



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA



Estrategias dietéticas para disminuir la biodisponibilidad oral de arsénico inorgánico

Tesis Doctoral

M^a Jesús Clemente Peiró

Dirigida por:

Dra. Dinoraz Vélez Pacios

Dra. Vicenta Devesa i Pérez

Tutora:

Dra. Guillermina Font Pérez

Valencia, septiembre 2018

Programa de Doctorado en Ciencias de la Alimentación
Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la
Alimentación, Toxicología y Medicina Legal
Universitat de València



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA



Dinoraz Vélez Pacios y Vicenta Devesa i Pérez, ambas Científico Titular del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

HACEN CONSTAR QUE: El trabajo de investigación titulado **“Estrategias dietéticas para disminuir la biodisponibilidad oral de arsénico inorgánico”** que presenta Dña. M^a Jesús Clemente Peiró para optar al grado de Doctor por la Universidad de Valencia, ha sido realizado en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IATA-CSIC) bajo su dirección y que reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Valencia, septiembre de 2018

Dra. Dinoraz Vélez Pacios

Dra. Vicenta Devesa i Pérez

A mi hija Noa

A mi marido Agustín

A mi familia

A todos los que confiásteis y apostásteis por mí

“Siempre es temprano para rendirse”

Norman Vincent Peale

“Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.”

Marie Curie

“El conocimiento no es una vasija que se llena, sino un fuego que se enciende”

Plutarco

“El futuro pertenece a quienes creen en la belleza de sus sueños”

Eleanor Roosevelt

Agradecimientos

Es para mí un orgullo poder expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que apostaron por mí en la realización de esta tesis doctoral. Sin el apoyo incondicional de cada una de ellas, mi tesis no hubiera visto este bonito final. En primer lugar, tras la finalización de un trabajo tan arduo y lleno de dificultades, pero a la vez tan rico en sentimientos, conocimientos, aprendizajes y experiencias, es inevitable destacar la participación de cada una de las personas e instituciones que han hecho posible con sus esfuerzos, apoyos, y aportes que mi tesis doctoral llegase a buen puerto. Evidentemente, ésta, mi tesis, nuestra tesis, ha requerido de un gran esfuerzo y muchísima dedicación por parte de la autora y de sus directoras de tesis. También el aporte incondicional y la cooperación desinteresada de cada una de las personas que a continuación mencionaré han contribuido al soporte justo y necesario para el desarrollo de este bonito trabajo. Por ello, es para mí un verdadero placer utilizar este espacio para ser justo y consecuente con ellas, expresándoles mis agradecimientos.

Debo agradecer de manera especial y sincera a mis directoras de tesis Dinoraz Vélez Pacios y Vicenta Devesa i Pérez por aceptarme y darme esta gran oportunidad de poder realizar con ellas y bajo su supervisión y dirección, mi tesis doctoral. Su apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para orientar los objetivos y metas de esta tesis, han sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de la misma, sino en mi formación tanto personal como profesional. Las ideas, las aportaciones, siempre han estado orientadas a dar el éxito a nuestro trabajo. Hemos logrado juntas, la clave del trabajo en equipo, un equipo formado por la amistad que nos ha unido y nos ha hecho cada día ser mejores en nuestra investigación. Les agradezco el haberme facilitado mis labores con los medios suficientes para poder llevar a cabo siempre todas y cada una de las propuestas de trabajo que nos planteamos.

Me gustaría expresar también mi más sincero agradecimiento a mi tutora Guillermina Font Pérez por su apoyo y buenos deseos, destacando su disponibilidad. No me cabe duda, que sus palabras tan sabias, sus buenos consejos hicieron que mis más angustiosos problemas parecieran evadirse como si de nada se trataran.

Ahora sí, agradezco de manera muy especial a cada uno de los componentes de mi laboratorio, los que no están, los que siguen luchando cada día y los que vendrán, porque estoy segura que de cada uno de ellos me he llevado o llevaré una parte de su interior. A mi compañero, amigo, mi gran técnico Antonio Ruiz López, por su generosidad a la hora de explicarme y hacerme partícipe de todos sus conocimientos y experiencias. Le agradezco de corazón por sus siempre atentas y rápidas respuestas a las diferentes inquietudes que me surgían. Él ha estado conmigo en los buenos y malos momentos y eso es de agradecerle por siempre. Gracias.

A mi Maitechu, a esa mujer llena de vitalidad y aplomo. Toda ella, Maite de la Flor Aguado, ha sido, es y será mi otro técnico especial. Ella me enseñó muchas de las cosas que aprendí con rapidez y eficiencia cuando llegué con tan sólo 18 años a este mundo de la investigación. Ha sido un camino largo y duro en el que, algunas veces, la fijación por lograr mis objetivos, mis metas, me han hecho olvidar la importancia del contacto humano. Sin embargo, como en todas las actividades de la vida, siempre al final hay alguien que te vuelve a marcar el rumbo, mi Maite, siempre estaba ahí dándome muy buenos consejos y criterios que me han permitido priorizar y es por ello que debo resaltar estas cariñosas palabras hacia ella.

La Dra. Marta Vázquez San Antonio, una joven emprendedora con gran carácter y generosidad, dispuesta siempre a ayudar. Compartió sus conocimientos y experiencias cuando ambas trabajábamos en equipo en nuestro laboratorio.

Durante cuatro largos años, fuimos grandes compañeras, me dio la oportunidad de permanecer a su lado en el camino de su carrera de doctorando, me hizo partícipe de sus ensayos, artículos, inquietudes... me llevo sin duda una gran amistad.

Mi compañero, amigo y buena persona Carlos Jadán Piedra; este chico ecuatoriano llegó a nuestro laboratorio ya casi hace siete años. Con él he podido compartir el trabajo del día a día en nuestra formación conjunta del Máster y luego nuestra carrera científica. Junto a él he aprendido a valorar aspectos como la paciencia, la tranquilidad, el hacer las cosas de forma pausada sin agobios ni malestares, tarea difícil en la realización de la tesis doctoral. Pero él siempre estuvo ahí, nunca se quejó de nada y siempre tuvo una bonita palabra o un gesto agradable. Simplemente, mis más sinceros agradecimientos. Espero algún día poder seguir trabajando junto a ti, tal y cómo hemos hablado en multitud de ocasiones en la hora de la comida.

Mi otra compañera de viaje en esta carrera científica es Gabriela de Matuoka e Chiocchetti. Ella llegó de Brasil, cuando yo finalicé mi Máster y de su mano aprendí el fascinante mundo de cultivos celulares. Sus palabras, siempre adecuadas a lo que se estaba haciendo, han hecho una base sólida de hábitos de trabajo con los cuales puedo afrontar el futuro con optimismo. He compartido con Gabi en los últimos años mis ilusiones, trabajos, congresos y esfuerzo. Gracias por enseñarme y hacer que me divirtiera mientras descubría las alegrías y también los sinsabores de investigar.

Al resto de compañeros, que han ido pasando por el laboratorio realizando prácticas de empresas, de fin de Máster, estancias, etc, que consiguieron darme el afecto necesario para disfrutar del día a día (Maleles y Alejandra), pero muy especialmente a Cristina Crespo Morro, una madrileña sincera y trabajadora que

siempre me escuchó, aguantó y animó a seguir adelante sin pedirme nada a cambio. Gracias por estar no sólo en los buenos momentos.

Mis agradecimientos, a todos los compañeros, investigadores y demás personal del departamento de Tecnologías de Conservación y Seguridad Alimentaria por sus préstamos de reactivos, consejos a la hora de utilizar cualquier equipo, pero destacaré al grupo de Envases, muy en especial a Gracia López, quién me dio su ayuda y colaboración en cada momento de consulta y soporte en este trabajo de investigación.

Siguiendo en este ámbito, mi agradecimiento a Vicente Monedero y Manuel Zúñiga del grupo de “Bacterias lácticas y probióticos” y al técnico Cristina Alcántara, por estar involucrados en el desarrollo de esta tesis. Gracias por todo lo que me enseñaron a la hora de trabajar con bacterias, un mundo que desconocía y aprendí de sus manos.

Por otro lado, doy mi más sincero agradecimiento al investigador Sergi Puig del grupo de “Biología de sistemas en levaduras de interés biotecnológico”. Gracias por haberme acogido siempre como un miembro más de vuestro equipo y por haberme ayudado de una forma u otra durante todo este tiempo. Me ofreciste en todo momento tus maravillosas explicaciones acerca de las levaduras, cómo trabajar con ellas, me enseñaste el manejo de las cepas y gracias a tu asesoramiento pudimos obtener buenos resultados. Gracias por dedicarme tú tiempo y colaboración en los diversos ensayos planteados. Como te he dicho en alguna ocasión, ha sido un gran placer poder trabajar de tu mano. Siempre te estaré agradecida.

Agradecer a María Luisa Cervera del departamento de Química Analítica, grupo “Soluciones e innovaciones en química analítica” por sus préstamos de equipos de fluorescencia. Sin el equipo no podría haber sacado adelante muestras ya preparadas. Gracias.

Quisiera agradecer de manera especial, a Pepe Coll, por su gran labor en el servicio de microscopía. Él me ha enseñado la instrucción, manejo y asesoramiento en el uso del microscopio de fluorescencia del IATA, al igual que en el análisis y procesamiento de imágenes. Gracias por tu amabilidad, dedicación y por tus palabras tan sabias.

A todos los laboratorios del IATA, porque estoy segura que en todo este tiempo me habéis prestado más de un reactivo o un equipo, aunque ahora no lo recuerde concretamente. Gracias a todos.

A continuación, paso a destacar el gran papel de todo el personal que forma administración; sin su ayuda, dedicación e interés la realización de mi tesis no hubiera podido suceder. A Dani y Toni, gracias por haberme facilitado siempre la búsqueda de reactivos y material, por vuestra ayuda en la realización de las encuadernaciones y por haberme acompañado a transportar los residuos e incluso a realizar las compras. A Tere y Mariano, por estar pendientes de mí, sus preguntas acerca de mis contratos y demás, me hacían estar bien, me transmitían tranquilidad y paz, y en esos momentos tan difíciles por los que estaba pasando a nivel personal, me transmitieron sus preocupaciones también. Gracias por estar ahí. Agradecerle a Pilar Redondo, por hacerme partícipe de los números de la ONCE, por transmitirme ese cariño especial. Gracias.

Continuando con mis agradecimientos, debo de dar las gracias al personal de Informática. Toni por la impresión de carteles, pósteres, siempre tan atento y eficiente. A Ana y Fernando, por su rápida intervención a la hora de subir a solucionarme cualquier problema informático. Nunca les importó la hora y siempre nos ayudaron prestándonos material y equipo informático para poder continuar trabajando. Mil gracias por vuestro eficaz trabajo.

En cuanto al departamento de mantenimiento, debo de agradecer enormemente a todos ellos, Nacho, Ferrán, Vicente y Belén por encontrar siempre

un hueco para subir al laboratorio rápidamente y arreglar de forma casi imposible, los equipos. Cuantas veces arreglaron los baños calientes, las bombas del equipo de fluorescencia atómica, los gases, el incubador, las cabinas de extracción, un sinfín de arreglos que sin ellos hoy no estaría escribiendo este trabajo. A Nacho y Ferrán, gracias por los buenos momentos que me habéis dado, por las sonrisas que me habéis sacado, por haberme brindado vuestra amistad. Gracias chicos.

A todo el equipo de recepción, especialmente a Pablo, Juan Carlos, Celes, Ali y a Fran, por abrirme las puertas del IATA a cualquier hora. Agradeceros de corazón el haberme ahorrado viajes al IATA durante los fines de semana. Gracias a todos por esos saludos matineros, tan especiales y alegres. Gracias por estar ahí, tan atentos y pendientes de mí. Cada día, al finalizar mi jornada laboral, vosotros eráis los últimos en darme los suficientes ánimos para regresar al día siguiente con más fuerza. Gracias a todos por ser tan buenos conmigo.

También quisiera agradecer a todo el personal de limpieza, puesto que sin ellos nuestro trabajo no podría realizarse, ya que el mundo de la investigación requiere de un cierto orden pero siempre de una gran limpieza. Es por ello que en especial, les doy las gracias a Alba, Kati, Miguel y Mar.

Y, por supuesto, el agradecimiento más profundo y sentido va para mi familia. Sin su apoyo, amor y cariño no habría sido posible llevar a cabo esta dura tarea. A mis padres, Fina y Manolo, por su ejemplo de lucha y honestidad, por ser mi fuente de ánimo, gracias por creer siempre en mí; a mi hermana Josefina y mi sobrino Jairo por compartir mis alegrías y mis tristezas y dedicarme bonitas palabras para animarme; a mis suegros Mari y Agustín, por su paciencia y generosidad; a mi marido Agustín, por estar ahí, escucharme y apoyarme en mis decisiones; y finalmente a mi hija, a mi dulce niña Noa, por todos los momentos que estuvo junto a mí, por sus lindos masajes, por su alegría, su fuerza y su gran

ejemplo de valentía y superación. Por todos ellos y para todos ellos, mis agradecimientos.

RESUMEN

La exposición crónica a arsénico (As) inorgánico [As(III) + As(V)] está asociada con una mayor incidencia de varios tipos de cáncer, diabetes tipo II, enfermedades vasculares y déficits neuroconductuales en población infantil. Se considera que en la actualidad alrededor de 200 millones de personas están expuestas a niveles de As inorgánico superiores a los recomendados, fundamentalmente a través del agua de bebida. Esta situación se ha puesto de manifiesto en los estudios realizados en esta tesis donde se muestran ingestas de As inorgánico muy superiores a las recomendadas en poblaciones del norte de Argentina, aportadas por el agua, pero también por los alimentos cocinados con esta agua contaminada. Los estudios de especiación por espectroscopía de absorción de rayos X muestran que el cocinado en presencia de As(V) produce un incremento en el contenido de As(III) en el producto listo para consumo. Esto supone, en algunos casos, un aumento del riesgo asociado a la ingesta del alimento, ya que la forma trivalente es más tóxica. La caracterización de la fracción solubilizada durante la digestión gastrointestinal de estos alimentos (fracción bioaccesible) evidencia que el As(III) permanece en esta forma, incluso que durante la digestión puede haber un aumento de la cantidad de la forma reducida. Estos resultados evidencian el riesgo asociado a la ingesta de agua contaminada y de los alimentos cocinados con esta agua.

Debido a la cantidad de personas afectadas y a las patologías que desarrollan, agencias relacionadas con la salud han emitido informes en los que se indica la necesidad de reducir la ingesta de As inorgánico. Teniendo en cuenta la dificultad de eliminar el As de las fuentes de exposición, una alternativa para reducir la exposición es disminuyendo la biodisponibilidad (cantidad del tóxico que llega a la circulación sistémica tras la ingesta). La biodisponibilidad puede reducirse empleando compuestos que formen complejos con el metaloide durante su paso por el tracto digestivo y eviten que éste se encuentre en una forma de fácil

absorción o impidiendo que se absorba empleando compuestos que compitan por sus mismas vías de entrada o que simplemente las afecten. En esta tesis se ha planteado este objetivo empleando componentes de la dieta y microorganismos de grado alimentario. Inicialmente se han seleccionado componentes y microorganismos capaces de reducir la cantidad del tóxico que queda soluble tras la digestión y por tanto disponible para la absorción (bioaccesibilidad) empleando un modelo de digestión *in vitro*. Este ensayo ha evidenciado que las sales de hierro, el tánico, la lignina y algunas celulosas pueden reducir la bioaccesibilidad del As(III) y el As(V) en solución acuosa y también cuando forman parte de los alimentos (algas y arroz). Sin embargo, las bacterias lácticas y las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* no son capaces de interaccionar con las formas inorgánicas de As y reducir su bioaccesibilidad, posiblemente por las características de sus paredes celulares.

Además, se ha puesto de manifiesto, empleando células intestinales como modelo de epitelio intestinal, que determinados compuestos alimentarios (hierro, cisteína, glutatión, curcumina, catequinas y quercetina) y suplementos dietéticos (extracto de alcachofa y de uva y suplementos de hierro); así como algunas cepas de *Lactobacillus* y *S. cerevisiae* son capaces de reducir el transporte a través del epitelio intestinal de las formas inorgánicas de As en disolución acuosa y en alimentos. Estos compuestos actúan formando complejos de menor absorción o modulando las uniones intercelulares y afectando la vía paracelular, una de las formas de entrada del As en el epitelio intestinal.

Finalmente, se ha confirmado que algunos de los componentes dietarios eficaces *in vitro* (glutatión y sales férricas) son capaces de reducir la biodisponibilidad de As(III) y As(V) y su acumulación tisular en ratones. Además, también se ha puesto de manifiesto que estos componentes no reducen la biodisponibilidad de otros elementos esenciales. Estos datos sugieren que

ambos compuestos podrían constituir estrategias válidas para la reducción de la exposición al tóxico en poblaciones de zonas con arsenicismo crónico endémico.

RESUM

L'exposició crònica a arsènic (As) inorgànic [As(III) + As(V)] està associada amb una major incidència de diversos tipus de càncer, diabetes tipus II, malalties vasculars i déficits neuroconductuals en població infantil. Es considera que en l'actualitat al voltant de 200 milions de persones estan exposades a nivells d'As inorgànic superiors als recomanats, fonamentalment a través de l'aigua de beguda. Aquesta situació s'ha posat de manifest en els estudis realitzats en aquesta tesi on es mostren ingestes d'As inorgànic molt superiors a les recomanades en poblacions del nord d'Argentina, aportades per l'aigua, però també pels aliments cuinats amb aquesta aigua contaminada. Els estudis d'especiació per espectroscopia de rajos X mostra que el cuinat en presència d'As(V) produeix un increment del contingut d'As(III) al producte llest per al consum. Això suposa un augment del risc associat a la ingesta de l'aliment, ja que la forma trivalente és més tòxica. La caracterització de la fracció solubilitzada durant la digestió gastrointestinal d'aquests aliments (fracció bioaccessible) evidencia que l'As(III) roman en aquesta forma, fins i tot que durant la digestió pot haver-hi un augment de la quantitat de la forma reduïda. Aquests resultats evidencien el risc associat a la ingesta d'aigua contaminada i dels aliments cuinats amb aquesta aigua.

A causa de la quantitat de persones afectades i a les patologies que desenvolupen, agències relacionades amb la salut han emès informes en els quals s'indica la necessitat de reduir la ingesta d'As inorgànic. Tenint en compte la dificultat d'eliminar l'As de les fonts d'exposició, una alternativa per reduir l'exposició és disminuint la biodisponibilitat (quantitat del tòxic que arriba a la circulació sistèmica després de la ingesta). La biodisponibilitat pot reduir-se utilitzant compostos que formin complexos amb el metal·loide durant el seu pas pel tracte digestiu i evitin que aquest es trobi en una forma de fàcil absorció o impedit que s'absorbeixi utilitzant compostos que competeixin per les seves

mateixes vies d'entrada o que simplement les afectin. En aquesta tesi s'ha plantejat aquest objectiu utilitzant components de la dieta i microorganismes de grau alimentari. Inicialment s'han seleccionat compostos i microorganismes capaços de reduir la quantitat del tòxic que queda soluble després de la digestió i per tant disponible per a l'absorció (bioaccessibilitat) utilitzant un model de digestió *in vitro*. Aquest assaig ha evidenciat que les sals de ferro, el tánic, la lignina i algunes cel·luloses poden reduir la bioaccessibilitat de l'As(III) i l'As(V) en solució aquosa i també quan formen part dels aliments (algues i arròs). No obstant això, els bacteris làctics i els llevats *Saccharomyces cerevisiae* no són capaços d'interaccionar amb les formes inorgàniques d'As i reduir la seua bioaccessibilitat, possiblement per les característiques de les seues parets cel·lulars.

A més, s'ha posat de manifest, utilitzant cèl·lules intestinals com a model d'epiteli intestinal, que determinats compostos alimentaris (ferro, cisteïna, GSH, curcumina, catequines i quercetina) i suplementes dietètics (extracte de carxofa i de raïm i suplementes de Fe); així com algunes soques de *Lactobacillus* i *S. cerevisiae* són capaços de reduir el transport a través de l'epiteli intestinal de les formes inorgàniques d'As en dissolució aquosa i en aliments. Aquests compostos actuen formant complexos de menor absorció o modulant les unions intercel·lulars i afectant la via paracel·lular, una de les formes d'entrada de l'As en l'epiteli intestinal.

Finalment, s'ha confirmat que alguns dels composts dietaris eficaços *in vitro* (GSH i sals fèrriques) són capaces de reduir la biodisponibilitat d'As(III) i As(V) i la seva acumulació tissular en ratolins. A més, també s'ha posat de manifest que aquests compostos no redueixen la biodisponibilitat d'altres elements essencials. Aquestes dades suggereixen que aquests compostos podrien constituir estratègies vàlides per a la reducció de l'exposició al tòxic en poblacions de zones amb arsenicisme crònic endèmic.

ABSTRACT

Chronic exposure to arsenic (As) inorganic [As (III) + As (V)] is associated with a higher incidence of several types of cancer, type II diabetes, vascular diseases and neurobehavioral deficits in children. It is considered that currently around 200 million people are exposed to levels of inorganic As above those recommended, mainly through drinking water. This situation has been shown in the studies carried out in this thesis, which evidence intakes of inorganic As that are much higher than those recommended in populations of northern Argentina, contributed by water, but also by food cooked with this contaminated water. Speciation studies by X-ray spectroscopy show that, cooking in presence of As(V) increased As(III) contents in the food product ready for consumption. This supposes an increase of the risk associated to the ingestion of the food, since the trivalent form is more toxic. The characterization of the fraction solubilized during the gastrointestinal digestion of these foods (bioaccessible fraction) shows that As(III) remains in this form, even that during the digestion there may be an increase in the amount of the reduced form. These results demonstrate the risk associated with the intake of contaminated water and the food cooked with this water.

Due to the number of people affected and the pathologies they develop, health-related agencies have issued reports indicating the need to reduce the intake of inorganic As. Taking into account the difficulty of eliminating the As from the sources of exposure, an alternative to reduce the exposure is decreasing the bioavailability (quantity of the toxic compound that reaches the systemic circulation after the ingestion). The bioavailability can be reduced using compounds that, a) form complexes with As with low intestinal absorption; b) compete for the same mechanisms of transport across the intestinal epithelium; c) modulate these routes of transport. In this thesis, this objective has been addressed using dietary components and food grade microorganisms. Initially, it

has been selected compounds and microorganisms capable of reducing the amount of the element that remains soluble after digestion and therefore available for absorption (bioaccessibility) using an *in vitro* digestion model. This evaluation has revealed that the salts of iron, tannic acid, lignin and some celluloses can reduce the bioaccessibility of As(III) and As(V) in aqueous solution and also when they are part of foods (algae and rice). However, lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* yeasts are not able to interact with the inorganic forms of As and reduce their bioaccessibility, possibly due to the characteristics of their cell walls.

