos muestran que el efecto del tratamiento culinario, consistente en un remojo con agua hirviendo durante 10 minutos, varía según el elemento considerado. Se observa una reducción del contenido en arsénico para todas las muestras (rango: 26-72%; mediana: 52%); para un 60% de las muestras hay una disminución del plomo (rango: 23-34%; mediana: 25%) y cadmio (rango: 31-54%; mediana: 48%), y sólo en un 20% de las muestras se evidencia una reducción del mercurio (rango: 10-35%; mediana: 21%).

La reducción de los contenidos de los elementos tóxicos es consecuencia en parte de su solubilización en el líquido de cocción durante el cocinado. Los contenidos de estos tóxicos en el líquido de cocción son muy variables, con los siguientes porcentajes respecto al contenido de la muestra: Hg 0.1-5%, Pb 4-12%, Cd 11-38%, As 28-52%. Estos datos indican que el cocinado de setas, tal y como se realiza en el presente estudio, reduce las cantidades de los elementos traza estudiados en el producto listo para el consumo. Esto supone una disminución del riesgo asociado a la ingesta de estos alimentos, especialmente en lo que al arsénico se refiere.

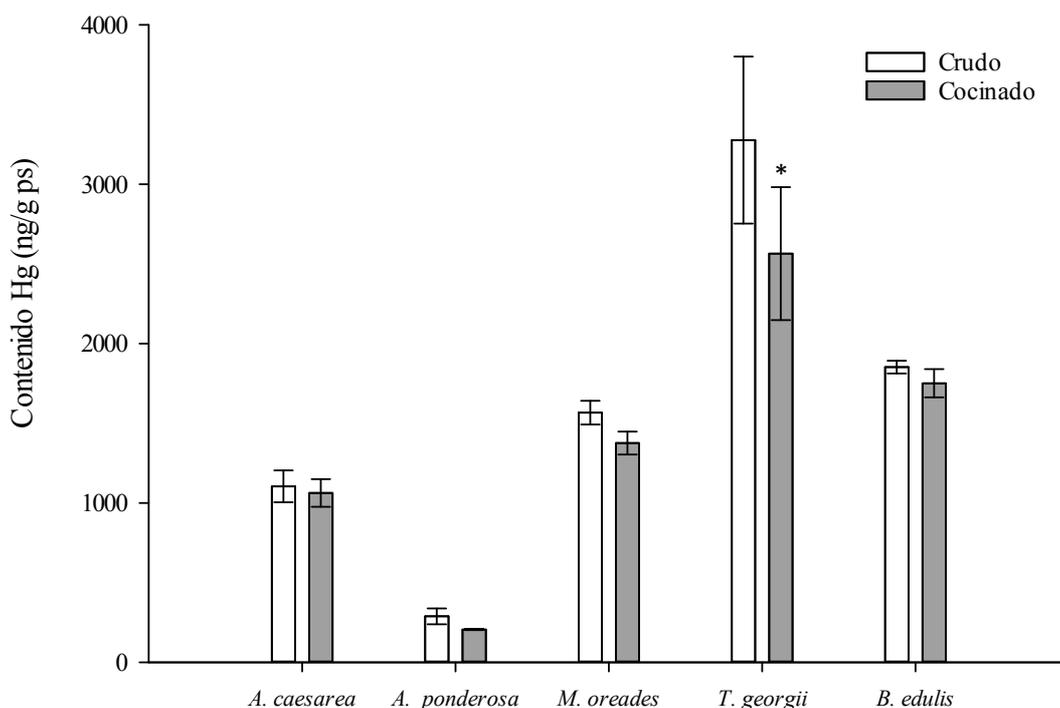


Figura 2. Contenidos de mercurio en setas crudas y cocinadas. Valores expresados como ng de mercurio/g muestra en peso seco (ps) (media \pm desviación estándar, n=3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas de los contenidos en muestras cocinadas respecto a las crudas ($p < 0.05$).

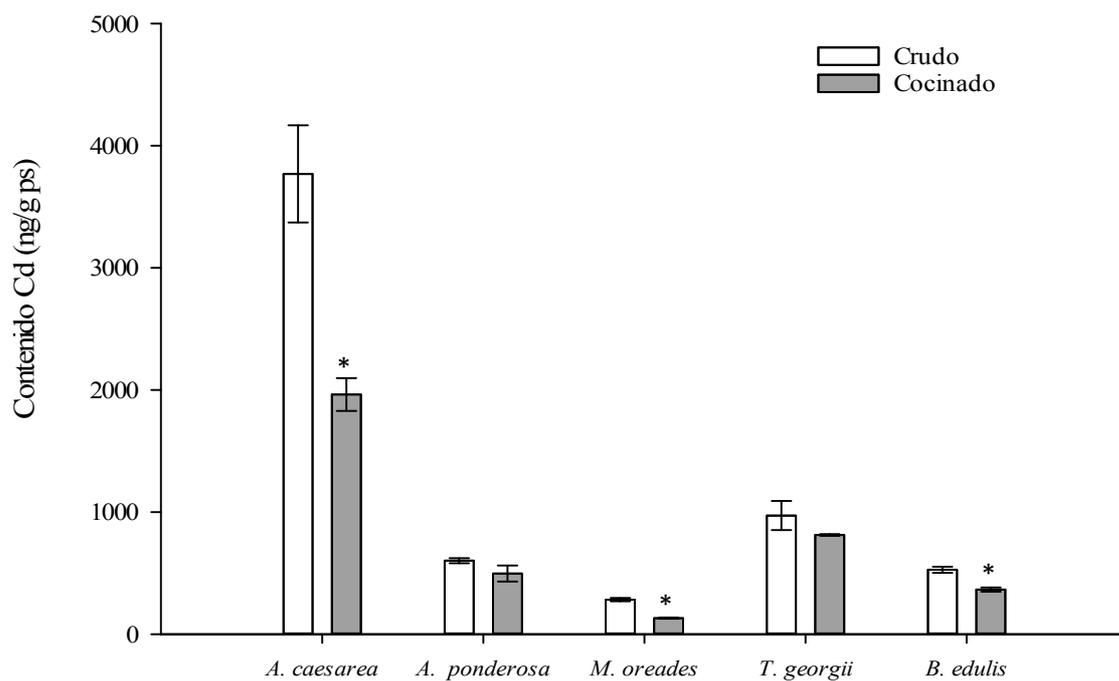


Figura 3. Contenidos de cadmio en setas crudas y cocinadas. Valores expresados como ng de cadmio/g muestra en peso seco (ps) (media \pm desviación estándar, n=3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas de los contenidos en muestras cocinadas respecto a las crudas ($p < 0.05$).

