



# FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

## DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS EN SEMILLA DE LINO

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Junio 2020

**Autor:** Víctor Alcaraz Pomares

**Modalidad:** Experimental Bromatología, Nutrición y Bromatología

**Tutora:** Dra. Elena García García

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas sin las que no hubiera sido posible realizar el trabajo con el que pongo punto final a mi etapa como universitario.

En primer lugar, agradecer a la Dra. Elena García García, mi tutora en este trabajo, por su gran ayuda, su dedicación en la realización de este TFG y su preocupación y atención en todo momento. Gracias por haberme dejado participar en esta línea de investigación ya que este trabajo es fruto de ideas, proyectos y esfuerzos previos que corresponden a otras ideas. Gracias por el apoyo financiero y por los medios que me ha proporcionado para poder realizar este proyecto. Su apoyo y confianza en mi y en este proyecto. Gracias por todo el esfuerzo que ha puesto y todas las horas que ha invertido, que no han sido pocas, tanto en el laboratorio como en todo lo demás. Gracias por todos los consejos que me ha dado para encaminar este trabajo. No solo ha sido una excelente tutora y profesora, si no que también es una gran persona con la que aprender a su lado.

En segundo lugar, agradecer a la Dra. Marta Beltrá García-Calvo por su importante aporte y participación. Gracias por su paciencia, por su disponibilidad, por su ayuda con los cálculos y sus siempre atentas y rápidas respuestas a mis correos. Por su activa participación en el laboratorio y por todo el tiempo que ha dedicado para ayudarme en este trabajo. Gracias por haber estado en todo momento ahí y por aguantarme.

En tercer lugar, agradecer al Dr. Eugenio Vilanova por dejarnos estar en su laboratorio. Agradecer a toda la gente que ha aportado su pequeño grano de arena a este trabajo.

Agradecer también a mi compañera de laboratorio, Atiqa Latrech, por su ayuda en el laboratorio y en todo el TFG. Por todos los mensajes que hemos intercambiado para ayudarnos.

Y, por supuesto, el agradecimiento más profundo y sentido va para mi familia. Sin su apoyo, colaboración e inspiración habría sido imposible llevar a cabo y terminar esta dura carrera.

## RESUMEN

En el presente estudio se ha determinado por espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) los niveles de una serie de oligoelementos (B, Ba, Ca, Mg, Na, K, Fe, Cu, Zn, Cr, Mn, Mo, Co, Ni, Sr, U, V Li) y de metales tóxicos (Al, Cd, Pb) en semilla de lino. Los niveles de elementos se han determinado en 10 muestras de semilla de lino (SL), ecológicas y no ecológicas, adquiridas en diferentes establecimientos, herboristerías, supermercados e internet.

El K fue el elemento que se encuentra en mayor concentración en las muestras (7300 mg/kg). También se encontró concentraciones elevadas de Mg, Ca y Na. El Be, Cr, V y Ni fueron descartados debido a que sus concentraciones se encontraban por debajo del límite de detección, por tanto, el aparato no puede determinarlos o no hay esos elementos en la semilla de lino.

Además, se intentó encontrar una relación entre una mayor acumulación de metales pesados y el hecho de que una muestra fuese ecológica o no. Encontrando diferencias estadísticamente significativas en aluminio entre muestras ecológicas y no ecológicas de semilla de lino (226 mg/kg vs 20,4 mg/kg) y en cadmio (0,168 mg/kg vs 0,230 mg/kg).

## **ÍNDICE**

<b>1.INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. METALES PESADOS .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1. Legislación .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.2. Cadmio.....</b>	<b>4</b>
1.1.2.1. Vías de exposición. ....	5
1.1.2.2. Absorción y toxicidad.....	5
<b>1.1.3. Aluminio. ....</b>	<b>6</b>
1.1.3.1. Vías de exposición .....	6
1.1.3.2. Absorción y toxicidad.....	6
<b>1.2. ALIMENTOS ECOLOGICOS .....</b>	<b>7</b>
<b>2.OBJETIVOS.....</b>	<b>10</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>10</b>
<b>3.1. METODOLOGÍA DE BÚSQUEDA DE INFORMACIÓN .....</b>	<b>11</b>
<b>3.2. DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS OBJETO DE ESTUDIO.....</b>	<b>11</b>
<b>3.3 REALIZACIÓN DE ENCUESTAS .....</b>	<b>12</b>
<b>3.4. EQUIPOS DE LABORATORIO.....</b>	<b>13</b>
<b>3.5. MATERIAL .....</b>	<b>13</b>
<b>3.6. REACTIVOS Y DISOLUCIONES .....</b>	<b>13</b>
<b>3.7. PROGRAMAS INFORMÁTICOS .....</b>	<b>14</b>
<b>3.8. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA .....</b>	<b>14</b>
3.8.1. Mineralización de la muestra. ....	14
3.8.2. Determinación de elementos por ICP-MS.....	16
<b>3.8.3. Patrones internos (ISTD). ....</b>	<b>18</b>
<b>3.8.4. Patrones y curvas de calibrado. ....</b>	<b>18</b>

3.8.5 Curva patrón multielemental.....	20
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>21</b>
4.1. RESULTADOS DE LAS ENCUESTAS.....	21
4.2. CONCENTRACIÓN DE METALES PESADOS .....	25
4.2.1. Concentración de metales pesados en muestras.....	25
4.2.1.1. Comparación con otros estudios previos.....	31
4.2.2. Análisis estadístico. ....	32
4.2.1.1 Elementos con distribución normal .....	33
4.2.1.2. Elementos con distribución no normal .....	34
<b>5. CONCLUSIÓN .....</b>	<b>34</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>36</b>
<b>7. ANEXO.....</b>	<b>40</b>
7.1. FORMATO DE ENCUESTA.....	40



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Nivel máximo de ingesta tolerable.....	3
<b>Tabla 2.</b> Nivel máximo de metales pesados en alimentos.....	4
<b>Tabla 3.</b> Países con mayor crecimiento en ventas de productos ecológicos....	9
<b>Tabla 4.</b> Muestras recopiladas en el estudio.....	12
<b>Tabla 5.</b> Reactivos utilizados en el estudio.....	14
<b>Tabla 6.</b> Concentración de las muestras patrón.....	17
<b>Tabla 7A y 7B.</b> Concentración (mg/L) de las 10 muestras.....	27
<b>Tabla 8.</b> Concentración (mg/kg) muestras ecológicas.....	29
<b>Tabla 9.</b> Concentración (mg/kg) muestras no ecológicas.....	30
<b>Tabla 10.</b> Resultados de la prueba de Kolmogorov-Smirnov.....	33
<b>Tabla 11.</b> Análisis estadístico para los datos que siguen una distribución normal. ....	34
<b>Tabla 12.</b> Análisis estadístico a los elementos que no siguen una distribución normal. ....	36

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Patrones utilizados en el estudio.....	15
<b>Figura 2.</b> Pesaje de las muestras.....	16
<b>Figura 3.</b> Foto después de añadir ácido nítrico.....	16
<b>Figura 4.</b> Foto tras finalizar la mineralización.....	17
<b>Figura 5.</b> Adición agua mili-Q .....	17
<b>Figura 6.</b> Equipo ICP-MS utilizado.....	18
<b>Figura 7.</b> Diagrama circular de la pregunta 10 de la encuesta.....	22
<b>Figura 8.</b> Diagrama circular de la pregunta 11 de la encuesta.....	22
<b>Figura 9.</b> Diagrama circular de la pregunta 12 de la encuesta.....	23
<b>Figura 10.</b> Diagrama circular de la pregunta 13 de la encuesta.....	24
<b>Figura 11.</b> Diagrama circular de la pregunta 1 de la encuesta.....	24
<b>Figura 12.</b> Diagrama circular de la pregunta 2 de la encuesta.....	24
<b>Figura 13.</b> Diagrama circular de la pregunta 3 de la encuesta.....	25
<b>Figura 14.</b> Diagrama circular de la pregunta 4 de la encuesta.....	25
<b>Figura 15.</b> Diagrama circular de la pregunta 5 de la encuesta.....	25
<b>Figura 16.</b> Diagrama circular de la pregunta 6 de la encuesta.....	26
<b>Figura 17.</b> Diagrama circular de la pregunta 7 de la encuesta.....	26
<b>Figura 18.</b> Diagrama circular de la pregunta 8 de la encuesta.....	26

## ABREVIATURAS

ANOVA: Análisis de la varianza

CE: Comisión Europea

Decs: Descriptores en ciencias de la salud.

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

FIBL: Instituto de Investigación de Agricultura Orgánica

IARC: Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer

ICP-MS: Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente

OMG: Organismo modificado genéticamente

RDI: Ingesta Dietética de Referencia

SL: Semilla de lino

UE: Unión Europea

UL: Ingesta Diaria Máxima Tolerable



## 1.INTRODUCCIÓN

Actualmente el consumidor espera que los alimentos cumplan nuevas funciones en beneficio de su salud, además de disfrutar de las características organolépticas. La semilla de lino (*Linum usitatissimum*) se recomienda por sus propiedades beneficiosas para la salud tales como la reducción de glucosa sanguínea en pacientes con diabetes tipo 2<sup>1</sup>, regresión de la placa de ateroma<sup>2</sup>, protección frente arritmias<sup>3</sup>, reducción de la presión arterial en pacientes hipertensos<sup>4</sup> o su efecto protector frente al cáncer de mama<sup>5</sup>. La determinación de elementos traza y contaminantes inorgánicos en alimentos es bastante importante ya que algunos elementos en concentraciones elevadas pueden ser nocivos para la salud. Los metales pesados causan daños conocidos a la salud, sin embargo, los oligoelementos resultan necesarios en reacciones fisiológicas vitales, pero tanto su déficit como su exceso puede resultar perjudicial<sup>6</sup>. Debido a esto, puede ser interesante averiguar la concentración de metales traza, tóxicos y esenciales, en alimentos, en especial la semilla de lino ecológica y no ecológica.