In addition, it has been evidenced, using intestinal cells as a model of intestinal epithelium, that certain food compounds (iron, cysteine, glutathione, curcumin, catechins and quercetin) and dietary supplements (artichoke and grape extracts and Fe supplements); as well as some strains of *Lactobacillus* and *S. cerevisiae* are capable of reducing the transport through the intestinal epithelium of the inorganic forms of As in aqueous solution and in food. These compounds act by forming complexes with low absorption ratio or by modulating the intercellular junctions and affecting the paracellular pathway, one of the forms of entry of As in the intestinal epithelium.

Finally, it has been confirmed that some of the dietary compounds that were effective *in vitro* (glutathione and ferric salts) are capable of reducing the bioavailability of As(III) and As(V) and their tissue accumulation in mice. In addition, it has also been shown that these compounds do not reduce the bioavailability of other essential elements. These data suggest that both compounds could be adequate strategies for the reduction of inorganic As exposure in populations of areas with chronic endemic arsenicism.

Índice general

Índice general	I
Índice de figuras	VII
Índice de tablas	IX
Abreviaturas	XI
INTRODUCCIÓN	1
1. Características generales y usos del arsénico	3
2. Arsénico en agua y alimentos	5
2.1. Arsénico en agua	7
2.2. Arsénico en alimentos	9
3. Efecto del cocinado sobre los contenidos de arsénico	11
4. Exposición humana a arsénico inorgánico	12
5. Toxicidad de las formas químicas de arsénico	14
6. Toxicocinética del arsénico	16
6.1. Absorción	16
6.2. Distribución y excreción	18
6.3. Metabolismo	20
6.4. Transformaciones arsenicales no metabólicas	23
7. Estrategias para reducir la exposición a arsénico inorgánico	24
7.1. Eliminación del arsénico inorgánico de las fuentes de exposición	24
7.2. Disminución de la ingesta de alimentos con elevados contenidos	26
7.3. Modificación de la toxicocinética del arsénico inorgánico	27
8. Modelos para la evaluación de la biodisponibilidad	30
8.1. Modelos <i>in vitro</i>	30
8.1.1. Modelos <i>in vitro</i> de digestión gastrointestinal	30
8.1.2. Método <i>in vitro</i> para la evaluación del transporte	32

8.2. Modelo <i>in vivo</i> para el estudio de la biodisponibilidad	35
OBJETIVOS	39
METODOLOGÍA	43
1. Especies arsenicales	45
2. Muestras de alimentos	45
3. Digestión gastrointestinal simulada	46
4. Determinación de arsénico total	48
5. Determinación de arsénico inorgánico	50
6. Determinación de elementos mayoritarios	52
7. Forma química del arsénico inorgánico en muestras de alimentos y sus fracciones bioaccesibles	52
8. Efecto de los componentes de la dieta sobre la bioaccesibilidad	53
9. Efecto de bacterias lácticas y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sobre la bioaccesibilidad	56
9.1. Evaluación de la captación de arsénico por las bacterias lácticas y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	57
9.2. Evaluación del efecto de las bacterias lácticas y <i>S. cerevisiae</i> sobre la bioaccesibilidad del arsénico presente en patrones acuosos	58
10. Efecto de los componentes de la dieta, bacterias lácticas y levaduras sobre la permeabilidad intestinal	59
10.1. Mantenimiento de los cultivos celulares	59
10.2. Ensayos de viabilidad celular	60
10.3. Evaluación de la permeabilidad aparente	60
10.3.1. Cultivo en sistemas bicamerales	60
10.3.2. Tratamiento de las fracciones bioaccesibles de los alimentos para los ensayos de permeabilidad	61
10.3.3. Ensayos de permeabilidad celular	62
10.3.4. Evaluación de la integridad de la monocapa celular durante los ensayos de transporte	66

11. Estudios <i>in vivo</i> de la biodisponibilidad de arsénico y el efecto de las estrategias dietéticas	66
11.1. Evaluación de la concentración plasmática de arsénico en función de la dosis empleada	67
11.2. Tratamiento con componentes alimentarios	67
11.3. Cálculo de los parámetros farmacocinéticos	68
11.4. Sacrificio y extracción de órganos	69
12. Análisis estadístico	69
CAPÍTULO 1. Arsénico inorgánico en alimentos: especiación, procesado y tránsito gastrointestinal	71
Resultados	73
1. Arsénico inorgánico en alimentos cocinados con agua contaminada y en sus fracciones bioaccesibles	73
2. Especiación mediante XANES de alimentos cocinados con agua contaminada y en sus fracciones bioaccesibles	75
2.1. Espectros de disoluciones patrón de arsénico	76
2.2. Espectros de alimentos y sus fracciones bioaccesibles	79
Discusión	83
Conclusiones	86
CAPÍTULO 2. Evaluación del efecto de componentes alimentarios sobre la bioaccesibilidad de las formas arsenicales	89
Resultados	92
1. Efecto de los componentes alimentarios sobre la bioaccesibilidad de arsénico desde disoluciones acuosas	92
2. Efecto de los componentes alimentarios sobre la bioaccesibilidad de arsénico desde alimentos	95
3. Efecto de los componentes alimentarios sobre la bioaccesibilidad de elementos esenciales	100
Discusión	102
Conclusiones	105
CAPÍTULO 3. Evaluación del efecto de bacterias lácticas y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sobre la bioaccesibilidad de las formas arsenicales	107

Resultados	110
1. Estudio sobre la capacidad de bacterias lácticas y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de unir arsénico inorgánico	110
2. Factores que afectan la captación de arsénico inorgánico	112
2.1. Concentración de las especies arsenicales	112
2.2. Viabilidad de los microorganismos	114
2.3. Medio de incubación	115
3. Efecto de las bacterias lácticas y levaduras sobre la bioaccesibilidad de arsénico inorgánico	119
Discusión	122
Conclusiones	124
CAPÍTULO 4. Evaluación del efecto de los componentes alimentarios, las cepas de bacterias lácticas y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sobre el transporte intestinal de las formas arsenicales	127
Resultados	130
1. Evaluación de la integridad de la monocapa celular en los ensayos de transporte	130
2. Coeficientes de permeabilidad aparente del modelo celular empleado	130
3. Efecto de los componentes alimentarios sobre la permeabilidad de arsénico inorgánico	131
3.1. Efecto de los componentes alimentarios sobre la permeabilidad de disoluciones acuosas de As(III) y As(V)	132
3.2. Influencia de suplementos dietéticos y extractos vegetales en la permeabilidad de As(III) y As(V)	133
3.3. Influencia de los componentes alimentarios, suplementos y extractos vegetales sobre la permeabilidad del arsénico presente en alimentos	135
4. Influencia de las bacterias lácticas y <i>Saccharomyces</i> sobre la permeabilidad de arsénico inorgánico	138
4.1. Efecto de las bacterias lácticas sobre la permeabilidad de disoluciones acuosas de As(III) y As(V)	138
4.2. Efecto de las cepas de <i>Saccharomyces</i> sobre la permeabilidad de disoluciones acuosas de As(III) y As(V)	139
4.3. Efecto de las bacterias lácticas y <i>Saccharomyces</i> sobre la permeabilidad del arsénico presente en alimentos	140

Discusión	142
Conclusiones	146
CAPÍTULO 5. Efecto <i>in vivo</i> de los componentes alimentarios sobre la toxicocinética de las disoluciones acuosas de arsénico inorgánico	147
Resultados	150
1. Estudios preliminares para la selección de la dosis a ensayar	150
2. Efecto de los componentes alimentarios sobre la biodisponibilidad de arsénico inorgánico	151
3. Efecto de los componentes alimentarios sobre la excreción fecal de arsénico inorgánico	154
4. Efecto de los componentes alimentarios sobre la acumulación tisular de arsénico inorgánico	155
5. Efecto de los componentes alimentarios sobre la acumulación hepática de elementos mayoritarios.....	158
Discusión	160
Conclusiones	163
CONCLUSIONES GENERALES	165
BIBLIOGRAFÍA	171
ANEXO	209

Índice de figuras

Figura 1. Diagrama Eh-pH para el As a 25 °C	7
Figura 2. Mecanismos de transporte intestinal del As inorgánico	18
Figura 3. Posibles rutas metabólicas de las formas inorgánicas del As en humanos	21
Figura 4. Técnicas <i>in vitro</i> para evaluar el transporte de un determinado compuesto	33
Figura 5. Esquema del proceso de digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	48
Figura 6. Esquema del sistema bicameral empleado en los estudios de permeabilidad	61
Figura 7. Espectros XANES normalizados de patrones de As	78
Figura 8. Espectros XANES y sus correspondientes espectros de la primera derivada en alimentos y sus fracciones bioaccesibles	81
Figura 9. Efecto de los componentes alimentarios sobre la bioaccesibilidad de disoluciones acuosas de As(III)	93
Figura 10. Efecto de los componentes alimentarios sobre la bioaccesibilidad de disoluciones acuosas de As(V)	94
Figura 11. Efecto de los componentes alimentarios sobre la bioaccesibilidad de As en arroz blanco	97
Figura 12. Efecto de los componentes alimentarios sobre la bioaccesibilidad de As en arroz integral	98
Figura 13. Efecto de los componentes alimentarios sobre la bioaccesibilidad de As en el alga <i>Hizikia fusiforme</i>	99
Figure 14. Efecto de la viabilidad de la cepa en la captación de As inorgánico	114
Figura 15. Efecto del medio de incubación sobre la captación de As inorgánico por bacterias lácticas y levaduras	116
Figura 16. Efecto de la concentración de fosfato inorgánico sobre la captación de As(V)	117
Figura 17 Captación de As(V) por cepas de bacterias lácticas en un medio con fosfato inorgánico 1 mM	119
Figura 18. Efecto de los componentes alimentarios sobre el transporte de As(III) en co-cultivos NCM-460/HT29-MTX	132
Figura 19. Efecto de los componentes alimentarios sobre el transporte de As(V) en co-cultivos NCM-460/HT29-MTX	133

Figura 20. Efecto de los suplementos dietéticos y extractos vegetales sobre el transporte de As(III) y As(V) en co-cultivos NCM-460/HT29-MTX	134
Figura 21. Efecto de las cepas de bacterias lácticas y levaduras sobre el transporte de As desde arroz	141
Figura 22. Concentración plasmática de As(III) en función de la dosis administrada	150
Figura 23. Concentración plasmática de As(V) en función de la dosis administrada	151
Figura 24. Área debajo de la curva (AUC) de ratones tratados con As(III) y componentes alimentarios	152
Figura 25. Área debajo de la curva (AUC) de ratones tratados con As(V) y componentes alimentarios	153
Figura 26. Acumulación tisular de As en ratones expuestos a As(III) o As(V) y componentes alimentarios	156

Índice de tablas

Tabla 1. Especies arsenicales más frecuentes en agua de bebida y alimentos consumidos por el hombre	6
Tabla 2. Exposición dietética a As inorgánico en población adulta	13
Tabla 3. Condiciones instrumentales utilizadas en la cuantificación de As mediante FI-HG-AAS	50
Tabla 4. Componentes alimentarios empleados en los ensayos de bioaccesibilidad	54
Tabla 5. Cepas de bacterias lácticas ensayadas	56
Tabla 6. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ensayadas	57
Tabla 7. Componentes de la dieta empleados para los estudios de permeabilidad celular	63
Tabla 8. Suplementos dietéticos o extractos empleados para los estudios de permeabilidad celular	64
Tabla 9. Contenidos de As inorgánico en muestras de aguas y alimentos ingeridos por poblaciones argentinas	74
Tabla 10. Ajuste por combinación lineal (LCF) de los espectros XANES	82
Tabla 11. Modificación de la bioaccesibilidad de Ca, Mg, K, Fe y P en muestras de alimentos tras aplicar la digestión gastrointestinal en presencia de componentes alimentarios	101
Tabla 12. Captación de As inorgánico (1 mg/L) por cepas de bacterias lácticas	111
Tabla 13. Captación de As inorgánico (1 mg/L) por cepas de <i>S. cerevisiae</i>	112
Tabla 14. Captación de As inorgánico (0.1 mg/L) por cepas de bacterias lácticas y levaduras	113
Tabla 15. Captación de As inorgánico por cepas de bacterias lácticas durante la digestión gastrointestinal	120
Tabla 16. Captación de As inorgánico por cepas de <i>S. cerevisiae</i> durante la digestión gastrointestinal	121
Tabla 17. Coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}) y retención en células y mucus en el modelo celular ensayado	131
Tabla 18. Efecto de los componentes alimentarios, los suplementos dietéticos y extractos vegetales sobre el transporte de As desde arroz	136
Tabla 19. Efecto de los componentes alimentarios, los suplementos dietéticos y extractos vegetales sobre el transporte de As desde el alga <i>Hizikia fusiforme</i>	137

Tabla 20. Efecto de las bacterias lácticas sobre el transporte de As(III) y As(V)139

Tabla 21. Efecto de las cepas de *Saccharomyces* sobre el transporte de As(III) y As(V)140

Tabla 22. Biodisponibilidad relativa (F) del As(III) y As(V) en animales co-expuestos a las formas arsenicales y los componentes alimentarios154

Tabla 23. Excreción fecal en ratones expuestos a As inorgánico y componentes alimentarios155

Tabla 24. Acumulación hepática de elementos mayoritarios en ratones expuestos a As inorgánico y componentes alimentarios159

Abreviaturas

Abreviatura	Nombre
AECOSAN	Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición
AQP	Aquagliceroporinas
As(III)	Arsenito
As(V)	Arseniato
ATSDR	Agencia para el Registro de Sustancias Tóxicas y Enfermedades
AUC	Área debajo de la curva
BL	Bacteria láctica
BMLD	Límite inferior del intervalo de confianza unilateral de la dosis de referencia
BSA	Albúmina de suero bovino
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CMC	Carboximetilcelulosa
Cys	Cisteína
DHLA	Ácido lipoico reducido
DMA	Arsénico dimetilado
DMA(III)	Ácido dimetilarsinoso
DMA(V)	Ácido dimetilarsínico
DMTA(V)	Ácido dimetiltioarsínico
DMDTA(V)	Ácido dimetilditioarsínico
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético

Abreviatura	Nombre
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
ESRF	European Synchrotron Radiation Facility
F	Biodisponibilidad relativa
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación
FDA	Administración de Drogas y Alimentos de EE.UU.
FI-HG-AAS	Espectrofotómetro de absorción atómica con generación de hidruros mediante inyección en flujo
FSA	Food Safety Agency (UK)
GRAS	Generally recognized as safe
GLUT	Permeasas de glucosa
GSH	Glutati6n reducido
HBSS	Soluci6n salina balanceada de Hanks
Hcys	Homocisteína
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N ² -2-etanosulf6nico
HPC	Hidroxipropilcelulosa
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulosa
HT-DMEM	Medio DMEM suplementado para células HT29-MTX
IARC	Agencia Internacional de Investigaci6n sobre el C6ncer
ICP-OES	Espectrofotometría de emisi6n acoplada a plasma inductivo
IST	Ingesta semanal tolerable
JECFA	Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios
LCF	Combinaci6n lineal de espectros
LD ₅₀	Dosis letal 50
LY	Lucifer Yellow
MC	Metilcelulosa

Abreviatura	Nombre
MEM	Medio esencial mínimo con sales de Earle
MMA	Arsénico monometilado
MMA(III)	Ácido monometilarsonioso
MMA(V)	Ácido monometilarsónico
MMMTA(V)	Ácido monometilmonotioarsónico
MRC	Material de referencia certificado
MRS	Medio Man, Rogosa y Sharpe
NAC	N-Acetilcisteína
NaPi	Transportador de fosfato
NCM-DMEM	Medio DMEM suplementado para células NCM-460
NRC	National Research Council (EEUU)
OATP	Polipéptidos transportadores de aniones orgánicos
OMS	Organización Mundial de la Salud
P_{app}	Coefficiente de permeabilidad aparente
PBS	Tampón fosfato salino
pc	Peso corporal
RET	Resistencia eléctrica transepitelial
SAM	S- adenosilmetionina
SeMet	Seleniometionina
SFB	Suero fetal bovino
TMA ⁺	Ion tetrametilarsonio
TMAO	Óxido de trimetilarsina
TMAS	Sulfuro de trimetilarsina
UFC	Unidades formadoras de colonias

Abreviatura	Nombre
U.S. EPA	Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos
XANES	Espectroscopía de absorción de rayos X cercana al borde de absorción
XAS	Espectroscopía de absorción de rayos X
YPD	Yeast Peptone Dextrose

Introducción

1. CARACTERÍSTICAS GENERALES Y USOS DEL ARSÉNICO

El arsénico (As) está considerado un metaloide ya que presenta propiedades intermedias entre metales y no metales. En el medioambiente aparece en distintos estados de oxidación (0, +3, -3, +5) y unido a distintos grupos químicos, generando numerosas especies inorgánicas y orgánicas.

Es el vigésimo elemento en orden de abundancia en la corteza terrestre donde forma parte de más de 200 minerales existentes en rocas ígneas y sedimentarias. Las principales fuentes minerales de As son el oropimente (As_2S_3), el rejalgal (As_4S_4) y la arsenopirita (FeAsS), que es el más abundante (Cullen y Reimer, 1989). Diversos procesos naturales o antropogénicos ocasionan la liberación del As al medioambiente causando su entrada en la cadena trófica y posibilitando la exposición humana al tóxico.

Aproximadamente un tercio del flujo atmosférico del As ocurre por causas naturales, debido a las erupciones volcánicas y a la erosión de rocas que movilizan el As de los minerales (Matschullat, 2000). Por lo que respecta a las actividades antropogénicas, la minería y las industrias de fundición y refinado de metales son los sectores que contribuyen en mayor medida a las emisiones de As, dado que este elemento es un subproducto en la producción de cobre, plomo, cobalto y oro, entre otros. También la quema de combustibles fósiles y el empleo de compuestos químicos que contienen As contribuyen a la difusión del tóxico (Matschullat, 2000).

La producción mundial de As en forma de trióxido de As, ascendió en 2016 a 37000 toneladas, siendo China y Marruecos los principales países productores (88%) (USGS, 2018). Aproximadamente un 90% de esta producción se destinó a la fabricación de arseniato de cobre cromatado (CCA), un preservante de la madera. Desde el año 2003, Estados Unidos y la Unión Europea han restringido el uso de este compuesto en ámbitos residenciales y domésticos (U.S. EPA, 2002;

Directiva 2003/2/CE). Actualmente se considera que su presencia en la madera de los parques infantiles supone un riesgo de exposición a As para la población infantil (Gress *et al.*, 2014).

El As inorgánico de alta pureza se utiliza en la fabricación de semiconductores. El arseniuro de galio (GaAs) se emplea para fabricar células fotovoltaicas que se incorporan a numerosos dispositivos domésticos (teléfonos móviles, periféricos de computadoras, iluminación, etc) y a la tecnología de satélites espaciales. El arseniuro de indio y galio se utiliza en la tecnología infrarroja de onda corta y el arseniuro de germanio y selenio en la fabricación de materiales ópticos.

Diferentes compuestos orgánicos de As se han utilizado durante décadas en la fabricación de herbicidas, insecticidas, desecantes de algodón, defoliantes y esterilizantes del suelo (IARC, 2012): metanoarsonato monosódico (MSMA), metanoarsonato disódico (DSMA), metanoarsonato de ácido de calcio (CAMA) y ácido cacodílico. Desde el año 2009, Estados Unidos ha prohibido su uso y sólo autoriza la aplicación de MSMA para la producción de algodón (U.S. EPA, 2009). Otras formas orgánicas (roxarsone, ácido p-arsanílico, carbarsona y nitarsona) se utilizan como aditivos en piensos para pollos, pavos y cerdos (Makris *et al.*, 2008; Nachman *et al.*, 2017). Su uso está prohibido en Europa (EFSA, 2004) y Estados Unidos (Nachman *et al.*, 2017).

También ha sido frecuente el uso del As como agente terapéutico desde la antigüedad. Los sulfuros de As eran recetados por Aristóteles e Hipócrates (siglo IV a. C.) para el tratamiento de las úlceras de la piel. Las preparaciones de As se usaron en los siglos XVIII y XIX como antipiréticos, antisépticos, antiespasmódicos, sedantes y como formulaciones para combatir la tripanosomiasis (Waxman y Anderson, 2001). Una de las preparaciones más populares fue el tónico de Fowler (solución al 1% de arsenito de potasio en

bicarbonato de potasio), utilizado para tratar enfermedades dermatológicas (dermatitis, pénfigo y psoriasis), el asma y la corea (Chen y Olsen, 2016). El salvarsán, compuesto orgánico de As, se utilizó desde principios del siglo XX para el tratamiento de la sífilis. Actualmente, el único uso médico destacable es la aplicación de trióxido de As para el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda en pacientes refractarios a la quimioterapia con retinoides y antraciclinas (Chen y Olsen, 2016).

2. ARSÉNICO EN AGUA Y ALIMENTOS

La presencia de As en agua y alimentos es habitual, existiendo grandes diferencias en la concentración y en las especies de As que presentan los distintos grupos de alimentos. El conocimiento sobre las especies químicas existentes en estas matrices ha evolucionado gracias al avance constante de las técnicas de análisis. En el año 1973 se identificaron las primeras especies orgánicas, ácido monometilarsónico [MMA(V)] y ácido dimetilarsínico [DMA(V)]; en 1977 se descubrió la arsenobetaina (AB) en organismos marinos y actualmente ya se han identificado más de 50 especies orgánicas (Francesconi y Kuehnelt, 2004). En la tabla 1, se detallan las especies más frecuentes en agua de bebida y los alimentos consumidos por el hombre.

Tabla 1. Especies arsenicales más frecuentes en agua de bebida y alimentos consumidos por el hombre (JEFCA, 2011).