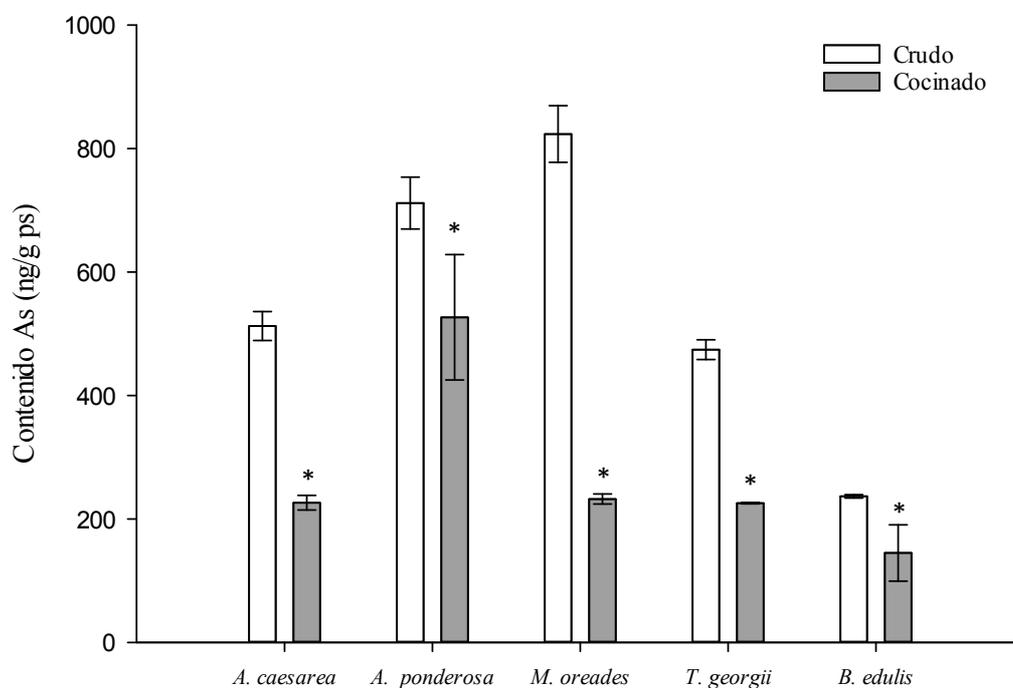


Figura 4. Contenidos de arsénico en setas crudas y cocinadas. Valores expresados como ng de arsénico/g muestra en peso seco (ps) (media \pm desviación estándar, n=3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas de los contenidos en muestras cocinadas respecto a las crudas ($p < 0.05$).

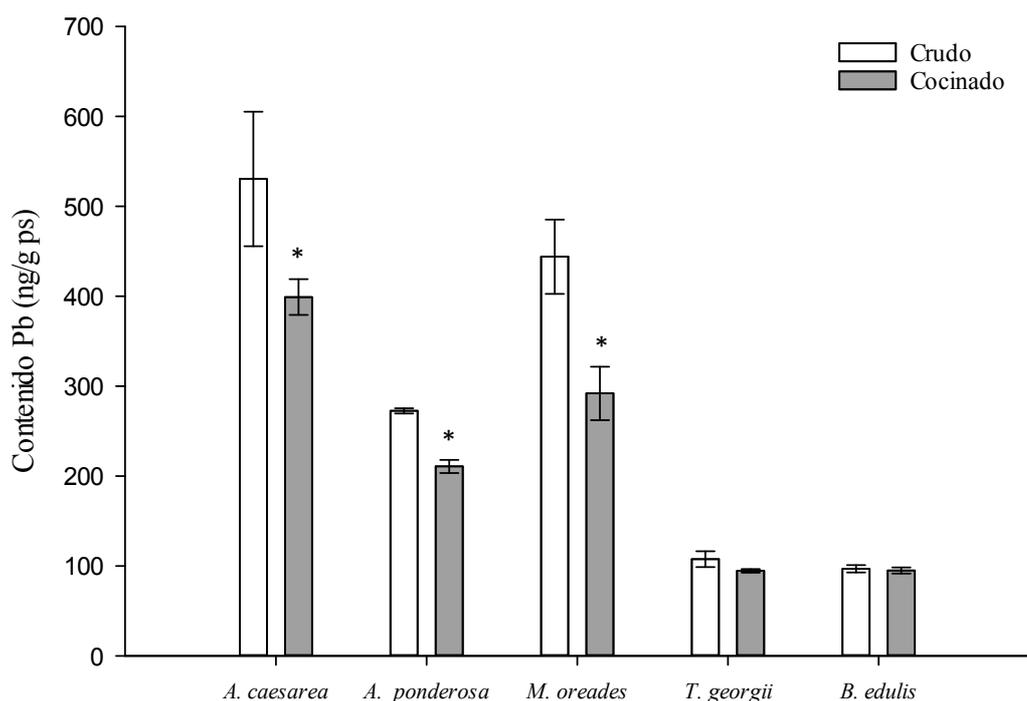


Figura 5. Contenidos de plomo en setas crudas y cocinadas. Valores expresados como ng de plomo/g muestra en peso seco (ps) (media \pm desviación estándar, n=3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas de los contenidos en muestras cocinadas respecto a las crudas ($p < 0.05$).

Para determinar las ingestas de cada uno de los elementos traza se consideró el contenido del producto cocinado, el cual se multiplicó por el peso de una ración habitual de setas deshidratadas (15 g en crudo, correspondiente a 47-63 g de producto cocinado). En la tabla 6 se muestran las ingestas calculadas para cada tóxico, las cuales siguen la gradación $Hg > Cd > Pb \approx As$.

El mercurio y arsénico se pueden encontrar en los alimentos en diferentes formas químicas, con distintos grados de toxicidad y, por tanto, con diferentes recomendaciones de ingesta. En esos elementos, para evaluar el riesgo asociado a su ingesta es necesario realizar estudios de especiación o bien considerar los trabajos previos al respecto. En el presente estudio se ha considerado que la totalidad del mercurio está en forma inorgánica, tal y como indican trabajos previos de especiación en setas (Ruiz de Cenzano et al., 2016). En el caso del arsénico se ha considerado un porcentaje medio de arsénico inorgánico del 84%, atendiendo a los resultados reportados por Llorente-Mirandes et al. (2014). Los datos de ingesta se han comparado con la ingesta semanal tolerable (IST) u otros parámetros toxicológicos relacionados con la ingesta, como el Benchmark dose lower confidence limit (BMDL), propuestos para cada elemento o para una de sus formas químicas por organismos internacionales [As inorgánico: 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso corporal/semana (JECFA, 2011); Cd: 2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso corporal/semana (EFSA, 2009a); Hg inorgánico: 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso corporal/semana (JECFA, 2011); Pb: 0.63-1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso corporal/día (EFSA, 2010)]. Con la ingesta de una ración de las setas analizadas no se supera el valor de referencia para ninguno de los elementos (tabla 6).