### 1.1. METALES PESADOS

Se entiende por metales pesados aquellos elementos cuya densidad es igual o superior a  $5\text{gcm}^{-3}$ , cuando está en estado elemental o cuando su número atómico sea superior a 20, sin incluir a los alcalinos y a los alcalinotérreos (grupo 1 y 2 de la tabla periódica). Junto a este grupo hay otros elementos que, aunque se consideran como metales ligeros o no metales se suele englobar en este grupo por presentar unos orígenes y comportamientos asociados, como es el caso del arsénico (As), boro (B), bario (Ba) y selenio (Se). En general son elementos que están presentes en la vida cotidiana del ser humano donde alguno de ellos tiene importantes repercusiones para la salud. Poseen un metabolismo y una excreción en algunos casos complicado formando reservorios tóxicos. La concentración y la acumulación de los contaminantes en cada persona depende de una serie de factores: edad, sexo, grupo étnico,

ingresos económicos, estado de salud, localización geográfica y características metabólicas individuales.

La mayoría de estos elementos actúan como componentes o activadores de enzimas o proteínas y otros pueden interactuar con algunas vitaminas o actuar libremente como iones metálicos<sup>7</sup>. Podemos destacar elementos que cuya presencia en el organismo es necesaria: zinc (Zn), magnesio (Mg), selenio (Se), hierro (Fe), cobre (Cu), cobalto (Co), etc. (Figura 1). Son los llamados oligoelementos vitales que son necesarios en pequeñas cantidades en el organismo para llevar a cabo una serie de funciones bioquímicas. Un aporte insuficiente de estos ya sea por una mala alimentación (deficiencias en la dieta), por enfermedades, síndromes o el uso de fármacos que provoquen una mala absorción intestinal, puede llegar a producir daños. Por otra parte, un exceso de concentración de estos oligoelementos también es perjudicial, ya que a concentraciones altas en el organismo estos elementos se convierten en tóxicos<sup>8</sup>. Con todo esto es evidente que el estrecho equilibrio de estos elementos en nuestro organismo depende en buena parte de la relación salud-enfermedad.

Elemento	UL/día
<b>Cu</b>	10 mg
<b>Mn</b>	11 mg
<b>B</b>	20 mg
<b>I</b>	1,100 ug
<b>Fe</b>	45 mg
<b>Mo</b>	2,000u
<b>Zn</b>	40 mg
<b>V</b>	1,8 mg
<b>Ni</b>	1,1 mg

**Tabla 1.** Nivel máximo de ingesta tolerable (UL/día) para diversos elementos traza en un adulto sano de 70 kg<sup>7</sup>.

Además de estos elementos, hay otros como el bario (Ba), el boro (B), el Bromo (Br) o el estroncio (Sr) que son considerados como candidatos para ser elemento

traza. Sin embargo, hay otros elementos que no son traza pero que se encuentran en los seres vivos en concentraciones variables, estos son: el Aluminio (Al), antimonio (Sb), germanio (Ge), rubidio (Rb), plata (Ag), oro (Au), plomo (Pb), bismuto (Bi), titanio (Ti), circonio (Zr). Estos elementos se adhieren como contaminantes ambientales<sup>9</sup>.

La peligrosidad de estos metales pesados tiene que ver con que no pueden ser degradados (ni química ni biológicamente) y, además, tienden a bioacumularse y a biomagnificarse (es decir, que esta concentración aumenta según ascendemos en la cadena trófica) provocando efectos tóxicos de carácter diverso en el organismo que consume el alimento.

Los elementos que se van a determinar en este trabajo son los siguientes: litio, berilio, sodio magnesio, aluminio, calcio, vanadio, cromo, manganeso, hierro, cobalto, níquel, cobre, zinc, molibdeno, plata, cadmio, talio, plomo, bismuto y potasio. Aunque nos vamos a centrar en el cadmio y en el aluminio por la repercusión que han tenido en determinadas enfermedades inflamatorias, degenerativas y cáncer.

### **1.1.1. Legislación**

La principal normativa es el Reglamento (CE) nº 1881/2006 de la Comisión Europea donde se fija el contenido máximo de determinados contaminantes, dentro de los cuales están los metales pesados en los productos alimenticios<sup>10</sup> (Tabla 2).

El Reglamento (CE) nº 333/2007 de la Comisión Europea establecía los métodos de muestreo y análisis para el control de los niveles de plomo, cadmio, mercurio, estaño inorgánico, 3-mcpd (El 3-monocloropropano-1,2-diol (3-MCPD) compuesto químico que se forma durante el procesado de los alimentos) y benzopireno en los productos alimenticios<sup>11</sup>.

Elemento	Nivel máximo permitido (mg/kg)
<b>Plomo</b>	0,20
<b>Cadmio</b>	0,20
<b>Mercurio</b>	1,0

**Tabla 2.** Niveles máximos permitidos según el Reglamento nº1881/2006.

En relación con el Cadmio, la UE emitió la Recomendación 2014/193/UE sobre la reducción de cadmio en los productos alimenticios mediante medidas de mitigación en diferentes ámbitos<sup>12</sup>.

Y, por último, hablamos de Norma UNE-EN 13804:2013 “Productos alimenticios. Determinación de elementos y sus especies químicas. Consideraciones generales y requisitos específicos que describe los criterios de funcionamiento para la selección de métodos de análisis de elementos en productos alimentarios e incluye los requisitos y características de funcionamiento, las directrices para la puesta a punto del laboratorio, la preparación de las muestras y los informes de análisis<sup>13</sup>.

### 1.1.2. Cadmio.

El cadmio es un metal pesado no esencial y poco abundante en la naturaleza, se encuentra en forma de óxidos complejos, sulfuros y carbonatos. Es un elemento que se traspasa fácilmente del suelo a los vegetales y su retención depende de una serie de circunstancias: tamaño de partícula, clima, características de la planta y velocidad de acumulación.

La agencia internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) clasificó el cadmio como un agente de la categoría 1 (cancerígeno para los humanos) por existir suficiente evidencia científica que lo avala<sup>14</sup> donde su papel en el cáncer de pulmón ha sido descrito y comprobado. La EFSA adoptó un dictamen el 30 de enero de 2009 sobre el cadmio, donde estableció una ingesta semanal tolerable de 2,5 microgramos/kg de peso corporal<sup>15</sup>.

#### 1.1.2.1. Vías de exposición.

Este elemento se utilizaba como cubierta para elementos de hierro o acero para protegerlos frente a la corrosión. Actualmente, forma una aleación con el cobre para los cables eléctricos y con el Pb y el Zn. Se usa también en barras de control y recubrimiento de reactores nucleares debido a su capacidad para absorber neutrones.

La población general está expuesta al cadmio a través de la contaminación del aire, agua, suelos, alimentos y el tabaco. Según un estudio (Norvell et al. 2000)<sup>16</sup> la dieta es la principal fuente de contaminación en humanos. Este metal se incorpora al medio ambiente a través de fuentes tanto naturales como industriales como puede ser la incineración, fundición de metales, galvanizado y plateado o la minería.

#### 1.1.2.2. Absorción y toxicidad.

Al fumar tabaco se inhala el humo, el cual lleva cadmio, de ahí llega a los pulmones, pasa a la sangre y a partir de este momento se distribuye por todo el organismo. La inhalación de productos que contengan cadmio puede producir neumonitis aguda y edema pulmonar, pudiendo producir con exposiciones prolongadas cambios estructurales en el pulmón y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)<sup>17</sup>. A partir de este punto el paso del cadmio a través del organismo, si es ingerido o inhalado, es el siguiente: el cadmio llega al hígado, donde se une a proteínas que son transportadas a los riñones. En este órgano el cadmio se empieza a acumular modificando la filtración de sustancias. Por otra parte, la ingesta de alimentos con alto contenido de cadmio produce una irritación grave en el estómago junto con vómitos y diarrea<sup>17</sup>. También puede verse afectado el metabolismo del calcio y la resorción ósea, lo que provoca situaciones de fragilidad y patologías como osteoporosis u osteomalacia, fracturas óseas y dolor en las articulaciones<sup>18</sup>. Estos síntomas se obtienen por

haber ingerido alimentos o agua con concentraciones de cadmio alrededor de 15 ppm<sup>17</sup>.

La exposición crónica de cadmio afecta principalmente al riñón ya que la acumulación de cadmio provoca el fallo de la función renal por daño en los túbulos, generalmente irreversible<sup>17</sup>.

### **1.1.3. Aluminio.**

El aluminio es un elemento abundante en la superficie terrestre, y, por lo tanto, está de manera natural en el agua y en el suelo. En los alimentos, además de su presencia natural, se puede encontrar por la adición de aditivos y por la transferencia desde utensilios de cocina que contengan aluminio.

#### **1.1.3.1. Vías de exposición**

Este elemento no se considera como oligoelemento esencial para los humanos. El aluminio es utilizado como aditivo alimentario en la superficie de algunos productos como el queso fundido, huevos procesados o algunos productos de confitería. También se encuentra en productos cosméticos como desodorantes, pintalabios o pasta de dientes y en algunos fármacos como antiácidos o analgésicos<sup>18</sup>.

#### **1.1.3.2. Absorción y toxicidad**

Los alimentos son la principal vía de exposición del aluminio para la población, en especial pescado, mariscos, pan y cereales. Se absorbe muy poco por vía oral, entre un 0,01% y un 0,3%. En un medio ácido como el estómago, los compuestos de aluminio son muy solubles, sin embargo, en medios básicos como el intestino, estos compuestos son insolubles. En la sangre es transportado por la transferrina y se acumula de manera mayoritaria en los tejidos, siendo los pulmones su principal diana. También se puede encontrar en piel, intestinos, nódulos linfáticos o en el cerebro<sup>18</sup>.

Existe poca información sobre los efectos perjudiciales que puede tener el aluminio en el organismo. Hay estudios que sugieren una relación entre el aluminio y enfermedades degenerativas, como el Alzheimer<sup>20</sup>. Sin embargo, la EFSA considera que la exposición al aluminio en la dieta no constituye un riesgo para padecer la enfermedad de Alzheimer<sup>21</sup>.

