

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA

GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



**DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO INORGÁNICO EN
PRODUCTOS SIN GLUTEN**

TRABAJO FIN DE GRADO

Septiembre-2016

Autor: Elena López Olmo

Tutor/es: Francisco Miguel Burló Carbonell

Marina Cano Lamadrid

TÍTULO

Determinación de arsénico inorgánico en productos sin gluten

Determination of inorganic arsenic in gluten-free products

RESUMEN

Numerosos estudios han demostrado la relación entre el arsénico (As) y el arroz. El arroz es el cereal más consumido por la población celiaca y esta enfermedad va en aumento en los últimos años, por lo tanto, existe un especial interés en determinar la presencia de As-i (forma más tóxica del arsénico) en productos sin gluten elaborados a base de arroz. El presente estudio analiza el As-i existente en galletas, magdalenas, bizcochos de chocolate y pan. Se observó que las muestras con mayor contenido en As-i fueron las galletas con 68 μg As-i/kg de producto, siendo cantidades inferiores a lo que marca el Reglamento 2015/1006, sin embargo este Reglamento debe tratar sobre el contenido máximo de As-i en productos destinados para personas celiacas ya que es un grupo de población con alto riesgo de contaminación.

Palabras clave: *Oryza sativa*, especiación, elementos traza, límite de ingesta, toxicidad

ABSTRACT

Numerous studies show the relationship between arsenic (As) and rice. Rice is the most consumed cereal by celiac population and this disease is increasing in recent years. This is why there is a special interest in the knowledge of the presence of As-i (most toxic form of arsenic) in gluten-free rice-based products. This study determined the quantity of As-i in cookies, muffins, brownies and bread. It was observed that the group with the highest i-As content was cookies with 68 μg As-i/kg of product. This value was lower than the existing limit in "Reglamento 2015/1006". However it is necessary to review it to fix a maximum content of i-As in these kind of products, due to celiac population is a group with high risk of contamination though the rice and rice-based products intake.

Keywords: *Oryza sativa*, speciation, trace elements, intake limit, toxicity

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	6
1.1 Arsénico	8
1.1.1 Arsénico inorgánico	9
1.1.2 Arsénico orgánico	10
1.1.3 Vías de contaminación	10
1.1.4 Toxicidad	12
1.1.5 Metabolismo	14
1.2 Celiaquía	15
1.2.1 Definición	15
1.2.2 Epidemiología	16
1.2.3 Formas clínicas	17
1.2.4 Tratamiento	18
1.2.5 Etiquetado de productos sin gluten	21
1.3 Arsénico en arroz	22
1.3.1 Importancia del arroz en alimentación sin gluten	23
1.3.2 Límites de ingesta tolerable	24
2. OBJETIVOS	25
3. MATERIAL Y MÉTODOS	26
3.1 Diseño experimental	26
3.2 Materiales	26
3.2.1 Equipos	26
3.2.2 Material	29
3.2.2.1 Limpieza	30
3.2.3 Reactivos	31
3.2.4 Recomendaciones generales	31

3.3 Muestras	32
3.3.1 Material de referencia	32
3.3.2 Muestras de alimentos sin gluten	33
3.3.2.1 Preparación de las muestras	39
3.4 Método analítico	39
3.4.1 Determinación de arsénico inorgánico	39
3.4.1.1 Digestión en horno microondas	39
3.4.1.1.1 Preparación de reactivos	40
3.4.1.1.2 Preparación de muestra	40
3.4.1.1.3 Digestión	40
3.4.1.2 Medición de arsénico inorgánico por HPLC-HG-AFS	41
3.4.1.2.1 Preparación de muestras	42
3.4.1.2.2 Preparación de patrones de recta de calibrado	42
3.4.1.2.3 Preparación de reactivos	44
3.4.1.2.4 Análisis en HPLC-HG-AFS	45
3.4.2 Tratamiento estadístico	46
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
4.1 Calibración para la determinación de arsénico inorgánico (As-i)	47
4.2 Resultados de arsénico inorgánico (As-i) de las muestras analizadas	50
5. CONCLUSIONES	56
6. BIBLIOGRAFÍA	58

1. INTRODUCCIÓN

Este trabajo se centra en la determinación del contenido de arsénico inorgánico (As-i) en productos sin gluten elaborados a base de arroz. Nos centramos en este tema, ya que hay numerosos estudios en los que se observa una relación entre el arsénico (As) y el arroz.

Los investigadores Burló *et al.* 2012 demostraron que los productos elaborados a partir de este cereal contienen niveles importantes de As. El objetivo fue conocer la cantidad de As que se encontraba en productos para bebés en España, ya que como ocurre con las personas celíacas, deben llevar una alimentación libre de gluten, en los primeros meses de vida para evitar una alergia futura a las proteínas del gluten.

En 2014, Munera-Picazo *et al.* estudiaron la presencia de arsénico total (As-t) en diferentes grupos de productos sin gluten destinados a población infantil (pastas, pan, cereales de desayuno, galletas con chocolate, galletas “maría”) comparándolas con productos control sin gluten elaboradas a base de maíz u otras féculas en cada uno de los grupos. Se concluyó que existía una correlación positiva entre el porcentaje de arroz y el contenido en As-t, siendo indetectable en las muestras control.

Otros dos estudios recientes destacan de la misma forma una correlación positiva entre el contenido de arroz y niveles de As en los alimentos destinados a niños menores de 1 año. En el primero de ellos, Burló *et al.*, 2012 encontraron que la concentración de As en los alimentos infantiles libre de gluten, 57 µg/mg, duplica la de los productos con gluten, tales como los multicereales con 34 µg/mg. Estos datos reflejan la diferente composición de estos alimentos: los productos sin gluten tienen una media de contenido de arroz de 80,6 % con respecto al 10-15 % de los productos con gluten; esta situación es similar a la de los productos sin gluten para celíacos, que pueden llegar a contener hasta un 95 % de arroz. En el segundo, Carbonell-Barrachina *et al.*, 2012, evaluaron la concentración de As en una amplia gama de alimentos infantiles (arroz para bebés, cereales para bebés, puré de carne y pescado y alimentos especiales) de diferentes países (China, EE.UU, Reino Unido y España). Estos autores

encontraron que las muestras sin gluten de arroz presentaban el segundo contenido más elevado de As-t y el de mayor contenido de As-i.

Por otra parte, Munera-Picazo *et al.*, 2014 observó la presencia de As-t y As-i en productos a base de arroz para productos sin gluten destinada a la población adulta, como harina, pan rallado, pasta, pan tostado, cerveza y bebidas de soja y arroz. Se concluyó que existía una correlación positiva entre el porcentaje de arroz teniendo cantidades de As-i importantes. Esta misma relación se observa en un estudio reciente sobre la cantidad de As en alimentos destinados para deportistas con contenido de arroz en su formulación (Cano-Lamadrid *et al.*, 2016).

Centrándonos en la enfermedad celíaca, ésta es una enfermedad que va en aumento en los últimos años, siendo la prevalencia en España de 1 persona por cada 118 en la población infantil y 1 por cada 389 en la población adulta. Por tanto, esta prevalencia de personas celíacas junto con la presencia y toxicidad del As en el arroz, cereal más consumido por esa población, hace que se cree un interés en determinar la presencia de As-i, forma más tóxica del arsénico, en otros productos aptos para celíacos no estudiados hasta el momento. Los productos sin gluten escogidos en este trabajo son pan, galletas, magdalenas y bizcochos de chocolate, productos que tienen una importancia en la alimentación diaria de niños y adultos.

Es importante remarcar que el 1 de Enero del 2016 entró en vigor el Reglamento 2005/1006 donde ya aparece el contenido máximo permitido de arsénico en algunos productos provenientes de arroz y destinados a algún grupo de población, como es la población infantil. Sin embargo, hay que dar importancia al colectivo de celíacos, colectivo con un alto consumo de arroz y con mayor riesgo. Por lo tanto, es imprescindible hacer estudios que relacionen el As del arroz y de productos a base de este cereal con su consumo en esta población, para poder establecer un límite máximo de As en estos productos.

1.1 ARSÉNICO

El arsénico es un elemento químico con propiedades intermedias entre metales y no metales, denominado metaloide, por lo tanto, puede estar ligado al carbono, hierro, oxígeno, hidrógeno y sulfuro, formando especies de arsénico orgánicas e inorgánicas en diferentes estados de oxidación.

Este compuesto se encuentra en el grupo V de la Tabla periódica y cuyo símbolo es As. Sus características son las siguientes:

Tabla 1. Propiedades del As.

Número atómico	33
Valencia	-3, 0, +3, +5
Estado de oxidación	+5
Electronegatividad	2,1
Radio covalente (Å)	1,19
Radio iónico (Å)	0,47
Radio atómico (Å)	1,39
Configuración electrónica	(Ar)3d ¹⁰ 4s ² 4p ³
Potencial 1º de ionización (eV)	10,08
Masa atómica (g/mol)	74,922
Densidad (g/mL)	5,72
Punto de ebullición (°C)	613
Punto de fusión (°C)	817

En la naturaleza se pueden encontrar formas arsenicales como compuestos orgánicos e inorgánicos, con propiedades y toxicidad diferente.

Las formas presentes del arsénico en el medio ambiente son:

Tabla 2. Formas del As

	Especie	Forma química
As inorgánico	Arsenitos (As III)	H_3AsO_3
	Arseniatos (As V)	H_3AsO_4
As orgánico	Monometilarsonato (MMA)	$CH_3AsO(OH)_2$
	Dimetilarsinato (DMA)	$(CH_3)_2AsO(OH)$
	Arsenobetaina (ASB)	$(CH_3)_3As^+-CH_2-COO^-$
	Arsenocolina (ASC)	$(CH_3)_3As^+-CH_2-CH_2-OH$

1.1.1 Arsénico inorgánico

EL As-i se encuentra en estado trivalente y pentavalente, estos últimos son menos tóxicos que los trivalentes debido a que la afinidad con los grupo tiol (-SH) de las proteínas es menor (Kreppel *et al.*, 1993).

Los compuestos más frecuentes de As-i trivalente son el trióxido de arsénico, arsenito de sodio y tricloruro de arsénico.

En cuanto a la forma pentavalente se encuentra el pentóxido de arsénico, ácido arsénico y arseniatos de plomo y calcio (Goyer, 1986), estos compuestos son menos tóxicos que los trivalentes ya que la afinidad con los grupo tiol (-SH) de las proteínas es menor (Kreppel *et al.*, 1993).

Los derivados arsenicales con un estado de oxidación -3 son menos frecuentes, como la arsina y los arseniuros (Fabiani *et al.*, 1984; Arnold, 1987), pero a pesar de su escasez, la arsina es el compuesto arsenical de mayor toxicidad.

1.1.2 Arsénico orgánico

El arsénico está presente en numerosos compuestos de carácter orgánico, ya que posee una alta estabilidad en condiciones normales de pH y potencial redox.

Estas especies orgánicas se encuentran en menor concentración que las especies de arsénico inorgánico y el aumento de su concentración se debe a la metilación de las especies inorgánicas debido a la enzima arsenito reductasa.

El As-o se encuentra también de forma trivalente y pentavalente. Las formas trivalentes son el ácido arsenioso o formas mezcladas como consecuencia de la biometilación por organismos del suelo, y el agua (Goyer, 1986). Y las formas pentavalentes son el ácido dimetilarsónico (ADMA) y el ácido monometilarsónico (AMMA), formas de As-o dominantes (Hasegawa *et al.*, 1999), además de compuestos orgánicos derivados del As en organismos marinos como son la arsenobetaina, arsenocolina, arsenolípidos y arsenoazúcares (WHO, 1981).

1.1.3 Vías de contaminación

El arsénico está ampliamente distribuido en la corteza terrestre y las principales vías de exposición al As para los seres humanos son el aire, el agua, el suelo, y en especial los alimentos.

Los elementos químicos del grupo V de la Tabla periódica son muy abundantes en la corteza terrestre, el As ocupa el tercer lugar de éstos (Housecroft *et al.*, 2006), en forma de arseniatos, arsenitos y óxidos de arsénicos.

Las fuentes de contaminación por As pueden deberse a procesos naturales (erupciones volcánicas, ciclo biológico de microorganismos, plantas, animales...) o bien a procesos derivados de la actividad humana (emisión residuos, uso de plaguicidas y fertilizantes).

La entrada de As en la cadena alimentaria se origina en la contaminación del suelo básicamente (Williams *et al.* 2007). Las vías principales vías de contaminación en el suelo son:

- **Calidad del agua de riego:** cantidad de As presente en el agua. Las tierras de Bengala Occidental (India) fueron regadas con agua contaminada por As (Meharg *et al.* 2003). Gosh *et al.* (2004) seguidamente demostraron la presencia de elevadas concentraciones de este metaloide en el suelo de la zona mencionada.
- **Uso de productos fitosanitarios** (con elevada concentración de As): ocasiona un incremento de la concentración de As al suelo y a las aguas. Hoy en día, se limita el contenido de este elemento en los fitosanitarios para poder controlar la contaminación.