Elemento	Seta	Ingesta	% del valor de referencia
Hg	<i>A. caesarea</i>	15.13 ± 1.24	6 ± 1
	<i>A. ponderosa</i>	2.65 ± 0.67	1 ± 0.3
	<i>B. edulis</i>	12.72 ± 2.93	5 ± 1
	<i>M. oreades</i>	39.94 ± 6.49	9 ± 1
	<i>T. georgii</i>	39.94 ± 6.49	17 ± 3
Cd	<i>A. caesarea</i>	27.95 ± 2.35	19 ± 2
	<i>A. ponderosa</i>	7.33 ± 1.19	5 ± 1
	<i>B. edulis</i>	2.98 ± 2.73	2 ± 2
	<i>M. oreades</i>	2.01 ± 0.10	1 ± 0.1
	<i>T. georgii</i>	9.38 ± 1.30	6 ± 1
As	<i>A. caesarea</i>	2.71 ± 0.17	15 ± 1
	<i>A. ponderosa</i>	6.53 ± 1.55	36 ± 9
	<i>B. edulis</i>	1.90 ± 0.73	11 ± 4
	<i>M. oreades</i>	3.00 ± 0.13	17 ± 1
	<i>T. georgii</i>	3.92 ± 1.68	22 ± 10
Pb	<i>A. caesarea</i>	6.25 ± 1.02	17 ± 3
	<i>A. ponderosa</i>	3.11 ± 0.13	8 ± 0.3
	<i>B. edulis</i>	1.36 ± 0.23	4 ± 1
	<i>M. oreades</i>	6.21 ± 3.01	16 ± 8
	<i>T. georgii</i>	1.32 ± 0.26	1 ± 0.2

Tabla 6. Ingestas de mercurio, cadmio, arsénico y plomo vehiculadas por las setas cocinadas. Valores de ingesta expresados en µg (media ± desviación estándar, n=3) y porcentajes que estas ingestas suponen respecto al valor de referencia.

4.3. Bioaccesibilidad de mercurio, arsénico, cadmio y plomo en muestras crudas y cocinadas

4.3.1. Contenidos bioaccesibles. Efecto del cocinado sobre la bioaccesibilidad

La tabla 7 muestra los contenidos bioaccesibles y la bioaccesibilidad de las setas crudas y cocinadas. Los datos de plomo no se presentan ya que los contenidos hallados son inferiores al límite de detección de la metodología. Los datos de bioaccesibilidad son relativamente bajos para el mercurio y el cadmio, con valores que no superan el 40% del contenido inicial de la muestra. Estos datos indican que la digestión gastrointestinal conlleva una reducción del riesgo asociado a la ingesta en lo que a estos tres metales se refiere. Por el contrario, la bioaccesibilidad del arsénico es elevada (54-86%), por tanto, para este metaloide la reducción del riesgo es mucho menor. Esta bioaccesibilidad no está afectada por el procesado del alimento ya que las diferencias de este parámetro entre setas crudas y cocinadas no son elevadas ni estadísticamente significativas.

Elemento	Seta	Fracción bioaccesible cruda	Fracción bioaccesible cocinado
Hg	<i>A. caesarea</i>	228.3 ± 1.7 (15%)	116.0 ± 16.7 (40%)
	<i>A. ponderosa</i>	76.3 ± 19.7 (31%)	14.0 ± 3.7 (25%)
	<i>B. edulis</i>	331.9 ± 13.6 (20%)	142.7 ± 6.0 (27%)
	<i>M. oreades</i>	427.6 ± 29.8 (31%)	93.2 ± 12.9 (28%)
	<i>T. georgii</i>	520.3 ± 14.2 (12%)	136.1 ± 8.3 (21%)
Cd	<i>A. caesarea</i>	504.8 ± 10.9 (15%)	97.0 ± 11.8 (18%)
	<i>A. ponderosa</i>	62.4 ± 4.3 (12%)	18.5 ± 25.3 (12%)
	<i>B. edulis</i>	141.8 ± 6.1 (29%)	24.7 ± 8.6 (27%)
	<i>M. oreades</i>	58.8 ± 5.8 (23%)	8.1 ± 20.8 (25%)
	<i>T. georgii</i>	113.7 ± 9.1 (16%)	28.9 ± 9.0 (12%)
As	<i>A. caesarea</i>	316.2 ± 57.9 (69%)	39.1 ± 5.9 (63%)
	<i>A. ponderosa</i>	282.6 ± 37.0 (54%)	56.5 ± 10.1 (66%)
	<i>B. edulis</i>	253.6 ± 27.0 (86%)	26.5 ± 3.3 (70%)
	<i>M. oreades</i>	611.9 ± 71.7 (84%)	67.0 ± 6.0 (81%)
	<i>T. georgii</i>	350.9 ± 33.8 (73%)	52.8 ± 4.7 (69%)

Tabla 7. Bioaccesibilidad de mercurio, cadmio y arsénico en setas crudas y cocinadas. Valores expresados en ng/g seta (media ± desviación estándar, n=3) y porcentajes respecto al contenido total de la seta (entre paréntesis).

4.3.2. Influencia de los diferentes parámetros de la digestión y la muestra sobre la bioaccesibilidad

La baja bioaccesibilidad observada para mercurio, cadmio y plomo en setas puede ser consecuencia de: a) una digestión incompleta de la matriz que no favorece la liberación de estos metales y/o b) la presencia de compuestos en la misma matriz que formen complejos insolubles con los metales. Para evaluar estos dos posibles factores se han realizado las aproximaciones que se exponen a continuación. En estos ensayos se han evaluado únicamente las bioaccesibilidades de mercurio y cadmio, ya que los contenidos de plomo en las fracciones bioaccesibles no son detectables.

A) Modificación de las condiciones de digestión.

Se han modificado los parámetros de la digestión que pudieran afectar la bioaccesibilidad de estos metales, siempre dentro de los intervalos habituales en una digestión, con el fin de determinar si existe alguna condición que favorezca más la solubilización de los metales desde el alimento, al permitir una mayor digestión de la matriz.