## **1.2. ALIMENTOS ECOLOGICOS**

Otro de los objetivos de este trabajo es observar la posible diferencia en la concentración de metales pesados entre alimentos ecológicos y no ecológicos. Los alimentos ecológicos se elaboran de una forma respetuosa con el medio ambiente y es aquel que se obtiene a través de métodos de producción ecológicos. Por ello, según el REGLAMENTO (CE) 848/2018 sobre producción y etiquetado de productos ecológicos dictamina que para un producto de estas características: se prohíbe el uso de organismo modificados genéticamente (OMG) y de radiaciones ionizantes, limita el uso de fertilizantes artificiales, herbicidas o plaguicidas y por último, prohíbe el uso de hormonas y restricción del uso de antibióticos<sup>22</sup>. La caza de animales y la pesca de animales salvajes no se consideran alimentos ecológicos.

Este tipo de alimentos tiene una serie de ventajas frente a los alimentos llamados convencionales, que son: ausencia de pesticidas, menor contaminación de agua y suelo y tienen mejor calidad (sabor y olor). Según K. Brandt et. Al. (2011)<sup>23</sup> se observó un aumento de metabolitos secundarios implicados en la defensa del organismo y de vitamina C en productos ecológicos. Además, estos alimentos tienen una mayor cantidad de micronutrientes como el Zinc o el Hierro en comparación con los convencionales. En el siguiente meta-análisis realizado por M, Baranski et. al. (2014)<sup>24</sup> se determinó que los alimentos orgánicos tienen aumentado en un 21% su cantidad de antioxidantes y que los productos convencionales con los que se compararon tenían una concentración cuatro veces superior de pesticidas y una concentración superior de Cadmio.

Sin embargo, el beneficio de este tipo de alimentos no está del todo claro, ya que hay otros estudios, que no encontraron suficientes datos estadísticamente significativos para recomendar una dieta orgánica frente a una no orgánica<sup>25</sup>. También, un estudio realizado en los Países Bajos en 2010<sup>26</sup>, donde se comparó el consumo de verduras ecológicas y convencionales, no encontró evidencias significativas, para recomendar un consumo ecológico de verduras, aunque observaron algún micronutriente aumentado, no era suficiente como para recomendar un consumo de verduras ecológico.

Debido a todo lo expuesto, se puede afirmar que los alimentos ecológicos presentan una serie de ventajas, frente a los llamados tradicionales, pero debemos basarnos en realidades, es decir, en propiedades demostradas científicamente y no en técnicas de marketing o en etiquetados engañosos. Hace falta estudiar tanto las propiedades nutritivas y saludables de estos productos, como las no saludables, ya que existen muchos sectores implicados debido al crecimiento en las ventas de este tipo de artículos. En la tabla 3 podemos ver los países con mayor crecimiento en la UE de venta de productos ecológicos.

<b>Países con mayor crecimiento 2015-2016 (Europa)</b>			
<b>País</b>	<b>% crecimiento</b>	<b>País</b>	<b>% crecimiento</b>
<b>Irlanda</b>	22 %	Luxemburgo	15 %
<b>Francia</b>	22 %	Italia	14 %
<b>Dinamarca</b>	20 %	Finlandia	14 %
<b>Noruega</b>	20 %	España	13 %
<b>Liechtenstein</b>	15 %	Austria	13 %

**Tabla 3.** Países con mayor crecimiento de ventas de productos ecológicos entre 2015-2016. Fuente: FIBL

### 1.3. ANTECEDENTES

Tras hacer una revisión bibliográfica en varias bases de datos, para conocer los antecedentes y el punto de partida donde se encontraba esta investigación, se encontraron diversos estudios sobre la acumulación de metales pesados en suelo o en semilla de lino. En el estudio realizado por Angelova, V et al 2003<sup>27</sup> se comprobó la acumulación de diversos metales pesados, en distintas especies de plantas y en varias partes de estas, donde se llegó a la conclusión que el lino es la especie que más concentración de estos metales tenía entre todas las estudiadas, siendo la raíz donde más se acumula. Por este motivo, se vio que es una especie adecuada para limpiar el suelo de contaminantes.

En otro estudio realizado por Soudek, P et al 2010<sup>28</sup>, se midió los efectos que tenían los metales pesados en la germinación de la semilla de lino. Así, llegaron a la conclusión, que los que más influyen en la semilla de lino son el Arsénico, el cobre y el cadmio.

Xing, Li et al 2014<sup>29</sup> determinaron mediante ICP los elementos que se encontraban en mayor cantidad en la semilla de lino de diez regiones diferentes. Observaron que en mayor cantidad se encontraba el potasio, estroncio, manganeso, níquel, cobre, cobalto, cadmio, selenio, zinc y cromo.

En un estudio realizado en Finlandia<sup>30</sup> obtuvieron que la cantidad de cadmio en las semillas de lino variaba entre 0,27 y 1,3 mg/kg. Comprobaron que estas cantidades superaban el máximo permitido por la EFSA que es de 0,1 mg/kg.

Por último, en un estudio español realizado por Rubio, C et. al 2018<sup>31</sup> se determinó la presencia de metales pesados en determinados productos alimentarios, entre ellos la semilla de lino y, además, diferenciaron las muestras entre ecológicas y no ecológicas para comprobar si hubiera diferencias respecto a la concentración de metales pesados. Llegaron a la conclusión que los elementos no superaban las ingestas máximas recomendadas. Únicamente

encontraron diferencias en el aluminio donde la concentración era superior en ecológicos.

Como conclusión, tras realizar la búsqueda bibliográfica se observa la escasa cantidad de estudios relacionados con la determinación de metales pesados en semilla de lino. Debido a la poca presencia de estudios y a la creciente demanda de productos ecológicos era necesario realizar este estudio.

## **2.OBJETIVOS**

Este trabajo de fin de grado tiene los siguientes objetivos:

- El objetivo principal es analizar la concentración de metales pesados en semilla de lino.
- Comprobar en que concentración se encuentran los diferentes elementos traza.
- Estudiar si existen diferencias de concentraciones entre las diversas marcas comerciales.
- Comprobar si por el hecho de ser ecológico la concentración de metales pesados es menor o mayor que un producto no ecológico.
- Realizar encuestas en oficinas de farmacia para comprobar el conocimiento que tiene la población sobre la semilla de lino.

## **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

En este apartado se van a ir desarrollando tanto los métodos realizados como los distintos aparatos utilizados en la presente investigación y la descripción del material utilizado en la misma.

### **3.1. METODOLOGÍA DE BÚSQUEDA DE INFORMACIÓN**

La estrategia de búsqueda principal, se llevó a cabo identificando los diferentes descriptores en Ciencias de la Salud (Decs), a través de la página decs.bvs.br... Seguidamente, estos descriptores, fueron llevados a la base de datos Medline, por medio de los Medical Subject Headings (MeSH). Los MeSH utilizados fueron "Flax", "Heavy metals", "Cadmium", "Arsenicum", "Aluminum". A través de estos descriptores, se realizaron una serie de búsquedas con el objetivo de encontrar referencias y bibliografía sobre este tema.

### **3.2. DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS OBJETO DE ESTUDIO**

Para llevar a cabo este estudio, se seleccionaron 10 marcas de semilla de lino, realizando una búsqueda en diversos establecimientos destinados a su venta como parafarmacias, herboristerías, tiendas dietéticas y grandes superficies, distribuidas por la ciudad de Elche (Alicante). En el presente estudio se ha considerado oportuno clasificar las muestras en función de si se trata de muestras ecológicas o no ecológicas, como se muestra en la tabla 4. La recogida de muestras se realizó en enero de 2020.

Una vez en el laboratorio de la Dra. Elena García García, en el Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández (UMH), las muestras se conservaron, protegidas de la luz y de la humedad, y se mantuvieron a temperatura ambiente, imitando las condiciones de almacenamiento comerciales. Se consideró como criterios de selección que se consumieran en Elche y alrededores y que fueran muestras que se pudieran encontrar normalmente en herboristerías, supermercados y grandes superficies y por internet en formato de bolsa. En cuanto a los criterios de exclusión se estableció que no estuviera el producto caducado.

Nº Muestra	Marca comercial	Variedad (Marrón/dorado)	Origen	Ecológico Si/No
1	Rincón del segura	Marrón	Kazajistán	Si
2	Biográ Bio-organic	Dorado	España	Si
3	Mercadona	Marrón	Polonia	No
4	Biográ Eco	Dorado	España	Si
5	Biocop	Marrón	España	Si
6	El corte ingles	Dorado	UE	No
7	Carrefour	Dorado	Canadá	No
8	Hijas del sol	Dorado	España	Si
9	Carrefour Bio	Dorado	Canadá	Si
10	Prozis	Marrón	Canadá	No

**Tabla 4.** Muestras recopiladas en el estudio.

### 3.3 REALIZACIÓN DE ENCUESTAS

La encuesta (Anexo 1) se realizó en la UMH por el equipo de trabajo. La encuesta fue pasada en un espacio fijo, que fue en la Farmacia Iborra situada en la calle Doctor Caro nº 101. Se eligió dicha Oficina de Farmacia por la disposición de su propietaria a colaborar sin dilación y de forma desinteresada con la UMH de Elche, con la que lleva cooperando desde hace varios años, ofreciendo la posibilidad a los estudiantes de 5º curso de realizar las prácticas tuteladas en dicha oficina. También, destacar su estratégica ubicación y las características de los pacientes que la frecuentan ya que son muy propicias para alcanzar los objetivos perseguidos en el presente trabajo. Doña Asunción Iborra Campos nos abrió las puertas de esta dependencia para llevar a cabo el pase de la encuesta.

La encuesta fue pasada por el personal de la farmacia a sus clientes y estaba compuesta por 13 preguntas (Anexo 1) que se podían dividir en dos bloques: un primer bloque donde se valoraba el conocimiento del encuestado acerca de la semilla de lino y su consumo y otro bloque de variables sociodemográficas.

### **3.4. EQUIPOS DE LABORATORIO.**

En relación con los equipos de laboratorio, para pesar las semillas se utilizó una balanza de precisión de marca Gram serie ST con un margen de error de 0,005 gramos. La disolución de las muestras se realizó en un thermoblock de marca FALC. Por último, el análisis del contenido de metales se llevo a cabo en un ICP-MS de marca Aquilent modelo 7500, que se encuentra en el laboratorio de D. Eugenio Vilanova situado en el Instituto de Bioingeniería de la UMH.