Especie	Abreviatura	Fórmula
Especies inorgánicas		
Arsenito	As(III)	AsO ₃ ⁻³
Arseniato	As(V)	AsO ₄ ⁻³
Especies orgánicas		
Ácido monometilarsónico	MMA(V)	CH ₃ AsO ₃ ⁻²
Ácido dimetilarsínico	DMA(V)	(CH ₃) ₂ AsO ₂ ⁻¹
Óxido de trimetilarsina	TMAO	(CH ₃) ₃ AsO
Ión tetrametilarsonio	TMA ⁺	(CH ₃) ₄ As ⁺
Arsenobetaina	AB	(CH ₃) ₃ As ⁺ CH ₂ COOH
Trimetilarsoniopropionato	TMAP	(CH ₃) ₃ As ⁺ CH ₂ CH ₂ COOH
Arsenocolina	AC	(CH ₃) ₃ As ⁺ CH ₂ CH ₂ OH
Arsenoazúcares dimetilados		$ \begin{array}{c} \text{O} \qquad \qquad \qquad \text{OH} \\ \parallel \qquad \qquad \qquad \\ (\text{CH}_3)_2\text{As}-\text{CH}_2-\text{C}_1\text{H}-\text{C}_2\text{H}-\text{O}-\text{C}_3\text{H}-\text{C}_4\text{H}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2\text{Y} \\ \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \\ \qquad \qquad \qquad \text{OH} \qquad \qquad \qquad \text{OH} \end{array} $ <p>Y= -OH, -SO₃H, -OSO₃H, - OPO₃HCH₂CH(OH)CH₂OH</p>
Arsenolípidos		$ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OR} \\ \\ \text{CHOR} \\ \\ \text{CH}_2-\text{OPO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{As}^+(\text{CH}_3) \end{array} $ <p>R: - H (glicerofosforilarsenocolina) R: -CO(CH₂)_nCH₃ (fosfatidilarsenocolina)</p>

2.1. Arsénico en agua

En el agua destinada al consumo humano predominan las especies inorgánicas de As, arsenito [As(III)] y arseniato [As(V)]. El potencial redox (Eh) del medio y el pH son los factores que condicionan la especiación de As en el agua (IPCS, 2001; Terlecka, 2005), tal y como muestra la figura 1. En condiciones reductoras (<200 mV), como las existentes en aguas subterráneas, las especies trivalentes son las mayoritarias, pero en las condiciones oxidantes, habituales en el medioambiente y en las aguas superficiales, las formas pentavalentes, H_2AsO_4^- o $\text{H}_2\text{AsO}_4^{2-}$, son las más abundantes (IPCS, 2001; Terlecka, 2005). En aguas superficiales también pueden aparecer especies metiladas, MMA(V) y DMA(V), resultado del efecto de microorganismos sobre los compuestos inorgánicos, si bien las concentraciones de estas especies orgánicas son poco relevantes.

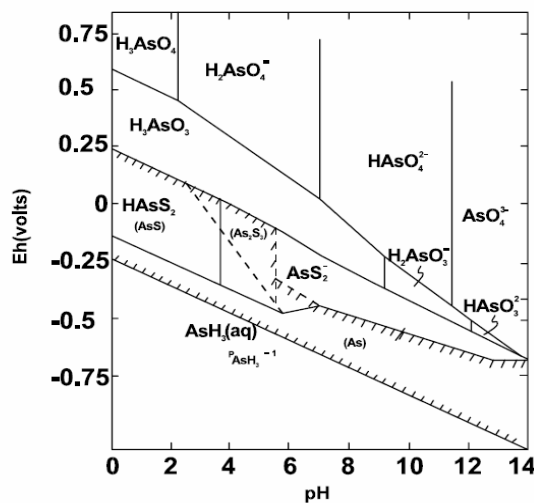


Figura 1. Diagrama Eh-pH para el As a 25 °C (IPCS, 2001).

Los contenidos habituales de As en aguas continentales oscilan entre 1 y 2 $\mu\text{g/L}$, pero en aguas superficiales y subterráneas de áreas con rocas volcánicas y depósitos minerales de azufre se han descrito concentraciones muy superiores (12 mg/L) (OMS, 2011). La mayoría de los países limitan el contenido máximo de As en el agua destinada al consumo humano y en muchos casos adoptan el valor guía propuesto por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (10 $\mu\text{g/L}$; OMS, 2017).

En ciertas áreas geográficas la población sólo puede abastecerse de agua de fuentes subterráneas con altos niveles de As. En el año 2009 se estimó que 140 millones de personas de 50 países consumían agua con contenidos de As superiores al valor recomendado por la OMS. Se han hallado fuentes domésticas de agua que alcanzan 3000 $\mu\text{g/L}$ (McCarty *et al.*, 2011; Rasheed *et al.*, 2017). Si bien es una problemática global, los países más afectados se encuentran en América Latina (Argentina, Bolivia, Chile, Perú, México) y Asia (Bangladesh, India, Camboya, China, Nepal, Pakistan y Vietnam) (McCarty *et al.*, 2011; Bundschuh *et al.*, 2012; Yunus *et al.*, 2016; Rasheed *et al.*, 2017). En Bangladesh, donde la presencia de As en el agua se detectó en 1993, el problema se consideró una emergencia de salud pública al afectar a 21 millones de personas (Smith *et al.*, 2000) y desencadenó el interés de investigadores, organizaciones no gubernamentales y autoridades locales, que actualmente intentan disminuir la contaminación (Flanagan *et al.*, 2012). Esto contrasta con la situación en América Latina, donde países como Argentina conocen desde hace mucho tiempo la presencia de As en el agua de consumo de ciertas regiones, y las medidas instauradas para reducir la exposición son mucho más escasas (Bundschuh *et al.*, 2012).

2.2. Arsénico en alimentos

La determinación de As total es un análisis habitual en los programas de vigilancia de contaminación química de los alimentos. Por el contrario, la información sobre especies arsenicales es más reducida; se genera principalmente en laboratorios de investigación y pocos son los organismos públicos de control que incluyen la especiación en su programa de vigilancia de la seguridad alimentaria. El As inorgánico constituye la especie más tóxica de las existentes en alimentos. Esta forma arsenical es la que más preocupa a investigadores y agencias de evaluación de riesgo, que en sus últimas opiniones científicas, señalan la necesidad de incrementar la información sobre sus contenidos en la dieta de la población (EFSA, 2009; JECFA, 2011; Cubadda *et al.*, 2017).

Las diferencias cualitativas y cuantitativas del As existente en alimentos de origen terrestre y de origen acuático son muy significativas. Salvo excepciones puntuales, los productos de origen terrestre presentan concentraciones de As inferiores a los de origen acuático y una menor variedad de especies. Los valores medios en productos pesqueros oscilan entre 0.71 y 2.5 mg/kg (EFSA, 2009; ANSES, 2011; FSANZ, 2011). Puntualmente se han descrito concentraciones superiores a 50 mg/kg en organismos bentónicos (Storelli y Marcotrigiano, 2000; EFSA, 2009; Julshamn *et al.*, 2012) y en crustáceos (EFSA, 2009), no asociadas a medioambientes contaminados. En estos alimentos son mayoritarias las especies orgánicas, destacando su contenido en AB que representa habitualmente más del 80% del As total en pescados y cerca del 50% en bivalvos (Suñer *et al.*, 2002). Las concentraciones de As inorgánico suelen ser inferiores a 0.2 mg/kg (Lynch *et al.*, 2014) y representan un bajo porcentaje respecto al contenido total de As (0.02-11%) (Muñoz *et al.*, 2000; EFSA 2014; Lynch *et al.*, 2014). Se han descrito concentraciones de esta forma química muy superiores en casos puntuales: 5.8 mg/kg en bivalvos de las costas noruegas que supone el 42% del As total (Sloth y Julshamn, 2008).

Las algas son los alimentos marinos que presentan las mayores concentraciones de As. Los contenidos en las algas pardas son superiores a los hallados en algas rojas y verdes (Almela *et al.*, 2002; Rose *et al.*, 2007). Son destacables las altas concentraciones que presenta el alga parda *Hizikia fusiforme* (38-149 mg/kg) (Almela *et al.*, 2002; Ichikawa *et al.*, 2006; Rose *et al.*, 2007; Lynch *et al.*, 2014). Los arsenoazúcares son las especies arsenicales predominantes, seguidas de DMA(V) y As inorgánico (Llorente-Mirandes *et al.*, 2011). Las concentraciones de As inorgánico son normalmente inferiores a 1 mg/kg, con la excepción del alga parda *Hizikia fusiforme* en las que sistemáticamente las especies inorgánicas suponen altos porcentajes del As total (55-88%), alcanzando concentraciones de 150 mg/kg (Almela *et al.*, 2005; Ichikawa *et al.*, 2006). Estas concentraciones de As inorgánico no son consecuencia de la contaminación del ambiente acuático.

Por lo que respecta a los alimentos terrestres, en muchas ocasiones sus concentraciones no son detectables. Las setas y el arroz constituyen una excepción. Algunos géneros de setas como *Laccaria* (77-224 mg/kg peso seco) (Vetter, 2004; Zhang *et al.*, 2015) y *Boletus* (>10 mg/kg peso seco) (Slekovec y Irgolic, 1996) presentan concentraciones muy superiores a la de los alimentos de origen marino. Estos contenidos no se asocian a un crecimiento en suelos contaminados, sino a factores elevados de bioacumulación seta/suelo. El As inorgánico puede llegar a ser la especie predominante (Gonzálvez *et al.*, 2009, Llorente-Mirandes *et al.*, 2014).

El arroz es el alimento terrestre que presenta sistemáticamente las mayores concentraciones de As total, aportado por As inorgánico y DMA(V). En arroz cultivados en áreas de Bangladesh contaminadas se han detectado elevadas concentraciones de As (1.23-2.05 mg/kg) (Williams *et al.*, 2005). Al margen de estos valores, no representativos de la problemática global, las concentraciones no superan habitualmente 0.3 mg/kg (Zavala y Duxbury, 2008; Codex, 2012). El

As inorgánico supone porcentajes entre 11-91% del As total (Torres-Escribano *et al.*, 2008). Esta especie se acumula en el salvado por lo que las concentraciones de As inorgánico son superiores en el arroz integral. Los productos que contienen arroz en sus formulaciones también presentan concentraciones destacables de As inorgánico (Sun *et al.*, 2009).

3. EFECTO DEL COCINADO SOBRE LOS CONTENIDOS DE ARSÉNICO

Los tratamientos aplicados en el ámbito industrial o doméstico a los alimentos se ha demostrado que pueden modificar los contenidos de As y el perfil de especies químicas existentes en el producto crudo. Los estudios se han realizado mayoritariamente en los grupos de alimentos con las concentraciones de As más elevadas: productos de la pesca, algas y arroz.

Los procedimientos culinarios de cocción, cocinados al vapor y remojo pueden producir la solubilización del As hacia el líquido con la consiguiente disminución en el contenido del tóxico respecto al producto crudo. Así se ha evidenciado en muestras de pescados y marisco (descensos del 12-54%; Cheyns *et al.*, 2017; Liao *et al.*, 2018), algas (descensos 34-71%; Rose *et al.*, 2007; García-Sartal *et al.*, 2012) y vegetales (descensos 60%; Díaz *et al.*, 2004; Cheyns *et al.*, 2017). Otros tratamientos culinarios como fritura y horneado, no producen cambios significativos en el contenido de As de pescados y algas (Wei *et al.*, 2003; Almela *et al.*, 2005; Perelló *et al.*, 2008; Cheyns *et al.*, 2017; Liao *et al.*, 2018). No obstante, si las temperaturas del tratamiento son muy elevadas se ha demostrado que pueden producirse transformaciones de AB a ión tetrametilarsonio (TMA⁺), incluso a As inorgánico (Devesa *et al.*, 2001; Hanaoka *et al.*, 2001).

El efecto del cocinado adquiere relevancia en poblaciones que consumen agua

contaminada con As inorgánico. El uso de esta agua para el lavado y cocinado de vegetales, cereales y legumbres eleva de forma considerable el As inorgánico en el alimento. El incremento de los niveles de contaminación del agua conlleva un aumento en el As del alimento cocinado (Díaz *et al.*, 2004; Torres-Escribano *et al.*, 2008). Las concentraciones de As total halladas en alimentos preparados por estas poblaciones expuestas son elevadas (hasta 1.7 mg/kg) y muy alejadas de las concentraciones existentes en los alimentos crudos utilizados para la preparación de los platos (Del Razo *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2006a; Díaz *et al.*, 2015). Por ello, en estas áreas no considerar la exposición a As inorgánico a través de alimentos cocinados subestima notablemente la exposición al tóxico.

4. EXPOSICIÓN HUMANA A ARSÉNICO INORGÁNICO

La evaluación del riesgo asociado a la exposición a As inorgánico ha adquirido en las dos últimas décadas relevancia para las agencias de evaluación del riesgo. En 2011, el Comité conjunto OMS/FAO de aditivos alimentarios (JECFA) propuso un nuevo valor guía basado en estudios epidemiológicos: BMLD_{0.5} 3 µg/kg peso corporal (pc)/día [2-7 µg/kg pc/día] (JEFCA, 2011).

Son varios los países que han estimado la exposición dietética a As inorgánico (tabla 2). Los valores medios de estas ingestas son inferiores al valor de referencia toxicológico. En la mayor parte de los estudios los cereales son los alimentos que contribuyen en mayor medida a la exposición (≈50%), tanto en población infantil como adulta (Wong *et al.*, 2013; EFSA, 2004; Cubadda *et al.*, 2016; Seo *et al.*, 2016; Marin *et al.*, 2017). Francia constituye una excepción dado que el agua realiza la mayor contribución a la exposición dietética (≈19%) (Arnich *et al.*, 2012). Los estudios también indican que la exposición disminuye con la edad (EFSA, 2014; Cubadda *et al.*, 2016). El estudio de Dieta Total de Italia indica que la exposición es elevada en los percentiles 95 de los grupos bebés y niños

pequeños y niños y adolescentes (Cubadda *et al.*, 2016), por lo que no puede descartarse el riesgo para estos grupos de población.

Tabla 2. Exposición dietética a As inorgánico en población adulta.

Pais/Localidad	µg/kg pc/día	Periodo	Referencia
Europa	0.09-0.38	—	EFSA, 2014
Francia	0.24-0.28	2004-2009	Arnich <i>et al.</i> , 2012
Italia	0.079-0.091	2012-2014	Cubadda <i>et al.</i> , 2016
Irlanda	0.01-0.02	2012-2014	FSAI, 2016
Reino Unido	0.03-0.09	2006	Rose <i>et al.</i> , 2010
España (Valencia)	0.08	2010-2011	Marin <i>et al.</i> , 2017
España (Cataluña)	0.09	2007-2010	Fontcuberta <i>et al.</i> , 2011
China (Hong Kong)	0.23	2005-2007	Wong <i>et al.</i> , 2013
Japón	0.36-0.46	—	JECFA, 2011
Corea	0.2	2010-2011	Seo <i>et al.</i> , 2016
Nueva Zelanda	0.13	2016	NZFS, 2016
Camerún (Yaundé)	0.230	2008	Gimou <i>et al.</i> , 2013
Estados Unidos	0.023-0.072	2006-2008	Jara y Winter, 2014
Canadá	0.29	—	JECFA, 2011

La situación es muy distinta en áreas que consumen agua contaminada con As. En ellas se carece de estudios de Dieta Total pero las escasas estimaciones de exposición a As inorgánico realizadas a través del consumo de agua de bebida y algunos de los alimentos evidencian situaciones de riesgo alarmantes. Se han descrito, por ejemplo, ingestas superiores a 1000 µg/día en el norte de Chile (Díaz *et al.*, 2004) y en Bangladesh (Smith *et al.*, 2006a).

5. TOXICIDAD DE LAS FORMAS QUÍMICAS DE ARSÉNICO

La toxicidad del As varía en función de la especie química en la que se encuentra. El As inorgánico constituye la forma más tóxica encontrada hasta el momento en agua y alimentos. Está considerado por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) como un carcinógeno para el hombre (Grupo 1, IARC, 2004). Es uno de los pocos compuestos que se ha demostrado que causan cáncer en humanos a través del consumo de agua de bebida. La exposición crónica a As inorgánico está asociada con una mayor prevalencia de cánceres de pulmón, tracto urinario, hígado, riñón y piel (Chen *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1992, 1999), extendiendo evidencias que apuntan al cáncer de pulmón como la principal causa de muerte por este tipo de exposición. Además, se ha reportado un aumento de otras patologías como diabetes tipo II, problemas cardiovasculares (hipertensión) y cerebrovasculares (infartos), enfermedades respiratorias obstructivas crónicas y manifestaciones dérmicas no carcinogénicas (hipo e hiperpigmentaciones, queratosis palmar) (EFSA, 2009).

La exposición perinatal a As inorgánico también representa un problema de salud pública. El As inorgánico afecta el desarrollo fetal, apareciendo efectos adversos en el nacimiento y en edades tempranas, incluso a niveles de exposición relativamente bajos. La exposición *in utero* está asociada con una mayor incidencia de partos pretérmino, niños de bajo peso al nacer, reducciones de las circunferencias craneal y torácica (Rahman *et al.*, 2008; Bloom *et al.*, 2014), así como un mayor riesgo de procesos infecciosos durante el primer año de vida (Farzan *et al.*, 2016). En las últimas dos décadas, varios informes epidemiológicos también han demostrado que esta exposición temprana puede alterar la función cognitiva, particularmente el aprendizaje y la memoria (Tyler y Allan, 2014).

Adicionalmente, estudios retrospectivos de cohorte muestran que además de los efectos de carácter más inmediato, las exposiciones perinatales a As inorgánico también están asociadas con patologías en la edad adulta (Naujokas *et al.*, 2013). Smith *et al.* (2006b) evidencian en un estudio realizado en Antofagasta (Chile) que la exposición durante la primera infancia o en el útero tiene efectos pulmonares pronunciados, aumentando la mortalidad en adultos (< 50 años) por enfermedades pulmonares malignas y no malignas.

En la actualidad, se sabe que hay formas más tóxicas que las inorgánicas, las cuales proceden del metabolismo del As inorgánico (apartado 6.3, introducción), si bien éstas no se han detectado en matrices alimentarias. Se trata del ácido monometilarsonioso [MMA(III)] y el ácido dimetilarsinioso [DMA(III)] detectadas en la orina de humanos expuestos a As inorgánico, indicativo de que se trata de metabolitos estables de las formas inorgánicas (Valenzuela *et al.*, 2006). Petrick *et al.* (2001) muestran que la LD₅₀ (dosis letal 50) en hámsteres dosificados intraperitonealmente es menor para el MMA(III) (20.3 µg/kg pc) que para el As(III) (110 µg/kg pc). Cohen *et al.* (2007) concluyen que la inducción de cáncer de vejiga urinaria en ratas tras 2 años de exposición a DMA(V) a través del agua de bebida (50-200 mg/L) observado por Wei *et al.* (2002) se debe en parte a la reducción del DMA(V) a DMA(III).

Los mecanismos celulares y moleculares implicados en la toxicidad del As inorgánico y sus metabolitos metilados son muy variados. La evaluación de estos mecanismos está parcialmente dificultada por el hecho de que los efectos observados varían en función del tiempo, la dosis, la especie arsenical y la susceptibilidad individual. El As inorgánico se ha asociado a alteraciones en numerosas vías de señalización celular, el arresto del ciclo celular, alteraciones de la expresión de factores de crecimiento, resistencia a la apoptosis, inhibición de la reparación del ADN, disminución de la respuesta inmune, alteración de los patrones de metilación del ADN y un aumento del estrés oxidativo (Lantz y Hays,

2006). Uno de los mecanismos de acción más estudiados es el estrés oxidativo (Jomova *et al.*, 2011). Se ha puesto de manifiesto que el As disminuye los niveles intracelulares de antioxidantes endógenos como el glutatión (GSH) o que afecta la actividad de enzimas responsables de mantener el equilibrio redox como la catalasa o el superóxido dismutasa. Adicionalmente, se ha evidenciado *in vitro* e *in vivo* que la exposición a determinadas formas arsenicales aumenta la generación de radicales libres de oxígeno y/o nitrógeno.

6. TOXICOCINÉTICA DEL ARSÉNICO

Los estudios sobre toxicocinética en metales y metaloides se han llevado a cabo principalmente dosificando animales de laboratorio a través del agua de bebida o por sonda empleando soluciones salinas de los patrones. Sin embargo, en muchos casos estos elementos tóxicos se presentan en la matriz unidos a proteínas u otro tipo de moléculas y no siempre son liberados durante la digestión en una forma química similar a la de los patrones que se comercializan. La forma de estos tóxicos disponible para la absorción puede ser diferente dependiendo del alimento y por tanto, su mecanismo de absorción también.

6.1. Absorción

En humanos, la mayoría de los estudios de absorción intestinal de As se han centrado en el As inorgánico, donde se pone de manifiesto una elevada absorción (Bettley y O'Shea, 1975; Pomroy *et al.*, 1980; Buchet *et al.*, 1981). En animales de experimentación, la absorción de una dosis única de As(III) o As(V) administrada por sonda es superior al 75% (Freeman *et al.*, 1995; Roberts *et al.*, 2002; Juhasz *et al.*, 2006). La absorción reportada para el DMA(V) es más variable, con valores que oscilan entre 80% en roedores (Vahter *et al.*, 1984) y 33% en cerdos (Juhasz *et al.*, 2006). Un estudio empleando cerdos muestra que

la absorción de MMA(V) ($16.7 \pm 5.0\%$) es menor que la de las formas inorgánicas y dimetiladas (Juhasz *et al.*, 2006).

Estudios *in vitro* sobre el coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}) de las formas arsenicales más tóxicas, empleando Caco-2 como modelo de epitelio intestinal, muestran que las formas trivalentes se absorben con mayor eficacia que las pentavalentes [DMA(III) > MMA(III) >> As(III) >> As(V) > MMA(V) > DMA(V)] (Calatayud *et al.*, 2010, 2011).

Las investigaciones sobre la absorción de especies arsenicales presentes en los alimentos indican que la matriz alimentaria es un factor a considerar. Juhasz *et al.* (2008) ponen de manifiesto que la absorción en cerdos de las formas inorgánicas de As presente en productos vegetales es menor que la hallada en patrones acuosos. Este hecho evidencia que algunos componentes de los alimentos pueden modular la absorción intestinal de las formas arsenicales (apartado 7.3, introducción).