De todos los parámetros analizados, sólo el pH gástrico (Figura 6A) e intestinal (Figura 6B) afectan significativamente la solubilización del mercurio y cadmio durante la digestión de las setas. El

aumento del pH gástrico supone la reducción de la bioaccesibilidad del mercurio (porcentaje de reducción: 36-80%) y en menor medida del cadmio (porcentaje de reducción: 15-21%) en las dos especies de setas ensayadas. El pH intestinal afecta de forma diferente a la bioaccesibilidad de cada elemento. Un aumento de este pH reduce la bioaccesibilidad de cadmio (20-40%) y aumenta la de mercurio (45-107%).

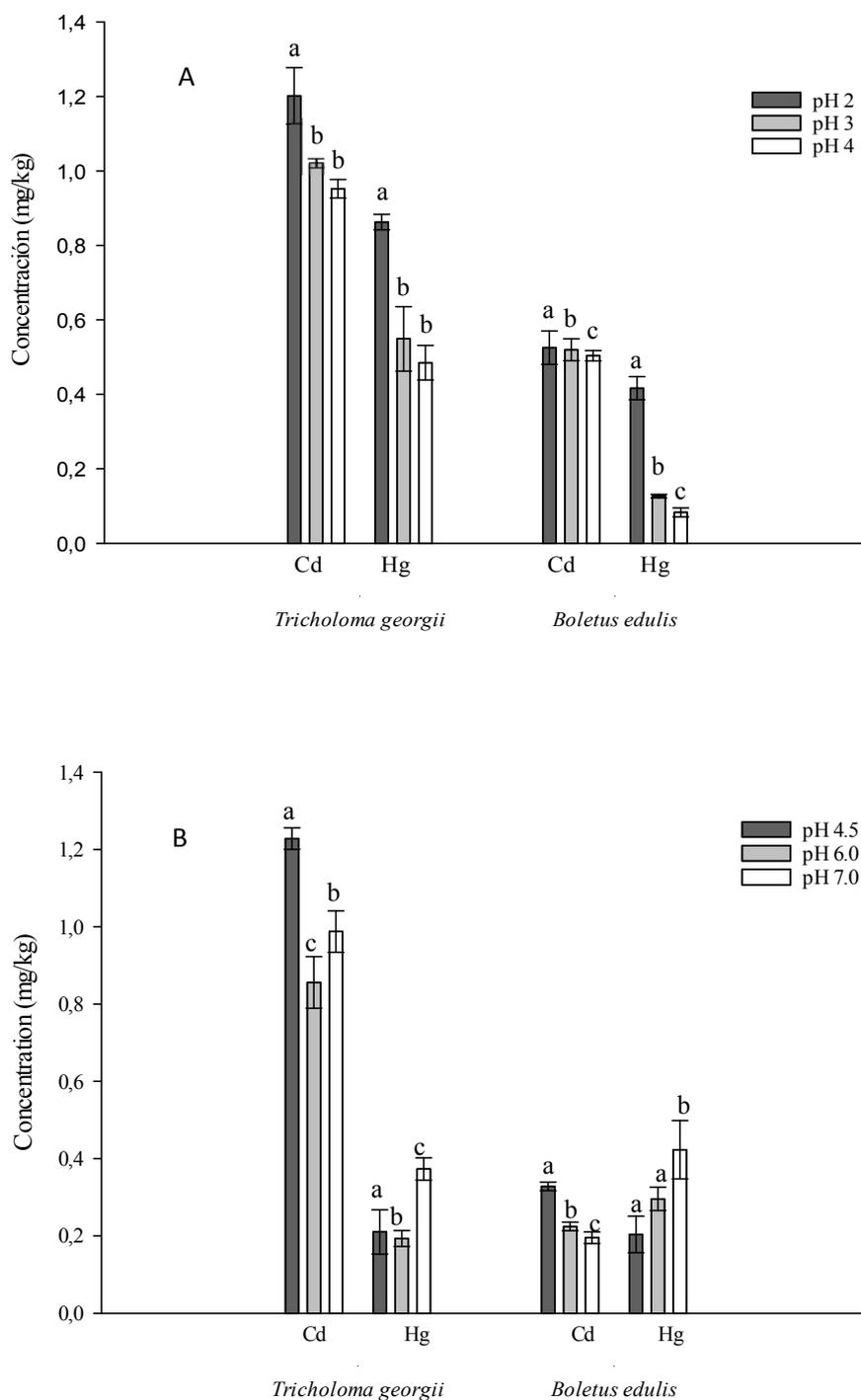


Figura 6. Influencia del pH gástrico (6A) e intestinal (6B) en la bioaccesibilidad de cadmio y mercurio en setas. Contenidos de cadmio y mercurio en la fracción bioaccesible expresados en mg/kg de muestra (media \pm SD, n=4). Las letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los contenidos bioaccesibles a distintos pH para una misma muestra.

El efecto del pH podría ser consecuencia de cambios en los estados de ionización de los metales o de compuestos que puedan unir a estos metales, favoreciendo la formación de complejos de menor solubilidad. El hecho de que el aumento de las concentraciones de enzimas y sales no influya en la cantidad de metal bioaccesible es un indicativo de la baja digestibilidad de este alimento con las actividades enzimáticas habituales en el tracto gastrointestinal.

B) Influencia de los componentes de los alimentos sobre la bioaccesibilidad

La adición de las fibras insolubles a la digestión se ha llevado a cabo teniendo en cuenta la concentración de estos compuestos en las setas. Sari et al. (2017) evalúan una amplia variedad de setas, mostrando contenidos de β -glucano que oscilan entre 10-40 g por cada 100 g de alimento (ps). Los contenidos de quitina reportados son ligeramente inferiores (0.4-10 g/100 g de seta ps) (Nitschke et al., 2011).

La figura 7 muestra los contenidos de las fracciones bioaccesibles obtenidas en ausencia y presencia de quitina o β -glucano para las disoluciones acuosas de mercurio y cadmio (1 mg/L). Para ambos elementos, la presencia de estas fibras supone una reducción de la bioaccesibilidad (Cd: 46-51%; Hg: 21-25%). Este hecho indica que la quitina y el β -glucano influyen en la cantidad de estos metales que queda disponible para la absorción tras la ingesta.