### **3.5. MATERIAL**

Para este TFG se han utilizado los siguientes materiales:

- Embudo.
- Matraz aforado de 10 mL.
- Vasos de precipitados de diferentes tamaños.
- Tubos de plástico de 10 mL.
- Tubos de ensayo de cristal de 25 mL
- Gradillas.
- Papel de filtro.
- Micropipetas.
- Pipetas Pasteur.

### **3.6. REACTIVOS Y DISOLUCIONES**

Se utilizaron reactivos de calidad pura para el tratamiento y el análisis de la muestras, estos reactivos se pueden observar en la tabla 5. Además, se ha utilizado agua bidestilada o mili-Q (18m  $\Omega$ ) envasada en recipientes de plástico.

Reactivo	Concentración	Marca comercial
Ácido nítrico	65%	Panreac Barcelona (España)
Ácido nítrico	5%	Panreac Barcelona (España)
Ácido perclórico	60%	Panreac Barcelona (España)
ICP multielement standart	10%	Sigma-Aldrich (USA)

Tabla 5. Reactivos utilizados en el presente estudio.

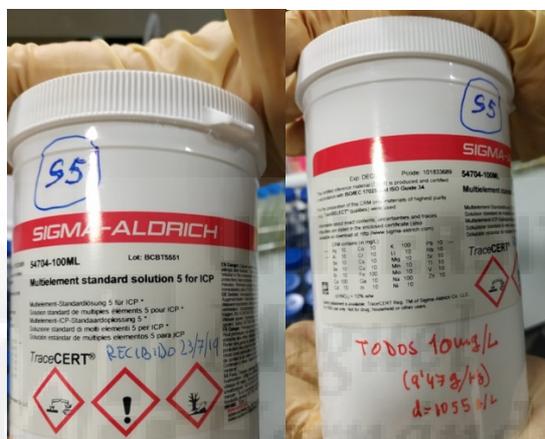


Figura 1. Patrones utilizados en el estudio.

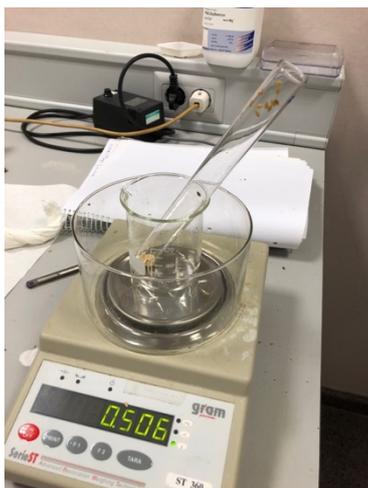
### 3.7. PROGRAMAS INFORMÁTICOS

Los análisis estadísticos se realizaron con el software R Commander (GNU GPL, paquete R, versión 2.6-2, software gratuito de John Fox, Departamento de Sociología de la Universidad McMaster (Canadá))

### 3.8. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

#### 3.8.1. Mineralización de la muestra.

En esta fase, tras hacer una revisión bibliográfica se llegó a la conclusión que para obtener un resultado óptimo, se debían pesar 0,5 gramos de cada muestra, como se observa en la figura 2, con una precisión de  $\pm 0,005$  gramos.



**Figura 2.** Pesaje de las muestras.

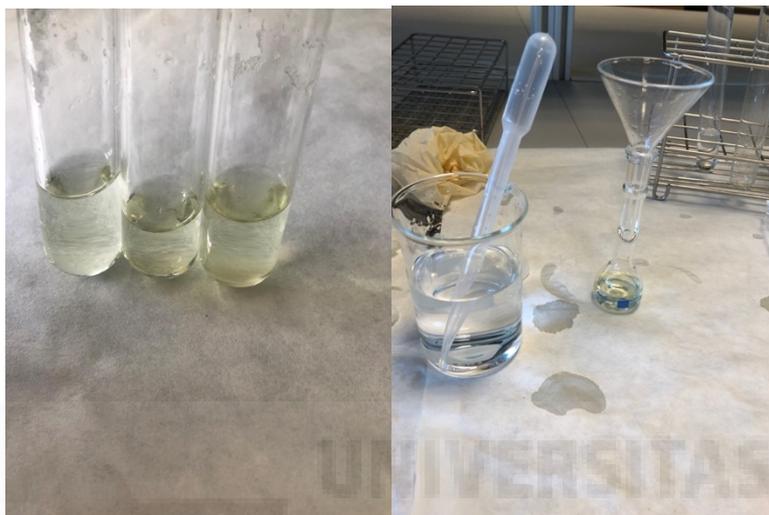
Una vez pesadas las muestras, se añade 5 mL de ácido nítrico al 65% a cada una de las muestras (Figura 3) y se introducen en un Thermoblock, para proceder a la digestión de las muestras, con un primer paso, de 30 minutos a 60°C, para después un segundo paso, aumentando la temperatura hasta 130°C y manteniendo las muestras a esa temperatura durante una hora.



**Figura 3.** Foto tomada después de añadir los 5 mL de ácido nítrico.

El paso siguiente consiste en añadir 1 mL de ácido perclórico al 60% y colocarlo en el Thermoblock a 130°C durante 3 horas y 45 minutos. En la figura 4 se puede observar el resultado final de la mineralización realizada. Pasado este tiempo y digeridas, se pasan a un matraz aforado de 10 mL donde se enrasa con agua desmineralizada o mili-Q, que es aquella a la que se le han extraído los cationes como sodio o calcio, y aniones como el carbonato, fluoruro o cloruro, mediante

un proceso de intercambio iónico. Este proceso, como se observa en la figura 5, se realiza para bajar la concentración de los reactivos que se añadidos, para que estén en un rango adecuado para una óptima acción en el espectrómetro. Una vez diluidas, se agitaron y se colocaron en tubos de plástico de 10 mL; donde se cogieron 5 mL para su análisis.



**Figura 4 y 5.** Foto tras acabar la mineralización y adición de agua mili-Q

### 3.8.2. Determinación de elementos por ICP-MS.

Una vez que se han obtenido las muestras procesadas en forma de disolución de las semillas de lino, se procede a medir y cuantificar los contenidos en elementos mediante el equipo de ICP-MS. Los metales analizados mediante esta técnica fueron los siguientes: Ag, Al, As, Au, B, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Se, Sr, Tl, U, V y Zn.

En el funcionamiento del ICP-MS se forma un plasma de gas argón obtenido por la interacción de un campo de radio frecuencia y el gas argón ionizado. La corriente de argón fluye entre dos tubos de cuarzo y se hace conductora por exposición a una descarga eléctrica que crea iones y electrones. Éstos, son obligados a circular dentro del campo magnético por un espacio anular cerrado en el que sufren un calentamiento debido a la resistencia que encuentran, provocándose una ionización adicional. Este proceso, consigue que el plasma

se expanda en todas las direcciones en cuyo centro se inyecta la muestra en forma de aerosol. Los átomos de la misma están sometidos a temperaturas entre 6000 a 8000°K, consiguiéndose una disociación casi completa y lográndose una reducción de las interferencias químicas<sup>32</sup>.

En el ICP-MS, los iones de los átomos son orientados por lentes electromagnéticas hacia un espectrómetro de masas, permitiendo la separación de los elementos y sus isótopos por la relación/carga, gracias a campos electromagnéticos que orientan los iones hacia un detector que cuenta los impactos de estos, detectándose así los diferentes isótopos del elemento y cuantificándose.

La ICP-MS es una técnica muy adecuada para el control analítico de la contaminación ambiental por metales traza, con alta sensibilidad y total especificidad, con la ventaja de la determinación simultánea de muchos elementos. En la figura 6, se puede observar el equipo que se utilizó para el estudio de los elementos minerales de las muestras analizadas.



**Figura 6.** Equipo ICP-MS utilizado en este estudio.

### **3.8.3. Patrones internos (ISTD).**

Para cubrir la totalidad del espectro y con el objetivo de corregir la variabilidad propia del equipo se utilizaron como patrones internos el Sc (m/z 45), I (m/z 89) y el Re (m/z 1856) ICP Standard 1000 mg/L CertiPUR® Merck. Un patrón o estándar interno es una sustancia en una cantidad constante a una muestra, en blanco y estándar en el análisis. Puede compensar errores sistemáticos y aleatorios, por ejemplo, si hay fluctuaciones de los instrumentos que causan errores aleatorios en la medición. Se utilizaron dos criterios de selección de estos compuestos: que no estuvieran presentes en la semilla de lino y que fueran monoisótopos. El patrón interno debe tener un comportamiento parecido al analito problema, tanto en el potencial de ionización como la masa atómica.

Con estos patrones, se hizo una disolución (usando HNO<sub>3</sub> al 6% como diluyente), con un volumen de 500 ml conteniendo los tres elementos a una concentración de 1000 mg/l cada uno, a la que se llamó patrón interno (*Pi*). La disolución *Pi*, se colocó en un frasco de plástico previamente tratado con HNO<sub>3</sub> al 6%, al cual se le adaptó un dosificador para botella previamente calibrado para dispensar 0,5 ml. Usando ese dispensador se prepararon 26 tubos Falcon con 0,5 ml de *Pi* cada uno: 10 para las muestras de semilla de lino, 6 para los patrones de calibración y 10 para blancos de laboratorio y reserva.

Tras haber realizado el procesamiento de digestión de las muestras de semilla de lino, se tomaron 5 ml de cada muestra y se agregaron a los tubos previamente preparados con 0,5 ml de patrón interno de Y, Re y Sc ICP standard, a concentración de 1000mg/l.

### **3.8.4. Patrones y curvas de calibrado.**

La señal de medida del ICP-MS se obtiene a partir de las cuentas por segundo de cada disolución del patrón para conseguir las curvas de calibrado

correspondientes a cada elemento a analizar, expresadas como cuentas por segundo frente a la concentración de cada elemento.

En primer lugar, se realizó un ajuste interno del ICP-MS con una disolución patrón 10 nM de Litio, Cobalto, Talio e Ytrio de Autotune de Agilent Instruments. Previo al comienzo del análisis de las muestras en el laboratorio, se llevó a cabo la puesta a punto del método con las condiciones más adecuadas para medir dichos elementos. Para ello, se utilizaron dos métodos: el método cuantitativo ("fullquant") y el método semicuantitativo ("semiquant").