Los mecanismos de transporte que intervienen en la absorción intestinal de las formas inorgánicas de As han sido recientemente evaluados empleando Caco-2 como modelo de epitelio (figura 2). Se ha puesto de manifiesto que el transporte intestinal de As(III) y As(V) tiene un importante componente paracelular, es decir, se transportan a través de los espacios intercelulares (Calatayud *et al.*, 2010, 2011). Adicionalmente se ha reportado la existencia de un transporte transcelular mediado por portador. Distintos estudios han evidenciado o sugerido la participación del transportador de fosfato (NaPi), aquagliceroporinas (AQP), permeasas de glucosa (GLUT) y polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATP) en la captación intracelular de As(III) y/o As(V) (Lu *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006; Villa-Bellosta y Sorribas, 2008; Mukhopadhyay *et al.*, 2014). A nivel intestinal, Calatayud *et al.* (2012a) han demostrado la participación de las isoformas OATPB, AQP10 y GLUT5 para As(III) y NaPiIb

para As(V) empleando células Caco-2 transfectadas con el siRNA correspondiente a cada isoforma.

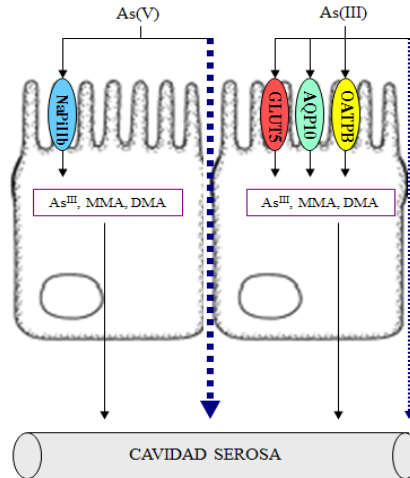


Figura 2. Mecanismos de transporte intestinal del As inorgánico (Calatayud *et al.*, 2012b).

6.2. Distribución y excreción

La distribución del As en sangre es la principal forma de transporte a los distintos órganos una vez absorbido. Las especies inorgánicas se transportan unidas principalmente a grupos tiol de proteínas y moléculas de bajo peso molecular como el GSH o la cisteína (Cys) (NRC, 1999). La distribución y la permanencia del As inorgánico en sangre dependen de los niveles de exposición, de la forma química y de la especie animal evaluada. Así, los contenidos del metaloide en glóbulos rojos son mayores a los presentes en plasma a niveles de exposición bajos; sin embargo, son similares cuando los niveles de exposición se incrementan (NRC, 1999). La semivida de eliminación del As inorgánico en

sangre es de aproximadamente 1 h en muchos de los mamíferos estudiados; hecho que muestra la elevada eficacia de la captación del metaloide por los órganos.

La acumulación tisular también es un reflejo de la dosis, de la forma química y del tiempo de exposición. En general, los contenidos en los órganos son mayores cuando se administra As(III) que cuando se dosifica As(V). La retención en riñones, hígado, bilis, cerebro, huesos, piel y sangre es 2-25 veces superior tras exposición a la forma trivalente frente a la pentavalente (U.S. EPA, 2009). Kenyon *et al.* (2008) muestran tras una exposición subcrónica (12 semanas) a As(V) una acumulación tisular en ratones que sigue la siguiente gradación: riñones > pulmones > vejiga urinaria > piel > hígado. La exposición subcrónica a As(III) (8 semanas) muestra un patrón de acumulación similar al de As(V), siendo los pulmones y riñones los órganos con mayor contenido en As (Li *et al.*, 2013).

Por otro lado, el As(III) y As(V), así como sus metabolitos metilados, son capaces de atravesar la placenta en distintos modelos animales (U.S. EPA, 2009). Los niveles de As en cordón umbilical de neonatos son similares a los de la madre en sangre, indicando que la transferencia transplacentaria de As también se produce en humanos (Concha *et al.*, 1998; Hall *et al.*, 2007).

El As inorgánico se excreta principalmente a través de la orina. La excreción urinaria se produce mayoritariamente entre las 48 h y los 4 días tras la ingesta (ATSDR, 2007; U.S. EPA, 2010). Los seres humanos excretan porcentajes variables de As inorgánico y sus metabolitos dependiendo de la dosis y de la forma química administrada. A medida que aumenta la dosis, el porcentaje de la forma dimetilada [DMA: DMA(V) + DMA(III)] se reduce y aumenta el de la forma monometilada [MMA: MMA(V) + MMA(III)] y el de As inorgánico (Tseng, 2007), reflejo de un menor metabolismo (apartado 6.3, introducción). Además de la excreción urinaria, se ha puesto de manifiesto una eliminación

minoritaria a través de heces, glándulas sudoríparas, pelo y leche materna (EFSA, 2009).

6.3. Metabolismo

La mayoría de las formas arsenicales absorbidas experimentan procesos metabólicos. El metabolismo más estudiado ha sido el del As inorgánico. En la actualidad se consideran dos posibles rutas metabólicas (figura 3), que dan lugar a metabolitos mono [MMA(III), MMA(GS)₂ o MMA(V)] y dimetilados [DMA(III), DMA(GS) o DMA(V)]. Los procesos de metilación, comunes en ambas vías (A y B), requieren la S-adenosilmetionina (SAM) como dador de grupos metilo.

En la primera vía (A), propuesta en la década de los 30 por Challenger, hay una reducción previa a la metilación que requiere de un dador de electrones (Waters *et al.*, 2004). En la segunda vía (B), las formas arsenicales deben estar formando complejos con GSH para poder ser metiladas. Durante muchos años, ha existido el debate sobre los enzimas responsables de este proceso metabólico. En la actualidad, existe un consenso general por parte de la comunidad científica sobre el hecho de que la metiltransferasa As3MT, caracterizada por Lin *et al.* (2002), es la enzima responsable de las transformaciones desde el As(III) hasta las formas dimetiladas o trimetiladas finales.

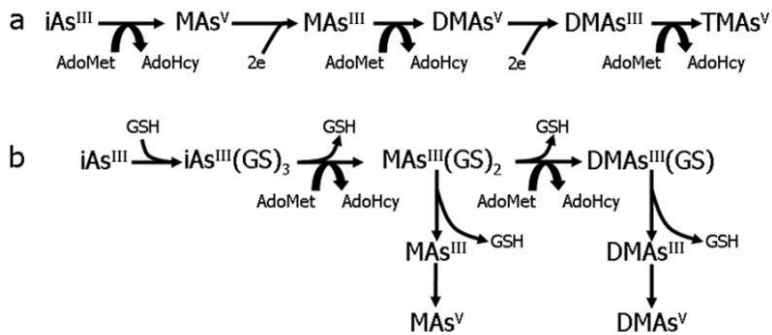


Figura 3. Posibles rutas metabólicas de las formas inorgánicas del As en humanos (Drobná *et al.*, 2009).

La eficacia del proceso metabólico en humanos y animales se determina generalmente mediante el análisis de los metabolitos urinarios. Una mayor tasa metabólica se traduce en un mayor porcentaje de DMA en orina. En zonas con arsenicismo crónico endémico, se asocia una menor tasa metabólica con la aparición de enfermedades derivadas de la exposición. Así, se ha reportado en zonas endémicas de México una mayor incidencia de lesiones cutáneas en personas con un mayor porcentaje urinario de MMA y As inorgánico, junto con un menor porcentaje de DMA (Del Razo *et al.*, 1997). También se ha asociado un aumento del porcentaje urinario de MMA con un mayor riesgo de cáncer de piel, cáncer de vejiga y enfermedades vasculares periféricas en poblaciones expuestas de Taiwán (Tseng, 2007).

Además de un metabolismo sistémico, existe un metabolismo presistémico que afecta a las formas arsenicales. Se ha evidenciado la formación de derivados volátiles de As inorgánico en aislados de heces humanas y de ratones incubados en condiciones anaeróbicas (Michalke *et al.*, 2008). Meyer *et al.* (2008) llevan a cabo un estudio para identificar los microorganismos del intestino humano responsables de la volatilización del metaloide, evidenciando que algunas cepas

de arqueobacterias son capaces de generar a partir de As inorgánico especies metiladas volátiles [CH_3AsH_2 , $(\text{CH}_3)_2\text{AsH}$, $(\text{CH}_3)_3\text{As}$].

También se han puesto de manifiesto la formación de metabolitos arsenicales solubles a partir de As inorgánico. Hall *et al.* (1997) muestran que las formas inorgánicas de As se transforman a especies mono y dimetiladas en una alta proporción (hasta 40%) tras 21 h de incubación en condiciones anaeróbicas, siendo el MMA la forma predominante. Esta transformación es más rápida para el As(III), indicando que la reacción de reducción de As(V) a As(III) es una etapa limitante, y se inhibe al aumentar la concentración de As inorgánico. Estas transformaciones observadas en contenidos intestinales de roedores, se han confirmado a posteriori en humanos, en ensayos *in vitro* empleando aislados de heces. Alava *et al.* (2013) llevan a cabo un estudio de biotransformación con patrones acuosos de As(V) y arroces donde predominan las formas As(V) y DMA(V), observando en ambos casos la formación de DMA(III), MMA(III) y ácido monometilmonotioarsónico [MMMTA(V)].

La transformación de las especies arsenicales orgánicas procedentes del metabolismo de As inorgánico también se ha evaluado. Kuroda *et al.* (2004) muestran que *Escherichia coli* aislada del ciego de ratas transforma DMA(V) en metabolitos de mayor grado de toxicidad en presencia de Cys; sin embargo, no identifican los compuestos. Posteriormente Kubachka *et al.* (2009) identifican estos metabolitos como tres especies tioladas, ácido dimetiltioarsínico [DMTA(V)], ácido dimetilditioarsínico [DMDTA(V)] y sulfuro de trimetilarsina (TMAS), siendo el DMDTA(V) la especie predominante.

Además del metabolismo presistémico debido a la microbiota intestinal, también se ha puesto de manifiesto un metabolismo por parte de las células epiteliales del intestino. En un estudio realizado empleando la línea celular Caco-2 como modelo de epitelio intestinal, se evidencia que las células son capaces de

metabolizar As(III) a especies mono y dimetiladas en estado trivalente y pentavalente (Calatayud *et al.*, 2012c). Esto es un indicativo de que el epitelio intestinal no actúa meramente como barrera fisiológica durante el tránsito del As inorgánico ingerido.

6.4. Transformaciones arsenicales no metabólicas

Las transformaciones arsenicales mencionadas en el apartado anterior se deben al metabolismo del organismo o al de la microbiota intestinal asociada. Estas no son las únicas transformaciones que experimenta el As tras su ingesta. Se ha evidenciado que durante el paso por el tracto gastrointestinal hay una serie de cambios relacionados con las sustancias reductoras y oxidantes presentes en el lumen. Calatayud *et al.* (2013) en un estudio realizado empleando un modelo estático de digestión gastrointestinal evidencian cambios en el estado de oxidación de las especies arsenicales presentes inicialmente en los vegetales. Los vegetales cocinados con As(V), MMA(V) y DMA(V) tras la digestión presentan un importante porcentaje de reducción de las formas arsenicales pentavalentes [0.1-22% As(III), 4-35% MMA(III) y 5-26% DMA(III)]. Según los autores estos cambios se deben a la puesta en contacto de las formas arsenicales con sustancias reductoras de los alimentos vegetales ensayados (ajo, brócoli y espárragos). Zhao *et al.* (2014) también concluyen que el proceso de digestión gastrointestinal puede reducir la forma inorgánica de As en algas. Estos autores indican que posiblemente la causa de esta transformación sea la etapa ácida del estómago.

Las transformaciones metabólicas y no metabólicas que experimenta el As inorgánico previo a su llegada a la circulación sistémica pueden modificar la cantidad del tóxico que alcanza los órganos diana y la toxicidad del mismo. Estas modificaciones químicas no se consideran cuando se evalúa el riesgo asociado a la ingesta. El conocimiento de las formas arsenicales que están presentes en el

lumen disponibles para la absorción puede ser una herramienta útil no sólo para realizar una evaluación de riesgo más realista sino también para llevar a cabo una búsqueda más adecuada de estrategias encaminadas a reducir la entrada del metaloide en la circulación sistémica (biodisponibilidad).

7. ESTRATEGIAS PARA REDUCIR LA EXPOSICIÓN A ARSÉNICO INORGÁNICO

Las elevadas cifras de población expuesta unidas a los datos procedentes de los estudios epidemiológicos, son algunas de las razones que han llevado a las agencias internacionales relacionadas con la salud a recomendar la reducción de la ingesta de este tóxico. Las posibles vías para reducir esta exposición no son sencillas y aunque en algunas ocasiones no parecen de difícil ejecución, no han sido hasta el momento todo lo exitosas que se esperaba. A continuación, se detallan las posibles vías de intervención para reducir la exposición oral a As inorgánico.

7.1. Eliminación del arsénico inorgánico de las fuentes de exposición

Se ha evidenciado que la mayoría de las tecnologías para eliminar As del agua son más eficientes cuando predomina la forma inorgánica pentavalente, ya que el As(III) es una especie neutra a $\text{pH} < 9.2$, y por tanto no es una buena diana para procesos de precipitación, adsorción o intercambio iónico, fundamentos de las técnicas de eliminación. De hecho, las metodologías convencionales presentan una etapa previa de oxidación del As(III) a As(V) (Nicomel *et al.*, 2016).

La coagulación con sulfato de aluminio [$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$] o cloruro férrico (FeCl_3) y la floculación con sales de hierro son las técnicas más empleadas para la eliminación de As del agua. En estos procesos, el As disuelto se transforma en un

sólido insoluble, que posteriormente se filtra o precipita. También son frecuentes las metodologías basadas en el intercambio iónico y membranas de ósmosis inversa (Nicomel *et al.*, 2016). La mayoría de los métodos de remediación no consiguen una eliminación completa del metaloide, quedando concentraciones residuales superiores al estándar de calidad del agua. Además, estas técnicas no siempre son aplicables a pequeña escala, por lo que poblaciones rurales, en las que se consume mayoritariamente agua de pozo, continúan en muchas ocasiones, expuestas a altas concentraciones de tóxico. Se han propuesto opciones de descontaminación de bajo coste que pueden aplicarse en estas áreas (Cornejo *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2014). Para que las tecnologías sean exitosas deben encajar adecuadamente en la rutina del lugar y ser aceptadas por las poblaciones (Mohan y Pittman, 2007).

La eliminación del As presente en el alimento o evitar que exista una contaminación en estas matrices es un objetivo todavía más complejo. El arroz ha sido el alimento más estudiado en este aspecto y se han propuesto medidas de mitigación basadas en la actuación sobre factores ambientales y agrícolas (Brammer, 2009). Se ha evidenciado que los transportadores de silicio y las aquaporinas presentes en las raíces captan el As inorgánico del suelo, el cual es posteriormente transportado a las partes comestibles de la planta a través de la reductasa AtACR2 (Zhao *et al.*, 2009). Basándose en estos conocimientos se han diseñado estrategias dirigidas a la reducción del transporte. Se ha reportado que la fertilización con silicio reduce los contenidos de As en los granos de arroz (Bogdan y Schenk, 2008; Li *et al.*, 2009). Asimismo, la reducción de la expresión de AtACR2 genera plantas que acumulan menos As inorgánico (Dhankher *et al.*, 2010). Estas estrategias implican un cambio en el tipo de cultivo o la creación de alimentos genéticamente modificados; por ese motivo son de difícil implementación.

El problema también se ha abordado desde la etapa de procesado y/o

tratamiento culinario. Se ha evidenciado que el lavado del grano y el incremento en el ratio agua/arroz durante la cocción favorecen la reducción del contenido (Raab *et al.*, 2009). Recientemente se han propuesto procedimientos que disminuyen el contenido de As inorgánico, como el cocinado del arroz por percolación en una corriente continua de agua cercana a la ebullición que produce reducciones de hasta un 96% del As inorgánico (Signes-Pastor *et al.*, 2017). Esta alternativa de cocinado se ha aplicado con éxito a nivel doméstico (Carey *et al.*, 2015). No obstante produce una reducción del contenido mineral y de nutrientes hidrosolubles.

7.2. Disminución de la ingesta de alimentos con elevados contenidos

Las fuentes dietéticas de As inorgánico son alimentos básicos en la dieta de muchas poblaciones. Si la ingesta elevada es debida al agua, se puede aconsejar el uso de agua embotellada; sin embargo, esto no resuelve el problema, ya que esta agua se emplea en el cocinado de alimentos. Si son los alimentos, y en concreto los cereales, los que contribuyen en mayor medida a la ingesta, su eliminación de las dietas de determinadas regiones del planeta es prácticamente inviable, ya que se trata de la base de la misma y su principal fuente de energía. La modificación de los hábitos alimentarios en estas poblaciones es de difícil abordaje, más si se tiene en cuenta que en muchos casos se trata de poblaciones con limitados recursos económicos.

De todas las matrices problemáticas en lo que al As inorgánico se refiere sólo se han emitido recomendaciones para el alga *Hizikia fusiforme*. Agencias de seguridad alimentaria de diferentes países han recomendado que se evite el consumo de este alga parda (FSA, 2010; CFIA, 2012).

7.3. Modificación de la toxicocinética del arsénico inorgánico

Otra vía alternativa de reducción de la exposición es modular su toxicocinética tras la ingesta, modificando los procesos de absorción intestinal, excreción o metabolismo del tóxico. Para este objetivo se han propuesto diferentes estrategias basadas en productos de origen alimentario o extractos vegetales.

Los efectos más estudiados de la dieta sobre la toxicocinética del As son los que afectan al metabolismo. Tal y como se ha comentado previamente (apartado 6.3, introducción), una mayor tasa metabólica supone una mayor excreción urinaria y una menor acumulación tisular. Kenyon *et al.* (1997) muestran que el selenio (Se) de la dieta altera el metabolismo del As inorgánico. La metilación de As inorgánico se reduce en ratones alimentados con dietas ricas en Se, posiblemente por una reducción de los niveles de SAM, molécula dadora de grupos metilo en el proceso metabólico del As inorgánico (apartado 6.3, introducción). Por el contrario, cuando se administran concentraciones de Se normales, este elemento puede conllevar una reducción de la retención de As en los tejidos, al favorecer la excreción biliar (Gregus *et al.* 1998). Los autores sugieren que el Se inorgánico forma complejos con el As, principalmente con el As(III), que se eliminan por vía biliar. Estudios posteriores han revelado, empleando espectroscopia de absorción de rayos X, la presencia de seleno-bis (S-glutationil) arsenio [(GS)₂AsSe] en la bilis de conejos expuestos a As(III) y Se(IV) (Gailer *et al.*, 2000).

El ácido fólico, vitamina esencial para la metilación ya que interviene en la síntesis de SAM, también afecta la toxicocinética del As inorgánico. En poblaciones endémicas de Bangladesh, con bajos niveles plasmáticos de folato, la suplementación con esta vitamina durante 12 semanas incrementa la tasa de metabolismo del As inorgánico y por tanto aumenta la excreción urinaria del metaloide (Gamble *et al.*, 2006). Heck *et al.* (2007, 2009), en otro estudio

realizados en Bangladesh, muestran que nutrientes relacionados con los procesos de metilación también afectan el metabolismo del As inorgánico y por tanto su acumulación. El consumo dietario de Cys, metionina, vitamina B12, calcio y proteína supone un incremento del metabolismo y una mayor excreción.

Además de los efectos sobre el metabolismo también se ha evidenciado una interacción de algunos componentes de la dieta con el proceso de absorción intestinal del As inorgánico. Los compuestos presentes en el lumen pueden modificar la absorción de As a través del epitelio intestinal como consecuencia de distintos mecanismos: a) formación de compuestos con el As insolubles o de baja absorción; b) transformación de las formas arsenicales; c) competencia con el metaloide por los mismos mecanismos de transporte; d) modificación de la permeabilidad paracelular del epitelio.

Yu *et al.* (2016), empleando un modelo *in vitro* de digestión gastrointestinal dinámico, muestran que las sales de Fe(III) reducen la cantidad de As(III) que queda soluble tras la digestión de alimentos (15-37%). El efecto del hierro (Fe) podría deberse a la formación de sales insolubles, tal y como se ha puesto de manifiesto en muestras medioambientales. La fibra posiblemente tenga un efecto similar a las sales de Fe, al quelar y reducir la solubilidad de As durante su paso por el tracto intestinal. Kenyon *et al.* (1997) muestran un aumento de la absorción de As(V) (10%) en ratones alimentados con una dieta baja en fibra respecto a los que se alimentan con una dieta normal.

También, se ha evidenciado un efecto en la absorción del As inorgánico como consecuencia de fenómenos de competencia. González *et al.* (1995) muestran que el fosfato reduce la absorción intestinal de As(V). Estudios posteriores han puesto de manifiesto que los transportadores sodio dependientes de fosfato presentes en la membrana apical de los enterocitos pueden intervenir en la absorción intestinal de As(V) (Villa-Bellosta y Sorribas, 2010; Calatayud *et al.*, 2012c), confirmando

la posible competencia de ambos oxaniones por el mismo mecanismo de absorción.

Finalmente, hay que destacar el posible efecto de los probióticos sobre la toxicocinética del As. Singh y Sarma (2010) ponen de manifiesto que el *Lactobacillus acidophilus* es capaz de eliminar proporciones relevantes de As(III) en disolución acuosa a pH 7 (40-100%). Monachese *et al.* (2012) sugieren que esta capacidad puede estar relacionada con una adsorción a las proteínas de superficie de las cepas de *L. acidophilus*. Bisanz *et al.* (2014) llevan a cabo una intervención en una población africana para estudiar el efecto de los probióticos sobre los niveles plasmáticos de As. En este estudio se administra durante 24 días yogurt con 1×10^{10} UFC (unidades formadoras de colonias) de *L. rhamnosus* GR-1. Los autores muestran una reducción significativa de los niveles de As en la sangre de las personas tratadas con el probiótico, si bien no es relevante desde el punto de vista toxicológico.

Todos los antecedentes mostrados en esta sección evidencian que componentes de la dieta pueden reducir la llegada del As inorgánico a la circulación sistémica o facilitar su excreción, reduciendo de esta forma la acumulación en los órganos diana. Estos compuestos, habituales en la dieta, no presentan riesgos asociados a su consumo si se administran a las dosis dietéticas. La mayoría de estudios poblacionales se han realizado empleando compuestos que faciliten la excreción a través de un aumento del metabolismo; sin embargo, la reducción de la llegada al torrente sanguíneo, es decir la reducción de la biodisponibilidad, es la aproximación más segura ya que se evita que el tóxico pueda distribuirse y ejercer el efecto tóxico en los órganos diana.

8. MODELOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA BIODISPONIBILIDAD

Los estudios de biodisponibilidad pueden realizarse *in vivo* con el empleo de roedores de pequeño tamaño, cerdos, conejos o primates, o bien *in vitro*, en cuyo caso se pueden analizar las distintas etapas empleando modelos específicos para cada una de ellas.