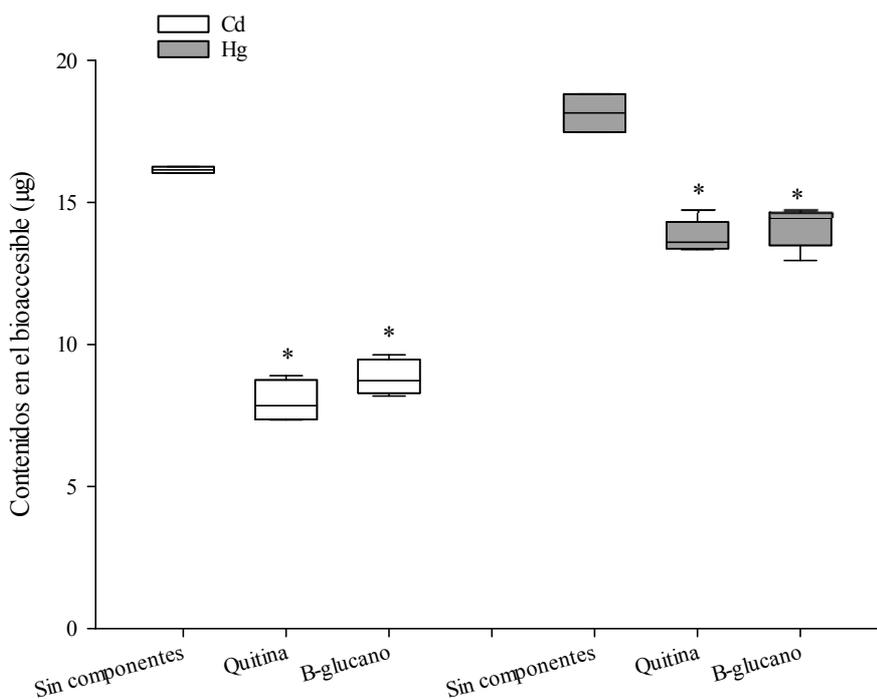


Figura 7. Influencia de las fibras insolubles en la bioaccesibilidad de cadmio y mercurio en setas. Contenidos de cadmio y mercurio en la fracción bioaccesible expresados en μg (media \pm SD, n=4). Los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) de los contenidos bioaccesibles en las disoluciones patrón digeridas en presencia de quitina y β -glucano con respecto a las digeridas sin estas fibras

5. DISCUSIÓN

Los elementos traza evaluados en el presente estudio producen efectos adversos en exposiciones continuadas, en muchos casos con el desarrollo de procesos cancerígenos. La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) ha clasificado al cadmio como sustancia cancerígena para el hombre (Grupo 1A; IARC, 1993). Esta clasificación se basa en estudios donde existe una exposición vía inhalatoria y se debe a un aumento de la incidencia de cáncer de pulmón. Sin embargo, no hay evidencias convincentes que vinculen la exposición oral a cadmio con la aparición de procesos cancerígenos, si bien existen algunos estudios que apuntan a una mayor incidencia de cánceres de próstata, mamá y páncreas (ATSDR, 2012). La IARC también ha clasificado al arsénico inorgánico como carcinógeno para los humanos (Grupo 1A; IARC, 2004). La mayoría de los estudios epidemiológicos muestran una mayor prevalencia de cánceres de piel, vejiga, riñón y pulmones en poblaciones expuestas crónicamente (Smith et al., 1999). También existe una asociación entre la exposición crónica a este metaloide y otras patologías no cancerígenas (diabetes tipo II, enfermedades cardio y cerebrovasculares, hiperqueratosis, y déficits neuroconductuales en la población infantil) (EFSA, 2009b).

Los compuestos inorgánicos de plomo se clasifican como probables carcinogénicos para los seres humanos (grupo 2A; IARC, 2006). El acetato de plomo administrado por vía oral o intraperitoneal causa cánceres de riñón, cerebro (gliomas) y pulmón en roedores, y actúa de forma sinérgica con otros carcinógenos (Steenland y Boffetta, 2000). Finalmente, el mercurio inorgánico ha sido incluido dentro del grupo 3, no clasificable como cancerígeno para el hombre (IARC, 1993). Esta forma química de mercurio, sin embargo, produce importantes patologías renales. Los estudios a largo plazo (2 años, dosificaciones 5 días/semana, concentraciones entre 0.3-5 mg/kg peso corporal/día) en ratas muestran una alta incidencia de nefropatías que cursan con regeneración tubular, engrosamiento de la membrana basal del túbulo y túbulos dilatados con cilindros hialinos (NTP, 1993).

Debido al carácter tóxico de estos elementos, su presencia en agua y alimentos no es deseable y existen diferentes reglamentos que limitan sus contenidos en numerosas matrices alimentarias, aunque a veces el alcance de estas legislaciones es menor que el que cabría esperar atendiendo a los datos toxicológicos existentes. La legislación europea únicamente limita el contenido máximo de plomo y cadmio en tres especies de setas: *Agaricus bisporus* (champiñón), *Pleurotus ostreatus* (seta de ostra) y *Lentinula edodes* (seta shiitake). Los contenidos máximos permitidos se fijan en 0.3 mg/kg para el plomo (Reglamento UE 2015/1005) y 0.2 mg/kg para el cadmio (Reglamento UE 488/2014). Estas legislaciones hace referencia a setas frescas; su aplicación a setas deshidratadas requiere utilizar un factor de transformación de 10 para considerar los cambios de concentración del contaminante provocados por la pérdida de agua durante el proceso de secado. De las especies contempladas en los reglamentos, únicamente la seta shiitake ha sido analizada en este trabajo y sus contenidos de plomo y cadmio no superan el límite permitido por la Unión Europea.

Con el fin de poder evaluar la seguridad alimentaria de todas las especies de setas analizadas en este trabajo se han considerado los límites máximos establecidos por la legislación de China (GB 2762-2012), país muy restrictivo en contaminación química de alimentos. Fija para todas las especies de setas que se comercialicen los siguientes contenidos máximos: plomo 1 mg/kg (10 mg/kg para deshidratadas); mercurio 0.1 mg/kg (1 mg/kg para deshidratadas); arsénico 0.5 mg/kg (5 mg/kg para setas deshidratadas). En el caso del cadmio, establece un contenido máximo de 0.2 mg/kg (2 mg/kg para deshidratadas) que se eleva a 0.5 mg/kg para la seta shiitake. Alguna de las muestras analizadas incumple la legislación china para cadmio y mercurio, evidenciando que existen problemas de seguridad. El límite de cadmio es superado en una muestra de *Tricholoma georgii* y una muestra de *Amanita caesarea*. Los incumplimientos para el mercurio se detectan en muestras de *Amanita ponderosa* (7.2-10 mg/kg), *Boletus edulis* (0.95-1.8 mg/kg), *Marasmius oreades* (0.8-1.7) y *Tricholoma georgii* (3.5-4.3 mg/kg).