El método cuantitativo se utilizó para analizar aquellos elementos de los cuales se habían preparado previamente sus respectivos patrones. Este método calcula las concentraciones de cada elemento mediante las curvas de calibrado construidas a partir de las concentraciones conocidas de los patrones que se han introducido previamente. En cambio, el método semicuantitativo se utilizó para determinar aquellos elementos que eran interesantes analizar, pero de los que no se disponía de patrón. Este método se basa en que la respuesta de un ion formado en el plasma es una función continua de la masa ion. De esta forma, se pueden construir curvas de respuesta utilizando una serie de elementos a concentración conocida que cubran todo el rango de masas si el equipo se ha calibrado previamente con una disolución de concentración conocida de algunos elementos representativos del sistema periódico. Este modo de trabajo permite obtener resultados en tiempo de análisis muy cortos con errores en torno al 10%, margen que es suficiente en muchos controles.

Usando los patrones CertiPUR® Merck, ya descritos anteriormente, y un matraz aforado de 25 mL, se preparó una disolución conteniendo: 250 µg/l de patrón de Al, 250 µg/l de patrón de Hg y 24,5 ml de patrón multielementos.

Se hicieron 12 patrones a diferentes diluciones para las curvas de calibración de cada elemento de estudio, excepto para el Cu y el Zn, de los que se hicieron 15. El análisis de Ag, Au y U se hizo por método semicuantitativo,

usando como patrón la solución Tunning para ICP-MS Agilent con los elementos Li (m/z:7), Co (m/z: 59), Y (m/z: 89), Ce (m/z: 140) y Tl (m/z: 205), a una concentración de 10 µg/l. Los patrones internos utilizados en este trabajo fueron el Escandio (Sc), Itrio (I), el Renio (Re) y Oro (Au).

### 3.8.5 Curva patrón multielemental.

Se realizaron 6 patrones diferentes a distintas concentraciones, se partió del patrón 0 (muestra sin diluir) y, a partir de este momento, las demás diluciones eran disoluciones seriadas 1:3, sobre el patrón 0 (Tabla 6). El patrón 0 era 100 mg/L para el calcio, hierro, sodio y potasio. Para el aluminio, plata, bario, berilio, cadmio, cobalto, cesio, cromo, litio, magnesio, manganeso, molibdeno, níquel, plomo, zinc, titanio y vanadio, la concentración fue de 10 mg/L. Dependiendo del comportamiento del elemento en el ICP-MS, se realizó la calibración de la recta patrón de cada elemento. De este modo y como se ha mencionado ya previamente, todos los elementos fueron analizados con método cuantitativo en el software del ICP, usando las curvas de calibración correspondientes a cada elemento.

Concentración inicial		
mg/L	Dilución	
<b>Patrón 0</b>	100 mg/L	10 mg/L
<b>Patrón 1</b>	33.333 mg/L	3.333 mg/L
<b>Patrón 2</b>	11.111 mg/L	1.111 mg/L
<b>Patrón 3</b>	3.700 mg/L	0,370 mg/L
<b>Patrón 4</b>	1,234 mg/L	0,123 mg/L
<b>Patrón 5</b>	0,411 mg/L	0,041 mg/L
<b>Blanco (Agua mili-Q)</b>	0,000 mg/L	0,000 mg/L

**Tabla 6.** Concentración de las muestras patrón.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. RESULTADOS DE LAS ENCUESTAS

Para el estudio se aplicó la técnica del auto informe y de este modo obtener información empírica mediante cuestionarios sobre una muestra de participantes con el objeto de investigar el consumo de semilla de lino en la misma. El cuestionario respeta la Ley de protección de datos y se pidió consentimiento, fueron respondidos anónimamente, y sólo se usarán los datos de manera estadística para conocer la realidad del consumo de semilla de lino.

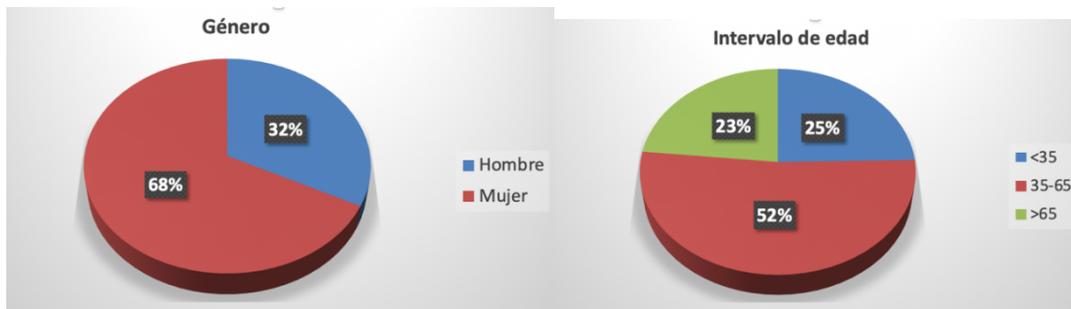
El cuestionario está compuesto por tres partes:

1. Datos sociales y personales
2. Consumo de semilla de lino
3. Consumo ecológico o tradicional

Se realizaron un total de 80 encuestas (formato encuesta en Anexo 1) en la Farmacia Iborra (Elche). Posteriormente se realizó un análisis para dar los resultados en porcentajes, ver figuras (7-18).

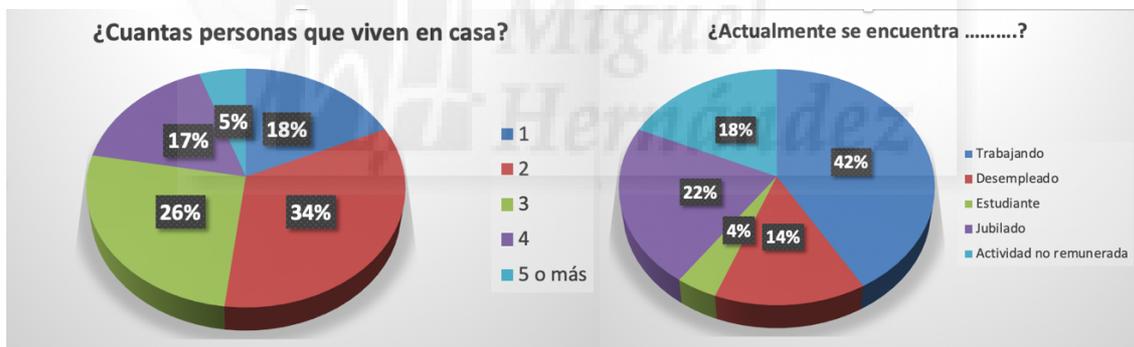
La Figura 7 recoge el género de los encuestados, donde se puede observar que de la muestra está compuesta mayoritariamente por mujeres (n=54, 68%) y, en menor cantidad, por hombres (n=26, 32%). Además, la figura 8 deja como resultado que la mitad de los encuestados se encontraban dentro del rango de edad entre los 35-65 años.

**Figuras 7 y 8.** Respuestas en formato de diagrama circular a las preguntas 11 y 12 de la encuesta respectivamente.



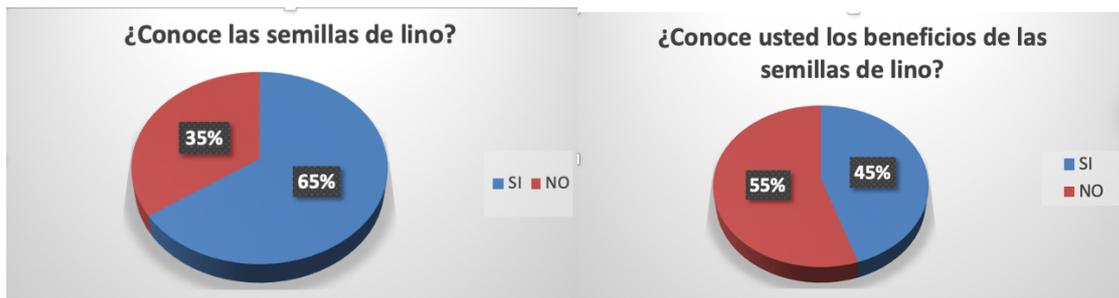
Las siguientes preguntas fueron sobre dos variables sociales. Las figuras 9 y 10 nos dejaron como conclusión que la mayoría de los hogares estaban ocupados por 3 personas o menos y que el 42% de los encuestados se encontraban trabajando en la actualidad.

**Figura 9 y 10.** Respuestas en formato de diagrama circular a las preguntas 12 y 13 de la encuesta respectivamente.



Como se puede observar en la figura 11, el 65% de los encuestados conoce la semilla de lino frente a un 35% que no. Sin embargo, la figura 12 muestra que a pesar de que más de la mitad de las personas encuestadas conoce la semilla de lino, el 55% no conoce sus posibles beneficios.

**Figuras 11 y 12.** Respuestas en formato de diagrama circular a las preguntas 1 y 2 de la encuesta respectivamente.



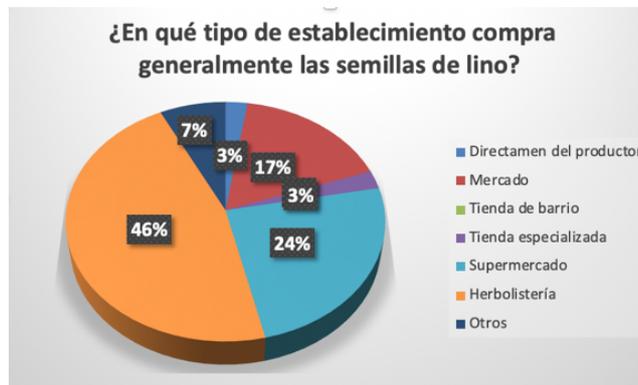
En la figura 13 se observa una clara diferencia donde el 61% de los encuestados no consume semilla de lino contra el 39% que si consume. A la gente que contestó si a la pregunta 3 se le hizo la pregunta n°4, donde se observa que el 75% lo consumía por sus beneficios para la salud como se refleja en la figura 14.