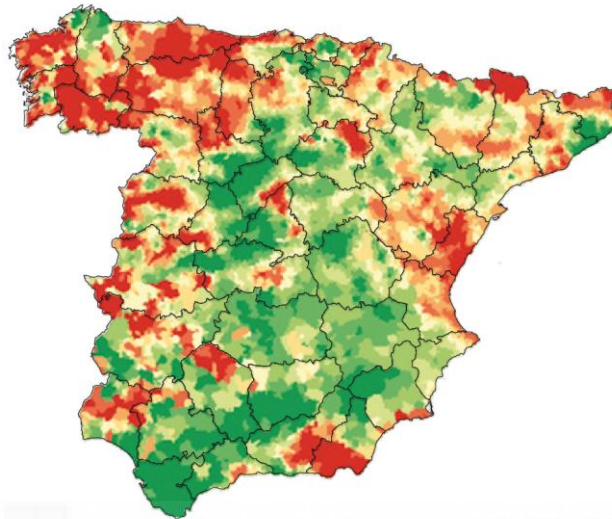
El nivel de contaminación de los suelos depende de varios factores principalmente los que determinan la capacidad de absorción y retención: textura de los suelos, el contenido de sesquiterpenos y presencia de otros compuestos que puedan influir. Se ha demostrado que la arcilla es el principal material absorbente de As (Carbonell Barrachina *et al.* 1995).

Se puede observar en la Figura 3 el mapa de concentración de As en suelos de España.

Concentración de arsénico en el suelo

mg/kg

1,00- 6,53	6,53- 8,65	8,65- 10,33	10,33- 11,96	11,96- 13,70	13,70- 15,44	15,44- 17,58	17,58- 21,19	21,19- 99,37
---------------	---------------	----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------



Fuente: IGME. EL PAÍS

Figura 1. Concentración de arsénico en suelos

Científicos del Centro Nacional de Epidemiología han detectado una “asociación estadística” entre la concentración de arsénico en el suelo y una mayor mortalidad por diferentes tipos de cáncer en España.

1.1.4 Toxicidad

La toxicidad del As depende de la forma química en que sea ingerido, dependiendo del estado de oxidación y de su solubilidad. El As-i tiene una mayor biodisponibilidad que el As-o, es decir la cantidad de arsénico que puede pasar al torrente sanguíneo (Domínguez, 2009).

El As se diferencia de la mayor parte del resto de los elementos químicos en que los compuestos inorgánicos son más tóxicos que los compuestos orgánicos (O'Neill, 1995). En la Figura 2, se puede observar de forma visual la toxicidad de las especies arsenicales. El arsenito y arseniato (formas inorgánicas) muestran un nivel de

toxicidad elevada en comparación con las especies organoarsenicales (Pardo *et al.* 2001), debido a que son más hidrosolubles. Entre las formas inorgánicas, las que presentan mayor toxicidad son las trivalentes respecto a las pentavalentes (ATSDR, 1989). La especie más tóxica es la arsina, cuya dosis letal, para el 50% de la población en ratas (LD_{50}), es de 3 mg/kg, seguido del arsenito, As (III), con un valor de LD_{50} entre 20 y 60 mg/kg y por último el arseniato As V. La toxicidad de las especies orgánicas, tales como el monometilarsénico (MMA) o el dimetilarsénico (DMA), es mucho más baja, del orden de 1000 veces menos (Harrison, 1989).

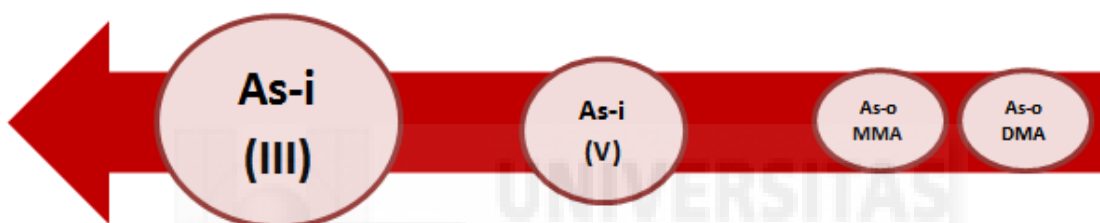


Figura 2. Toxicidad especies arsenicales

Tanto el As III, el MMA y el DMA deben su toxicidad a la inhibición de los grupos -SH de las enzimas, mientras que la toxicidad de As V se debe a que inhibe la fosforilación oxidativa. La diferencia de toxicidad entre los arsenitos y arseniatos, puede explicarse en base a la velocidad de excreción y retención en el cuerpo, así como al número de enzimas afectadas.

La Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) incluye al As-i en el grupo 1, grupo de compuestos cancerígenos (Tsuda *et al.* 1992). Varios estudios epidemiológicos han demostrado que la ingestión de As-i puede aumentar el riesgo de cáncer de la piel, hígado, vejiga y pulmones.

1.1.5 Metabolismo

El As se digiere y absorbe en el intestino, dependiendo de la solubilidad del compuesto y pasa al torrente sanguíneo almacenándose en los glóbulos blancos o en los glóbulos rojos si la dosis es elevada y se distribuye a través del organismo llegando al hígado, pulmones, bazo, piel y riñón. El As se une a las proteínas y a los grupos hidroxilos y tioles inhibiendo la acción de las enzimas, impidiendo así el correcto funcionamiento celular e incluso afectando a la estructura del ADN, por hipometilación (Sciandrello *et al.* 2004):

Este elemento presenta especial afinidad por la queratina, proteína rica en azufre que compone los tejidos córneos del cuerpo como las uñas, cabellos y parte superficial de la piel, por lo que es en estas zonas donde se acumulan de forma preferente.

La principal vía metabólica de detoxificación del As es la metilación, generándose compuestos como los ácidos monometilarsónico, dimetilarsínico o trimetilarsónico, es decir, los compuestos inorgánicos se transforman en orgánicos, siendo una respuesta protectora del organismo.

El arseniato (As V) se excreta rápidamente en la orina y aparentemente no se acumula en los tejidos. Por otro lado, el arsenito (As III) no se excreta rápidamente, se acumula en el hígado, cabello, uñas, piel y leucocitos y si no es absorbido se excreta por vía biliar (Gibson *et al.* 1982).

El principal problema para la salud habita en la acumulación del As debida a la exposición prolongada y con dosis elevadas. El cuadro clínico crónico que puede ser desencadenado se manifiesta de la siguiente manera:

- Lesiones dérmicas: cáncer de piel, hiperqueratosis y melanosis, hiperhidrosis, dermatitis.
- Lesiones de mucosas: queratoconjuntivitis que pueden llegar a necrosis y ulceración de la córnea, irritación de vías respiratoria.

- Trastornos del aparato digestivo: diarrea, náuseas, estreñimiento, hepatopatías, cirrosis, síndrome de hipertensión portal.
- Alteraciones cardiovasculares: alteraciones del electrocardiograma, arterioesclerosis.
- Trastornos del sistema nervioso: cefalea, insomnio, fasciculaciones, alteración motora.
- Trastornos hematológicos: leucopenia, anemia megaloblástica, trombocitopenia, anemia aplásica y pancitopenia.
- Efecto cancerígeno: cáncer de pulmón, de piel, leucemia, linfoma, de vejiga, angiosarcoma hepático.

1.2 CELIAQUÍA

1.2.1 Definición

La enfermedad celíaca (EC) es una intolerancia permanente al gluten del trigo, cebada, centeno y probablemente avena que se presenta en individuos genéticamente predispuestos, caracterizada por una reacción inflamatoria, de base inmune, en la mucosa del intestino delgado que dificulta la absorción de macro y micronutrientes (principios inmediatos, sales y vitaminas), cuya repercusión clínica y funcional va a depender de la edad y la situación fisiopatológica del paciente (FACE, 2001; AHRQ, 2004; Polanco *et al.*, 2010).

Esta mucosa es la capa interna que tapiza la luz del intestino, cuya misión principal es absorber los nutrientes contenidos en la dieta, una vez que han sido convenientemente digeridos por los enzimas digestivos.

La enfermedad celíaca o celiacía (EC) consiste en una intolerancia permanente a las proteínas, denominadas prolaminas, del gluten presentes en el trigo (gliadina), centeno (secalina) y cebada (hordeína), en cereales híbridos o derivados de estos,

como el triticale y el kamut, y posiblemente en la avena (avenina) por contaminación durante la cosecha, transporte o procesado con los anteriores.

Es un trastorno sistémico de naturaleza autoinmune, en el cual existe un proceso inflamatorio crónico que afecta a la mucosa y submucosa del intestino delgado superior y se caracteriza desde el punto de vista clínico, por la presencia de diversas manifestaciones sistémicas, como dolor abdominal, distensión, gases o indigestión, estreñimiento, fatiga, vómitos, retraso del crecimiento, disminución del apetito y/o diarrea que desencadena en una pérdida de peso, sin embargo, tanto en el niño como en el adulto, los síntomas pueden ser atípicos o estar ausentes, dificultando el diagnóstico.

Se han descrito numerosas asociaciones de EC con otras patologías, muchas con base inmunológica, como dermatitis herpetiforme (considerada, realmente, como la enfermedad celíaca de la piel), déficit selectivo de IgA, diabetes mellitus tipo I o tiroiditis y hepatitis autoinmune, entre otras (Polanco *et al.*, 2010).

1.2.2 Epidemiología

Según el Ministerio de Sanidad y consumo la EC afecta tanto a niños como a adultos y la relación mujer/varón es de 2:1. Está presente no sólo en Europa y los países poblados por personas de ascendencia europea, sino también en Oriente Medio, Asia, Sudamérica y Norte de África, y puede llegar a afectar hasta el 1% de la población en algunos países occidentales. La prevalencia mundial se estima en 1 persona por cada 266 personas sin intolerancia al gluten, y en España oscila entre 1 persona por cada 118 en la población infantil y 1 por cada 389 en la población adulta. Sin embargo, se considera que la prevalencia de la EC puede ser mayor ya que un porcentaje importante de casos permanece sin detectar. Así, según diversos estudios epidemiológicos realizados en todo el mundo, la EC sin sintomatología clásica es más frecuente que la forma sintomática, constituyendo un reto para el sistema sanitario su detección precoz.

1.2.3 Formas clínicas

Entre las formas clínicas de presentación cabe destacar:

- Enfermedad celíaca clásica: Se caracteriza por la aparición de síntomas graves de malabsorción, anticuerpos séricos positivos y atrofia grave de las vellosidades. Este patrón de presentación es hoy en día excepcional en la edad adulta. Los pacientes pueden cursar con síntomas digestivos o extradigestivos.
- Enfermedad pauci o monosintomática: Actualmente es la forma más frecuente de EC, tanto de la edad adulta como de la pediátrica, y puede cursar con síntomas intestinales y/o extraintestinales. El espectro histológico es variable, desde enteritis linfocítica a la atrofia total y el porcentaje de positividad de autoanticuerpos séricos es variable (15 al 100%) y dependiente de la gravedad histológica.
- Enfermedad celíaca silente: No hay manifestaciones clínicas, pero sí lesiones histológicas características (incluso atrofia de vellosidades). Estos casos suelen descubrirse bien por una determinación de marcadores séricos indicada por sospecha clínica o bien por pertenecer a alguno de los grupos de riesgo.
- Enfermedad celíaca latente: Se caracteriza por la existencia de una mucosa duodenoyeyunal normal en individuos que toman gluten en la dieta en el momento de ser evaluados, con o sin anticuerpos positivos, pero que en algún momento de su vida han presentado o van a presentar características propias de la EC.
- Enfermedad celíaca potencial: El término potencial hace referencia a aquellos individuos que no han presentado nunca alteraciones histológicas características de la enfermedad, pero por sus características genéticas (HLA-DQ2/DQ8) o inmunológicas (en ocasiones anticuerpos séricos positivos) presentan un riesgo “potencial” de desarrollarla.

- Enfermedad celíaca refractaria: Hace referencia a aquellos pacientes con lesión histológica bien documentada (generalmente con atrofia vellositaria) cuyos síntomas no desaparecen después de haber excluido el gluten de la dieta al menos durante un período de seis meses.