8.1. Modelos *in vitro*

La mayoría de modelos *in vitro* contemplan una o dos etapas del proceso de llegada del compuesto a la circulación sistémica. Algunos estudios sólo evalúan la etapa de la digestión gastrointestinal, mientras que otros combinan esta etapa con la de absorción a través del epitelio intestinal.

8.1.1. Modelos *in vitro* de digestión gastrointestinal

La fracción de un elemento solubilizada desde la matriz durante el proceso de digestión (fracción soluble o bioaccesible) es indicativo de la máxima cantidad de elemento que podría ser absorbida por el epitelio intestinal (Wragg y Cave 2002). Así, la bioaccesibilidad (porcentaje solubilizado respecto al contenido existente en la matriz) se considera por sí sólo un parámetro adecuado para obtener estimaciones de la biodisponibilidad.

Para evaluar la bioaccesibilidad se utilizan métodos *in vitro* que emulan las condiciones de la digestión humana. Son modelos simplificados de un proceso complejo, pero sus ventajas en cuanto a simplicidad, rapidez, bajo coste y reproducibilidad han propiciado su creciente utilización. Existen métodos estáticos y dinámicos para la evaluación *in vitro* de la bioaccesibilidad. Los modelos estáticos emulan secuencialmente las condiciones de la digestión bucal, gástrica e intestinal: pH, temperatura, actividades enzimáticas (amilasas,

proteasas, lipasas) y sales biliares. Muchos de los métodos aplicados a alimentos presentan diferencias importantes en las condiciones de trabajo por lo que no siempre pueden compararse los resultados obtenidos por distintos grupos de investigación. Para subsanar este inconveniente, se ha consensuado recientemente un método de digestión *in vitro* para alimentos (INFOGEST) que estandariza las condiciones en cada una de las etapas (Minekus *et al.*, 2014). El método ha sido sometido a varios ejercicios interlaboratorio que han permitido introducir especificaciones adicionales tras identificar las etapas que generaban mayor variabilidad en los resultados, como la hidrólisis proteica durante la etapa gástrica derivada del uso de pepsinas con distintas actividades enzimáticas (Egger *et al.*, 2016).

Los modelos dinámicos *in vitro* reproducen de forma más precisa el tránsito gradual de los alimentos a través del tracto gastrointestinal. Mediante control informático es posible la simulación de los movimientos peristálticos, los tiempos de tránsito de cada etapa de la digestión, los cambios de pH y de concentraciones salinas que se producen durante el proceso digestivo. Son multicompartimentales y pueden reproducir las condiciones de estómago, duodeno, yeyuno, íleo y colon por separado (Minekus *et al.*, 1999). Los equipos más conocidos son los desarrollados y patentados por el centro tecnológico TNO (Holanda) (TIM-1, TIM-2 y SHIME). Los experimentos de validación han demostrado el valor predictivo de estos sistemas dinámicos para evaluar la biodisponibilidad de minerales y vitaminas (Blanquet *et al.*, 2004), superando a los modelos estáticos. Sin embargo, su uso está menos extendido en el estudio de contaminantes traza ya que la proporción muestra/fluido es baja y dificulta la cuantificación del analito.

Los primeros métodos estáticos *in vitro* para estudios de bioaccesibilidad de As se aplicaron a muestras de suelos (Ruby *et al.*, 1996). Hasta el año 2002 no se publicaron los primeros datos sobre bioaccesibilidad de As desde alimentos. La

mayoría de los estudios en alimentos utilizan métodos estáticos y emulan las etapas gástrica e intestinal. La digestión bucal es reproducida por pocos autores (Maulvault *et al.*, 2011; Leufroy *et al.*, 2012). Los métodos dinámicos y en concreto el SHIME, se ha aplicado únicamente a muestras de arroz (Alava *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2012).

Aplicando métodos *in vitro* estáticos se ha obtenido bioaccesibilidades de As del 32-106% en algas, 44-96% en pescados, 36-102% en arroz (Moreda-Piñeiro *et al.*, 2011; García-Sartal *et al.*, 2012; Signes-Pastor *et al.*, 2012; Koch *et al.*, 2013; Pizarro *et al.*, 2016; Castor *et al.*, 2016; Liao *et al.*, 2018). El cocinado de los alimentos produce cambios en la matriz que podrían afectar a la solubilización de especies arsenicales. Se ha puesto de manifiesto que el cocinado no modifica la bioaccesibilidad de los arsenozúcares de las algas (Laparra *et al.*, 2007); sin embargo disminuye un 17% la bioaccesibilidad de la AB de mariscos (Liao *et al.*, 2018). Si bien los datos son escasos, esta posible influencia del cocinado hace aconsejable el uso de alimentos preparados tal y como van a ser consumidos con vistas a generar datos de bioaccesibilidad más acordes a la realidad.

8.1.2. Método *in vitro* para la evaluación del transporte

Existen diferentes aproximaciones para valorar o predecir la magnitud del transporte intestinal (figura 4): evaluación de las propiedades fisicoquímicas de los compuestos (solubilidad, coeficientes de partición octanol/agua); determinación de la difusión a través de membranas artificiales (PAMPA); evaluación del paso de la sustancia a través de modelos biológicos de barrera intestinal (sacos invertidos, segmentos intestinales aislados perfundidos, modelos celulares). Estos últimos son modelos más predictivos ya que en su mayoría están constituidos por células del entorno intestinal o fragmentos tisulares del intestino, que pueden alcanzar una complejidad estructural elevada.

Dentro de los modelos biológicos son los cultivos de células intestinales posiblemente los más empleados. La mayoría de las células que se ensayan son tipos inmortalizados procedentes de adenocarcinomas de colon, ya que la obtención y mantenimiento de células primarias es difícil y en la mayoría de los casos no admiten la criopreservación. Para la evaluación de la biodisponibilidad, estos tipos celulares se suelen sembrar sobre membranas porosas insertadas en pocillos de placas multipocillo. Este tipo de siembra favorece la polarización de las monocapas celulares, permitiendo una mejor caracterización del transporte trans- y paracelular (apartado 10.3.1, metodología).

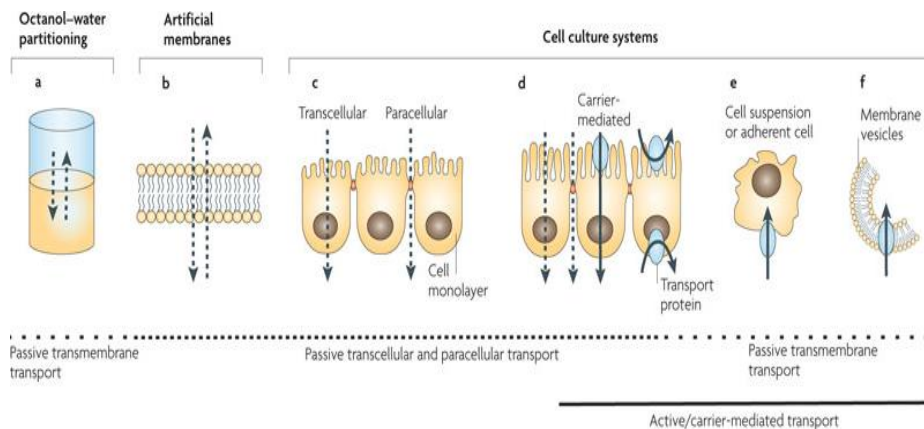


Figure 4. Técnicas *in vitro* para evaluar el transporte de un determinado compuesto (Sugano *et al.*, 2010).

Las células Caco-2 constituyen el modelo celular más utilizado en estudios de permeabilidad y transporte. Durante el cultivo se diferencian en células intestinales polarizadas con uniones estrechas entre las células adyacentes y el borde apical del cepillo con transportadores y enzimas específicos de enterocitos maduros. Aunque son de origen colónico, expresan la mayoría de las características morfológicas y funcionales de las células absortivas del intestino

delgado, incluida la presencia de enzimas de fase I y fase II (Le Ferrec *et al.*, 2001).

Debido a su elevado uso, existen estudios de correlación con los datos de absorción en humanos; incluso hay criterios que permiten clasificar las sustancias según su coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}) en células Caco-2 en sustancias de baja, moderada o alta absorción en humanos. Siguiendo el criterio de Yee (1997), Calatayud *et al.* (2010, 2011) clasifican las formas inorgánicas de As como especies de moderada absorción. Esta clasificación, sin embargo, no refleja los datos observados en animales de experimentación, que muestran una elevada biodisponibilidad de As(III) y As(V) (apartado 6.1, introducción). Los autores llegan a la conclusión que esta falta de correlación *in vitro-in vivo* es debida a la importante contribución del transporte paracelular en la absorción de estas especies arsenicales. Debido a su origen colónico, la monocapa generada por Caco-2 presenta una elevada resistencia eléctrica transepitelial (RET), que reduce de forma significativa el paso paracelular, siendo este menor al existente en el intestino delgado de humanos y roedores.

Se ha evidenciado que la incorporación de la línea mucosecretora HT29-MTX, una línea procedente también de un adenocarcinoma de colon, reduce la RET, creando monocapas más laxas que además presentan una capa externa de mucus (Hilgendorf *et al.*, 2000; Artursson *et al.*, 2001), un componente importante en el transporte de la mayoría de metales/metaloideos. Las proporciones celulares empleadas en los co-cultivos Caco-2/HT29-MTX suelen ser las más cercanas a las condiciones fisiológicas (90/10; 80/20). Calatayud *et al.* (2012d) muestran que el paso de las especies inorgánicas a través del co-cultivo es mayor que el observado en monocultivos Caco-2 y que su retención al mucus no es relevante, y concluyen que la clasificación teniendo en cuenta el P_{app} de co-cultivos muestra una mejor correlación con los datos de absorción en humanos y animales.

Otra desventaja de las células intestinales más empleadas en los estudios de transporte es su origen cancerígeno que genera incertidumbres a la hora de su empleo en la predicción de lo que ocurre en el intestino de un individuo sano. En la actualidad existen muy pocas líneas celulares procedentes de tejido intestinal no transformado. Las células NCM-460 constituyen una excepción (Moyer *et al.*, 1996). Su empleo en estudios de transporte y permeabilidad se ha incrementado en los últimos años (Nabokina *et al.*, 2014; Ghosal *et al.*, 2015; Subramanian *et al.*, 2015).

8.2. Modelo *in vivo* para el estudio de la biodisponibilidad

Los resultados *in vivo* proporcionan el efecto combinado de permeabilidad, distribución, metabolismo y excreción, y generan mayor número de parámetros farmacocinéticos. Su principal desventaja es que no permiten el estudio aislado de las variables que pueden influir en el proceso de absorción. Para los estudios de biodisponibilidad se emplean principalmente roedores de pequeño tamaño, en concreto son las ratas el modelo más empleado. Su manipulación es sencilla y por su tamaño proporcionan la cantidad de tejido necesaria para el ensayo de un número elevado de parámetros. Para la investigación toxicocinética del As inorgánico, sin embargo, el ratón es el mejor modelo de roedor. La toxicocinética de As inorgánico en otros roedores de pequeño tamaño difiere en mayor medida de la observada en humanos. Las ratas y hámsters metabolizan el As inorgánico hasta la forma trimetilada (TMAO) (Yamauchi y Yamamura 1985; Yoshida *et al.*, 2001), en lugar de tener como metabolito final el DMA, como ocurre con ratones y humanos. Además, el metabolismo en ratas es más eficaz que en ratones y humanos, los cuales presentan una menor tasa metabólica (Drobná *et al.*, 2010). Por otro lado, el tiempo de permanencia del As en sangre es mucho mayor en ratas debido a la elevada afinidad de la hemoglobina de este tipo de roedor por el

As inorgánico, motivo por el cual la excreción urinaria de As es menor (Vahter, 1994).

Existen algunos estudios, sin embargo, que indican que los roedores pueden no ser el modelo más idóneo para la evaluación de la toxicocinética de metales. Weis y LaVelle (1991) apuntan como uno de los principales problemas los hábitos alimentarios de los roedores, tales como la coprofagia, su forma continuada de comer que evita el vaciado estomacal y la presencia de una microflora estomacal que digiere celulosa y otro tipo de materiales no digeribles por el hombre. Los estudios de biodisponibilidad realizados en ratones, sin embargo, muestran en la mayoría de las ocasiones una buena correlación con los escasos datos existentes en humanos (apartado 6.1, introducción).

Los métodos empleados *in vivo* para la determinación de la biodisponibilidad se basan en la dosificación de un compuesto y la posterior determinación del mismo en el plasma o en fluidos biológicos o excretas a distintos intervalos de tiempo. La biodisponibilidad absoluta es el porcentaje real de la dosis administrada que alcanza la circulación sistémica. La estimación implica comparar la exposición después de una administración extravascular con la de una administración intravenosa, que se considera el 100% de biodisponibilidad. La biodisponibilidad relativa implica la comparación de dos formas de administración distintas de un mismo compuesto sin referencia a una administración intravenosa.

Se dispone de información sobre la biodisponibilidad oral absoluta de especies arsenicales administradas en disolución acuosa a humanos y animales de laboratorio (apartado 6.1, introducción). Sin embargo, la biodisponibilidad de As y/o sus especies químicas desde alimentos ha sido escasamente estudiada. Los resultados obtenidos en animales muestran biodisponibilidades absolutas cercanas al 100% para As(III) y As(V). En alimentos se evidencia que la

biodisponibilidad de las formas inorgánicas es altamente dependiente de la matriz; así para muestras de arroz es elevada (>85%) mientras que en los vegetales es variable, observándose diferencias para ambos estados de oxidación (rábanos: As(III) 7%, As(V) 85%; alubias As(III) 90%, As(V) 10%) (Juhasz *et al.*, 2006, 2008; Islam *et al.*, 2017). Los datos obtenidos en estos estudios muestran que la absorción intestinal y por tanto la biodisponibilidad puede reducirse en presencia de la matriz alimentaria, tal y como se ha indicado previamente (apartado 7.3, introducción),

Objetivos

Las posibles vías para reducir la exposición a As inorgánico no son de fácil ejecución. No es una tarea sencilla evitar la contaminación del alimento o eliminar el contaminante previamente a su consumo, siendo necesaria la búsqueda de vías alternativas para disminuir la exposición a la forma inorgánica de As. Entre las posibles vías de actuación está la de reducir la llegada del tóxico a la circulación sanguínea tras su ingesta oral (biodisponibilidad). Para ello se puede actuar a distintos niveles; se puede disminuir la cantidad de tóxico que tras la digestión está disponible para la absorción (bioaccesibilidad) o reducir la tasa de transporte a través del epitelio intestinal (absorción intestinal). El empleo de compuestos o microorganismos de origen o uso alimentario que formen parte de nuestra dieta habitual, es la aproximación más segura para conseguir este propósito.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, el objetivo general del presente trabajo es la **BÚSQUEDA DE ESTRATEGIAS DIETÉTICAS CAPACES DE REDUCIR LA BIODISPONIBILIDAD ORAL DEL ARSÉNICO INORGÁNICO.**

Para llevar a cabo este objetivo general se han planteado los siguientes objetivos específicos:

A) Evaluación del riesgo asociado a la ingesta en zonas con arsenicismo crónica endémico mediante la caracterización del As inorgánico presente en los alimentos listos para el consumo y y en la fracción bioaccesible.

B) Identificación de compuestos alimentarios o microorganismos de uso alimentario que puedan reducir la bioaccesibilidad del As inorgánico presente en agua y alimentos.

C) Identificación de compuestos alimentarios o microorganismos de uso alimentario que puedan reducir el transporte intestinal de las formas inorgánicas de As presente en agua y alimentos.

D) Evaluación *in vivo* de la capacidad de los componentes de la dieta seleccionados en los apartados anteriores para reducir la biodisponibilidad oral del metaloide.

Metodología

1. ESPECIES ARSENICALES

El patrón de As(V) (1000 mg/L, As₂O₅) fue adquirido a Merck. El patrón de As(III) (1000 mg/L) se preparó por disolución de 1.320 g de As₂O₃ (Riedel de Haën) en 25 mL de 20% (m/v) KOH (Panreac), neutralización con 20% (v/v) H₂SO₄ (Merck) y dilución a 1 L con 1% (v/v) H₂SO₄.

Los patrones de As(V) + L-cisteína [As(V)-Cys] y As(III) + L-cisteína [As(III)-Cys] se prepararon disolviendo 1.1 g de L-cisteína (Merck) en 100 mL de las disoluciones patrón de As(V) y As(III) (1000 mg/L) anteriormente descritas. La disolución patrón de As(V)-glicerol se preparó disolviendo 1 mL de As(V) 1000 mg/L en un exceso de glicerol (8 mL, Sigma).

2. MUESTRAS DE ALIMENTOS

Para la evaluación de la ingesta de As inorgánico en zonas endémicas (capítulo 1), se emplearon muestras de agua y alimentos procedentes de un estudio realizado en la provincia del Chaco y de Santiago del Estero (norte de Argentina) (Rocha *et al.*, 2017). Los alimentos, que correspondían a la dieta de un día completo, se recogieron durante 5 días. Tras su recogida, se liofilizaron en la Universidad Nacional de Jujuy (Argentina) y posteriormente fueron homogenizados. Las muestras de agua fueron almacenadas en botes de plástico en medio ácido. Las muestras se transportaron al laboratorio de Elementos Traza del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC), donde se mantuvieron a 4 °C hasta su análisis.

Para evaluar el efecto del cocinado y la digestión gastrointestinal en la especiación de As inorgánico empleando espectroscopía de absorción de rayos X (XAS, capítulo 1), se emplearon muestras de ajos, espárragos y arroz blanco. Las muestras se cocinaron en agua adicionada con As(V) (100 mg/L) en una relación

muestra/agua de 1/5 para arroz y de 1/3 para espárragos y ajo. Tras el cocinado, se decantó el exceso de líquido (sólo en el caso del espárrago y el ajo). Las muestras crudas y cocinadas se homogenizaron y una porción se destinó al análisis del As total (apartado 4, metodología). Otra porción de la muestra cocinada se liofilizó para su posterior análisis por XAS (apartado 7, metodología).

Para el resto de ensayos de la tesis se emplearon muestras del alga *Hizikia fusiforme* deshidratada, arroz blanco y arroz integral. Las algas se cocinaron en agua desionizada durante 20 minutos (proporción muestra/agua: 1/4). Los arroces se cocinaron en una disolución patrón de 1 mg/L de As(V) hasta sequedad (proporción muestra/agua: 1/4).

3. DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL SIMULADA

Para la digestión de alimentos y patrones acuosos de las formas inorgánicas se empleó un método estático que simula las etapas gástrica e intestinal del proceso de digestión humana (figura 5; Laparra *et al.*, 2003). En la aplicación del método se utilizaron los siguientes equipos: pH-metro (Consort modelo C830), agitador orbital (Stuart modelo SSL1) y centrífuga (RC-5B Superspeed Refrigerated Centrifuge, Sorvall, Du Pont).

Etapa gástrica. Se pesó en un erlenmeyer el alimento (2-10 g), se adicionaron 85 g de agua desionizada y la mezcla se homogeneizó mediante agitación mecánica. Se ajustó el pH a 2 con HCl (Merck) y se completó el peso hasta 100 g con agua desionizada. Para la digestión con patrones de As(III) y As(V), éstos se prepararon a una concentración final de 1 mg/L en agua o disolución salina y el conjunto se ajustó a pH 2. Para llevar a cabo la etapa gástrica se utilizó pepsina porcina (Sigma, actividad enzimática 944 U/mg de proteína). Se preparó una disolución de pepsina al 10% (m/v) en HCl 0.1 mol/L. Se adicionó al erlenmeyer

el volumen necesario para proporcionar 20 mg de pepsina/100 g de disolución. Posteriormente el erlenmeyer se selló con parafilm y se incubó en agitación (120 rpm) a 37 °C durante 2 h.

Etapa intestinal. Se ajustó el pH del digerido gástrico a 6.5 utilizando NH₃ (Scharlau) y se adicionó pancreatina porcina (Sigma, actividad equivalente a 4 × especificaciones de Farmacopea de EEUU/mg de pancreatina) y extracto biliar porcino (Sigma, glicina y taurina conjugadas con ácido desoxicólico y otras sales biliares). Se preparó una disolución de pancreatina porcina al 0.4% (m/v) y de extracto biliar porcino al 2.5% (m/v) en NH₄CO₃ 0.1 mol/L (Merck). Se adicionó al digerido el volumen necesario para proporcionar 5 mg de pancreatina/100 g de disolución y 30 mg de extracto biliar/100 g de disolución. La mezcla se tapó con parafilm y se incubó nuevamente en agitación (120 rpm) durante 2 h a 37 °C. Una vez finalizada la etapa intestinal, el digerido se centrifugó (10000 rpm/30 min/4 °C) para separar la fracción soluble (bioaccesible) y el residuo.

En la fracción soluble se cuantificó el contenido de As utilizando la metodología que se describe en la sección 4. Para la evaluación de la bioaccesibilidad de As se utilizó la ecuación 1.

$$\text{Bioaccesibilidad} = \frac{\text{As en la fracción bioaccesible}}{\text{As en el alimento o patrón acuoso}} \times 100 \text{ (Ecuación 1)}$$

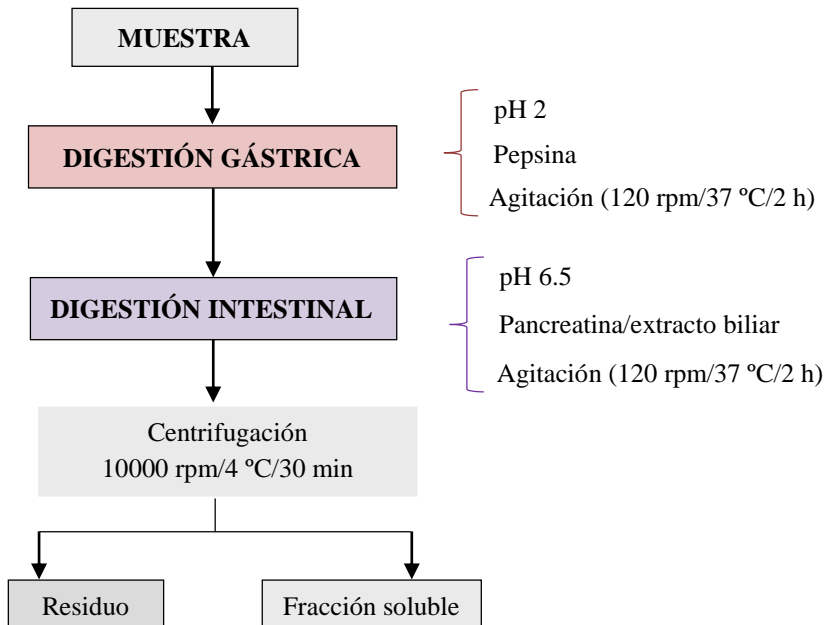


Figura 5. Esquema del proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*. Modelo empleado para la determinación de la bioaccesibilidad de As en patrones acuosos y alimentos.

4. DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO TOTAL

Para el análisis de As total se procedió a la mineralización de las muestras por vía seca y posterior cuantificación por espectrofotometría de absorción atómica con generación de hidruros mediante inyección en flujo (FI-HG-AAS) (Muñoz *et al.*, 2002). Todas las muestras de la presente tesis (alimentos, fracciones bioaccesibles, células intestinales, bacterias, levaduras, medios de incubación y cultivo, tejidos animales y heces) fueron mineralizadas en horno mufla (Heraeus, modelo K 1253). La cantidad mineralizada de cada muestra varió en función de la naturaleza de la matriz y de la concentración de As esperada.

Para la mineralización se adicionó a la muestra 1 mL de agente de

mineralización [$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 20% m/v (Panreac) + MgO 2% m/v (Merck)] y 5 mL de HNO_3 (7 mol/L) (Merck). La mezcla se evaporó a sequedad en un baño de arena termostatado (Raypa, modelo PL 5125, Selecta) y posteriormente se mineralizó en el horno mufla, aplicando un ciclo temperatura-tiempo en el que tras una subida paulatina de la temperatura (50 °C/h), las muestras se mantuvieron 12 h a 450 °C. Si tras el ciclo de mufla se obtuvieron cenizas blancas se procedió a su disolución. En caso contrario, las cenizas se trataron con 5 mL de HNO_3 (7 mol/L), se secaron en el baño de arena y fueron sometidas nuevamente al programa temperatura-tiempo del horno mufla indicado anteriormente.

Las cenizas blancas obtenidas tras la mineralización se disolvieron en HCl 6 mol/L y en una disolución reductora [5% m/v KI (Panreac) y 5% m/v ácido ascórbico (Merck)]. La proporción de reductor adicionado con respecto al volumen final de disolución fue de 1:5. Transcurridos 30 min, la disolución se filtró a través de papel Whatman No. 1 y se llevó a volumen final (10 mL) con HCl 6 mol/L. El contenido total de As se determinó empleando un espectrofotómetro Perkin Elmer (PE) modelo 3300, equipado con un sistema de inyección en flujo (PE modelo FIAS 400) y un automuestreador (PE modelo As-90). En la tabla 3 se describen las condiciones instrumentales de la metodología.

El control de calidad de la cuantificación de As mediante FI-HG-AAS se realizó a través del análisis de la muestra de agua de referencia certificada con un contenido en As de 30.2 ± 0.293 $\mu\text{g/L}$ (RTC QCI-049-1, LGC Standards).

Tabla 3. Condiciones instrumentales utilizadas en la cuantificación de As mediante FI-HG-AAS.

Generación de hidruros	
Muestra	0.5 mL
Disolución reductora	NaBH ₄ 0.2% (m/v) en NaOH 0.02 mol/L. Flujo 5 mL/min
Disolución ácida	HCl 1.2 mol/L. Flujo 10 mL/min
Gas transportador	Argón. Flujo 100 mL/min
Espectroscopía de absorción atómica	
T ^a de atomización	900 °C
Longitud de onda	193.7 nm
Rendija	0.7 nm
Lámpara de As	Lámpara de descarga sin electrodos; 400 mA

5. DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO INORGÁNICO

Para la determinación de As inorgánico en muestras de alimentos (capítulo 1) se aplicó un método basado en digestión ácida, extracción del As inorgánico con cloroformo, retroextracción en medio ácido y cuantificación mediante FI-HG-AAS (Muñoz *et al.*, 1999).

Digestión ácida. Se pesó la muestra (1 g) en un tubo de plástico de 50 mL. Posteriormente se adicionaron 4.1 mL de agua desionizada y la mezcla se agitó mecánicamente durante 10 min hasta la completa humectación de la muestra. Finalmente se adicionaron 18.4 mL de HCl 12 mol/L y tras agitar, se dejó en reposo 12-15 h.

Extracción con cloroformo. Se adicionaron a la digestión ácida, 1 mL de una disolución de sulfato de hidracina (1.5% m/v, Merck) y 2 mL de HBr concentrado (48%, Fluka), agitándose mecánicamente la mezcla durante 1 min. A

continuación se adicionaron 10 mL de cloroformo (Merck), se agitó la mezcla mecánicamente durante 5 min y se centrifugó (2000 rpm/5 min) para separar la fase ácida de la fase clorofórmica. La fase clorofórmica se recuperó por aspiración y se depositó en un tubo de plástico de 50 mL. El proceso de extracción con cloroformo se repitió dos veces más. Al final de esta etapa se recuperó un volumen de fase clorofórmica de aproximadamente 30 mL. El conjunto de las fases clorofórmicas se filtró utilizando filtros de politetrafluoroetileno con un tamaño de poro de 0.45 μm y diámetro de 25 mm (Whatman GD/X).

Extracción ácida. El As inorgánico presente en la fase clorofórmica se extrajo empleando HCl 1.2 mol/L. En una primera etapa se adicionaron 10 mL de HCl 1.2 mol/L y la mezcla se agitó durante 5 min. Las fases se separaron por centrifugación (2000 rpm/5 min) y la fase ácida se recuperó por aspiración y se depositó en un vaso de precipitado de pyrex. El proceso de extracción se repitió una vez más. Al final de esta etapa, se recuperó un volumen de fase ácida de aproximadamente 20 mL y se procedió a su mineralización por vía seca.

Mineralización y cuantificación. Se adicionaron 2.5 mL de agente de mineralización [$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 20% m/v + MgO 2% m/v] y 10 mL de HNO_3 14 mol/L a la fase ácida. La mezcla se evaporó a sequedad en un baño de arena. Posteriormente, se aplicó el proceso de mineralización en horno mufla, disolución de las cenizas blancas y cuantificación mediante FI-HG-AAS descrito para la determinación de As total (apartado 4).

El control de calidad de la cuantificación de As inorgánico se realizó comparando los valores hallados en la muestra de referencia SRM1568a, con el intervalo de valores de As inorgánico reportados por otros autores (0.08-0.110 $\mu\text{g/g}$ peso seco, ps) (Torres-Escribano *at al.*, 2008).

6. DETERMINACIÓN DE ELEMENTOS MAYORITARIOS

Los contenidos de Ca, Mg, K, Fe y P en los alimentos, las fracciones bioaccesibles y los tejidos animales se determinaron mediante digestión ácida por microondas (modelo MARS, CEM) y posterior detección por espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES; modelo 4300D, Perkin Elmer). Las muestras se pesaron en reactores de teflón y se trataron con 4 mL de HNO₃ (14 mol/L) y 1 ml de H₂O₂ (30% v/v, Prolabo). Los reactores se irradiaron (180 °C, 15 min) y el digerido obtenido se llevó a volumen (10 mL) con agua desionizada. Las condiciones operativas del ICP-OES fueron las siguientes: flujo de Ar en plasma, 15 mL/min; flujo de Ar auxiliar, 0.2 mL/min; nebulizador, flujo de Ar, 0.8 mL/min; Potencia de RF, 1300 W; captación de muestra, 2 mL/min; longitudes de onda (nm): Ca 317.933, Mg 285.213, K 766.490, Fe 238.204, P 213.617.

7. FORMA QUÍMICA DEL ARSÉNICO INORGÁNICO EN MUESTRAS DE ALIMENTOS Y SUS FRACCIONES BIOACCESIBLES

Se analizaron las formas inorgánicas del As en muestras cocinadas de arroz, ajo y espárragos (apartado 1, metodología) y en sus fracciones bioaccesibles mediante espectroscopía de absorción de rayos X (XAS). Los espectros de absorción K α del As de las muestras liofilizadas y cocinadas y sus correspondientes fracciones bioaccesibles, así como los patrones de As sólidos y líquidos fueron medidos en modo fluorescencia, a temperatura ambiente, en la línea BM25A (SpLine) del 'European Synchrotron Radiation Facility' (ESRF) en Grenoble (Francia) [6 GeV, 100 mA, monocromador de Si(111)], empleando un detector de estado sólido Si(Li) de 13 elementos. La energía del haz fue calibrada a 11875 eV del máximo de absorción-K del compuesto KH₂AsO₄ (Sigma). Los espectros de las muestras se adquirieron en modo fluorescencia dentro del rango

XANES, comenzando en 11650 eV. Los espectros de los patrones sólidos se midieron en modo transmisión.

El espectro final de cada muestra se obtuvo promediando espectros replicados (hasta seis espectros dependiendo de la calidad de los datos) y se analizó mediante combinación lineal de espectros (LCF) con el programa Athena (software Demeter [112]). La E₀ se fijó a 11875 eV. El ruido de fondo se extrajo empleando la rutina “Autobk” del Athena para el ajuste de la región EXAFS.

La caracterización de las muestras se llevó a cabo por comparación de los espectros promedio de las muestras por la parte XANES con la de los estándares de As disponibles. Para ello, se utilizó la opción “linear combination fitting (LCF)” de Athena utilizando la combinación de dos o tres espectros de referencia en base al mejor ajuste estadístico, utilizando como parámetro variable la energía y limitando la contribución de las muestras de referencia a valores positivos. En la combinación lineal de estándares (LCF) no se forzó a que la suma total de las contribuciones de las muestras de referencia consideradas finalmente fuera igual al 100 %, aunque luego los distintos porcentajes obtenidos fueron normalizados a ese porcentaje.

8. EFECTO DE LOS COMPONENTES DE LA DIETA SOBRE LA BIOACCESIBILIDAD

Se llevó a cabo una búsqueda de componentes de origen alimentario con capacidad para reducir la cantidad de As soluble tras la digestión y por tanto disponible para la absorción. En todos los casos la evaluación se realizó en patrones acuosos de As(III) y As(V) y muestras de alimentos (arroz y algas). Se seleccionaron 33 componentes alimentarios que se utilizaron a las concentraciones habituales en alimentos (tabla 4).

Tras 30 min de contacto del patrón de As(III) o As(V) (ambos a 1 mg/L preparados en PBS) con el componente alimentario, se aplicó una digestión gastrointestinal siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3. Aquellos compuestos que redujeron al menos un 30% la bioaccesibilidad en patrones se ensayaron en alimentos cocinados (algas, arroz blanco e integral). Las muestras de alimentos (10 g) se sometieron a una digestión gastrointestinal en presencia de los compuestos (tabla 4).

En las fracciones bioaccesibles de alimentos en las que se observó una elevada reducción del As, se determinó la concentración de Ca, Fe, Mg, K y P siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.

Tabla 4. Componentes alimentarios empleados en los ensayos de bioaccesibilidad. Concentraciones expresadas en g/100 mL; n.e: no ensayados.

Componente dietario	Concentración (patrones)	Concentración (alimentos)	Marca
(±)- α -Ácido lipoico	0.024; 0.08	n.e	Sigma
Ácido lipoico reducido	0.012; 0.04	n.e	Sigma
Ácido cítrico	0.06	n.e	Panreac
Ácido fítico dipotásico	0.1;0.50	n.e	Sigma-Aldrich
Ácido málico	0.8	n.e	Sigma-Aldrich
Ácido oxálico	0.075; 0.150	n.e	Merck
Ácido tánico	0.5;3.32	n.e	Merck
Alginato sódico	0.2	n.e	EPSA
Carbonato de calcio	0.25; 0.50	n.e	Sigma-Aldrich
CaCl ₂ /Fitato dipotásico	0.55/0.11 1.4/0.28	0.55/0.11 1.4/0.28	Panreac/Sigma
Cloruro de magnesio	0.5	n.e	Sigma-Aldrich
Gelatina (piel porcina)	0.5; 1	n.e	Sigma

Tabla 4. Continuación

Componente dietario	Concentración (patrones)	Concentración (alimentos)	Marca
Goma arábica	0.5; 1	n.e	Fluka
Goma guar	0.5; 1	n.e	Fluka
Goma xantana, (<i>X. campestris</i>)	0.5; 1	n.e	Sigma
Hidroxipropilcelulosa (HPC)	0.2; 0.4	0.2; 0.4	Aldrich
Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC)	0.2; 0.4	0.2; 0.4	Dow Chemical company
L-Cisteína (L-Cys)	0.01; 0.50	n.e	Merck
Lignina	0.4; 1.4	n.e	Aldrich
N-acetilcisteína (NAC)	0.6; 1.2	0.6; 1.2	Sigma
Metilcelulosa (MC)	0.2	n.e	Dow Chemical company
Óxido de magnesio	0.005; 0.011	0.005; 0.011	Sigma-Aldrich
Óxido de titanio	0.005; 0.02	0.005; 0.02	Sigma-Aldrich
Pectina de manzana	1.0	n.e	Sigma
Quitosano	0.5	n.e	Aldrich
Saponina	1.5; 2.0	1.5; 2.0	Santa Cruz Biotechnology
Selenometionina (SeMet)	0.1×10^{-3}	n.e	Sigma
Sulfato cúprico	0.002	n.e	Sigma-Aldrich
Sulfato de aluminio	0.005; 0.05	0.005; 0.05	Fluka
Sulfato ferroso [Fe(II)]	0.015; 0.100	0.030; 0.100	Sigma-Aldrich
Sulfato férrico [Fe(III)]	0.015; 0.100	0.030; 0.100	Scharlau
Xilano (copos de avena)	0.4; 1.4	n.e	Sigma
λ carragenato	0.215; 0.45	ne	Cargill

9. EFECTO DE BACTERIAS LÁCTICAS Y *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* SOBRE LA BIOACCESIBILIDAD

Las cepas de bacterias lácticas y de *S. cerevisiae* empleadas en la presente tesis se muestran en la tabla 5 y 6 respectivamente.

Tabla 5. Cepas de bacterias lácticas ensayadas.

Designación	Nombre	Origen
BL7	<i>Lactobacillus brevis</i> DSMZ ^a 1268	Cerveza
BL10	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC ^b 9224	Leche agria
BL17	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC ^b 4356	Intestino humano
BL23	<i>Lactobacillus casei</i> ^c	Cepa de laboratorio
BL36	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC ^b 14869	Intestino humano
BL73	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CNRZ ^d 55	Heces de rata
BL75	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CNRZ ^d 217	Flora digestiva rata
BL166	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 ^e	Intestino humano
BL221	<i>Lactobacillus crispatus</i> M247 ^e	Heces recién nacido
BL278	<i>Lactobacillus crispatus</i> DSMZ ^a 20584	Lágrimas
BL279	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CECT ^f 4529	Intestino de pollo
BL280	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CECT ^f 4179	Heces de rata
LGG	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC ^b 53103	Intestino humano
Lpp ⁺	<i>Lactobacillus plantarum</i> ^c	Cepa de laboratorio

^a Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, ^b American Type Strain Culture Collection, ^c Colección del laboratorio de bacterias lácticas y probióticos (IATA-CSIC), ^d Centre National de Reserches Zootechniques (CNRZ), ^e Colecciones de otros laboratorios, ^f Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

Tabla 6. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* ensayadas. Cepas procedentes del laboratorio de biología de sistemas en levaduras de interés biotecnológico (IATA-CSIC).

Cepa	Nombre	Características
2	BY4743	Cepa de laboratorio diploide
3	T73	Cepa vínica
4	VRB	Cepa productora de manoproteínas
7	Ultralevura	Cepa probiótica (Upsamédica S.L.)
8	YPS128	Cepa silvestre de origen norteamericano
9	UWOPS03-461.4	Cepa silvestre de origen malayo
10	Kyokai 6	Cepa de sake

Las bacterias se crecieron en medio MRS (Man, Rogosa y Sharpe) (BD Difco) a 30 °C en condiciones estáticas. Tras centrifugación (4000 rpm, 10 min, 4 °C), se resuspendieron en el medio adecuado para el análisis. Las levaduras se mantuvieron en medio YPD (Yeast Peptone Dextrosa) constituido por 0.5% (m/v) de extracto de levadura, 1% (m/v) de peptona bacteriológica y 2% (m/v) de glucosa (Sigma). Para los ensayos de bioaccesibilidad tanto las bacterias lácticas como las levaduras se lavaron con PBS y tras centrifugación (4000 rpm, 5 min) se resuspendieron en el medio de ensayo.

9.1. Evaluación de la captación de arsénico por las bacterias lácticas y *Saccharomyces cerevisiae*

Se llevó a cabo una incubación de las cepas de bacterias lácticas (densidad óptica, DO 10) y las cepas de *S. cerevisiae* (DO 4) con As(III) y As(V) (ambos a 1 mg/L) a 37 °C durante 4 h en medio PBS. Transcurrido el tiempo de incubación, los tubos se centrifugaron a 4000 rpm durante 2 min. Los contenidos de As en el

sobrenadante y en el pellet celular se analizaron según el protocolo descrito en el apartado 4. Los resultados obtenidos en este estudio mostraron una baja captación de As por los microorganismos. Para determinar las posibles causas de este fenómeno se evaluaron una serie de factores que podían afectar la interacción As/microorganismo. En estos ensayos se empleó la cepa Lpp⁺ de bacteria láctica y la cepa 10 de *S. cerevisiae*.

A) Influencia del medio de incubación sobre la captación de As. La incubación se realizó con patrones de As(III) y As(V) (1mg/L) sustituyendo el medio PBS por NaCl 0.9% (m/v) con o sin la adición de glucosa 20 mM (Sigma) o de concentraciones crecientes de fosfato sódico (0.01, 0.1, 1 y 10 mM) (Merck).

B) Influencia de la concentración de As(III) y As(V) en la captación. La incubación se llevó a cabo empleando dos concentraciones de las especies arsenicales (0.1 y 1 mg/L).

C) Influencia de la viabilidad de los microorganismos. Las bacterias o levaduras fueron tratadas térmicamente a 80 °C durante 30 min. Posteriormente se adicionaron a patrones de As(III) y As(V) (1 mg/L) preparados en PBS y se procedió a la incubación.

9.2. Evaluación del efecto de las bacterias lácticas y *S. cerevisiae* sobre la bioaccesibilidad del arsénico presente en patrones acuosos

Se llevó a cabo una digestión gastrointestinal de disoluciones acuosas de As inorgánico en presencia de bacterias lácticas y levaduras siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3. En un erlenmeyer se añadió el patrón de As(III) y As(V) preparado en agua (concentración 1 mg/L, volumen 10 mL) y las bacterias (DO 10) o *S. cerevisiae* (DO 4). El conjunto se sometió a la digestión gastrointestinal simulada ajustando las condiciones de ensayo al volumen final utilizado.

10. EFECTO DE LOS COMPONENTES DE LA DIETA, BACTERIAS LÁCTICAS Y LEVADURAS SOBRE LA PERMEABILIDAD INTESTINAL

10.1. Mantenimiento de los cultivos celulares

Se emplearon dos líneas celulares humanas del epitelio colónico: NCM-460 (células no transformadas) y HT29-MTX (células mucosecretoras procedentes de un adenocarcinoma). La línea NCM-460 fue adquirida a Incell Corporation y mantenida en frascos de 75 cm² a los que se añadió 10 mL de medio modificado de Dulbecco (DMEM) con alto contenido en glucosa (4.5 g/L) y glutamina (0.87 g/L) a pH 7.2. El medio fue suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB), 1 mM de piruvato sódico, 10 mM de N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES), 100 U/mL de penicilina, 0.1 mg/mL de estreptomycin y 0.0025 mg/L de anfotericina B (NCM-DMEMc). Los ensayos se realizaron con células entre los pases 21 y 29.

La línea celular HT29-MTX fue proporcionada por la Dra. Thécia Lesuffleur (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM UMR, Francia). El mantenimiento celular fue realizado en DMEM suplementado con 10% SFB, piruvato sódico 1 mM, HEPES 10 mM, 100 U/mL de penicilina, 0.1 mg/mL de estreptomycin y 0.0025 mg/L de anfotericina B (HT-DMEMc). Los ensayos se realizaron con células entre los pases 17 y 25.

Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 95% de humedad relativa y un flujo de CO₂ de 5%, cambiando el medio cada 3 días. Cuando la monocapa celular alcanzó 80-90% de confluencia, se realizó el pase mediante la adición de una disolución de tripsina (0.5 mg/mL) y ácido etilendiaminotetracético (EDTA 0.2 mg/mL). Las células se sembraron a una densidad de 1.3×10^4 células/cm² en frascos de 75 cm². Todos los reactivos utilizados en el mantenimiento de las líneas celulares se obtuvieron de Hyclone.

10.2. Ensayos de viabilidad celular

Previo a los estudios de transporte, se evaluó el efecto del As sobre la viabilidad de los distintos tipos celulares, con el fin de trabajar en condiciones subletales. La evaluación de la viabilidad se realizó determinando la capacidad de las células viables de reducir resazurina sódica (sal sódica de 10-óxido de 7-hidroxi-3-hidrofenoquin-3-ona, Sigma) a resorufina, medibles ambas por métodos colorimétricos.

Los ensayos se llevaron a cabo en el rango de concentraciones 0.1-2 mg/L durante 4 h. Las células se sembraron a una densidad de 2.5×10^4 células/cm² en placas de 24 pocillos en el medio DMEM suplementado correspondiente a cada tipo celular, cambiando el medio cada 2-3 días. Tras 7-8 días de siembra, las células se expusieron a los distintos tratamientos en medio esencial mínimo con sales de Earle (MEM) suplementado con 100 U/mL de penicilina, 0.1 mg/mL de estreptomina, 0.0025 mg/mL de anfotericina B y 10 mM de HEPES.

Tras la exposición, se retiró el medio y el cultivo se lavó con PBS. Posteriormente, se añadieron 500 µL de resazurina sódica (10 µg/mL en MEM suplementado) y se incubó durante 2 h a 37 °C, 95% humedad relativa y flujo de CO₂ del 5%. Tras la incubación se transfirieron 100 µL a una placa de 96 pocillos y la reducción de la resazurina se determinó por espectrofotometría con lecturas a 570 y 600 nm (PowerWave HT Microplate Scanning Spectrophotometer, Bio-Tek instruments).