**Figuras 13 y 14.** Respuestas en formato de diagrama circular a las preguntas 3 y 4 de la encuesta respectivamente.



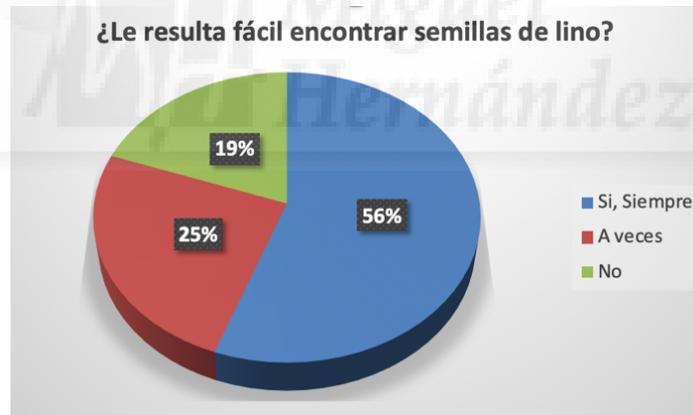
La figura 15 muestra que casi el 50% de los consumidores compran semilla de lino en herboristerías. Esto puede explicar el bajo porcentaje de consumidores que se refleja en las encuestas.

**Figura 15.** Respuestas en formato de diagrama circular a la pregunta 5 de la encuesta.



Como se puede observar en la figura 16, solo a un 19% de los consumidores les cuesta encontrar semillas de lino, por lo que se puede decir que está bastante extendida en el mercado.

**Figura 16.** Respuestas en formato de diagrama circular a las pregunta 6 de la encuesta respectivamente.



La figura 17 refleja el consumo de productos ecológicos que tiene la población, donde se observa que el 53% no consume este tipo de productos. Además, se preguntó (figura 18) por la posibilidad de incluir la semilla de lino en el menú de los comedores infantiles, dando como resultado que un 58% estaría de acuerdo con esa posibilidad.

**Figura 17 y 18.** Respuestas en formato de diagrama circular a las preguntas 7 y 8 de la encuesta respectivamente.



## 4.2. CONCENTRACIÓN DE METALES PESADOS

### 4.2.1. Concentración de metales pesados en muestras.

En las tablas 7A y 7B se puede observar las concentraciones obtenidas por el ICP-MS. El Be, Cr, V y Ni, se eliminaron del estudio debido a que todas sus concentraciones se encontraron por debajo del límite de detección, y por tanto, el aparato no fue capaz de proporcionar las concentraciones para estos elementos o no existen en la semilla de lino.

Elemento							
Muestra	Li	Na	Mg	Al	Ca	Mn	K
SL1	1,01x10 <sup>-3</sup>	23,51	123,4	8,231	97,63	1,231	433,2
SL2	6,10 x10 <sup>-4</sup>	15,54	113,5	4,153	87,96	1,683	343,5
SL3	6,11 x10 <sup>-4</sup>	40,42	138	1,603	94,29	1,533	311
SL4	4,08 x10 <sup>-4</sup>	51,94	152	2,319	123,6	1,629	388,8
SL5	1,94 x10 <sup>-4</sup>	47,03	127,0	1,46	99,42	1,47	377,8
SL6	2,13 x10 <sup>-3</sup>	20,98	156,1	6,66 x10 <sup>-1</sup>	92,15	1,313	469,6
SL7	1,94 x10 <sup>-4</sup>	13,67	127	8,57 x10 <sup>-1</sup>	124,3	1,414	415,2
SL8	1,94 x10 <sup>-4</sup>	24,44	131,1	6 x10 <sup>-1</sup>	116,5	1,182	458,6
SL9	1,94 x10 <sup>-4</sup>	34,74	131	1,095	80,58	1,229	368,5
SL10	1,07 x10 <sup>-3</sup>	18,63	149	9,62x10 <sup>-1</sup>	92,03	1,36	270,3

**Tabla 7A.** Datos de concentración (mg/L) de las 10 muestras proporcionados por el ICP-MS como media de dos medidas. SL= Semilla de lino

Elemento								
Muestra	Fe	Co	Cu	Zn	Mo	Cd	Tl	Pb
SL1	11,23	11,19	2,17 x10 <sup>-1</sup>	3,42 x10 <sup>-1</sup>	3,54 x10 <sup>-2</sup>	8,44 x10 <sup>-3</sup>	8,96x10 <sup>-3</sup>	1,39x10 <sup>-2</sup>
SL2	6,054	4,779	2,1 1x10 <sup>-1</sup>	5,29 x10 <sup>-1</sup>	3,63 x10 <sup>-2</sup>	8,44 x10 <sup>-3</sup>	8,99x10 <sup>-3</sup>	1,09x10 <sup>-2</sup>
SL3	3,56	4,509	2,18 x10 <sup>-1</sup>	6,03 x10 <sup>-1</sup>	3,51 x10 <sup>-2</sup>	8,44 x10 <sup>-3</sup>	8,98x10 <sup>-3</sup>	1,07x10 <sup>-2</sup>
SL4	4,741	4,655	2,12 x10 <sup>-1</sup>	5,31 x10 <sup>-1</sup>	3,68 x10 <sup>-2</sup>	8,44 x10 <sup>-3</sup>	9,02x10 <sup>-3</sup>	1,08x10 <sup>-2</sup>
SL5	4,893	4,641	2,13 x10 <sup>-1</sup>	5,61 x10 <sup>-1</sup>	3,31 x10 <sup>-2</sup>	8,44 x10 <sup>-3</sup>	9,03x10 <sup>-3</sup>	1,06x10 <sup>-2</sup>
SL6	3,091	4,421	2,15 x10 <sup>-1</sup>	4,68 x10 <sup>-1</sup>	3,49 x10 <sup>-2</sup>	1,22 x10 <sup>-2</sup>	8,99x10 <sup>-3</sup>	1,05x10 <sup>-2</sup>
SL7	3,406	4,489	2,11 x10 <sup>-1</sup>	5,82 x10 <sup>-1</sup>	3,43 x10 <sup>-2</sup>	1,42 x10 <sup>-2</sup>	8,99x10 <sup>-3</sup>	1,07x10 <sup>-2</sup>
SL8	3,101	4,449	2,1 x10 <sup>-1</sup>	4,75 x10 <sup>-1</sup>	3,47 x10 <sup>-2</sup>	8,44 x10 <sup>-3</sup>	9,02x10 <sup>-3</sup>	1,05x10 <sup>-2</sup>
SL9	2,782	4,377	2,14 x10 <sup>-1</sup>	5,23 x10 <sup>-1</sup>	3,56 x10 <sup>-2</sup>	8,44 x10 <sup>-3</sup>	9,01x10 <sup>-3</sup>	1,07x10 <sup>-2</sup>
SL10	3,495	4,462	2,14 x10 <sup>-1</sup>	5,15 x10 <sup>-1</sup>	3,56 x10 <sup>-2</sup>	1,12 x10 <sup>-2</sup>	9,03x10 <sup>-3</sup>	1,06x10 <sup>-2</sup>

**Tabla 7B.** Datos de concentración (mg/L) de las 10 muestras medidas en el ICP-MS como media de dos medidas. SL= Semilla de lino

MUESTRAS ECOLÓGICAS						
	SL1	SL2	SL4	SL5	SL8	SL9
<b>Li</b>	0,021	0,012	0,008	0,004	0,004	0,004
<b>Na</b>	470	310	1038	940	588	694
<b>Mg</b>	2468	2270	3040	2558	2622	2589
<b>Al</b>	164,6	83,06	463,8	292	135,7	219
<b>Ca</b>	2042	1860	2598	2162	2486	1733
<b>Mn</b>	24,62	33,66	32,58	29,4	23,64	24,58
<b>Fe</b>	224	112	94	97	62	55
<b>Co</b>	0,223	0,095	0,093	0,092	0,088	0,087
<b>Cu</b>	4,346	4,218	4,248	4,258	4,196	4,282
<b>Zn</b>	68,24	10,574	10,618	11,222	9,49	10,464
<b>Mo</b>	0,707	0,726	0,736	0,736	0,661	0,712
<b>Cd</b>	0,168	0,168	0,168	0,168	0,168	0,168
<b>Tl</b>	0,179	0,179	0,180	0,180	0,180	0,180
<b>Pb</b>	0,278	0,217	0,215	0,211	0,210	0,213
<b>Bi</b>	0,170	0,170	0,170	0,170	0,170	0,170
<b>K</b>	8664	6870	7766	7556	9172	7370
<b>Ag</b>	0,631	0,631	0,632	0,633	0,633	0,631

**Tabla 8.** Datos concentración (mg) de los elemento por kg de muestra ecológicas.

Las tablas 8 y 9 muestran las concentraciones de los metales analizados haciendo distinción entre muestras ecológicas y no ecológicas. El elemento que se encontró en mayor concentración tanto en muestras ecológicas como no ecológicas fue el K con 7900 mg/kg y 7300 mg/kg, respectivamente. Además, el Mg, el Ca y el Na son los otros tres elementos que tienen concentraciones más altas en ambos grupos.

<b>MUESTRAS NO ECOLÓGICAS</b>				
	<b>SL3</b>	<b>SL6</b>	<b>SL7</b>	<b>SL10</b>
<b>Li</b>	0,012	0,042	0,003	0,021
<b>Na</b>	808	416	273	372
<b>Mg</b>	2760	3122	2540	2980
<b>Al</b>	32,06	13,32	17,13	19,23
<b>Ca</b>	1885	1843	2486	1840
<b>Mn</b>	30,66	26,26	28,28	27,20
<b>Fe</b>	71	61,8	68	69
<b>Co</b>	0,090	0,088	0,089	0,089
<b>Ni</b>	3,964	3,964	3,964	3,964
<b>Cu</b>	4,360	4,292	4,220	4,270
<b>Zn</b>	12,068	9,352	11,648	10,304
<b>Mo</b>	0,702	0,698	0,685	0,712
<b>Cd</b>	0,169	0,243	0,224	0,284
<b>Tl</b>	0,180	0,180	0,179	0,181
<b>Pb</b>	0,213	0,210	0,214	0,213
<b>Bi</b>	0,171	0,170	0,170	0,170
<b>K</b>	6220	9390	8304	5410
<b>Ag</b>	0,634	0,632	0,632	0,633

**Tabla 9.** Datos concentración (mg) de cada elemento por kg de muestra no ecológicas.

En cuanto a las declaraciones nutricionales y de salud (en BADALI<sup>32</sup> encontramos un resumen) podemos deducir una serie de afirmaciones que se podrían alegar de las semillas de lino.