Estudios previos han evidenciado que para determinadas combinaciones alimento/metal pesado o metaloide se produce una modificación del riesgo asociado a la ingesta como consecuencia del procesado previo al consumo. La solubilización del elemento tóxico al líquido de cocción o enlatado

o su concentración por la pérdida de agua y otros compuestos solubles durante el cocinado son algunas de las causas de la modificación de los contenidos del tóxico en el producto cocinado o procesado (Devesa et al., 2008; Hajeb et al., 2014). En el presente estudio se evidencia, al comparar los contenidos en base seca (Figuras 2-5), que en todas las muestras existen pérdidas relevantes del arsénico tras el cocinado (28-52%). El resto de elementos no experimentan reducciones importantes de sus contenidos tras la cocción, a excepción de una muestra de *Amanita caesarea* con una reducción del 38% para cadmio. El distinto comportamiento del arsénico durante el cocinado respecto al resto de elementos traza puede ser debido a que su unión a matriz sea diferente; no hay que olvidar que el cadmio, plomo y mercurio son cationes metálicos, mientras que el arsénico es un oxoanión.

Estudios previos evidencian mayores pérdidas de los elementos traza tóxicos durante el cocinado de setas, si bien en ningún caso se trata de muestras deshidratadas. Falandysz y Drewnowska (2017) muestran una reducción de hasta un 56% del contenido de mercurio tras el hervido de setas de la especie *Amanita fluva*; en este caso se trata de muestras crudas previamente blanqueadas. Cibulka et al. (1999) también observan una pérdida de mercurio de aproximadamente un tercio durante el tratamiento térmico de setas frescas a altas temperaturas, simulando un proceso de fritura. Las diferencias en este último estudio también pueden ser consecuencia del empleo de tratamientos térmicos más drásticos que una cocción en agua.

La mayor parte de la reducción del contenido de estos elementos se debe a su paso al líquido de cocción. En estos casos puntuales se podría hablar de una reducción del riesgo, siempre y cuando se descarte el líquido de cocción para el consumo. En el informe del CBI (2016) se reporta que uno de los principales usos de estas setas deshidratadas es la elaboración de sopas; en este caso, no se podría hablar de una disminución del riesgo asociado. El cálculo de las ingestas (tabla 6) ha mostrado que en ninguno de los casos se superan las ingestas recomendadas (IST o BMDL, sección 4.3.1 del presente trabajo), esto es debido en parte a que se trata de alimentos que se ingieren en pequeñas cantidades. Habría que realizar este tipo de evaluación de riesgo teniendo disponibles datos sobre consumidores extremos o poblaciones donde el consumo de setas es más habitual. Por otro lado, tal y como se ha comentado anteriormente, si se consume el líquido de cocción, se eleva en algunos casos considerablemente la ingesta vehiculada por estas setas.

La evaluación del riesgo considerando el alimento cocinado siempre es una aproximación más realista que si se considera el alimento tal y como se adquiere. Por otro lado, tras la ingesta, el alimento sufre una serie de procesos que podrían también influir en el riesgo asociado a la ingesta del alimento. La liberación del tóxico de la matriz alimentaria durante la digestión y su posterior absorción intestinal son condiciones imprescindibles para que llegue a la circulación sistémica y ejerza su efecto. Los estudios de bioaccesibilidad *in vitro* se emplean para valorar la cantidad de tóxico que queda disponible tras la digestión para su absorción y se ha visto que en muchos casos reflejan con bastante precisión los datos obtenidos en animales e incluso en humanos (Versantvoort et al., 2004). Los ensayos de bioaccesibilidad realizados en el presente estudio evidencian que la cantidad de plomo, mercurio y cadmio que se libera de la matriz tras la digestión es muy baja. Estos datos sugieren que estos metales no se absorberían y serían eliminados posiblemente por vía fecal, por tanto no se acumularían en los órganos diana y no conllevarían efectos adversos. Por el contrario, la bioaccesibilidad del arsénico es elevada, con valores que son cercanos al 100% en varias muestras. Al igual que ocurría en el cocinado, el comportamiento de este metaloide es distinto al de los tres metales. Posiblemente la causa sea la misma que la comentada para el efecto del cocinado; la interacción del arsénico a la matriz es diferente y posiblemente más fácil de romper durante la digestión.

La baja bioaccesibilidad de los metales observada en las setas podría deberse a varias causas, tal y como se ha indicado previamente: a) que exista una baja digestibilidad de la muestra; b) que los elementos se liberen de la matriz en forma de complejos de baja solubilidad; c) que tras su liberación de la matriz se unen a otros elementos o compuestos también liberados de la matriz y formen complejos de baja solubilidad. Algunos estudios indican que las setas constituyen una matriz de difícil digestión debido a su composición. Los enzimas digestivos secretados por el páncreas y el borde en cepillo de los enterocitos no pueden hidrolizar el enlace glucosídico de los β -glucanos (Aida et al., 2009). De hecho, el aumento de las concentraciones de los enzimas y las sales biliares empleados en la digestión simulada no han supuesto cambios en la bioaccesibilidad de los metales, indicativo de que estos

enzimas no juegan un papel relevante en la digestión. A esta falta de digestibilidad de la matriz, se une el hecho de que, tal y como se ha evidenciado en este trabajo (figura 8), las fibras mayoritarias de las setas pueden unir estos cationes metálicos formando complejos que no quedan solubles tras la digestión.

La captación de metales pesados por la quitina ha sido previamente documentada, especialmente en plomo y cadmio. Xiong et al. (2010) muestran una captación de cadmio en disolución acuosa con un máximo a pH 5.4. Los autores ponen de manifiesto mediante análisis en infrarrojos que el cadmio se une a los grupos hidroxilo y acetilamino de la quitina. La captación de mercurio es todavía más eficiente, con porcentajes cercanos al 90%, con un pH óptimo en torno a 7 (Barriada et al., 2008). Este estudio muestra que una vez formado el complejo quitina-mercurio es difícil la desorción del metal. En nuestro estudio observamos una mayor captación de cadmio por parte de la quitina, posiblemente debido a que el rango de pHs empleados durante la digestión es inferior al pH óptimo de unión del mercurio. Por otro lado, el complejo quitina-metal resiste las condiciones de digestión gastrointestinal, hecho que confirma la fuerte unión de la quitina a estos metales.

Los datos *in vitro* muestran que tanto el cocinado (para el arsénico) como la digestión gastrointestinal (para el mercurio, cadmio y plomo) reducen las cantidades que cabría esperar que llegaran a la circulación sistémica tras la ingesta, respecto a las halladas cuando se consideran solo los contenidos del alimento crudo. La influencia de estos factores debería confirmarse *in vivo*, para así demostrar que, aunque algunas de estas setas presentan valores de mercurio y cadmio por encima de los límites legislados, tras su procesado y digestión, la cantidad del tóxico que alcanza la circulación sistémica puede no ser relevante.