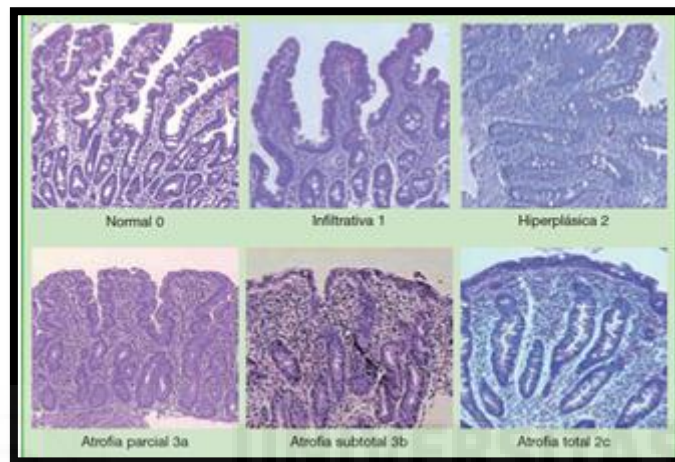


Figura 3. Clasificación de las lesiones del intestino delgado

1.2.4 Tratamiento

El único tratamiento eficaz de la enfermedad celíaca es una dieta estricta sin gluten durante toda la vida. Con ello se consigue la mejoría de los síntomas aproximadamente a partir de las dos semanas, la normalización serológica entre los 6 y 12 meses y la recuperación de las vellosidades intestinales en torno a los 2 años de tratamiento. En pacientes adultos, la respuesta clínica suele ser más lenta.

La dieta exenta de gluten (DEG) supone supresión de la dieta de todos los productos que contienen gluten, concretamente todos los productos que incluyen harinas de trigo, cebada, centeno y avena (Polanco, 2008).

Las proteínas que forman parte del gluten y que ejercen esta intolerancia son las prolaminas y se encuentran en distintos porcentajes según el cereal. El gluten se caracteriza ya que al mezclarse con agua es capaz de formar una masa gomosa viscoelástica, constituida por una serie de proteínas que permanecen después de la

digestión del almidón con diferentes puntos de solubilidad en soluciones acuosas y de alcohol, separándose en dos fracciones importantes, como son las prolaminas y las gluteninas.

Estas prolaminas poseen una alta concentración de aminoácidos glutamina (+30%) y prolina (+15%), esta gran cantidad de dichas sustancias y junto con la secuencia específica glutamina-glutamina-glutamina-prolina o bien prolina-serina-glutamina-glutamina son los responsables del efecto tóxico en la mucosa del paciente.

Por lo tanto para la recuperación completa se deben excluir las prolaminas del trigo (gliadinas) y las análogas de cebada (hordeína) y centeno (secalina). Y con respecto a la avena, estudios recientes han puesto en entredicho la toxicidad de la avena. Así, algunos autores no han objetivado recaída histológica tras cinco años de provocación con avena en celíacos adultos; otros sí encuentran lesión histológica mediada por células T específicas para avenina. En los dos estudios pediátricos más relevantes, tras un año de consumo de avena, se observa una mucosa intestinal sin alteraciones y no se detecta respuesta serológica específica frente a la avenina. Actualmente no existe unanimidad en cuanto a considerar a la avena una proteína segura para el sujeto celíaco, ya que, al ser su contenido en prolaminas muy inferior al de los tres cereales reconocidos como tóxicos, sus efectos podrían manifestarse a más largo plazo o sólo en individuos con un mayor grado de sensibilidad hacia estas prolaminas. Por ello que, en el momento actual, la recomendación más generalizada es el desaconsejar su consumo.

Tabla 3. Contenido en prolamina en cereales

CEREAL	PROLAMINA	% PROLAMINA
Trigo	Gliadina	80-90%
Cebada	Hordína	30-50%
Centeno	Secalina	30-50%
Avena	Avenina	10-15%

Son aptos para DEG aquellos alimentos que, de forma natural, no contienen prolaminas tóxicas; como carnes, pescados, huevos, leches y derivados, legumbres, frutas, verduras y hortalizas y cereales sin gluten como el maíz o arroz; e igualmente se consideran aptos los productos elaborados con almidones de los cereales tóxicos que no superan el contenido máximo de gluten autorizado por el Codex Alimentarius, i.e. 20 ppm (mg/kg) para alimentos naturalmente exentos de gluten y 200 ppm (mg/kg) para aquellos elaborados con almidón de trigo. En la Tabla 4 se presenta la clasificación de los alimentos en función a su contenido en gluten.

Tabla 4. Clasificación de alimentos en función del contenido en gluten

ALIMENTOS SIN GLUTEN	ALIMENTOS QUE PUEDEN CONTENER	ALIMENTOS CON GLUTEN
<ul style="list-style-type: none"> • Leche y derivados (quesos, requesón, nata, yogures naturales y cuajada). • Todo tipo de carnes y vísceras frescas, congeladas y en conserva al natural, cecina, jamón serrano y jamón cocido. • Pescados frescos y congelados sin rebozar, mariscos frescos y pescados y mariscos en conserva. • Huevos. • Verduras, hortalizas y tubérculos. Frutas. • Arroz, maíz y tapioca, así como sus derivados. • Todo tipo de legumbres. • Azúcar y miel. Aceites y mantequillas. • Café en grano o molido, infusiones y refrescos. • Toda clase de vinos y bebidas espumosas. • Frutos secos crudos. • Sal, vinagre de vino, especias en rama y grano y todas las naturales. 	<ul style="list-style-type: none"> • Embutidos: chorizo, morcilla, etc. • Productos de charcutería. Patés diversos. • Yogures de sabores y con trocitos de fruta. • Quesos fundidos, en porciones, de sabores. • Conservas de carnes. Conservas de pescado con distintas salsas. • Caramelos y gominolas. • Sucedáneos de café y otras bebidas de máquina. • Frutos secos fritos y tostados con sal. • Helados. Sucedáneos de chocolate. • Colorante alimentario. 	<ul style="list-style-type: none"> • Pan y harinas de trigo, cebada, centeno, triticale, y probablemente la avena. • Productos manufacturados en cuya composición figure cualquiera de las harinas ya citadas y en cualquiera de sus formas: almidones, almidones modificados, féculas, harinas y proteínas. • Bollos, pasteles, tartas y demás productos de pastelería. • Galletas, bizcochos y productos de pastelería. • Pastas italianas (fideos, macarrones, tallarines, etc.) y sémola de trigo. • Bebidas malteadas. • Bebidas destiladas o fermentadas a partir de cereales: cerveza, agua de cebada, algunos licores, etc.

1.2.5 Etiquetado de productos sin gluten

Según el *REGLAMENTO (CE) No 41/2009 DE LA COMISIÓN de 20 de enero de 2009 sobre la composición y etiquetado de productos alimenticios apropiados para personas con intolerancia al gluten*, cuyo contenido se resume a continuación:

1. Los productos alimenticios para personas con intolerancia al gluten, constituidos por uno o más ingredientes procedentes del trigo, el centeno, la que supere los 100 mg/kg en los alimentos tal como se venden al consumidor final.

2. El etiquetado, la publicidad y la presentación de los productos mencionados en el apartado 1 llevarán la mención «contenido muy reducido de gluten». Pueden llevar el término «exento de gluten» si el contenido de gluten no sobrepasa los 20 mg/kg en total, medido en los alimentos tal como se venden al consumidor final.

3. La avena contenida en alimentos para personas con intolerancia al gluten debe ser producida, preparada o tratada de forma especial para evitar la contaminación por el trigo, el centeno, la cebada, o sus variedades híbridas y su contenido de gluten no debe sobrepasar los 20 mg/kg.

4. Los productos alimenticios para personas con intolerancia al gluten constituidos por uno o más ingredientes que sustituyan el trigo, el centeno, la cebada, la avena o sus variedades híbridas, no contendrán un nivel de gluten que supere los 20 mg/kg en los alimentos tal como se venden al consumidor final. El etiquetado, la presentación y la publicidad de esos productos deberá llevar la mención «exento de gluten».

5. En caso de que los productos alimenticios para personas con intolerancia al gluten contengan tanto ingredientes que sustituyen el trigo, el centeno, la cebada, la avena o sus variedades híbridas como ingredientes procedentes del trigo, el centeno, la cebada, la avena o sus variedades híbridas que hayan sido tratados de forma especial para eliminar el gluten, se aplicarán los apartados 1, 2 y 3 y no se aplicará el apartado 4.

6. Los términos «contenido muy reducido de gluten» o «exento de gluten» mencionados en los apartados 2 y 4 deberán aparecer muy cerca del nombre comercial del producto.

1.3. ARSÉNICO EN ARROZ

El arroz (*Oryza Sativa*) es una monocotiledónea que se encuentra dentro de la familia de las gramíneas y subfamilia de las *Poaceas*. Su cultivo se realiza en condiciones de inundación, quedando disponible el arsénico y absorbiéndolo por la planta junto con el agua.

Esto se consigue ya que las plantas de arroz oxigenan su rizosfera mediante la formación de placas de oxi-hidróxidos de hierro, placas encargadas de secuestrar el As, y más concretamente el arsenito ya que es a muestra más móvil, conforme aumente la cantidad de As secuestrado en las placas, habrá menos translocación de As a otras partes de la planta, como por ejemplo, los granos de arroz.

La biodisponibilidad del arsénico en la planta depende del cultivar, del arsénico presente en el agua de riego y de la presencia y naturaleza de la especiación de arsénico en el agua de cocción y de la variedad de arroz que determina la cantidad de placas de hierro que secuestran el As (Juhasz *et al.*, 2006).

También juega un papel importante la mineralización del suelo, ya que puede regular la concentración en la disolución del suelo de las especies de As mediante la formación de sales de As de baja solubilidad (Meharg, 2004).

En España, el arroz comercializado con el que también se podría fabricar muchos productos derivados, contiene niveles de As-t entre 100 µg/kg y 350 µg/kg, llegando el inorgánico a niveles de 253 µg/kg (Torres-Escribano *et al.*, 2008; Burló *et al.*, 2010). O incluso puede variar entre 100 a 400 µg/kg y a veces más altas (Sun *et al.*, 2008; Meharg *et al.*, 2009).

1.3.1 Importancia del arroz en alimentación sin gluten

El arroz es uno de los tres cereales más importantes a nivel mundial, junto con el trigo y el maíz, debido a su volumen de producción. Aunque en menor tonelaje que los anteriores, es con mucho el cereal más importante en términos de las personas que dependen de él, ya que es sustento para 2/3 partes de la población mundial (Callejo, 2002; Dendy y Dobraszczyk, 2004). Además, es un cereal básico en la alimentación de personas celiacas.

Según datos de la FAO, si nos centramos en el consumo mundial de arroz *per cápita* observamos que en el 2015/2016 el consumo medio es de 54,4 Kg, valor ligeramente superior a la estimación del año pasado debido principalmente al pequeño incremento en Asia con 78,7 kilogramos por persona. Teniendo en cuenta que este es el consumo de una persona no celiaca, hay que tener en cuenta que el colectivo de celiacos tiene un consumo de este cereal mucho mayor y por tanto, mayor la toxicidad debido a la cantidad de arroz consumido directamente, así como todos los productos elaborados a partir de arroz que la población celiaca consume.

El arroz es por lo tanto esencial para la fabricación de productos para celíacos y alcanza altos porcentajes en sus formulaciones.

A diferencia del trigo, el arroz se consume como grano generalmente, sin embargo este cereal también se elabora en forma de harinas para productos de producción de productos sin gluten. Este cereal es una buena opción para productos sin gluten debido a su baja alergenicidad, alta digestibilidad, suavidad y al valor nutricional (Meharg *et al.*, 2008) que poseen las proteínas del arroz en comparación con las del trigo, cebada, centeno y avena.

1.3.2 Límites de ingesta tolerable

El 12 de octubre de 2009, la Comisión Técnica Científica de Contaminantes de la Cadena Alimentaria (Contam) de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) concluyó que la ingesta semanal tolerable provisional (ISTP) que hasta ahora estaba permitida de 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal establecida por el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) ha dejado de ser apropiada, ya que hay datos que muestran que el arsénico inorgánico causa cáncer de pulmón, de vejiga y de piel, y se ha comunicado que produce una serie de efectos nocivos con exposiciones inferiores a las revisadas por el JECFA. Por lo tanto, la Contam estableció un límite de confianza inferior de la dosis de referencia (BMDL_{01}) situado entre 0,3 y 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal al día para los cánceres de pulmón, piel y vejiga, así como para las lesiones cutáneas. En el dictamen científico se consideró que la exposición alimentaria al As-i estimada que correspondía a un nivel de consumo medio o alto en Europa se situaba dentro del rango de valores del BMDL_{01} establecido, por lo que el margen de exposición es reducido o inexistente y no puede excluirse que se plantee un riesgo para algunos consumidores.

Por lo tanto en 2015 se publicó el Reglamento 2015/1006 donde se trata el contenido máximo de arsénico inorgánico en los productos alimenticios. Este contenido máximo de arsénico inorgánico se empezó a aplicar recientemente, el 1 de Enero del 2016. El Reglamento 2015/1006 establece niveles de As-i en productos elaborados como galletas, pasteles, obleas a base de arroz por debajo de 0,30 mg/kg de peso fresco, y arroz destinados a la producción de alimentos para lactantes y niños de corta edad por debajo de 0,10 mg/kg de peso fresco, arroz elaborado no sancochado por debajo de 0,20 mg/kg de peso fresco y arroz sancochado y descascarado por debajo de 0,25 mg/kg de peso fresco.