En relación con el calcio, se puede decir que la semilla de lino es una buena fuente, todas las muestras contienen cantidades superiores a 120 mg Ca/100 g de producto (Tabla 8 y 9), cantidad mínima que se necesita para ser considerado como tal. Incluso podemos afirmar que las muestras 4, 7 y 8 tienen un alto contenido en calcio debido a que tienen una concentración superior a 240 mg

Ca/100 g de producto. Con todos estos datos, podríamos declarar que la semilla de lino podría tener beneficio en algunas de las funciones en las que participa el calcio, como la coagulación sanguínea, mantenimiento de huesos y dientes, crecimiento y desarrollo en niños, neurotransmisión o funcionamiento de músculos

Otro elemento para destacar es el K, se puede ver (Tabla 8 y 9) que la semilla de lino tiene un alto contenido ya que todas las muestras, excepto la 10, tienen unas concentraciones superiores a 600 mg K/100 g. Por lo que se puede considerar que la semilla de lino podría tener beneficios en el funcionamiento del sistema nervioso y el mantenimiento de la tensión arterial.

También se ha podido observar en relación con el Fe, que la semilla de lino tiene un alto contenido de este elemento, según las tablas 8 y 9, todas las concentraciones están por encima de 4,2 mg de Fe/100g. Como tiene un alto contenido de Fe, podría tener beneficio en ciertas funciones biológicas donde participa el Fe: formación de glóbulos rojos y de hemoglobina, transporte de oxígeno en el cuerpo, funcionamiento del sistema inmunitario o desarrollo cognitivo en niños.

Con el magnesio, todas las muestras tienen concentraciones superiores a 112,5 mg Mg/100 g de producto, por ello, la semilla de lino, podría tener utilidad en el metabolismo energético, equilibrio electrolítico o funcionamiento del sistema nervioso.

En este estudio, se ha comprobado que la semilla de lino tiene un bajo contenido en Na, todas las muestras presentan una concentración inferior a 120 mg de Na/100g de producto. Por lo tanto, no se considera una fuente de sodio y así su consumo contribuye a mantener la tensión arterial normal.

Las RDI del resto de oligoelementos son: 10 mg Zn/día, 1 mg Cu/día, 2 mg Mn/día y 1000 µg Li/día. Si tenemos en cuenta que la RDI es de 45 g/día,

podemos observar que únicamente el manganeso supera el 100% de la RDI. Una exposición alta de manganeso puede producir neurotoxicidad<sup>33</sup> por lo que sería buena idea la monitorización de estos consumos elevados. La posibilidad de neurotoxicidad es mayor en infantes, ya que no tienen el sistema neurológico desarrollado completamente. Para obtener un buen aporte de manganeso es más recomendable las nueces, el té o la piña.

Los resultados obtenidos sobre los metales tóxicos revelaron que para la cantidad recomendada de semilla de lino y según la UL (1 mg Al/kg peso corporal, 0.5 mg Pb/kg peso corporal, 2.5 µg Cd/kg peso corporal), las concentraciones encontradas no representan peligro para la salud. Si realizamos una pequeña cuenta, para que un adulto de 70 kg superase estas concentraciones de Al, Pb y Cd, haría falta ingerir 300 g, 178 kg y 780 g de semilla de lino respectivamente, para alcanzar la UL.

Pero es importante destacar que con respecto al Cd, las muestras no orgánicas, excepto la 3, superaban el límite de 0,20 mg Ca/kg marcado por el Reglamento 488/2014 de la UE, aunque las concentraciones de Cd más altas en alimentos, normalmente se encuentran en vísceras de animales (hígados y riñones), en bivalvos o cefalópodos. Sin embargo, no hay un límite legal para concentraciones de Al en alimentos, únicamente está regulado el nivel de aluminio en aguas. Aunque para el Al, existe un límite de UL anteriormente descrito.

#### 4.2.1.1. Comparación con otros estudios previos.

Si comparamos estos resultados con otros autores, en el estudio realizado por Rubio, C et al 2018<sup>31</sup>, podemos observar que estos coinciden con los obtenidos en este trabajo. Los elementos que se encuentran en mayor concentración en ese estudio (K, Mg, Ca y Na) coinciden con los que se han obtenido en el presente. Aunque las concentraciones que se han obtenido en el presente estudio resultan ligeramente superiores, son mayores las concentraciones de Fe, Mo y Mn que las obtenidas en el estudio de Rubio, C et al 2018.

#### 4.2.2. Análisis estadístico.

Para el tratamiento estadístico de los datos, se empleó una base de datos en Excel, donde se analizaron todos los datos obtenidos mediante gráficas y tablas, estudiando las diferentes variables categóricas. Se han realizado una serie de pruebas para diferenciar los elementos que se comportan con una distribución normal y los que no la siguen, mediante una prueba de normalidad.

La prueba de Kolmogorov-Smirnov es un test de normalidad cuya hipótesis nula,  $H_0$ , considera que la variable a estudiar cumple con una distribución normal. En esta prueba se calcula el nivel de significación o p-valor, por lo que se pueden dar dos situaciones:

- Si  $p\text{-valor} > 0,05$  aceptamos  $H_0$  (hipótesis nula)  $\rightarrow$  Distribución normal.
- Si  $p\text{-valor} < 0,05$  rechazamos  $H_0$  (hipótesis nula)  $\rightarrow$  Distribución no normal.

En la tabla 10 podemos ver los elementos se comportan con una distribución normal y cuáles no. Los elementos con  $p\text{-valor} > 0,05$  siguen una distribución normal, estos son: Li, Ag, Al, Bi, Ca, Cu, Mo, Na, Mn y Ti.

Elemento	p-valor	Elemento	p-valor
Li	0,427	Co	0,0000007
Mn	0,823	Bi	0,17
Na	0,527	Cu	0,841
Mg	0,003	Zn	0,0000007
Al	0,408	Mo	0,897
Ca	0,114	Pb	0,000533
K	0,033	Cd	0,00005
Fe	0,045	Ti	0,258

**Tabla 10.** Resultados de la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Donde una  $p\text{-valor} > 0,05$  indica que sigue una distribución normal.

#### 4.2.1.1 Elementos con distribución normal

Para estos, se calculó los valores estadísticos de media y desviación estándar, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor. ANOVA, técnica estadística que estudia si dos variables (una dependiente y otra independiente) están relacionadas, en base a, si las medias de la variable dependiente son diferentes en las categorías o grupos de la variable independiente. Es decir, se va a intentar explicar si la concentración de un elemento (variable dependiente) está relacionada con ser un producto ecológico o no (variable independiente). Los resultados del estudio ANOVA se pueden ver en la tabla 11 donde una  $p < 0,05$  significa que su diferencia es estadísticamente significativa.

Elemento	ECOLÓGICO n=6		NO ECOLÓGICO n=4		p
	Media	Desviación	Media	Desviación	
Li	$8,713 \times 10^{-3}$	$6,577 \times 10^{-3}$	$2,005 \times 10^{-2}$	$1,668 \times 10^{-2}$	0,164
Ag	0,632	$9,993 \times 10^{-3}$	0,633	$7,483 \times 10^{-4}$	0,14
Al	226,3	136,6	20,4	8,125	0.0184
Ca	2018,9	328	2013	315,4	0,9812
Cu	4,258	$5,266 \times 10^{-2}$	4,288	$5,602 \times 10^{-2}$	0,414
Mo	0,706	$2,653 \times 10^{-2}$	0,699	$1,145 \times 10^{-2}$	0,66
Mn	28,08	4,406	$28,10 \times 10^{-3}$	1,896	0,993
Na	673,9	277,4	468,5	234,7	0,26
Tl	0,180	$5,258 \times 10^{-3}$	0,179	$4,168 \times 10^{-3}$	0,527

**Tabla 11.** Análisis estadístico para los datos que siguen una distribución normal.

Como se puede observar en la tabla 11, el único elemento de los que siguen una distribución normal que tiene una  $p < 0,05$  es el aluminio. Por lo tanto, los valores encontrados para el aluminio en las semillas no ecológicas se diferencian estadísticamente de los encontrados en ecológicas, donde la concentración en no ecológicas es de  $0,0204 \text{ mg/g}$  frente a los  $0,226 \text{ mg/g}$  que tiene las muestras ecológicas, por lo que es mayor en estos últimos. Para el resto de los elementos

no hay diferencias estadísticamente significativas entre ecológicos y no ecológicos.

#### 4.2.1.2. Elementos con distribución no normal

Los elementos que no siguen una distribución normal se le han realizado otras pruebas, estos son: Bo, Cd, Co, Fe, K, Mg, Pb y Zn (Tabla 10). Con estos se calculo la mediana y el cuartil 25% y 75%. Se les realizó la prueba de Kruskal-Wallis, método no paramétrico que asume una distribución no normal de los datos, a diferencia del ANOVA. Es un método que se utiliza para comparar si los datos provienen de la misma población, para comparar si existen diferencias entre las dos variables se realizó la prueba de Wilcoxon. Los resultados de estas dos pruebas se pueden observar en la tabla 12 donde una  $p < 0,05$  indica que hay diferencia estadísticamente significativa entre ecológicos y no ecológicos.

Elemento	ECOLÓGICO n=6			NO ECOLÓGICO n=4			p
	Mediana	RIQ 25%	RIQ 75%	Mediana	RIQ 25%	RIQ 75%	
<b>Bi</b>	0,1704	0,1703	0,1704	0,1704	0,1703	0,1705	0,7430
<b>Cd</b>	0,168	0,163	0,168	0,233	0,210	0,253	0,0258
<b>Co</b>	0,0930	0,0899	0,0949	0,0851	0,0890	0,0899	0,3524
<b>Fe</b>	96,34	70,220	115,27	69,01	66,545	70,22	0,3524
<b>K</b>	7661	7416,5	8439,5	6855	4070	8576	0,7619
<b>Mg</b>	2589,5	2453	2621	2872	2705	3015,5	0,4762
<b>Pb</b>	0,241	0,211	0,217	0,213	0,212	0,213	0,3524
<b>Zn</b>	10,5	10,4	11,07	10,9	10,1	11,75	0,9140

**Tabla 12.** Análisis estadístico a los elementos que no siguen una distribución normal.

La tabla 12 nos deja al Cd como el único elemento que tiene una  $p < 0,05$ . Esto significa que los valores encontrados en las semillas no ecológicas se diferencian estadísticamente de las ecológicas. En el Cd se puede observar que la

concentración en muestras no ecológicas (0,23 mg/kg) es superior a las ecológicas (0,169 mg/kg). En el resto, no hay diferencias estadísticamente significativas entre ecológicos y no ecológicos.