6. CONCLUSIONES

Los datos obtenidos en el presente estudio permiten obtener las siguientes conclusiones,

1. Los contenidos de mercurio en *Amanita ponderosa*, *Boletus edulis*, *Marasmius oreades* y *Tricholoma georgii*, así como los contenidos de cadmio en *Amanita caesarea* y *Tricholoma georgii* superan los límites legislados. Este hecho indica que para algunas especies de setas existen problemas de seguridad en lo que a estos metales pesados se refiere.
2. El cocinado sólo reduce de forma relevante los contenidos de arsénico en las muestras analizadas, siendo las reducciones inferiores al 20% para el resto de elementos. El cocinado de las setas solo reduce el riesgo asociado a la ingesta de estos alimentos en lo que al arsénico se refiere.
3. La bioaccesibilidad es baja para el mercurio, cadmio y plomo en todas las muestras. Esto supone que aunque en algunos casos las setas superan los límites legislados, finalmente la cantidad de estos elementos tóxicos que llega a la circulación sistémica no parece tan relevante desde el punto de vista toxicológico.
4. La baja bioaccesibilidad de los metales observada en las setas se debe posiblemente a la reducida digestibilidad de este alimento y a la capacidad de las fibras mayoritarias para formar complejos insolubles con los elementos traza tóxicos.
5. Estos datos deben confirmarse *in vivo*, empleando animales de laboratorio. De confirmarse esta baja bioaccesibilidad, sería interesante plantearse el empleo de este parámetro a la hora de evaluar el riesgo asociado a la ingesta de setas.

7. REFERENCIAS

- AIDA, F.M.N.A.; SHUHAIMI, M.; YAZID, A.; MAARUF, A.G. (2009). Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. *Trends Food Sci. Technol.*, 20: 567-575.
- ÁRVAY, J.; TOMÁŠ, J.; HAUPTVOGL, M.; KOPERNICKÁ, M.; KOVÁČIK, A.; BAJČAN, D.; MASSÁNYI, P. (2014). Contamination of wild-grown edible mushrooms by heavy metals in a former mercury-mining area. *J. Environ. Sci. Health B.*, 49: 815-827.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (2012). Profile for Cadmium. U.S. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA.
- BARRIADA, J.L.; HERRERO, R.; PRADA-RODRÍGUEZ, D.; SASTRE DE VICENTE, M.E. (2008). Interaction of mercury with chitin: A physicochemical study of metal binding by a natural biopolymer. *React. Funct. Polym.*, 68: 1609-1618.
- CBI (Centre for the Promotion of Imports from developing countries). (2016). The Netherlands Ministry of Foreign Affairs. Exporting dried mushrooms to Europe. <https://www.cbi.eu/node/2611/pdf/>
- CHEUNG, P.C.K. (2013). Mini-review on edible mushrooms as source of dietary fiber: Preparation and health benefits. *Food Sci. Human Wellness*, 2: 162-166.
- CIBULKA, J.; CURDOVA, E.; MIHOLOVA, D.; STEHULOVA, I. (1999). Mercury loss from edible mushrooms after their model thermal treatment. *Czech J. Food Sci.*, 17, 238-240.
- COLLIN-HANSEN, C.; YTTRI, K.E.; ANDERSEN, R.A.; BERTHELSEN, B.O.; STEINNES, E. (2002). Mushrooms from two metal-contaminated areas in Norway: Occurrence of metals and metallothionein-like proteins. *Geochem. Explor. Env. A.*, 2: 121-130.
- DEVESA, V.; VÉLEZ, D.; MONTORO, R. (2008). Effect of thermal treatments on arsenic species contents in food. *Food Chem Toxicol.*, 46: 1-8.
- EFSA (European Food Safety Authority). (2009a). Scientific opinion on cadmium in food. *EFSA J.*, 980: 1-139.
- EFSA (European Food Safety Authority). (2009b). Scientific opinion on arsenic in food. *EFSA J.* 7(10): 1351.
- EFSA (European Food Safety Authority). (2010). Scientific opinion on lead in food. *EFSA J.*, 8, 1570 1-147.
- FALANDYSZ, J.; GUCIA, M.; BRZOSTOWSKI, A.; KAWANO, M.; BIELAWSKI, L.; FRANKOWSKA, A.; WYRZYKOWSKI, B. (2003). Content and bioconcentration of mercury in mushrooms from northern Poland. *Food Addit. Contam.*, 20: 247-253.
- FALANDYSZ, J.; BOROVIČKA, J. (2013). Macro and trace mineral constituents and radionuclides in mushrooms: health benefits and risks. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97: 477-501.
- FALANDYSZ, J. (2014). Distribution of mercury in *Gypsy Cortinarius caperatus* mushrooms from several populations: An efficient accumulator species and estimated intake of element. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 110: 68-72.
- FALANDYSZ, J.; KRASINSKA, G.; PANKAVEC, S.; NNOROM, I.C. (2014). Mercury in certain boletus mushrooms from Poland and Belarus. *J. Environ. Sci Health. B*, 49: 690-695.
- FALANDYSZ, J.; DREWNOWSKA, M. (2017). Cooking can decrease mercury contamination of a mushroom meal: *Cantharellus cibarius* and *Amanita fulva*. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 24: 13352-13357.
- HAJEB, P.; SLOTH, J.J.; SHAKIBAZADEH, S.; MAHYUDIN, N.A.; AFSAH-HEJRI, L. (2014). Toxic elements in food: Occurrence, binding, and reduction approaches. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 13: 457-472.