Sin embargo los contenidos máximos de este contaminante deben revisarse para grupos de población con un consumo elevado de arroz y/o de productos elaborados a base de este cereal como es el colectivo de celíacos.

2. OBJETIVOS

El presente Trabajo Fin de Grado tiene los siguientes objetivos:

- Determinar el contenido de arsénico inorgánico en alimentos básicos para personas celíacas, usando para ello productos específicos para este grupo de población y que contengan arroz en su formulación.
- Proponer a los fabricantes una serie de recomendaciones relativas al etiquetado de estos productos, al uso de variedades y de procedencias de arroz y también a las autoridades competentes.
- Por último, exigir a los organismos encargados de la seguridad alimentaria la revisión de la reglamentación en materia de arsénico en arroz como son la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) y la European Food Safety Authority (EFSA).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

En este trabajo se llevó a cabo el análisis de 4 grupos de alimentos destinados al consumo de niños celíacos, estos alimentos fueron: pan, galletas, magdalenas y bizcochos de chocolate. En cada uno de los grupos se utilizó un producto de referencia sin contenido arroz y sustituido por maíz, excepto en el grupo de bizcochos de chocolate, ya que no se encontró ningún producto con características similares hecho a base de otro cereal sin gluten que no fuera el arroz. El porcentaje de arroz fue variable, o incluso desconocido ya que no aparece en la etiqueta y el proveedor se negó a dar esta información. Un total de 21 muestras fueron analizadas.

Todos los productos fueron comprados en las provincias de Alicante en cadenas de supermercados que se encuentran por todo el país, siendo marcas conocidas nacional e internacionalmente.

La mineralización de estos productos se llevó a cabo por digestión en horno microondas (MW) y la determinación de arsénico inorgánico con cromatografía líquida de alta resolución asociada a generación de hidruros-espectroscopía de fluorescencia atómica (HPLC-HG-AFS).

3.2 MATERIALES

3.2.1 Equipos

Los equipos utilizados para la preparación de las muestras son:

- Molinillo *Taurus*, modelo Aromatic (Figura 4)
- Balanza de precisión *Mettler Toledo*, modelo AG204. (max. 210 g; d=0,1 mg) (Figura 5)

- Sistema Milli-Q de obtención de agua ultrapura, modelo MIIPAK MILLIPORE (Gif-Sur-Yvette, Francia) (Figura 6)
- Micropipetas *BioPette* (Figura 7)
- Horno de aire *Selecta*, de 0-200°C (Figura 8)
- Centrifuga *Sigma*, modelo 3-16PK (Figura 9)
- Agitador magnético *OVAN*, modelo MBG05E (Figura 10)
- pHmetro *EUTECH INSTRUMENTS*, modelo 510 (Figura 11)

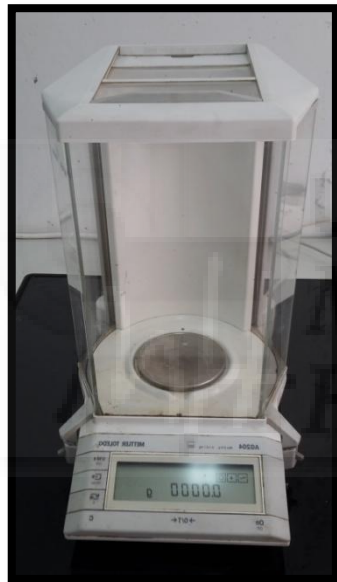


Figura 4. Molinillo Taurus



Figura 5. Báscula de precisión



Figura 6. Sistema Milli-Q



Figura 7. Micropipeta



Figura 8. Horno de aire caliente



Figura 9. Centrífuga



Figura 10. Agitador magnético

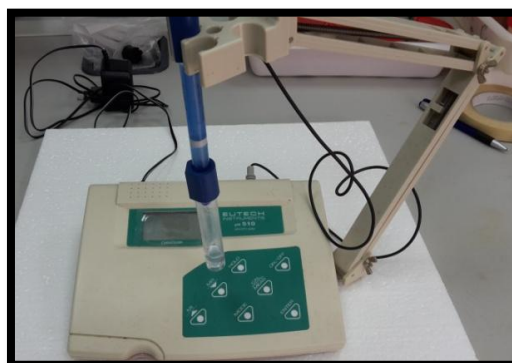


Figura 11. pHmetro

Los equipos utilizados para la determinación de arsénico son:

- Horno de microondas *Milestone S.r.l*, modelo Start D (Figura 12)
- HPLC-HG-AFS *P S Analytical*, Modelo Myllenium system (Figura 13)



Figura 12. Horno de microondas



Figura 13. HPLC-HG-AFS

3.2.2 Material

- Material de vidrio (vasos de precipitado, matraces aforados, probetas, embudos, tubos, recipientes) (Figura 14)
- Tubos de plástico (guardar las muestras molidas)
- Filtros de Nylon de 0,45 μm (Figura 15)
- Jeringuillas de plástico (Figura 15)
- Tubos de centrífuga de HDPE de 60 mL con tapa (Figura 16)
- Parafilm PM996
- Espátula
- Recipientes de teflón del horno MW (Figura 17)
- Botella de agua ultrapura
- Gradillas



Figura 14. Material de vidrio



Figura 15. Filtro y jeringuilla



Figura 16. Tubos de centrifuga



Figura 17. Recipientes de teflón

3.2.2.1 Limpieza

Como en otros estudios (Laserna, 1985; Pomeranz *et al.*, 1984; Cornelis, 1993), se enfatizó la necesidad de una limpieza exhaustiva del material utilizado en este trabajo. Para ello se lavó con agua desionizada y jabón neutro sin fosfatos y posteriormente enjuagado doble con agua ultrapura. Tras este lavado inicial se realizó un baño con una disolución de ácido nítrico (HNO_3) al 30% (v/v) durante 24 horas. Tras este periodo de enjuagó con agua desionizada seguida de agua ultrapura desionizada por triplicado para ser secado finalmente al aire.

3.2.3 Reactivos

- Ácido nítrico, HNO_3 , concentrado al 69%, de la marca *Panreac Química*.
- Ácido clorhídrico, HCl , concentrado al 35%, de la marca *Panreac Química*.
- Hidróxido de sodio en lentejas, NaOH , con una riqueza del 98%, de la marca *Labkem*.
- Borohidruro sódico, NaBH_4 , con una pureza del 99%, de la marca *Fluka Analytical*.
- Agua ultrapura desionizada mediante el sistema Milli-Q (MILLIPORE, Gif-Sur Yvette, Francia), de resistividad específica $=18,2\text{M}\Omega/\text{cm}$.
- Potasio di-hidrogenofosfato, KH_2PO_3 , de la marca *Scharlau*
- Fosfato de potasio, KHPO_4 , de la marca *Panreac Química*.
- NaAsO_2 , con una pureza del 98%, de la marca *Panreac Química*.
- $\text{NaHASO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, de la marca *Panreac Química*.
- $\text{CH}_4\text{AsNaO}_3 \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$, con una pureza 99,5%, de la marca *Chem Service*
- $(\text{CH}_3)_2\text{AsNaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, de la marca *Fluka Chemika*



Figura 18. Reactivos utilizados

3.2.4 Recomendaciones generales

En general, para el análisis de trazas metálicas, deben tenerse en cuenta las siguientes recomendaciones de Blanco *et al.*, 1991:

- Extremar las precauciones en cuanto a limpieza del material que, a su vez, debe ser lo más inerte posible.

- Asimismo, los reactivos deben tener una pureza elevada, exentos de metales. Hay que evitar al máximo la contaminación procedente del aire o polvo presente en el laboratorio.
- Reducir, en lo posible, el número de pasos necesarios para la determinación así como del material empleado.
- Observar estrictamente los procedimientos de preparación de muestras, vigilando los tiempos y las temperaturas.
- Realizar los análisis al menos por triplicado contrastando los resultados con otros laboratorios.

3.3 MUESTRAS

3.3.1 Material de referencia

El material de referencia fue utilizado para evaluar la eficacia tanto de los métodos analíticos. Este material de referencia es harina de arroz SRM 1568a, con una cantidad en Arsénico de $0,29 \pm 0,03$ mg/Kg.



Figura 19. Material de referencia

3.3.2 Muestras de alimentos sin gluten

Los productos analizados fueron comprados en supermercados nacionales de la provincia de Alicante. Un total de 21 alimentos para celíacos fueron analizados

Los productos se dividieron en 4 grupos:

1. Pan;
2. Galletas;
3. Magdalenas; y,
4. Bizcochos de chocolate.

En cada uno de los grupos se utilizó un producto de referencia que no contenía arroz en su composición, excepto el grupo de bizcochos de chocolate, que no se encontró ningún producto con características similares hecho a base de otro cereal sin gluten que no fuera el arroz.





En la Tabla 5 que se muestra a continuación se realiza una descripción de las características de cada uno de los productos.



Tabla 5. Características de etiquetado de los productos trabajados

Cod.	PRODUCTO	MARCA	FOTO	INGREDIENTES	% ARROZ
1	Galletas clásicas	Schar		Almidón de maíz, harina de maíz, mantequilla, azúcar, almidón de tapioca modificado, huevos, leche entera en polvo, jarabe de remolacha, emulgente: esteres monoacetil y diacetil tartárico de los mono- y diglicéridos de los ácidos grasos, gasificantes: carbonato ácido de amonio, carbonato ácido de sodio; sal, aromas naturales, acidificante: ácido cítrico.	0
1A	Cookies con chips de chocolate	Gerblé		Azúcar, grasa vegetal no hidrogenada de palma, harina de maíz, harina de teff orgánica, pepitas de chocolate (pasta de cacao, azúcar, manteca de cacao, emulgentes: lecitinas de soja, aroma natural de vainilla), harina de arroz , almidón de mandioca, azúcar, jarabe de glucosa (dióxido de azufre) aroma, emulgente: lecitinas de nabina, gasificante: carbonatos de amonio, espesante: goma xantana, almidón de arroz y sal	9
1B	Galletas al cacao	Gerblé		Harina de arroz , azúcar, grasas vegetales no hidrogenadas de palma y coco, almidón de maíz, caco desgrasado en polvo, almidón de patata, harina de maíz, dextrosa, jarabe de glucosa, aceite de girasol, almidón de arroz , gasificantes: carbonatos de sodio, espesante: goma xantana, aromas, emulgente: lecitina de soja, sal	28
1C	Galletas de mantequilla	Gerblé		Harina de arroz , mantequilla, azúcar, huevo entero pasteurizado, jarabe de glucosa, almidón de maíz pregelatinizado, espesante: goma guar, gasificantes: difosfatos y carbonatos de sodio, almidón de maíz, aroma	47
1D	Galletas de mantequilla	Schar		Almidón de maíz, mantequilla, harina de maíz, azúcar, harina de soja, jarabe de glucosa, sal, almidón de arroz , almidón de maíz modificado, gasificantes: carbonato ácido de amonio, carbonato ácido de sodio; aroma natural de vainilla, acidificante: ácido cítrico	ND^y
1E	Cookie cacao	Gerblé		Harina de arroz , margarina (grasas vegetales no hidrogenadas de palma y de nabina, agua, sal, emulgentes: mono y diglicéridos de ácidos grasos y lecitinas, acidulante: ácido cítrico, aromas, colorante: carotenoides), azúcar, huevos enteros pasteurizados, cacao en polvo, pepitas de chocolate (pasta de cacao, azúcar. Emulgente: lecitina de soja, aroma), proteínas de leche, almidón de maíz y arroz , copos de patata, espesante: goma guar, huevo en polvo, jarabe de glucosa, gasificantes: difosfatos y carbonato de sodio, dextrosa, aromas	20