## **5. CONCLUSIÓN**

En el presente trabajo se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1. El ICP-MS es una técnica rápida y selectiva para la determinación de elementos en semilla de lino. La idoneidad del método se ha puesto de manifiesto por los resultados obtenidos en el estudio.
2. El proceso de digestión ácida aplicado es rápido y resulta adecuado para la variedad de muestras de semilla de lino (marrón y dorada) determinadas en este estudio.
3. Los niveles de Cd determinados en SL no ecológica son significativamente superiores a los de semilla de lino ecológica. Esto puede ser debido a las características edafológicas, a posibles contaminaciones industriales o del ambiente.
4. No se han encontrado diferencias significativas en cuanto a las concentraciones de los diferentes elementos medidos en semilla de lino marrón y dorado
5. Los resultados de la encuesta ponen de manifiesto que la mayor parte de los encuestados conoce la SL, pero no conoce sus propiedades sobre la salud. Concluyendo el importante papel del farmacéutico en la labor del Consejo Nutricional y de Salud.

Por todo lo expuesto, se deberían realizar trabajos de investigación para evitar el riesgo alimentario que podría suponer la presencia de concentraciones elevadas de algún elemento nocivo, concretamente por los niveles de Cd encontrado (declarado como cancerígeno).

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1- Soltanian, N.; Janghorbani, M. A randomized trial of the effects of flaxseed to manage constipation, weight, glycemia, and lipids in constipated patients with type 2 diabetes. *Nutr. Metab.* 2018, 15, 36.

2- Francis, A.A.; Austria, J.A.; La Vallee, R.K.; Deniset, J.F.; Maddaford, G.G.; Dibrov, E.; Pierce, G.N. The effects of dietary flaxseed on atherosclerotic plaque regression. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2013, 304, H1743–H1751.

3- Ander, B.P. et al. Dietary flaxseed protects against ventricular fibrillation induced by ischemia-reperfusion in normal and hypercholesterolemic rabbits. *J. Nutr.* 2004, 134, 3250–3256.

4- Caligiuri, S.P.B. et al. Flaxseed consumption reduces blood pressure in hypertensive patients by altering circulating oxylipins via an alpha linolenic acid-induced inhibition of soluble epoxide hydrolase. *Hypertension* 2014, 64, 53–59.

5- Flower, G.; Fritz, H.; et al. Flax and Breast Cancer: A systematic review. *Integr. Cancer Ther.* 2014, 13, 181–192.

6- Russell RM, Suter PM. Deficiencia y exceso de vitaminas y oligoelementos. En: Kasper D, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson J, Loscalzo J. eds. *Harrison. Principios de Medicina Interna, 19e* New York, NY: McGraw-Hill.

7- Alarcón-Corredor, OM. Los elementos traza. *RMEP ULA.* 2009; 4(3):107-119

8- FAO. Características generales de los elementos trazas. Chile; FAO; 2002.

Disponible en:

[http://www.fao.org/tempref/GI/Reserved/FTP\\_FaoRlc/old/prior/comagric/codex/pdf/trazas%20.pdf](http://www.fao.org/tempref/GI/Reserved/FTP_FaoRlc/old/prior/comagric/codex/pdf/trazas%20.pdf)

- 9- Liebscher, K, Smith, H. Essential and nonessential trace elements. A method of determining whether an element is essential or nonessential in human tissue. Arch. Environ. Health. 1968; 17:881-890
- 10- Reglamento (CE) N°1881/2996, de 19 de diciembre de 2006, de contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea.
- 11- Reglamento (CE) n° 333/2007, de 28 de marzo de 2007, por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los niveles de determinados elementos en los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea.
- 12- Recomendación (CE) n°193/2014, de 4 de abril de 2014, sobre la reducción de la presencia de cadmio en los productos alimenticios.
- 13- UNE-EN 13804:2013, de productos alimenticios. Determinación de elementos y sus elementos y sus especies químicas.
- 14- MSCBS. Recomendaciones de consumo de crustáceos para reducir la exposición de cadmio. Madrid; MSCBS; 14/04/2011. Disponible en: [https://www.mscbs.gob.es/gl/consumo/pec/docs/Recomendaciones\\_cadmio.pdf](https://www.mscbs.gob.es/gl/consumo/pec/docs/Recomendaciones_cadmio.pdf)
- 15- EFSA (European Food Safety Authority). Cadmium in Food. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain (Question No EFSA-Q-2007-138). EFSA J980. 2009:1139.
- 16- Norvell, W.A., Wu, J., Hopkins, D.G., Welch, R. Association of cadmium in durum wheat grain with soil chlorine and chelate-extractable soil cadmium. Soil Science Society of America Journal. 2002; 64:2162-2168.

- 17- Pérez García, P E; Azcona Cruz, M I. Los efectos del Cadmio en la salud. Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas. 2012; 17 (3). p. 199-205.
- 18- Kazantzis, G. Cadmium, osteoporosis and calcium metabolism. Biometals. 2004 Oct;17(5):493-8.
- 19- Chacón C; Castells V; Gómez J et. al. Elementos Traza en los alimentos. Barcelona: Agencia de Salud Pública de Cataluña;2017. Disponible en: [http://acsa.gencat.cat/web/.content/Publicacions/Estudis\\_de\\_dieta\\_total/elements\\_traca/Elementos-traza-en-los-alimentos.-Estudio-de-dieta-total-en-Cataluna.-2015\\_17.pdf](http://acsa.gencat.cat/web/.content/Publicacions/Estudis_de_dieta_total/elements_traca/Elementos-traza-en-los-alimentos.-Estudio-de-dieta-total-en-Cataluna.-2015_17.pdf)
- 20- Miu, A; Benga, O. Aluminum and Alzheimer's disease: A new look. Journal of Alzheimer's disease : JAD. 2006 Dec;10(2-3): 179-201.
- 21- EFSA European Food Safety Authority. Panel on food additives, flavourings, processing aids and food contact materials Safety of aluminium from dietary intake. EFSA Journal. 2008; 758:1-34. Disponible en: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/754>.
- 22-Reglamento (UE) 2018/848 del parlamaneto europeo, de 30 de mayo de 2018, sobre producción ecológica y etiquetado de productos ecológicos.
- 23-K. Brandt, C et al. Agroecosystem Management and Nutritional Quality of Plant Foods: The Case of Organic Fruits and Vegetables. Critical Reviews in Plant Sciences.2011; 30:1-2, 177-197
- 24-Baransku, M et al. Higher antioxidant and lower cadmium concentrations and lower incidence of pesticide residues in organically grown crops: a systematic literature review and meta-analyses. Br J Nutr.2014;112(5):794-811.

- 25- Smith-Spangler, C et al. Are organic foods safer or healthier than conventional alternatives: a systematic review. *Ann Intern Med.* 2012;157(4):348-366.
- 26- Hoefkens, C. Consuming organic versus conventional vegetables: the effect on nutrient and contaminant intakes. *Food Chem Toxicol.* 2010;48(11):3058-66.
- 27- Angelova, V et al. Bio-accumulation and distribution of heavy metals in fibre crops (flax, cotton and hemp). *Industrial Crops and Products.*2004;19(3):197–205.
- 28- Soudek, P et al. Effect of Heavy Metals on Inhibition of Root Elongation in 23 Cultivars of Flax (*Linum usitatissimum* L.). *Arch Environ Contam Toxicol.* 2010; 59:194-203.
- 29- Xing, L et al. Principal component analysis of mineral elements and fatty acids composition in flaxseed from ten different regions. *Guang pu.* 2014; 34(9):2538-43.
- 30- Kymäläinen, HR. Cadmium content of finnish linseed and estimated consumer intake. *AGR FOOD SCI.* 2006; 15.
- 31- Rubio, C et al. Metals in food products with rising consumption (brewer's yeast, wheat bran, oat bran, sesame seeds, flaxseeds, chia seed). A nutritional and toxicological evaluation. *J Funct Foods.* 2018; 48:558-65.
- 32- BADALI web de nutrición Universidad Miguel Hernández. Disponible en: <https://badali.umh.es/home>
- 33- Alaimo, A. Neurotoxicidad inducida por manganeso. Universidad de Buenos Aires, Argentina. 2012. Disponible en: [https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis\\_n5087\\_Alaimo.pdf](https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n5087_Alaimo.pdf)

## 7. ANEXO

### 7.1. FORMATO DE ENCUESTA

Las preguntas que estaban incluidas en la encuesta realizada son las siguientes:

- 1) ¿Conoces la semilla de lino? Con las respuestas si/no.
- 2) ¿Conoces los beneficios de la semilla de lino? Con las respuestas si/no.
- 3) ¿Consume semillas de lino? Con las respuestas: Si habitualmente, una vez a la semana, una vez al mes o no
- 4) ¿Por qué consume semillas de lino? Con las respuestas: calidad mayor, respetuoso con el medio ambiente o beneficiosa para la salud
- 5) ¿En que tipo de establecimiento compra generalmente las semillas de lino? Con respuestas: Directamente del productor, mercado, tienda de barrio, tienda especializada, supermercado, herboristería u otros.
- 6) ¿Le resulta fácil encontrar semillas de lino? Con respuestas: Siempre, a veces o no.
- 7) ¿Le gustaría que sus hijos consumiesen semillas de lino en el comedor del colegio? Con respuestas: si o no
- 8) En caso de no consumir, ¿Por qué no consume?
- 9) ¿Consume productos ecológicos? Con respuestas: si o no.
- 10) Género del entrevistado
- 11) Intervalo de edad <35, 35-65 y >65.
- 12) ¿Cuántas personas viven en su casa? respuestas: 1, 2, 3, 4, 5 o más.
- 13) ¿Actualmente cómo se encuentra? respuestas: Trabajando, desempleado, estudiante, jubilado o actividad no remunerada