- IARC (International Agency for the Research on Cancer). (1993). Beryllium, cadmium, mercury and exposures in the glass manufacturing industry. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans, vol 58, Lyon.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). (2004). Summaries & evaluations: Arsenic in drinking-water (Group 1). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans, vol. 84, Lyon.
- IARC (International Agency for the Research on Cancer). (2006). Inorganic and organic lead compounds. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol 87, Lyon.
- JADÁN-PIEDRA, C.; SÁNCHEZ, V.; VÉLEZ, D.; DEVESA, V. (2016). Reduction of mercury bioaccessibility using dietary strategies. *LWT - Food Sci. Technol.*, 71: 10-16.
- JEFCA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). (2011). Safety evaluation of certain contaminants in food. Seventy-second meeting of JECFA. FAO JECFA Monographs 8, Rome, 2011.
- JORHEM, L.; SUNDSTRÖM, B. (1995). Levels of some trace elements in edible fungi. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 201: 311-316.
- KALÁČ, P.; SVOBODA, L. (2000). A review of trace element concentrations in edible mushrooms. *Food Chem.*, 69: 273-281.
- KALÁČ, P. (2013). A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. *J. Sci. Food Agric.*, 93: 209-218.
- KELES, A.; GENCCLEP, H.; DEMIREL, K. (2017). Elemental composition of naturally growing wild edible mushroom. *J. Nat. Prod. Plant. Resour.*, 7: 37-44.
- LARSEN, E.H.; HANSEN, M.; GÖSSLER, W. (1998). Speciation and health risk considerations of arsenic in the edible mushroom *Laccaria Amethystina* collected from contaminated and uncontaminated locations. *Appl. Organomet. Chem.*, 12: 285-291.
- LLORENTE-MIRANDES, T.; BARBERO, M.; RUBIO, R.; LÓPEZ-SÁNCHEZ, J.F. (2014). Occurrence of inorganic arsenic in edible Shiitake (*Lentinula edodes*) products. *Food Chem.*, 158: 207-215.
- MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente). (2013). Nota de prensa sobre los datos del Panel de Consumo Alimentario. http://www.magrama.gob.es/es/prensa/13.08.08%20Panel%20de%20Consumo%20Alimentario%20primer%20semestre%202013_tcm7-291630_noticia.pdf.
- MELGAR, M.J.; ALONSO, J.; GARCÍA, M.A. (2016). Cadmium in edible mushrooms from NW Spain: Bioconcentration factors and consumer health implications. *Food Chem. Toxicol.*, 88: 13-20.
- NEARING, M.M.; KOCH, I.; REIMER, K.J. (2014). Arsenic speciation in edible mushrooms. *Environ. Sci. Technol.*, 48: 14203-14210.
- NITSCHKE, J.; ALTENBACH, H.J.; MALOLEPSZY, T.; MÖLLEKEN, H. (2011). A new method for the quantification of chitin and chitosan in edible mushrooms. *Carbohydr. Res.*, 346: 1307-1310.
- NTP (National Toxicology Program). (1993). Toxicology and carcinogenesis studies of mercuric chloride (CAS No. 7487-94-7) in F344 rats and B6C3F1 mice (Gavage Studies). *Natl. Toxicol. Program. Tech. Rep. Ser.*, 408: 1-260.
- Reglamento (UE) n 488/2014 de la Comisión de 12 de mayo de 2014 que modifica el Reglamento (CE) n ° 1881/2006 por lo que respecta al contenido máximo de cadmio en los productos alimenticios. <http://data.europa.eu/eli/reg/2014/488/oj>

- Reglamento (UE) 2015/1005 de la Comisión de 25 de junio de 2015 que modifica el Reglamento (CE) n° 1881/2006 por lo que respecta al contenido máximo de plomo en determinados productos alimenticios. <http://data.europa.eu/eli/reg/2015/1005/oj>
- REID, T.; MUNYANYI, M.; MDULUZA, T. (2016). Effect of cooking and preservation on nutritional and phytochemical composition of the mushroom *Amanita zambiana*. *Food Sci. Nutr.*, 5: 538-544.
- REIS, F.S.; BARROS, L.; MARTINS, A.; FERREIRA, I.C. (2012). Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: an inter-species comparative study. *Food Chem. Toxicol.*, 50: 191-197.
- RUIZ-DE-CENZANO, M.; LÓPEZ-SALAZAR, O.; CERVERA, M.L.; DE LA GUARDIA, M. (2016). Non-chromatographic speciation of mercury in mushrooms. *Anal. Methods*, 8: 1774-1779
- SARI, M.; PRANGE, A.; LELLEY, J.I.; HAMBITZER, R. (2017). Screening of beta-glucan contents in commercially cultivated and wild growing mushrooms. *Food Chem.*, 216: 45-51.
- SEYFFERTH, A.L.; MCCLATCHY, C.; PAUKETT, M. (2016). Arsenic, lead, and cadmium in u.s. mushrooms and substrate in relation to dietary exposure. *Environ. Sci. Technol.*, 50: 9661-9670.
- SLEKOVEC, M.; IRGOLIC, K.J. (1996). Uptake of arsenic by mushrooms from soil. *Chem. Speciat. Bioavail.*, 8: 67-73.
- SMITH, A.H.; BIGGS, M.L.; MOORE, L.; HAQUE, R.; STEINMAUS, C.; CHUNG, J.; HERNANDEZ, A.; LOPIPERO, P. (1999). Cancer risks from arsenic in drinking water: implication for drinking water standards In: Chappell WR, Abernathy CO, Calderon RL, editors. Arsenic exposure and health effects. Elsevier Science. p 191-199.
- STEENLAND, K.; BOFFETTA, P. (2000). Lead and cancer in humans: where are we now? *Am. J. Ind. Med.*, 38: 295-299.
- SUN, L.; LIU, G.; YANG, M.; ZHUANG, Y. (2012). Bioaccessibility of cadmium in fresh and cooked *Agaricus blazei* Murill assessed by in vitro biomimetic digestion system. *Food Chem. Toxicol.*, 50: 1729-1733.
- SVOBODA, L.; ZIMMERMANNNOVÁ, K.; KALÁČ, P. (2000). Concentrations of mercury, cadmium, lead and copper in fruiting bodies of edible mushrooms in an emission area of a copper smelter and a mercury smelter. *Sci. Total Environ.*, 246: 61-67.
- SVOBODA, L.; KALÁČ, P.; ŠPIČKA, J.; JANOUŠKOVÁ, D. (2002). Leaching of cadmium, lead and mercury from fresh and differently preserved edible mushroom, *Xerocomus badius*, during soaking and boiling. *Food Chem.*, 79: 41-45.
- VALVERDE, M.; HERNÁNDEZ-PÉREZ, T.; PAREDES-LÓPEZ, O. (2015). Edible mushrooms: improving human health and promoting quality life. *Int. J. Microbiol.*, 376387.
- VERSANTVOORT, C.H.M.; VAN DE KAMO, E.; ROMPELBERG, C.J.M. (2004). Development and applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of contaminants from food. RIVM Report 320102002/2004. National Institute for Public Health and the Environment, The Netherlands.
- VETTER, J. (2004). Arsenic content of some edible mushroom species. *Eur. Food Res. Technol.*, 219: 71-74.
- XIONG, C. (2010). Adsorption of cadmium (II) by chitin. *J. Chem. Soc. Pak.*, 32: 429-435.
- ZHANG, J.; LI, T.; YANG, Y.L.; LIU, H.G.; WANG, Y.Z. (2015). Arsenic concentrations and associated health risks in *Laccaria* mushrooms from Yunnan (SW China). *Biol. Trace Elem. Res.*, 164: 261-266.