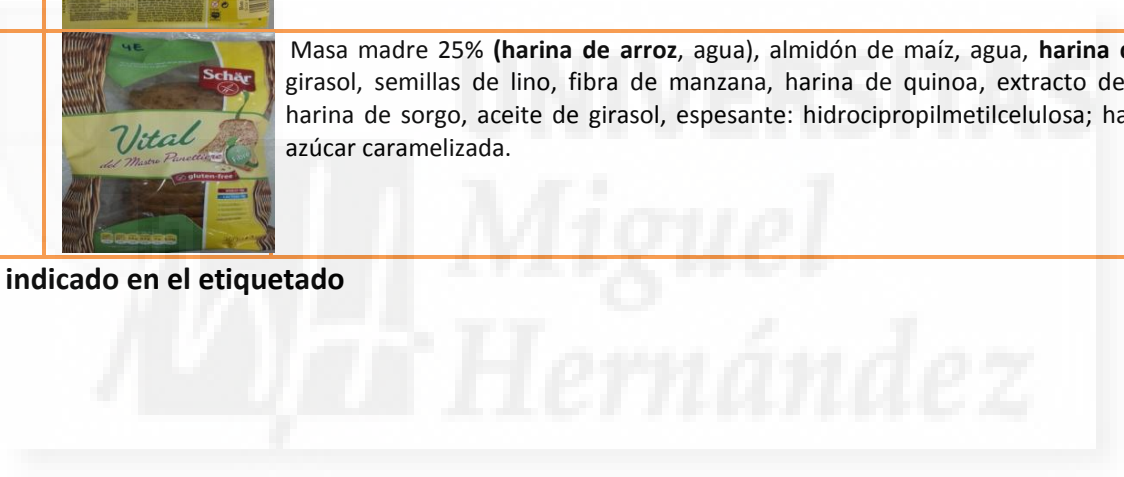
Cod.	PRODUCTO	MARCA	FOTO	INGREDIENTES	%ARROZ
2	Magdalenas	Noglut		Agua, aceite vegetales (girasol, oliva), azúcar moreno de caña integral, albúmina de huevo en polvo, maltodextrina de patata, almidón de patata, almidón de maíz, jarabe de glucosa-fructosa, aromas, emulgentes (mono y diglicéridos de los ácidos grasos, ésteres poliglicéricos de ácidos grasos), casinato cálcico, gasificantes (pirofosfato ácido de sodio, bicarbonato sódico), huevo en polvo, aroma natural, estabilizante (hidropropilmetilcelulosa), acidulante (ácido láctico)	0
2A	Magdalenas	Gerblé		Huevo entero, azúcar, fécula de patata, margarina (agua, grasa vegetal no hidrogenada de palma, emulgentes: mono y diglicéridos de ácidos grasos, corrector de la acidez: ácido cítrico), harina de arroz , estabilizante: glicerol de origen vegetal, jarabe de glucosa deshidratado, harina de maíz, almidón de maíz, emulgente (lecitina de nabina, fécula de patata BIO, espesante: goma guar, gasificantes: difosfatos, carbonatos de sodio y fosfatos de calcio; aromas, sal, conservante: propionato de calcio	4.1
2B	Magdalenas	Sinblat		Huevo, azúcar, aceite de girasol alto oleico, harina integral de arroz , almidón de maíz, azúcar, fécula de patata, fibra de remolacha, inulina, gasificantes (difosfato disódico y bicarbonato de sodio), humectantes (sorbitol, glicerina), emulgentes (mono- y diglicéridos de ácidos grasos, E472b, E477), harina de soja, estabilizante (goma de xantana), aromas, conservadores (ácido sórbico, propionato sódico)	ND [‡]
2C	Magdalenas	Airos		Aceite de girasol, huevo, azúcar, almidón de arroz , albúmina de huevo, proteínas de leche (caseinato sódico y cálcico), humectante (E422), gasificantes (E450, E500), harina de soja, sal, fibra de maíz, fécula de patata, conservador (E200), expectante (E415), aroma, antioxidante (3300)	ND [‡]
2D	Muffins	Schar		Huevo, azúcar, aceite de girasol, harina de arroz , harina de maíz, almidón de maíz, yogur desnatado, emulgente: mono- y diglicéridos de ácidos grasos, estearoil lactilato sódico; almidón de arroz , gasificantes: tartrato monopotásico, carbonato ácido de sodio; extracto de fruta (algarroba, manzana), albúmina en polvo, sal, espesante : goma xantana, aromas naturales	ND [‡]

Cod.	PRODUCTO	MARCA	FOTOS	INGREDIENTES	%ARROZ
3A	Brownies	Gerblé		Aceite de girasol, azúcar, chocolate (pasta de cacao, azúcar, manteca de cacao, emulgente: lecitinas de soja, aroma natural de vainilla), avellanas, harina de arroz , almidón de maíz, humectante: sorbitoles, cacao en polvo desgrasado, emulgente: lecitinas de nabina, conservador: propionato de calcio, espectante: goma xantana	5,4
3B	Minibizcochos al chocolate	Gerblé		Huevo entero, azúcar, grasa vegetal no hidrogenada de palma, fécula de patata, harina de arroz , dextrosa, chocolate negro (pasta de cacao, azúcar, manteca de cacao, emulgente: lecitina de soja, aroma), humectante: glicerol de origen vegetal, jarabe de glucosa (antioxidantes: anhidrido sulfuroso), emulgente: lecitina de nabina, gasificantes: difosfatos, carbonatos de sodio y fosfatos de calcio, espesante: harina de algarroba y goma xantana, sal	9,9
3C	Marble cake	Schar		Huevo, azúcar, aceite de girasol, harina de arroz , almidón de maíz, humectante: sorbitol, harina de maíz, almidón de arroz, cacao en polvo, emulgente: mono-y diglicéridos de ácidos grasos, gasificantes: difosfato disódico, carbonato ácido de sodio; espesantes: goma xantana, harina de algarroba; sal, aroma natural, acidulante: ácido tartárico	ND [¥]
3D	Tartitas con cacao	Schar		Azúcar, aceites y grasas vegetales (palma, palmiste, coco), huevos, jarabe de glucosa-fructosa, harina de arroz , agua, leche desnatada en polvo, almidón de maíz, cacao magro, harina de maíz, almidón de arroz, estabilizador: sorbitol, fibra de achicoria, gasificantes: delta glucono lactona, carbonato ácido de sodio; emulgentes: lecitina de soja, mono y diglicéridos de ácidos grasos; proteínas de leche, espesante: goma xantana, harina de semilla de algarrobo; gelificante: agar, aromas, sal	ND [¥]

Cod.	PRODUCTO	MARCA	FOTOS	INGREDIENTES	%ARROZ
4	Baguette	Auchan		Almidón de maíz, agua, azúcar, espesante (E415), emulgente (E472e), levadura, sal, gasificantes (E450i, E500ii), conservador (E282), antioxidantes (E300)	0
4A	Pan tradicional	Auchan		Almidón de maíz, agua, huevo líquido pasteurizado, margarina (grasas vegetales (palma , coco), agua, aceite vegetal de girasol, emulgente (monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos), acidulante (ácido cítrico), conservador (sorbato potásico), aromas, colorante (beta-caroteno)), azúcar moreno de caña, azúcar líquido invertido, levadura, espesantes fibra de arroz , sal, emulgentes monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, estearoil-2, harina de algarroba.	1
4B	Pan de molde	Gerblé		Almidón de trigo sin gluten, agua, margarina (grasa vegetal no hidrogenada de palma y aceite de girasol, agua, emulgentes: mono y diglicéridos de ácidos grasos, acidulante: ácido cítrico, aromas), azúcar, harina de arroz , almidón de maíz, levadura, proteínas de leche, dextrosa, fibra vegetal: plantago psyllium, espesante: goma xantana, emulgente: hidroxipropilmetilcelulosa y mono y diglicéridos de ácidos grasos, sal marina, aroma, acidulante: ácido tartárico	4
4C	Pan de molde	Auchan		Agua, almidón de maíz, margarina vegetal (grasas vegetales (palma y coco), aceite de girasol, agua, emulgente (E4??), acidulante (E330), conservador (E202), aromas, colorante (E460a), almidón de tapioca. Harina integral de arroz (harina de arroz y salvado de arroz), azúcar moreno de caña, azúcar, levadura, espesante (E415), emulgente (E472e), sal, harina de algarroba, conservador (E281), gasificantes (E450i, E500ii), antioxidante (E300)	7,1

4D	Pan dulce	Schar		<p>Harina de arroz, almidón de maíz, agua, azúcar, huevos, margarina vegetal (grasas y aceites vegetales (palma, palmiste, coco, colza en proporción variable), agua, sal, emulgente: mono- y diglicéridos de ácidos grasos, espesantes: harina de semillas de guar, hidroxipropil metil celulosa; levadura, fibra de manzana, sal, acidificante: ácido cítrico, aroma</p>	ND [‡]
4E	Pan de cereales	Schar		<p>Masa madre 25% (harina de arroz, agua), almidón de maíz, agua, harina de arroz, semillas de girasol, semillas de lino, fibra de manzana, harina de quinoa, extracto de manzana, levadura, harina de sorgo, aceite de girasol, espesante: hidroxipropilmetilcelulosa; harina de castaña, sal, azúcar caramelizada.</p>	ND [‡]

[‡] ND: no disponible. No está indicado en el etiquetado



3.3.2.1 Preparación de las muestras

Para la digestión de las muestras, primeramente se pesó una cantidad conocida y se secó en un horno de aire caliente a 60-70°C hasta peso constante. Seguidamente se molieron en un molinillo *Taurus* y se guardaron en refrigeración en tubos de plástico cerrados herméticamente y codificados (Figura 20).

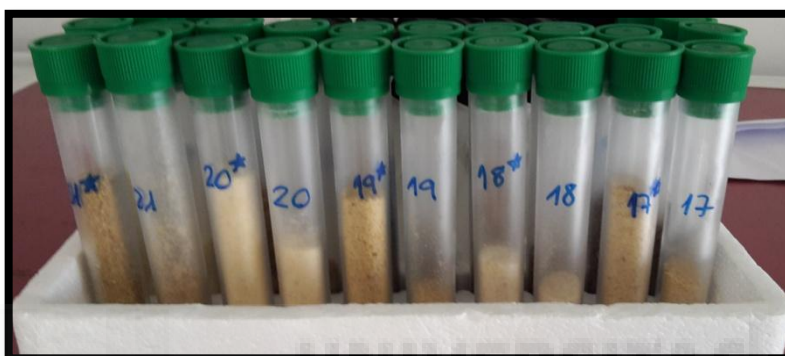


Figura 20. Muestras codificadas durante el almacenamiento.

3.4 MÉTODO ANALÍTICO

3.4.1 Determinación de arsénico inorgánico

Para la realización de este estudio, se cuantificaron 21 muestras de productos destinados a la alimentación sin gluten y la muestra de referencia con una cantidad de arsénico conocida. Cada análisis se realizó por triplicado. Todas las muestras fueron digeridas en un horno microondas y posteriormente se procedió a la determinación de arsénico inorgánico con cromatografía líquida de alta resolución-generación de hidruros - espectrometría fluorescente atómica (HPLC-HG-AFS).

3.4.1.1 Digestión en horno microondas

El método de digestión con horno de microondas tiene como ventaja la mínima manipulación de la muestra, contaminación de la muestra, disminución en la cantidad y peligrosidad de reactivos utilizados y por tanto, la disminución en la exposición por

parte del analista a los vapores generados durante la digestión ácida y la disminución sustancial del tiempo invertido en la mineralización de la materia orgánica pudiendo controlar de forma precisa parámetros como la presión o temperatura (Silva, 2012).

La digestión por microondas es uno de los procedimientos estándar en la preparación de muestras para el análisis elemental en química analítica. La muestra es calentada en vasos de teflón cerrados junto con el líquido extractante. La temperatura va aumentando hasta 95°C, produciéndose la degradación parcial o completa de la muestra. El resultado tras la extracción es una disolución acuosa ácida de la muestra, adecuada para su posterior análisis. Se realizaron 9 tandas de digestiones para realizar la extracción de todas las muestras.

3.4.1.1.1 Preparación de reactivos

Se preparó el líquido extractante:

- 0,2% de ácido nítrico al 69% y 1% de agua oxigenada en agua ultrapura.

3.4.1.1.2 Preparación de muestra

En los recipientes de teflón del horno microondas se pesaron de cada muestra 0,25 g o 0,5 g, según la formulación de cada uno de los alimentos. Una vez pesada la muestra, se añadieron 10 mL de líquido extractante a todas las muestras y en cada tanda se hizo un blanco únicamente con el líquido extractante para asegurarnos del buen funcionamiento del método.

3.4.1.1.3 Digestión

La rutina para realizar la digestión en MW es la siguiente:

Los vasos de teflón se cierran y se ajustan el tornillo de sujeción de cada vaso con una llave como accesorio del propio horno, se colocan dentro del horno alrededor del rotor y se colocan los sensores de temperatura y presión y se programa un programa de 3 etapas (Figura 21):

1. 50°C - 5 min rampa y 10min mantenimiento
2. 75°C- 5 min rampa y 10min mantenimiento
3. 95°C - 5min rampa y 10min mantenimiento

Cuando finaliza la digestión se espera unos minutos hasta que se enfríe y se procede a la preparación de las muestras para el análisis.



Figura 21. Pantalla monitorización horno MW

3.4.1.2 Medición de arsénico inorgánico por HPLC-HG-AFS

La cromatografía líquida de alta resolución asociada a generación de hidruros-espectroscopía de fluorescencia atómica (HPLC-HG-AFS) es una técnica con límites de detección excelentes, adecuada para determinación de especies arsenicales a niveles de ultratrazas, versátil y de costo de operación razonable (Litter *et al.*, 2009).