10.3. Evaluación de la permeabilidad aparente

10.3.1. Cultivo en sistemas bicamerales

Los ensayos se realizaron en placas de 12 pocillos con insertos de membrana de poliéster (diámetro 12 mm, tamaño de poro 0.4 µm, Transwell®, Corning). En

este sistema, las células se siembran sobre la membrana porosa del inserto que separa el pocillo en dos compartimentos: el apical (superior) que correspondería al lumen intestinal y el basolateral (inferior), que representaría la cavidad serosa donde llegan los compuestos tras la absorción intestinal (figura 6).

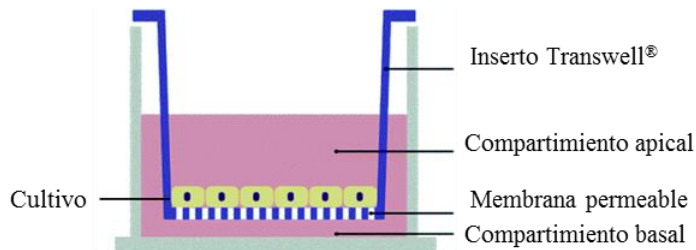


Figura 6. Esquema del sistema bicameral empleado en los estudios de permeabilidad.

Las células a una densidad de 1.8×10^5 células/cm² en medio HT-DMEMc se añadió al lado apical para producir co-cultivos NCM-460/HT29-MTX (80/20). En el lado basolateral se adicionó 1.5 mL de medio HT-DMEMc. Las células se mantuvieron en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de O₂ a 37 °C, con cambio de medio cada 2-3 días hasta el momento de ensayo (10-11 días post-siembra).

10.3.2. Tratamiento de las fracciones bioaccesibles de los alimentos para los ensayos de permeabilidad

La fracción soluble procedente de la digestión gastrointestinal no puede adicionarse directamente al cultivo celular. Previamente es necesario inactivar los enzimas proteolíticos utilizados en el proceso y ajustar la osmolaridad de las fracciones solubles a valores fisiológicos que permitan conservar la integridad de la monocapa celular durante el ensayo. Para inactivar las proteasas, la fracción

bioaccesible se sometió a un tratamiento térmico a 90 °C durante 4 min. A la fracción soluble inactivada, se le adicionó glucosa (5 mM concentración final, Sigma) para favorecer el mantenimiento de la viabilidad y actividad celular durante los ensayos. Finalmente, la osmolaridad se ajustó a valores entre 270-310 mOsmol/kg, mediante la adición de NaCl 5 M (Panreac), empleando un osmómetro crioscópico Automatic Micro-Osmometer Löser (Löser).

10.3.3. Ensayos de permeabilidad celular

Los ensayos se llevaron a cabo a 37 °C en dirección apical-basolateral (sentido absortivo), empleando como medio de ensayo la solución salina balanceada de Hanks con NaCO₃ (HBSS, Hyclone) suplementada con 10 mM HEPES (pH 7.2). Tras retirar el medio de mantenimiento de los compartimentos apical y basolateral, se adicionó al compartimento apical 0.5 mL de los patrones de As(III) y As(V) (0.75 mg/L) preparados en HBSS con 10 mM HEPES o la fracción bioaccesible previamente tratada como se especifica en el apartado 10.3.2, con o sin la adición de los componentes de la dieta y suplementos dietéticos (n=32; tabla 7 y 8 respectivamente). En el compartimento basolateral se adicionaron 2 mL de medio HBSS con 10 mM HEPES.

Tabla 7. Componentes de la dieta empleados para los estudios de permeabilidad celular. Concentraciones expresadas en mg/L. n.e: no ensayado.

Compuestos dietarios	Concentración (patrones)	Concentración (alimentos)	Marca
Albúmina	50 mg/L	n.e	Sigma-Aldrich
Cloruro de calcio	50 mg/L	n.e	Fluka
Cloruro de colina	5 mg/L	n.e	Sigma-Aldrich
Cloruro de magnesio	20 mg/L	100 mg/L	Sigma-Aldrich
Curcumina	10 mg/L	40 mg/L	Sigma-Aldrich
DHLA	25 mg/L	n.e	Sigma-Aldrich
Dihidrato de quercetina	10 mg/L	40 mg/L	Sigma-Aldrich
Epicatequina	10 mg/L	n.e	Sigma-Aldrich
Epigallocatequina	10 mg/L	100 mg/L	Sigma-Aldrich
Fosfato de amonio	25 mM	100 mM	Merck
Hidrato de catequina	10 mg/L	n.e	Fluka
Homocisteína (Hcys)	5 mg/L	n.e	Sigma-Aldrich
L-Cisteína (Cys)	20 mg/L	100 mg/L	Merck
Lecitina	20 mg/L	n.e	Sigma-Aldrich
L-glutati3n reducido (GSH)	5 mM	n.e	Sigma-Aldrich
Metionina	20 mg/L	n.e	Panreac
Quitosano	5 mg/L	n.e	Sigma-Aldrich
Se (IV)	1 mg/L	n.e	Merck
Seleno-DL-metionina (SeMet)	2 mg/L	n.e	Sigma-Aldrich
Sulfato de cobre	0.01 mM	n.e	Sigma-Aldrich
Sulfato de hierro(II) [Fe(II)]	5 mg/L	50 mg/L	Sigma-Aldrich
Sulfato de hierro(III) [Fe(III)]	5 mg/L	n.e	Scharlau
Taurocolato de sodio	2 mM	n.e	Sigma-Aldrich
Tiamina	50 mg/L	n.e	Sigma-Aldrich
Zn (NO ₃) ₂	5 mg/L	n.e	Merck

Tabla 8. Suplementos dietéticos o extractos empleados para los estudios de permeabilidad celular. Concentraciones expresadas en mg/L. n.e: no ensayado.

Suplementos dietéticos o extractos vegetales	Concentración (patrones)	Concentración (alimentos)	Marca
Extracto de ajo	25	n.e	Soria Natural
Extracto de alcachofa	25	100	Sakai
Extracto de brócoli	25	n.e	Soria Natural
Extracto de cacao	25	n.e	Naturex
Extracto de semilla de uva	25	100	Plantextrakt
Extracto de té verde	25	n.e	Plantextrakt
Suplemento de sulfato ferroso	25	50	Tardyferon

Para las bacterias lácticas (DO 0.6) y las cepas de levaduras (DO 1) se realizó un estudio preliminar con el fin de determinar el modo de exposición más favorable. Las condiciones ensayadas fueron las siguientes:

a) una pre-exposición de 2 h con los microorganismos en DMEM no suplementado, retirada de los microorganismos y posterior exposición a una disolución de As(III) 0.75 mg/L preparada en HBSS con 10 mM HEPES durante 90 min.

b) co-exposición microorganismos/As(III) 0.75 mg/L siguiendo las mismas pautas descritas para los compuestos alimentarios.

En estos estudios preliminares se empleó la cepa LGG de *Lactobacillus* y la cepa 2 de *S. cerevisiae*. Los resultados mostraron que para las bacterias lácticas era más efectiva la pre-incubación, mientras que para *S. cerevisiae* ambos tratamientos arrojaban similares reducciones. El resto de ensayos se realizaron con pre-incubación para bacterias lácticas [BL17, BL36, LGG y Lpp⁺ (tabla 5)]

y con co-exposición para levaduras [cepas 2, 3, 9 y 10 (tabla 6)]; en este último caso se optó por la co-exposición por tratarse de un método menos tedioso.

Tras los tratamientos descritos con anterioridad (componentes de la dieta, suplementos dietéticos, microorganismos) se retiraron alícuotas (1 mL) del compartimento basolateral a los tiempos establecidos y se sustituyeron por un volumen igual de medio fresco (HBSS 10 mM HEPES). En las alícuotas recogidas se procedió a la cuantificación de As, tal y como se describe en el apartado 4.

Los coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app}) se calcularon utilizando la ecuación 2.

$$P_{app} = \frac{dC}{dt} \times \frac{V_r}{A C_o} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde,

dC/dt es el flujo ($\mu\text{g/s}$) determinado por la pendiente lineal de la ecuación que rige la variación de las concentraciones de As, corregidas por la dilución, frente al tiempo.

V_r es el volumen del compartimento receptor (1.5 mL).

A es la superficie ocupada por la monocapa celular (1.12 cm^2).

C_o es la concentración inicial de las especies arsenicales añadida en el compartimento dador (0.75 mg/L en patrones).

10.3.4. Evaluación de la integridad de la monocapa celular durante los ensayos de transporte

Para determinar la validez de los ensayos de transporte es necesario evaluar la integridad de la monocapa celular durante el procedimiento. Esta se evaluó por determinación del P_{app} de Lucifer Yellow (LY, Sigma), compuesto fluorescente que se transporta principalmente por vía paracelular y cuyo transporte es un indicativo de la integridad. El LY se añadió a una concentración de 100 μM en el compartimento apical al mismo tiempo que los tratamientos. La fluorescencia del LY en las alícuotas recogidas a cada tiempo del lado basolateral se midió empleando un lector de microplacas (PolarSTAR OPTIMA reader, BMG-Labtech) a una longitud de onda de excitación/emisión de 485/520 nm. El cálculo del P_{app} se realizó aplicando la ecuación 2. Adicionalmente se determinó la resistencia eléctrica transepitelial (RET) al principio y final del ensayo, empleando un voltímetro Millicell[®]-ERS (Millipore Corporation).

Los ensayos de transporte se consideraron válidos cuando los valores del P_{app} del LY fueron $\leq 1 \times 10^{-5}$ cm/s y los de RET no variaron más de un 25% al final del ensayo respecto a la medida inicial.

11. ESTUDIOS *IN VIVO* DE LA BIODISPONIBILIDAD DE ARSÉNICO Y EL EFECTO DE LAS ESTRATEGIAS DIETÉTICAS

Para llevar a cabo esta investigación se emplearon 56 ratones de la raza BALB/c, procedentes de Charles River. Los animales se adquirieron con una edad de 6 semanas y con un peso que oscilaba entre 16 y 20 g. Las condiciones ambientales en las que se mantuvieron los animales a lo largo de todo el estudio fueron constantes: doce horas de luz y doce de oscuridad; temperatura ambiental de 22 °C; humedad del recinto de un 75%. Los ratones se alimentaron con pienso de mantenimiento estándar para roedores con un contenido en As reducido (50 ng/g).

Tras dos semanas de aclimatación, se iniciaron los ensayos de biodisponibilidad, acumulación y excreción que se describen a continuación.

El protocolo de experimentación al que fueron sometidos los animales se diseñó conforme a la normativa para el uso de animales de experimentación (Real Decreto 53/2013) y fueron autorizados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Valencia con la consiguiente aprobación de la Consellería d'Agricultura, Pesca i Alimentació de la Generalitat Valenciana.

11.1. Evaluación de la concentración plasmática de arsénico en función de la dosis empleada

En este ensayo inicial se emplearon 3 animales por grupo para establecer los tiempos de toma de muestra y las concentraciones de As(III) y As(V) a utilizar. Las disoluciones de As(III) o As(V) se prepararon en PBS y se dosificaron por sonda intragástrica a 3 concentraciones distintas (0.1, 0.5 y 2.0 mg/kg pc). La sangre se obtuvo por punción en el seno venoso submandibular (\approx 0.1 mL) a distintos tiempos (1, 3, 6 y 24 h). Las muestras se recogieron en tubos con heparina (Microvette, Sarstedt) y se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min para obtener el plasma. Las muestras de plasma se mineralizaron por vía seca y la concentración de As se evaluó por FI-HG-AAS (apartado 4).

11.2. Tratamiento con componentes alimentarios

Una vez fijadas las condiciones óptimas de toma de muestras y los niveles de dosificación, se pasó a evaluar *in vivo* aquellos compuestos de la dieta que podrían reducir la cantidad de As en plasma tras una ingesta oral de As(III) y As(V). Los componentes seleccionados en base a los estudios previos fueron el sulfato férrico [6 mg Fe(III)/kg pc], el ácido tánico (30 mg/kg pc) y el GSH (4

mmol/kg pc). Estos se co-administraron diariamente con las especies de As (1 mg/kg pc). La disolución componente alimentario/especie arsenical en PBS se preparó inmediatamente antes de la administración para evitar posibles precipitaciones. Los animales se estabularon en jaulas colectivas agrupados por tratamiento (7 animales/tratamiento). Tras la dosificación inicial se recogieron muestras de sangre (≈ 0.1 mL) en las 24 h siguientes para determinar la biodisponibilidad relativa, tal y como se describe en el apartado 11.3.

La dosificación se realizó durante 15 días consecutivos con el fin de evaluar tras el sacrificio, la acumulación de ambas especies arsenicales en hígado, pulmones e intestino. Adicionalmente, se recogieron muestras individuales de heces antes del sacrificio.

11.3. Cálculo de los parámetros farmacocinéticos

Los contenidos de As en plasma en la condición de referencia [animales expuestos a As(III) o As(V)] y en los tratamientos donde se administraban estas formas arsenicales con compuestos alimentarios permitieron el cálculo de la biodisponibilidad relativa, aplicando la ecuación 3.

$$F\% = \frac{AUC_a}{AUC_{referencia}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 3})$$

donde el subíndice *a* indica la AUC para los tratamientos conjuntos As/compuesto alimentario y el subíndice *referencia* indica la AUC para los tratamientos únicamente con As. Las AUC orales de cada tratamiento fueron calculadas empleando el programa SigmaPlot (versión 13) a partir de la representación de la concentración plasmática de As en función del tiempo.

Adicionalmente se llevó a cabo la recogida de muestras de heces, para determinar la influencia de los componentes alimentarios en la magnitud de la excreción por esta vía. Para el análisis de As total en estas muestras se procedió a su mineralización por vía seca y posterior cuantificación por FI-HG-AAS.

11.4. Sacrificio y extracción de órganos

Transcurrido el tiempo de exposición, los animales se anestesiaron con isoflurano y se sacrificaron por disloque cervical, tras el drenaje de la sangre. Posteriormente se extrajeron los órganos de interés (hígado, pulmones e intestino delgado). Las muestras tisulares tras limpiarlas con abundante solución salina, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el análisis de As total (apartado 4). En las muestras de hígado se analizó el contenido de Ca, Fe, K y P siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.

12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

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

La determinación del tamaño muestral necesario para los ensayos de biodisponibilidad, excreción y acumulación *in vivo* se llevó a cabo empleando el programa GPower 3.1, con un $\alpha = 0.05$ y un poder estadístico $(1-\beta)$ de 0.8.

Capítulo 1

**Arsénico inorgánico en alimentos: especiación,
procesado y tránsito gastrointestinal**

La especiación de los alimentos, el procesado previo a la ingesta y el tránsito a través del tracto gastrointestinal son factores que deberían incluirse dentro de la evaluación de la exposición oral a As y el riesgo asociado. El objetivo de este capítulo es identificar las especies arsenicales presente en alimentos cocinados con agua contaminada y sus fracciones bioaccesibles por técnicas convencionales y mediante el uso de Espectroscopia de Absorción de Rayos X Cercana al Borde de Absorción (XANES). Este estudio permitirá identificar posibles transformaciones del As durante los procesos previos a la llegada del tóxico a la circulación sistémica y determinar el riesgo asociado a la ingesta de estos alimentos de forma más realista.

RESULTADOS

1. ARSÉNICO INORGÁNICO EN ALIMENTOS COCINADOS CON AGUA CONTAMINADA Y EN SUS FRACCIONES BIOACCESIBLES

La tabla 9 presenta los contenidos de As inorgánico detectados en el agua de bebida y los alimentos cocinados consumidos por los niños asistentes a tres escuelas situadas en la región de Argentina objeto de estudio. Las tres escuelas presentan diferentes niveles de As en el agua de bebida. Los resultados muestran que la cantidad de As inorgánico se incrementa en los alimentos a medida que aumenta el contenido de As inorgánico en el agua utilizada para su preparación.

Tabla 9. Contenidos de As inorgánico en muestras de aguas y alimentos ingeridos por poblaciones argentinas. Valores expresados como media \pm SD (n = 5).

Población	As inorgánico	
	Agua ($\mu\text{g/L}$)	Alimentos ($\mu\text{g/kg}$)
Santa Teresa de Carballo	925 \pm 104	584 \pm 96
Taco Pozo	210 \pm 19	191 \pm 99
Jumi Pozo	16 \pm 5	39 \pm 17

Para evaluar la ingesta a partir de estos alimentos sólo se consideraron las comidas servidas en el colegio: un desayuno consistente en una taza de infusión de mate o leche chocolateada en polvo (250 mL) y una porción de pan (45 g); una comida de mediodía (300 g) consistente en estofado, pasta o sopa con carne; una merienda similar al desayuno. La cena, servida en los hogares, no se incluyó en el estudio. Las ingestas de As inorgánico en Santa Teresa de Carballo (1530-1620 $\mu\text{g/día}$; mediana: 1580 $\mu\text{g/día}$) y Taco Pozo (360-431 $\mu\text{g/día}$; mediana: 367 $\mu\text{g/día}$) superan el valor de referencia toxicológico propuesto por JEFCA para As inorgánico (BMLD_{0.5}: 3 $\mu\text{g As inorgánico/kg pc/día}$) que para un niño de 31 kg de peso es de 93 $\mu\text{g As inorgánico/día}$ (JEFCA, 2011). En las tres localidades los alimentos contribuyen de forma muy destacada al aporte dietético de As inorgánico (41-58%).

Tras la aplicación de la digestión gastrointestinal simulada a las muestras de alimentos de las dos áreas con alta exposición (Santa Teresa de Carballo y Taco Pozo) se obtienen porcentajes de bioaccesibilidad del As que oscilan entre 55-91%, valores que indican

que una parte importante del As está disponible para la absorción. En principio, el proceso digestivo no modifica de forma destacable el riesgo asociado a la ingesta. Sin embargo, para poder afirmar este hecho, hay que descartar que existan cambios en los estados de oxidación de las formas inorgánicas [As(III)/As(V)] debido a los cambios de pH, las actividades enzimáticas de la digestión y la presencia de otros compuestos liberados de la matriz alimentaria. Estas variaciones en el estado de oxidación supondrían cambios en la toxicidad.

2. ESPECIACIÓN MEDIANTE XANES DE ALIMENTOS COCINADOS CON AGUA CONTAMINADA Y EN SUS FRACCIONES BIOACCESIBLES

Avanzar en una adecuada caracterización del estado de oxidación del As inorgánico en los alimentos y en su fracción bioaccesible proporcionaría una valiosa información para refinar la evaluación del riesgo. Este abordaje se ha llevado a cabo en el presente capítulo empleando XANES, considerado un método de especiación complementario a las técnicas tradicionales que al requerir un procesamiento mínimo de la muestra permite preservar las especies arsenicales más lábiles (Nearing *et al.*, 2014a). La detección de As empleando XAS requiere de concentraciones en la matriz de análisis superiores a 10 mg/kg ps (Nearing *et al.*, 2014b). Las muestras de alimentos obtenidas en Argentina (tabla 9) no cumplen este requisito, ni siquiera las recogidas en el área con mayor contaminación. Por lo tanto, ha sido necesario preparar en el laboratorio muestras altamente contaminadas con As inorgánico mediante un proceso de cocción en

una disolución acuosa de 100 mg/L de As(V). Se han seleccionado muestras de arroz, espárrago y ajo que en un trabajo previo mostraron capacidad para reducir el As(V) utilizado en su cocción a As(III) (Calatayud *et al.*, 2013). Las muestras crudas de estos tres alimentos presentaron contenidos bajos de As (arroz: 0.11 mg/kg; espárrago: 0.28 mg/kg; ajo 0.08 mg/kg). Tras la cocción las concentraciones de As se elevaron hasta 216 mg/kg en el arroz, 49 mg/kg en el espárrago y 48 mg/kg en el ajo. La digestión gastrointestinal solubilizó la mayor parte del As presente en la muestra cocinada (arroz: 81-89%; espárrago: 84%; ajo: > 99%).

2.1. Espectros de disoluciones patrón de arsénico

Se obtuvieron los espectros XANES normalizados de distintos patrones de As inorgánico sólidos [As(III) y As(V)] y líquidos (disoluciones de As(III) y As(V), As(III)-Cys, As(V)-Cys, As(V)-glicerol) (figura 7).

El patrón de la disolución de As(III) y el patrón de As(III) sólido (As_2O_3) presentan un máximo de absorción a 11871.5 eV, siendo el eje de absorción de la disolución más intenso que el del patrón sólido. Así mismo, las modulaciones de los espectros también son diferentes para ambas sustancias, al existir diferentes características de absorción post-borde a 11873.4 eV. Estas diferencias también se observan entre la disolución de As(V) y el patrón sólido de As(V) (KH_2AsO_4), ambas con un máximo de absorción a 11875 eV. La disparidad entre sales (sólidas) y disoluciones de As (líquidas) ha sido previamente reportada (Webb *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2005).

El espectro del patrón de As(III)-Cys con un máximo de absorción a 11869.6 eV, es similar al hallado en estudios previos para otros

compuestos con enlace As(III)-S [AsS, As(Glu)₃] (Smith *et al.*, 2005). La metodología XAS da información de los átomos vecinos a la especie atómica seleccionada para la evaluación; sin embargo no es capaz de identificar átomos situados en posiciones más alejadas. Por ese motivo, el espectro de As(III)-Cys puede considerarse como un modelo de cualquier forma de As(III) coordinada a tioles alifáticos [As(III)-S]. Por otra parte, los espectros de los patrones As(III)-Cys y As(V)-Cys son prácticamente idénticos. Este resultado demuestra que en presencia de Cys se produce la reducción del As(V) a As(III), el cual forma un enlace con el azufre del grupo tiol de este aminoácido. La reducción de la forma pentavalente de As en presencia de un exceso molar de Cys ha sido evidenciada previamente (Chen *et al.*, 1992).

La disolución As(V)-glicerol presenta un máximo de absorción a 11876 eV. Koch *et al.* (2011) ya evidencian que el espectro de As(V)-glicerol a pH 6 presenta, respecto a la disolución de As(V), una diferencia de 1 eV en el máximo de absorción y una mayor amplitud. Estas diferencias han sido atribuidas a la presencia de As pentavalente hexacoordinado en el compuesto de glicerol frente a la forma tetraédrica del As(V) en disolución. Tal y como ocurre con la disolución As(III)-Cys, en este caso, el As(V)-glicerol puede considerarse un modelo de formas arsenicales donde el As(V) está coordinado con dos grupos hidroxilo vecinales generando una forma de disposición octaédrica (Andrahennadi *et al.*, 2009).