En la especiación de arsénico en primer lugar se lleva a cabo la separación de los compuestos como arsenito (As III), arsenato (As V), gracias a la cromatografía de cambio aniónico. Esta separación dura aproximadamente 12 min en la columna de intercambio aniónico usando tampón fosfato 25 mM (pH 6,0) como fase móvil a una velocidad de flujo de 0,8 mL/min.

Tras la separación de las especies, éstas pasan por el generador de hidruros, el cual las formas inorgánicas se transforman en arsina. Esta etapa está formada por un sistema reductor gracias al borohidruro en medio ácido unido a un separador gas-líquido.

Por último, gracias a la fluorescencia atómica se desactiva la radiación que existe tras la excitación de los átomos libres por la absorción de radiación de una longitud de onda específica desde una fuente de excitación apropiada (Mester *et al.*, 1997).

En nuestro caso al utilizar un medio oxidante durante la digestión, no podemos realizar la determinación de especies. Este método es únicamente para cuantificar la cantidad de arsénico inorgánico ya que el As (III) se oxida a As (V). Por otro lado, esta digestión no permite la determinación de especies orgánicas.

3.4.1.2.1 Preparación de muestras

Las muestras ya digeridas se traspasan a tubos de centrifuga y son centrifugadas a 2000 revoluciones durante 10-15min y a 15°C para eliminar la mayor cantidad de sedimento posible, seguidamente el sobrenadante se filtra ayudándonos de una jeringuilla y de un filtro de 0,45 μm , traspasando esta muestra a un tubo de cristal, necesitando 2 filtros por cada muestra, excepto con el blanco que solo se necesitó un filtro. Las muestras ya preparadas son guardadas en refrigeración y debidamente codificadas para el posterior análisis. (Figura 22).

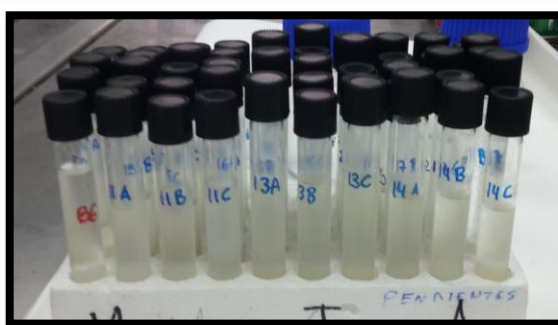


Figura 22. Muestras codificadas para el análisis

3.4.1.2.2 Preparación de patrones de recta de calibrado

Una vez preparadas las muestras para la cuantificación del arsénico inorgánico, se preparan los multi-patrones con los que posteriormente realizaríamos la recta de calibrado.

Se parte de sales arsenicales para elaborar los patrones 1000 ppm de cada una de las especies. Las sales utilizadas fueron NaAsO_2 y $\text{NaHAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pesando 0,1734 g y 0,4165 g, respectivamente y enrasando a 100 mL con agua ultrapura, explicada en la Tabla 6.

Tabla 6. Preparación de patrones 1000ppm

Patrones 1000 ppm	NaAsO_2	$\text{NaHAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Enrase (mL)
As III	0,1734 g		100
As V		0,4165 g	100

A partir de los patrones de 1000 ppm se realizan patrones de 1000 ppb. En estos casos se recogen 0,5 mL de cada disolución de 1000 ppm y se enrasa hasta 500 mL con agua ultrapura en matraz aforado, obteniendo disoluciones de As III y As V de 1000 ppb. La preparación de estos patrones se explica en la Tabla 7.

Tabla 7. Preparación de patrones 1000ppb

Patrones 1000 ppb	As III 1000 ppm	As V 1000 ppm	Enrase (mL)
As III	0,5 mL		500
As V		0,5 mL	500

Posteriormente para la especiación del arsénico se prepararon los patrones multiespecies de 10, 20, 30 y 40 ppb, mezclando 1, 2, 3 y 4 mL de cada disolución anteriormente preparada y enrasado a 100 mL con agua ultrapura en matraz aforado, traspasar a recipientes de cristal y almacenar en refrigeración. La preparación de multipatrones se explica en la Tabla 8.

Tabla 8. Preparación de multipatrones

Multipatrones (ppb)	As III 1000 ppb	As V 1000 ppb	Enrase (mL)
10	1 mL	1 mL	100
20	2 mL	2 mL	100
30	3 mL	3 mL	100
40	4 mL	4 mL	100

3.4.1.2.3 Preparación reactivos

Para la medición en HPLC necesitamos preparar reactivos imprescindibles para el análisis como el ácido clorhídrico (HCl) al 12,5%, boro-hidruro sódico (NaBH_4) al 1,4% y el tampón fosfato como fase móvil.

Para la preparación de ácido clorhídrico (HCl) al 12,5%:

Se añaden 125 mL de ácido clorhídrico al 35% y se enrasa a 1 L con agua ultrapura en un matraz aforado, mezclar y traspasar a una botella de cristal y almacenar en refrigeración.

Para la preparación de boro-hidruro sódico al 1,4%:

Se añaden 800 mL de agua ultrapura y 4 g de NaOH y agitar con agitador magnético, cuando este disuelto añadir 14 g de boro-hidruro sódico y dejar agitando. Cuando la disolución haya sido completa, verter a un matraz de 1 L y enrasar con agua ultrapura, mezclar y filtrar con papel a una botella que se almacenará en refrigeración.

Para la preparación de tampón fosfato se pesan 1,36 g KH_2PO_3 y 1,74 g KHPO_4 :

Se añaden unos 800 mL de agua ultrapura y se agitan con un agitador magnético hasta la completa disolución. Una vez preparado se ajusta el pH a 6 con HCl al 50%, por último se enrasa a 1 L con agua ultrapura y se traspasa a una botella.

3.4.1.2.4 Análisis en HPLC-HG-AFS

Con una jeringuilla se recoge la muestra ya preparada o los patrones y se inyectan 50 μL en el equipo uniéndose mediante un loop a la fase móvil y pasando a la columna para la retención de las diferentes especies arsenicales. La separación de las especies de arsénico tiene lugar en 12 minutos aproximadamente, con un caudal de la fase móvil de 0,8 mL/min. El orden de elución fue arsenito y arseniato y los tiempos de retención fueron 3,15 y 7,77 minutos para el arsenito y arseniato, respectivamente (Munera-Picazo *et al.*, 2014).

Mediante la reacción del borohidruro en condiciones ácidas (HCl) en el módulo de generación de hidruros se transforman las formas inorgánicas a su forma gaseosa, arsina, siendo este compuesto el medido por el equipo.

El arsénico gaseoso es alcanzado por el separador gas-líquido mientras que el argón arrastra éste hasta el detector.

Una vez separados llega al sistema de detección por fluorescencia y gracias al software se obtienen los resultados en la pantalla.

Las condiciones instrumentales empleadas se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9. Condiciones instrumentales empleadas

Caudal fase móvil	0,8 mL/min
Presión	88 bares
Gas portador	Argón
Reductor empleado	1,4% NaBH ₄
Agente acidificante	12,5% HCl
Volumen de la muestra	50 μL

3.4.2 Tratamiento estadístico

Los datos resultantes de esta determinación fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA) y Test de Rangos Múltiples (Test de Tukey) calculando su valor medio, la mediana, la desviación típica y el error de la media. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el paquete estadístico STATGRAPHICS 5.0 Plus.



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El contenido de arsénico en el arroz, como se ha mencionado en la Introducción, es de vital importancia, debido al gran consumo de este cereal, especialmente en determinados grupos de la población como son las personas celíacas, y por otra a la gran toxicidad de este metaloide. Además del consumo de arroz propiamente dicho, hoy en día se realizan cada vez más productos a partir de este cereal debido a la celiacía existente.

Como ya se ha descrito, los productos objeto de análisis de este trabajo son los productos de panadería sin gluten, especialmente los que contienen arroz, que forman parte de la dieta de personas celíacas como son las galletas, magdalenas, bizcochos y pan.

A continuación se exponen los resultados obtenidos del estudio de productos de panadería destinados a la alimentación de personas celíacas.

4.1. CALIBRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO INORGÁNICO (As-i)

Para conocer la concentración de arsénico inorgánico (As-i) siendo la suma de As (III) y As (V) mediante HPLC-Generador de hidruros-Detección por fluorescencia, se debe realizar una recta patrón a partir de concentraciones conocidas, relacionándolas con el área obtenidas.

Se prepararon 4 patrones multiespecies inorgánicas con concentraciones de 10, 20, 30 y 40 $\mu\text{g/L}$ (ppb) de cada una de las especies arsenicales sujetas a análisis [As (III) y As (V)].

Los datos de las áreas obtenidas (mV^*s) para cada una de las concentraciones se muestran en la Tabla 10 y Tabla 11, para As (III) y As (V), respectivamente.

Tabla 10. Áreas para patrones de As (III) con concentración conocida.

Concentración (ppb)	Área (mV*s)
10	619
20	1158
30	1580
40	2183

Tabla 11. Áreas para patrones de As (V) con concentración conocida.

Concentración (ppb)	Área (mV*s)
10	460
20	863
30	1255
40	1766

A partir de estas Tablas, se establecieron las relaciones lineales mostradas en la figura 23 y figura 24, para As (III) y As (V), respectivamente. Los coeficientes de determinación (R^2), fueron 0,9964 y 0,998 respectivamente, siendo valores aceptables para el análisis de las especies arsenicales mencionadas a niveles de $\mu\text{g/L}$.

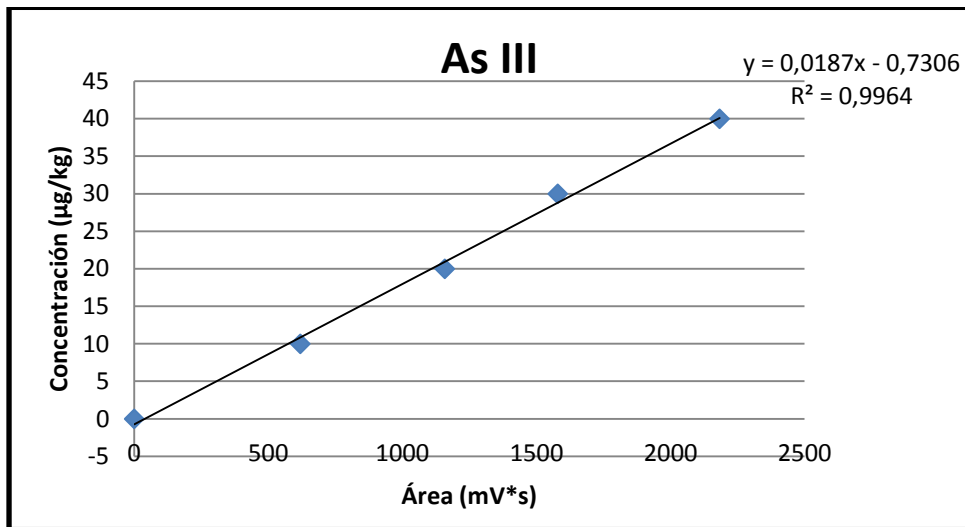


Figura 23. Recta de calibrado para la cuantificación de As (III) en las muestras.

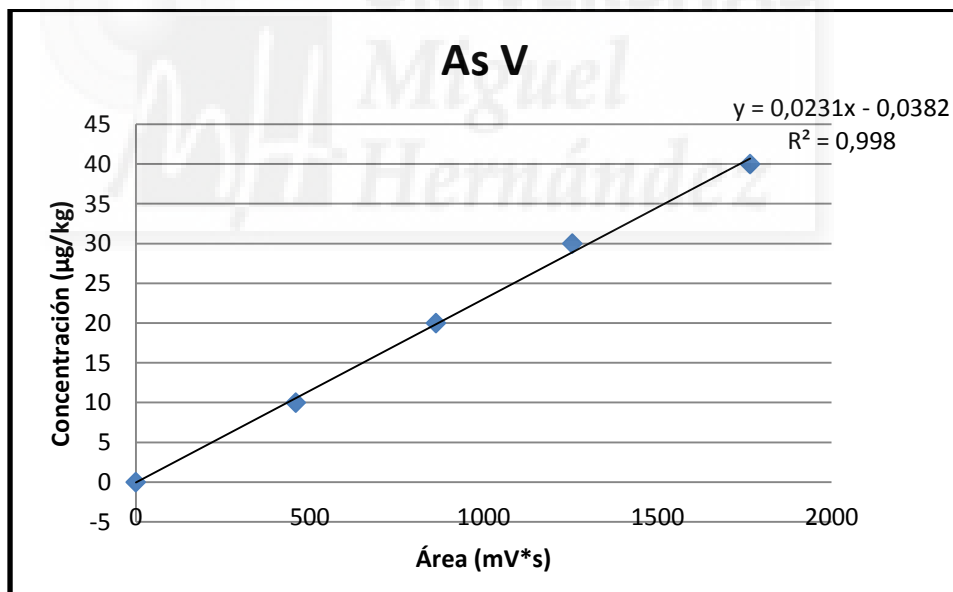


Figura 24. Recta de calibrado para la cuantificación de As (V) en las muestras.

Mediante las ecuaciones obtenidas de las rectas (Figura 23 y Figura 24) se obtendrá la concentración de cada una de las especies inorgánicas en cada una de las muestras, teniendo en cuenta las diluciones realizadas, para poder dar los valores de

contenido de arsénico inorgánico. No se puede dar valores de especiación independientes debido al protocolo utilizado ya que durante el proceso de extracción se utiliza un oxidante (H_2O_2), no pudiendo asegurar la no oxidación de As (III) a As (V).

4.2. RESULTADOS DE ARSÉNICO INORGÁNICO (As-i) DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS

Los resultados del contenido de i-As obtenido a partir del análisis de las muestras de productos sin gluten, divididos en productos y en grupos son los que se muestran en la Tabla 12.

El primer producto de cada grupo analizado no contiene arroz en su composición, como puede verse en los ingredientes que aparecen en la Tabla 5 (3. Materiales y métodos). Éstos contienen harina de maíz u otras féculas en lugar de harina de arroz.

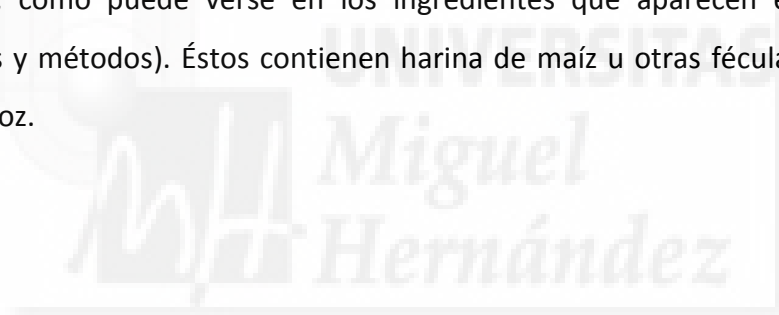


Tabla 12. Contenido de arsénico inorgánico (i-As) de las muestras divididas en grupos (Galletas = 1; Magdalenas = 2; Bizcochos = 3; Pan = 4).

Grupo	Código [†]	Arroz (%)	Σi-As (μg kg ⁻¹)
Galletas	1	0	92±9
Magdalenas	2	0	ND**
Bizcochos	3	NL*	NL
Pan	4	0	23±1
1. Galletas (n=5)	1A	9	66±5
	1B	28	97±4
	1C	47	104±1
	1D	ndp***	31±5
	1E	20	44±1
2. Magdalenas (n=4)	2A	4,1	16±3
	2B	Ndp	32±1
	2C	Ndp	29±8
	2D	Ndp	62±2
3. Bizcochos/Brownie (n=4)	3A	5,4	19±2
	3B	9,9	52±5
	3C	Ndp	41±2
	3D	Ndp	27±2
4. Pan (n = 5)	4A	1	46±2
	4B	4	ND
	4C	7	65±9
	4D	Ndp	ND
	4E	Ndp	13±2

*NL = No localizado en los centros de venta comunes para personas celíacas; **ND = por debajo de LOQ (límite de cuantificación determinado como tres repeticiones de la desviación estándar de los blancos, límite de detección [LOD], multiplicado por el factor de dilución); ***ndp = no disponible en la información de la etiqueta del producto, se realizó una consulta a FACE y a la empresa y no nos proporcionaron esta información.

Como se indica en la Tabla anterior, la tercera columna indica el porcentaje de arroz (%) declarado en el etiquetado o bien, indicado por el productor. Observamos como 8 productos de los 18 analizados no indican el % de arroz o no nos proporcionaron esa información. Es por ello, que parte de la discusión de este trabajo no se puede realizar al 100 % debido a la escasa información en el etiquetado.

Para encontrar la relación potencial entre As-i, el contenido y el porcentaje de arroz incluido en la formulación de los productos a base de arroz para celíacos, se incluyó en todos los grupos una muestra control, producto elaborado sin arroz, a excepción del grupo 3 (Bizcochos) donde fue imposible localizar este producto control.

En este estudio, el primer resultado importante fue la declaración de que las muestras control del grupo 2 (Magdalenas) (sin arroz en su composición) no contuvo cantidades mensurables (por encima del LOQ) de As-i. Similares resultados son lo que indican otros autores, Matos-Reyes *et al.*, 2010; Munera-Picazo *et al.*, 2014, los cuales comentaron que los contenidos se encuentran por debajo de sus LOQ (Límite de cuantificación) o bien por encima del límite de detección, como comenta Llorente-Mirandés *et al.*, 2014, donde se analizaron cereales y se encontraron valores bajos, 9 mg/kg, pero mensurables al igual que en aperitivos de maíz. Contrariamente a la bibliografía, los controles del grupo 1 (Galletas) y grupo 4 (Pan) presentaron concentraciones de i-As con valores de 92 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 23 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente. Esto puede ser debido a su contenido en arroz no declarado en la lista de ingredientes o por presencia de otro ingrediente con contenido de arsénico.

Los valores más altos de i-As de todas las muestras de los cuatro grupos se encontraron en las muestras 1C y 1B, siendo 104 y 97 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente. Los valores más altos comentados de i-As pertenecieron al grupo 1 (Galletas), que también contenían los porcentajes más altos de arroz, 47 y 28 %.

Los valores encontrados en el grupo de Galletas se encontraron entre 31 y 104 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Sin embargo, Munera-Picazo *et al.*, 2014 presenta unos valores de As-i en galletas entre 12 y 35,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, siendo inferiores a los obtenidos en este estudio. Se ha de comentar que el porcentaje de arroz de las muestras del presente estudio (hasta un 47 % de arroz) fue mayor a los previamente publicados (hasta un 15 % de arroz).

En el grupo 2 (Magdalenas) y en el grupo 3 (Bizcochos) se encontraron valores entre 16-62 y 19-52 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente. En el grupo 4 (Pan), los valores fueron entre ND y 65 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Si comparamos estos valores con Munera-Picazo *et al.*, 2014 observamos que los valores obtenidos se asemejan a los detectados en este estudio ya

que fueron entre 12,0 y 128 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en productos similares como panes, tortitas o cereales de desayuno.

Centrándonos en los resultados obtenidos vemos como en todas las muestras el contenido de As-i fue inferior al límite máximo establecido en el Reglamento 2015/1006 para productos elaborados a base de arroz (galletas, pasteles...) siendo este menor a 0,30 mg/kg de producto.

A nivel global, se ha realizado la media de la cantidad de i-As presente en cada grupo de productos, sin tener en cuenta las muestras control, que no contienen arroz, presentándose valores estadísticamente diferentes como se muestra en la Tabla 13. El grupo de "Galletas" es el que mayor concentración presentó, con un valor de 68 $\mu\text{g}/\text{kg}$, significativamente diferente a los demás grupos. El grupo de Magdalenas, Bizcochos y Pan, presentaron valores medios de As-i de 35, 35 y 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, no se observaron diferencias significativas.

Tabla 13. Resultados de la concentración de i-As en los grupos de productos.

Grupo de Productos	$\Sigma\text{i-As}$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
1. GALLETAS	68 \pm 14 a [†]
2. MAGDALENAS	35 \pm 9 b
3. BIZCOCHOS	35 \pm 7b
4. PAN	25 \pm 4 b

[†]Valores seguidos con diferentes letra, en la misma columna, fueron estadísticamente diferentes ($p < 0,05$), según en Test de Tukey.

La estimación de la cantidad de i-As en el arroz utilizado en la fabricación de estos productos no se ha realizado en todas las muestras por las pequeñas cantidades

de arroz (<10 % en su gran mayoría) o debido a que no se facilitó la información de contenido de arroz en la etiqueta del producto. La estimación se ha realizado solamente en 3 productos debido al motivo anterior, estos productos han sido el 1E, 1B y 1C con contenidos de arroz del 20, 28 y 47 %, obteniendo valores de 220, 346 y 221 $\mu\text{g}/\text{kg}$ respectivamente. Sin embargo, los % de estas muestras siguen siendo bajos y la estimación no es totalmente fiable, ya que en la formulación podrían existir otros ingredientes con As.

Desde el 1 de enero de 2016, los niveles máximos de i-As en el arroz para la producción de alimentos para lactantes y niños pequeños se establecieron a 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (UE 2015). Como se ha mencionado anteriormente, para productos destinados a personas celíacas no existe reglamentación. Considerando que los celíacos son una población en riesgo, ya que hay publicaciones científicas que apoyan esta hipótesis, si comparamos el límite de As-i para el arroz utilizado para productos destinados a lactantes y niños con los productos para celíacos analizados observamos que la cantidad de arsénico supera a ese límite establecido. La cantidad de i-As en el arroz depende del cultivar, del origen geográfico, la forma de procesamiento de arroz (Meharg *et al.*, 2009; Norton *et al.*, 2009; Signes *et al.*, 2008), y del % de arroz contenido en cada producto, sin embargo este dato no ha sido posible obtenerlo de todos los productos. Es por ello, por lo que es imprescindible este tipo de información en la etiqueta para que esté disponible para el consumidor.

Centrándonos en la relación entre el % de arroz utilizado en los productos y la presencia de As-i en este observamos la Figura 25. De forma general se puede observar perfectamente una relación positiva, a mayores concentraciones de arroz, la concentración de As-i va aumentando, exceptuando algunos casos. Sin embargo productos con % de arroz entre 0-20 la cantidad de As-i fluctúa considerablemente, esto puede ser debido a la importancia de la selección de las materias primas.

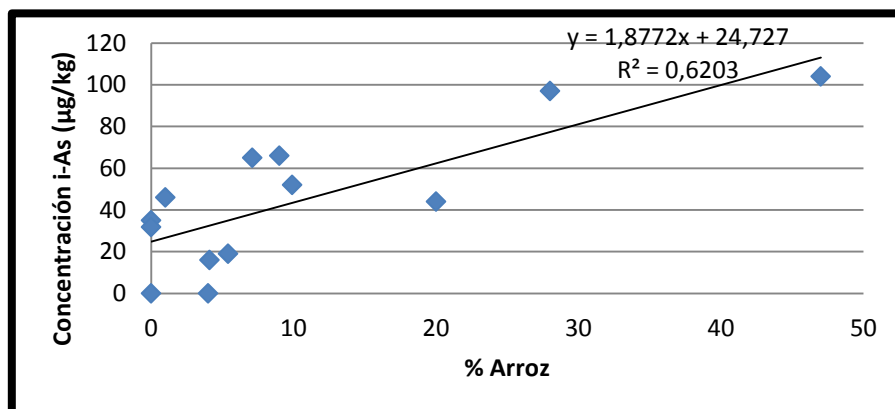


Figura 25. Correlación del porcentaje de arroz con el contenido de i-As en las muestras analizadas.

Observando la Figura 26 vemos como se muestra en forma de gráfica el contenido medio de i-As según el % de arroz utilizado en cada producto. Coincidiendo con lo encontrado en la Figura 25.

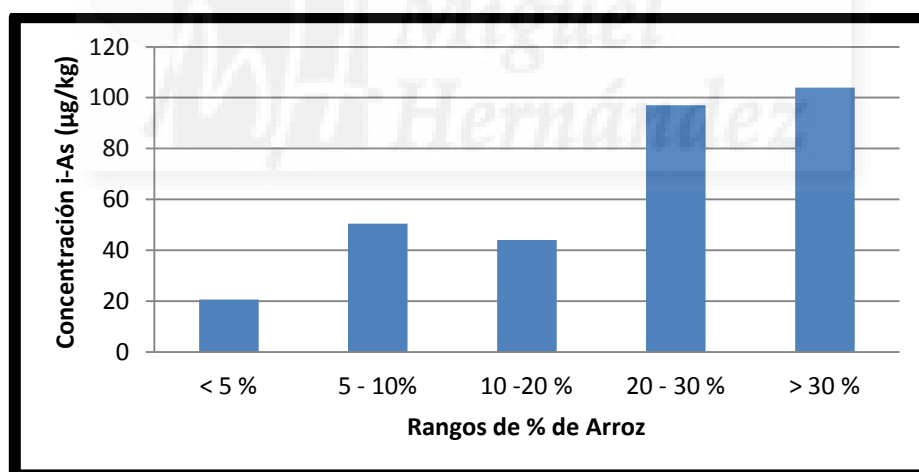


Figura 26. Contenido medio de i-As (µg/kg) en determinados rangos de % de Arroz.

5. CONCLUSIONES

- Algunas muestras control, exceptuando la muestra control del grupo "Magdalenas", con un 0% de arroz entre sus ingredientes, presentan concentraciones de As-i, esto puede ser debido a un contenido en arroz no declarado en la lista de ingredientes o a presencia de ingredientes en As.
- Las muestras con mayor cantidad de As-i son las muestra 1C y 1B, con concentraciones de 104 y 97 $\mu\text{g}/\text{kg}$ respectivamente, estas muestras pertenecen al grupo "Galletas", con los porcentajes más altos de arroz (47 y 28 % respectivamente).
- El contenido de As-i de todas las muestras analizadas fue inferior al límite máximo establecido en el Reglamento 2015/1006 para productos elaborados a base de arroz (galletas, pasteles...) siendo este menor a 0,30 mg/kg de producto.
- Hay una correlación positiva entre el arroz y arsénico, cuanto mayor es el porcentaje de arroz usado en la formulación del producto, mayor es el contenido de As-i.
- Los niveles máximos de i-As en el arroz para la producción de alimentos para lactantes y niños pequeños se establecieron a 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (UE 2015), en este estudio no se pudo realizar una correcta estimación de todo el arroz de las muestras debido a la pequeña cantidad de arroz en los productos analizados y a la no información del % de arroz en la etiqueta.
- Es necesario un etiquetado correcto en este tipo de productos, siendo obligatorio expresar el porcentaje de arroz usado, ya que si no es así no es posible estimar la ingesta de arsénico, además de la variedad y su procedencia.
- Este trabajo apoya a trabajos anteriores en los que se observa que la población celíaca debería ser una población de riesgo sobre la ingesta de arsénico. Por tanto, es necesario elaborar un Reglamento que trate sobre el contenido máximo de arsénico inorgánico en productos alimenticios específicos para esta población, ya que es un grupo con un elevado consumo de arroz, tanto en cereal como en subproducto, y por lo tanto un colectivo con mayor riesgo de contaminación por As-i.

A modo de recomendaciones o consideraciones para un futuro próximo podemos indicar que:

- Para reducir la cantidad de As-i procedente del arroz debe: i) Identificar variedades de arroz que acumulen niveles bajos de As-i, ii) utilizar cultivos de arroz con absorción limitada de As, iii) emplear mayor volumen de agua en la cocción del arroz para facilitar la migración de As al agua de cocción, iv) sustituir las harinas de arroz por harinas de otras féculas en los productos destinados para celíacos, y v) reducir el contenido de arroz en la alimentación.



6. BIBLIOGRAFÍA

1. Agency for Healthcare Research and Quality (AHRQ). 2004. Celiac Disease. Summary. *Evidence Report/Technology Assessment*, 104.
2. ATSDR. 1989. Decision guide for identifying substance-specific data needs related to toxicological profiles; Notice. *Federal Register*, 54: 37618-34.
3. Blanco, J.C., López, F.A., Cirugeda, M.E. 1991. Generalidades sobre contaminación metálica de los alimentos: Causas medioambientales de procesado y envasado. *Alimentaria*, 233:25-31.
4. Burló, F., Ramírez-Gandolfo, A., Signes-Pastor, A.J., Haris, P.I., Carbonell-Barrachina, A.A. 2012. Arsenic contents in spanish infant rice, pureed infant foods, and rice. *Journal of Food Science*, 71:15-19.
5. Callejo, M.J. 2002. Industrias de cereales y derivados. Colección Tecnología de alimentos. Ed. AMV-Munid-Prensa, Madrid.
6. Cano-Lamadrid, M., Munera-Picazzo, S., Burgos-Hernández, A., Burló, F., Carbonell-Barrachina, A.A. 2016. Inorganic and total arsenic contents in rice and rice-based foods consumed by a potential risk subpopulation: Sportspeople. *Journal of Food Science*, 81 (4).
7. Cano-Lamadrid, M., Munera-Picazzo, S., Burló, F., Hojjati, M., Carbonell-Barrachina, A.A. 2015. Total and inorganic arsenic in iranian rice. *Journal of Food Science*, 80 (5).
8. Carbonell-Barrachina, A.A., Wu, X., Ramirez-Gandolfo, A., Norton, G.J., Burló, F., Deacon, C., Meharg, A.A. 2012. Inorganic arsenic contents in ricebased infant foods from Spain, UK, China and USA. *Environmental Pollution*, 163:77-83
9. Carbonell-barrachina, A.A., Mataix, J.J., Burló, F.1995. Arsénico en el sistema suelo-planta. Editor: Universidad de Alicante
10. Cornelis, R., Heinzow, B., Herber, R., Tomassen, J., Vather, M., Veseteberg, O. 1993. Sample collection guidelines for trace elements in blood and urine. *Pure Applications of Chemistry*, 67:1575-1608.

11. Dendy, D., Dobraszcyk, B. 2004. Cereales y productos derivados. Química y Tecnología. Ed. Acribia, S.A., Zaragoza.
12. EU. 2009. *composición y etiquetado de productos alimenticios apropiados para personas con intolerancia al gluten*. En: UE, editor. Comisión reguladora 41/2009 de 20 Enero 2009
13. EU. 2006. Contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. En: UE, editor. Comisión reguladora 1881/2006 de 19 Diciembre 2006.
14. Fornieles Pérez H.G., Marlinez Coronel J.F., Bellot Iglesias J.L. Capitulo 10.8. Intoxicación por productos Industriales: 4.5 Intoxicación por Arsénico. En: F. Barranco Ruiz. Principios de Urgencias, Emergencias y Cuidados Criticos. Editorial UNINET, Edición electrónica 2009, España.
15. Federación de Asociaciones de Celiacos de España (FACE). 2001. Enfermedad celiaca. Manual del celíaco. *Real Patronato sobre Discapacidad*, Madrid.
16. Hasegawa , H., Matsui, M., Okamura, S., Hojo, M., Iwasaki, N., Sohrin, Y. 1999. Arsenic Speciation Including "hidden" Arsenic in Natural Waters. *Applied Organometallic Chemistry*, 13:113-119.
17. Hu, H. 2009. Intoxicación por melales pesados. *Harrison Principios de Medicina Interna*. 376
18. Juhasz, A., Smith, E., Weber, J., Rees, M., Rofe, A., Kuchel, T., Sansom, L., Naidu, R. 2006. In vivo Assesment of Arsenic Bioavailability in Rice and Its Significance for Human Health Risk Assesment. *Environmental Health Perspectives*, 114:1826-1831.
19. Laserna, S.S. 1985. Pérdidas y contaminación en análisis en trazas. Química Analítica. 4:22.
20. Litter, M.J., Armienta, M.A., Farías, S.S. 2009. Iberoarsen. Metodologías analíticas para la determinación y especiación de arsénico en aguas y suelos. *Ciencia y tecnología para el desarrollo*.
21. Llorente-Mirandes T, Calderón J, Centrich F, Rubio R, López-Sánchez JF. 2014. A need for determination of arsenic species at low levels in cereal-based food and infant cereals. Validation of a method by IC-ICPMS. *Food Chemical*. 147:377-85.

22. Marisa, G., Gonzalez, D.E., Amoedo, D. 2009. Chronic endemic regional hydroarsenicism: a challenge for diagnosis and prevention. *Arch Argent Pediatr.* 107 (5):467-73
23. Matos-Reyes MN, Cervera ML, Campos RC, de la Guardia M. 2010. Total content of As, Sb, Se, Te and Bi in Spanish vegetables, cereals and pulses and estimation of the contribution of these foods to the Mediterranean daily intake of trace elements. *Food Chem.* 122(1):188-94.
24. Meharg, A.A. 2004. Arsenic in rice-understanding a new disaster for south-east Asia. *Trends in Plants Science*, 9:415-417.
25. Meharg, A.A., Williams, P.N., Adomako, E., Lawgali, Y.Y., Deacon, C., Villada, A., Cambell, R.C.J., Sun, G., Zhu, Y.G., Feldman, J., Raab, A., Zhao, F.J., Islam, R., Hossain, S., Yanai, J. 2009. Geographical variation in total and inorganic arsenic content of polished (White) rice. *Environmental Science and Technology*, 43 (5):1612-1617.
26. Mester, Z., & Fodor, P. 1997. Characteristics of the atomic fluorescence signals of arsenic in speciation studies. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, 52(12), 1763-1771.
27. Munera-Picazo S, Ramírez-Gandolfo A, Cascio C, Castaño-Iglesias C, Signes-Pastor AJ, Burló F, Haris PI, Carbonell-Barrachina ÁA. 2014c. Arsenic in Rice-Based Infant Foods. *Wheat and Rice in Disease Prevention and Health: Elsevier Inc.* p. 377-91.
28. Munera-Picazzo, S., Ramirez-Gandolfo, A., Burló, F., Carbonell-Barrachina, A. 2014. Inorganic and total arsenic contents in rice-based foods for children with celiac disease. *Journal of Food Science*, 79 (1).
29. Munera-Picazzo, S., Burló, F., Carbonell-Barrachina, A.A. 2014. Arsenic speciation in rice-based food for adults with celiac disease. *Food Additives & Contaminants*, 31(8):1358-1366
30. Munera-Picazo S, Ramírez-Gandolfo A, Cascio C, Castaño-Iglesias C, Signes-Pastor AJ, Burló F, Haris PI, Carbonell-Barrachina ÁA. 2014c. Arsenic in Rice-Based Infant Foods. *Wheat and Rice in Disease Prevention and Health: Elsevier Inc.* p. 377-91.

31. Norton GJ, Islam MR, Deacon CM, Zhao FJ, Stroud JL, McGrath SP, Islam S, Jahiruddin M, Feldmann J, Price AH, Meharg AA. 2009. Identification of low inorganic and total grain arsenic rice cultivars from Bangladesh. *Environ. Sci. Technol.* 43(15):6070-5.
32. Polanco, I., Ribes, C. 2010. Libro Blanco de la Enfermedad celiaca. En: SEGHP-AEP. Protocolos diagnósticos y terapéuticos de gastroenterología, hepatología y nutrición pediátrica. *Ed. Argón*, Madrid.
33. Polanco, I. 2008. Libro Blanco de la Enfermedad celiaca. Conserjería de Sanidad de la Comunidad de Madrid. *Ed. ICM*, Madrid.
34. Pomeranz, Y., Melona, C.E. 1984. Food Analyses: Theory and practise. *Ed. Chapman and Hall*, Nueva York (EEUU).
35. Reglamento 2015/1006 EU. 2015. Contenido máximo de arsénico inorgánico en los productos alimenticios. En: UE, editor. Comisión reguladora 2015/1006 de 25 Junio 2015
36. Sciandrello, G., Caradona, F., Mauro, M., Barbata, G. 2004. Arsenic-induced DNA hypomethylation affects chromosomal instability in mammalian cells. *Carcinogenesis*. 25(3):413-7
37. Selene Chou, Ph.(D. Carolyn Harper, Ph.D. ATSDR. Division 01 Toxicology and Environmental Medicine, Atlanta, GA. Toxicological Profile for Arsenic. 3 marzo 2011, USA.
38. Signes A, Mitra K, Burló F, Carbonell-Barrachina AA. 2008b. Effect of two different rice dehusking procedures on total arsenic concentration in rice. *Eur. Food Res. Technol.* 226(3):561-7.
39. Silva, P. 2012. Digestión en horno de microondas para determinación de contenido de hierro y zinc totales en alimentos. *Tecnología en Marcha*, 25: 96-100
40. Sun, G.X., Williams, P.N., Carey, A.M., Zhu, Y.G., Deacon, C., Raab, A., Feldmann, J., Islam, R.M., Meharg, A.A. 2008. Inorganic arsenic in rice bran and its products are an order of magnitude higher than in bulk grain. *Environmental Science and Technology*, 42:7542-7546.

41. Torres-Escribano, S., Leal, M., Vélez, D., Montoro, R. 2008. Total and inorganic arsenic concentrations in rice sold in Spain, effect of cooking, and risk assessments. *Environmental Science and Technology*, 42:3867-3872.
42. Tsuda, T., Babazono, A., Ogawa, T., Hamad, H., Mino, Y., Aoyama, H., et al. 1992. Inorganic arsenic: A dangerous enigma for mankind. *Applied Organometallic Chemistry*, 6: 309-322.
43. Williams, P.N., Villada, A., Deacon, C., Raab, A., Figerola, J., Green, A.J., Feldman, J., Meharg, A.A. 2007. Greatly enhanced arsenic shoot assimilation in rice leads to elevated grain levels compared to wheat and barley. *Environmental Science and Technology*, 41: 6854-59
44. Xu, X.Y., McGrath, S.P., Meharg, A.A., Zhao, F.J. 2008. Growing rice aerobically markedly decreases arsenic accumulation. *Environmental Science and Technology*, 1;42(15):5574-9.