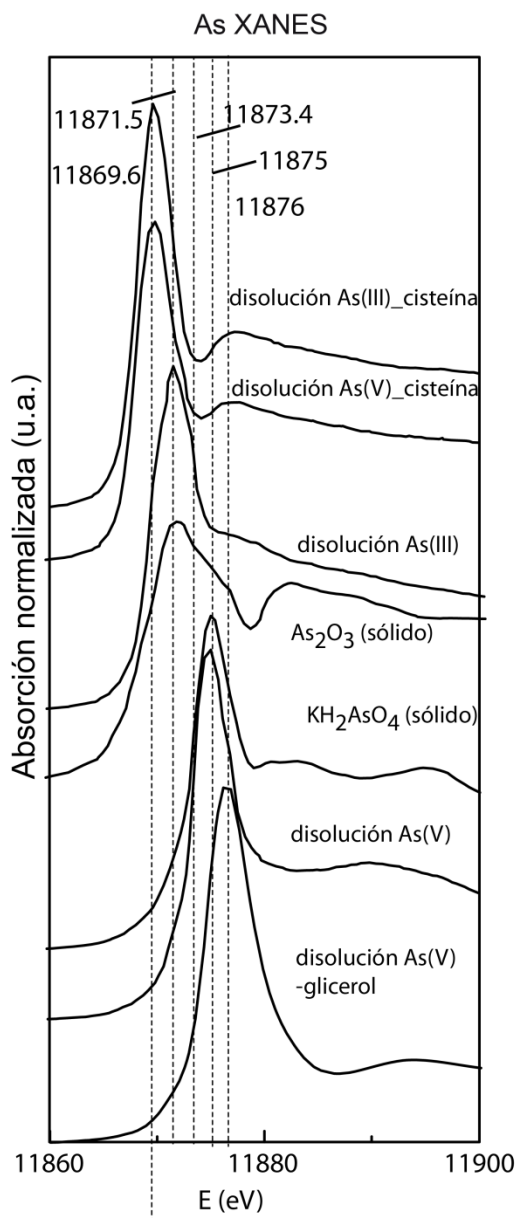


Figura 7. Espectros XANES normalizados de patrones de As. Espectros de disolución As(III)-Cys, disolución As(V)-Cys, disolución As(III), As₂O₃ (sólido), KH₂AsO₄ (sólido), disolución As(V), disolución As(V)-glicerol.

2.2. Espectros de alimentos y sus fracciones bioaccesibles

Los espectros XANES y sus correspondientes espectros de la primera derivada de las muestras cocinadas y de la fracción bioaccesible del arroz, espárrago y ajo se muestran en la figura 8. Los ejes de absorción $K\alpha$ del As del arroz cocinado y su fracción bioaccesible se caracterizan por un máximo de absorción a 11875 eV, similar al de los espectros de las disoluciones patrón de As(V), y una modulación a 11871.5 eV que coincide con el máximo de absorción de la disolución de As(III). Tanto el espectro XANES como su correspondiente primera derivada se ajustan mejor con las disoluciones patrones de As(III) y As(V) que con las muestras sólidas de los patrones. Los resultados del ajuste por combinación lineal (LCF) de los espectros XANES indican una menor proporción de As(III) en la muestra de arroz cocinada (12.2%) que en su fracción bioaccesible (17.5%) (tabla 10).

El espectro XANES de As de la muestra de espárrago cocinada se caracteriza por dos picos principales a 11869.6 eV y 11876 eV, que corresponden con el máximo de absorción de los espectros de la disolución patrón As(III)-Cys y As(V)-glicerol, respectivamente. El ajuste LCF de los espectros XANES (tabla 10) muestra porcentajes similares de ambas disoluciones [As(III)-Cys (54.5%); As(V)-glicerol (45.5%)]. Estos datos indican la presencia en la muestra de espárrago cocinada de formas arsenicales trivalentes unidas a grupos tiol y de especies inorgánicas pentavalentes en coordinación octoédrica, unidas posiblemente a compuestos con grupos OH vecinales.

Existen diferencias en las principales modulaciones e inflexiones (observadas en la primera derivada) entre la muestra cocinada y la fracción bioaccesible del espárrago (figura 8). En primer lugar el pico

observado a 11869.6 eV en la muestra cocinada queda reducido a un pequeño hombro en el espectro de la fracción bioaccesible. Por otra parte, el principal eje de absorción en el espectro de la fracción bioaccesible aparece a 11875 eV, mientras que en la muestra cocinada aparecía a 11876 eV, indicativo de la presencia en la fracción bioaccesible de As(V) en forma tetraédrica, el cual no se evidenciaba en el alimento cocinado. El mejor ajuste de los espectros XANES se obtiene utilizando las disoluciones patrón de As(III)-Cys (30.1%), disolución de As(V) (26.3%) y As(V)-glicerol (44%).

Por lo que respecta al ajo, el resultado de la combinación lineal de los espectros (LCF) obtenidos indica la presencia de As(V) [disolución de As(V) y As(V)-glicerol] y de As(III) [disolución de As(III)] (tabla 10). El porcentaje de As(III) es superior en la fracción bioaccesible (18.1%) que en la muestra cocinada (13.6%). Los porcentajes de As(V) son superiores a los de As(III) tanto en la muestra cocinada como en la fracción bioaccesible. La disolución de As(V) tiene mayor contribución en la fracción bioaccesible (64.9%) que en la muestra cocinada (29.9%), mientras que la distribución de As(V)-glicerol presenta el patrón contrario [cocinada (56.4%), fracción bioaccesible (17%)].

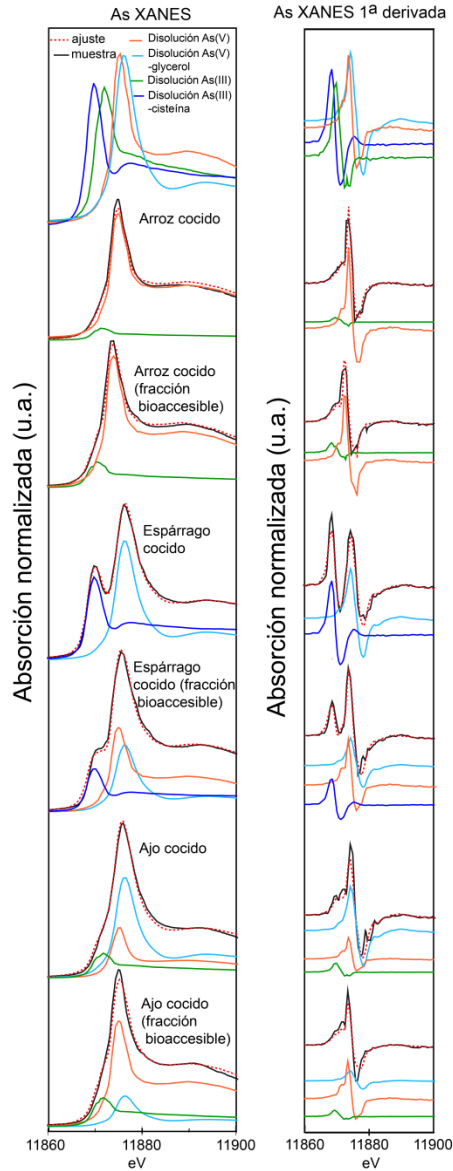


Figura 8. Espectros XANES y sus correspondientes espectros de la primera derivada en alimentos y sus fracciones bioaccesibles. Los espectros XANES se analizaron por combinación lineal utilizando los siguientes patrones de As en disolución: As(V), As(V)-glicerol, As(III), As (III)-cisteína.

Tabla 10. Ajuste por combinación lineal (LCF) de los espectros XANES.

Muestra	As(V)-glicerol (%) ^a	As(V) disolución (%) ^b	As(III) disolución (%) ^c	As(III)-Cys (%) ^d	Total	red. χ^2 ^f
Arroz						
Cocinado	—	97.9/87.8 ^e	13.6/12.2 ^e	—	111.5	0.007016
Fracción bioaccesible	—	91.6/82.4 ^e	19.5/17.5 ^e	—	111.1	0.003862
Espárrago						
Cocinado	50.6/45.5 ^e	—	—	60.5/54.5 ^e	111.1	0.00109
Fracción bioaccesible	48.8/44 ^e	29/26.3 ^e	—	33.4/30.1 ^e	110,8	0.00238
Ajo						
Cocinado	100/56.4 ^e	53.1/29.9 ^e	24.2/13.6 ^e	—	177.3	0.00469
Fracción bioaccesible	26.2/17 ^e	100/64.9 ^e	27.8/18.1 ^e	—	154	0.01491

^a Ajuste con patrón de disolución de As(V)-glicerol (Koch *et al.*, 2011).

^b Ajuste con patrón de disolución As(V) 1000 mg/L (de este estudio).

^c Ajuste con patrón de disolución As(III) 1000 mg/L (de este estudio)

^d Ajuste con patrón de disolución As(III)-cisteína 1000 mg/L (de este estudio).

^e Total (recalculado a un total 100%).

^f Bondad de ajuste reducido, calculado como tres veces la estimación de la SD para cada componente de la combinación lineal

DISCUSIÓN

El riesgo asociado a la presencia de As en alimentos varía dependiendo de la forma química en que éste se encuentra en el momento que el consumidor lo ingiera. Los estudios sobre especiación han mostrado la existencia de As inorgánico en alimentos listos para su consumo. La mayoría de estas evaluaciones se han realizado en las matrices más problemáticas (algas y arroz) o en alimentos procedentes de países donde no existe una contaminación por As. Sin embargo, los estudios de especiación en áreas con arsenicismo crónico endémico son escasos. Algunos trabajos aportan datos sobre contenidos de As inorgánico en alimentos crudos de dichas áreas (Signes-Pastor *et al.*, 2008; Rehman *et al.*, 2016). Otros cuantifican el tóxico tras emular el cocinado de los alimentos en el agua contaminada usada por las poblaciones (Díaz *et al.*, 2004), pero sorprendentemente son muy pocas las investigaciones sobre los contenidos de As inorgánico en los alimentos cocinados que constituyen la dieta de estas poblaciones (Halder *et al.*, 2014; Díaz *et al.*, 2015; Rasheed *et al.*, 2018). La investigación realizada en este capítulo de tesis contribuye a incrementar esta información. Evidencia la importante contribución de los alimentos cocinados a la ingesta de As inorgánico (hasta un 55%) y la necesidad de valorar este aporte al estimar la exposición al tóxico y el riesgo asociado. Además, pone de manifiesto la existencia de población infantil con una ingesta de As inorgánico muy superior al $BMLD_{0.5}$ en la que deberían implementarse medidas sanitarias encaminadas a disminuir la exposición y la situación de riesgo.

Una necesidad de investigación adicional a la cuantificación de As inorgánico en alimentos es intentar caracterizar el estado de oxidación del As en estas matrices, ya que, tal y como se ha indicado previamente (apartado 5, introducción), la forma trivalente es más tóxica que la pentavalente. Para abordar esta línea de trabajo, la muestra, sólida o líquida, debe experimentar la menor

manipulación posible antes de su análisis. La espectroscopía XANES constituye una alternativa para esta especiación. Esta metodología se ha aplicado previamente para la caracterización de alimentos crudos [arroz (Carey *et al.*, 2012; Maher *et al.*, 2013; Kramar *et al.*, 2017), moluscos (Whaley-Martin *et al.*, 2013) y setas (Nearing *et al.*, 2014b)]. Sin embargo, no existen datos sobre alimentos cocinados y sus fracciones bioaccesibles.

En el presente estudio, la especiación con XANES muestra que tras el cocinado de alimentos con agua contaminada emulando las condiciones existentes en las áreas con arsenicismo crónico, se producen transformaciones con importantes implicaciones toxicológicas. En el alimento cocinado con agua contaminada con As(V) se detectan concentraciones importantes de As inorgánico en forma trivalente. La magnitud de la reducción depende del alimento [arroz (12%) < ajo (13%) < espárragos (55%)], que es posiblemente a su vez función del poder reductor de la matriz. Calatayud *et al.* (2013) muestran, analizando fracciones bioaccesibles de ajo y espárragos, que los espárragos presentan mayor capacidad reductora.

Esta reducción puede agravar la situación de riesgo ya existente en estas zonas; el cocinado con agua contaminada con As(V) incrementa los contenidos de As inorgánico y parte de este As se encuentra en forma trivalente. Sin embargo, esta situación puede ser diferente dependiendo de la matriz. El arroz y el ajo presentan tras el cocinado, As(III) en forma salina; sin embargo, en el espárrago cocinado, el As trivalente aparece mayoritariamente unido a residuos tiol. La presencia de complejos As(III)-S ya ha sido puesta de manifiesto en setas crudas (Nearing *et al.*, 2014a) y arroz (Maher *et al.*, 2013), pero es la primera vez que se confirma la presencia de esta forma química de As en alimentos cocinados. Un estudio previo realizado por Demirkol *et al.* (2004) muestra que los espárragos presentaban los contenidos más elevados de compuestos tiolados (N-acetilcisteína, Cys, homocisteína, GSH) de todos los vegetales y frutas analizados.

La presencia de compuestos sulfurados de As(III) en el bioaccesible modifica posiblemente el ratio de absorción respecto al que cabría esperar si se tratase de As(III) coordinado con átomos de oxígeno. De hecho, en el capítulo 4, se evidencia que en presencia de Cys o GSH, ambas formas inorgánicas de As se transportan a través de monocapas de células intestinales en menor medida. Este hecho, que también se confirma *in vivo* en el capítulo 5, sugiere que la formación de complejos de As inorgánico con grupos tiol puede reducir la entrada de As en la circulación sistémica.

La aparición de formas inorgánicas pentavalente en forma octaédrica, posible indicio que la formación de complejos del As(V) con compuestos con grupos hidroxilo vecinales, también podría afectar la toxicocinética y la toxicidad. Se desconoce que compuestos podrían ser la fuente de estos grupos OH. Ambas matrices alimentarias contienen numerosos compuestos fenólicos y flavonoides con grupos OH vecinales (Chen *et al.*, 2013; Fan *et al.*, 2015), alguno de los cuales han demostrado afinidad por otros elementos traza tóxicos (Hider *et al.*, 2001; Symonowicz y Kolanek, 2012).

Por otro lado, el último informe sobre As de la OMS/FAO (JECFA, 2011), señaló la necesidad de conocer la biodisponibilidad de As desde alimentos con vistas a una mejor estimación de la exposición. La bioaccesibilidad estimada tras un proceso *in vitro* de digestión gastrointestinal proporciona información sobre la máxima biodisponibilidad oral. En los alimentos cocinados analizados en el presente trabajo las bioaccesibilidad son elevadas (> 81%); hecho que indica que tras la ingesta una parte importante del As puede ser absorbida. Además, la especiación con XANES muestra que el proceso digestivo puede aumentar ligeramente la proporción de As inorgánico en forma reducida existente tras el proceso de cocinado de muestras de arroz y ajo. Por tanto, la consideración del procesado doméstico y la etapa digestiva puede modificar de forma considerable el riesgo asociado a la ingesta.

Además de los cambios mostrados en las matrices alimentarias, hay que destacar el hecho de que en presencia de Cys la disolución estándar de As(V) se transforma en As(III)-Cys. Este hecho también tiene importantes implicaciones. Hay que tener en cuenta que el agua es la principal vía de exposición en poblaciones con arsenicismo crónico endémico. En el lumen existen un gran número de sustancias reductoras procedentes de la dieta, de las células gastrointestinales y de las secreciones biliares (Circu y Aw, 2012), las cuales podrían llevar a cabo la reducción de As(V) a As(III) tras la ingesta de agua de bebida.

La reducción del As(V) anterior a su entrada en la circulación sistémica muestra nuevamente que el tracto digestivo no es simplemente una barrera al paso de sustancias y que existen procesos de transformación previos a la absorción intestinal que pueden determinar tanto el ratio de absorción como la toxicidad local y sistémica del metaloide.

CONCLUSIONES

Este capítulo ha puesto de manifiesto la necesidad de considerar el aporte de As inorgánico a través de los alimentos a la hora de evaluar el riesgo asociado a la exposición a As en áreas con arsenicismo crónico endémico. Considerar únicamente el aporte de As a través del agua de bebida subestima la exposición. Además, se ha evidenciado que el proceso de cocinado de los alimentos y la posterior digestión gastrointestinal produce cambios en el As(V) aportado con el agua utilizada para preparar los alimentos. Se generan formas inorgánicas trivalentes, cuyo grado de toxicidad es, en algunos casos, superior a la del As(V). Este fenómeno de reducción posiblemente se produzca no sólo en matrices alimentarias si no también tras la ingesta de agua de bebida, ya que en el lumen existen numerosos compuestos con capacidad reductora.

Este capítulo muestra el riesgo que supone la ingesta de alimentos y agua contaminada y reafirma la necesidad de reducir esta exposición. Teniendo en cuenta la dificultad que supone en muchas áreas afectadas por arsenicismo crónico endémico la eliminación de As en las fuentes de exposición, se propone como alternativa disminuir la exposición a As(III) y As(V) actuando sobre su llegada a la circulación sistémica, objetivo de los siguientes capítulos de la presente tesis doctoral.

Capítulo 2

**Evaluación del efecto de componentes alimentarios
sobre la bioaccesibilidad de las formas arsenicales**

Los problemas de salud pública derivados de una exposición crónica a As inorgánico se han descrito detalladamente en la introducción. Además de estas situaciones crónicas, se ha evidenciado ingestas elevadas debido a un consumo frecuente de determinados productos alimentarios. En su último informe sobre As, EFSA indica que, aunque los consumidores frecuentes de arroz y productos derivados de algas tienen una exposición dietética por debajo del valor recomendado, no se puede excluir la posibilidad de riesgo (EFSA, 2009) y recomienda disminuir la exposición dietética a As inorgánico.

La reducción de la exposición al tóxico, cuando éste se vehicula a través de los alimentos, puede conseguirse mediante la disminución de la contaminación del alimento o evitando su consumo. Tal y como se indica en la introducción (apartado 7), estas estrategias son de difícil implementación. Una alternativa para reducir la exposición a As podría basarse en disminuir la entrada del metaloide a la circulación sistémica.

El objetivo de este capítulo es la búsqueda de componentes alimentarios capaces de reducir la cantidad de As bioaccesible tras la digestión gastrointestinal de agua [disoluciones acuosas de As(III) y As(V)] y alimentos (arroz y algas cocinadas), con el fin de encontrar alternativas para reducir la exposición a As. Una disminución de la bioaccesibilidad supone una reducción de la cantidad del tóxico que puede absorberse y llegar a la circulación sistémica, y por tanto de la exposición interna al tóxico. El empleo de componentes alimentarios busca que estas estrategias no supongan un riesgo para el consumidor.

RESULTADOS

1. EFECTO DE LOS COMPONENTES ALIMENTARIOS SOBRE LA BIOACCESIBILIDAD DE ARSÉNICO DESDE DISOLUCIONES ACUOSAS

La mayoría de componentes ensayados reducen significativamente la bioaccesibilidad del As presente en la disolución acuosa de As(III), a excepción del quitosano y la metilcelulosa (MC). Para el As(V) no se consiguen reducciones de la bioaccesibilidad con fitatos, sulfato cúprico, ácido cítrico, alginato sódico, carboximetilcelulosa (CMC) y λ carragenato.

Las figuras 9 y 10 muestran los componentes que causan reducciones superiores a un 30% en la bioaccesibilidad de As(III) y As(V) respectivamente. Las reducciones más importantes del As(III) se producen en presencia de sales de hierro (86-99%), dióxido de titanio (42-67%), la combinación calcio/fitato (53-60%), N-acetilcisteína NAC (45-50%), hidroxipropilcelulosa HPC (40-45%), saponina (30-42%), ácido oxálico (37-40%) y hidroxipropilmetilcelulosa HPMC (35-38%). Las mayores reducciones de la bioaccesibilidad del As(V) se consiguen con los componentes inorgánicos [Fe(III): > 96%, Fe(II): > 90%, Al(III): > 93%, Ti(II): 42-79%], siendo los componentes de mayor complejidad estructural menos eficaces [calcio/fitato (47-51%), HPC (33-43%)].

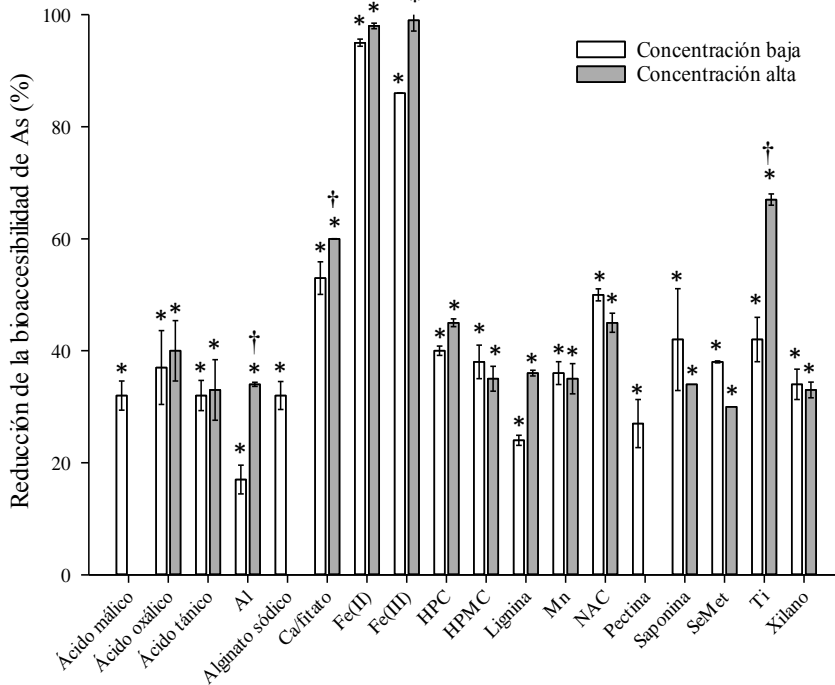


Figura 9. Efecto de los componentes alimentarios sobre la bioaccesibilidad de disoluciones acuosas de As(III). Porcentaje de reducción de la solubilidad de As en una disolución acuosa de As(III) (1 mg/L) tras la aplicación de una digestión gastrointestinal en presencia de componentes alimentarios. Valores expresados como media \pm SD (n=3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a la digestión de la disolución acuosa sin adición del componente alimentario ($p < 0.05$). El símbolo (†) indica una diferencia estadísticamente significativa entre las dos concentraciones ensayadas para cada componente ($p < 0.05$).

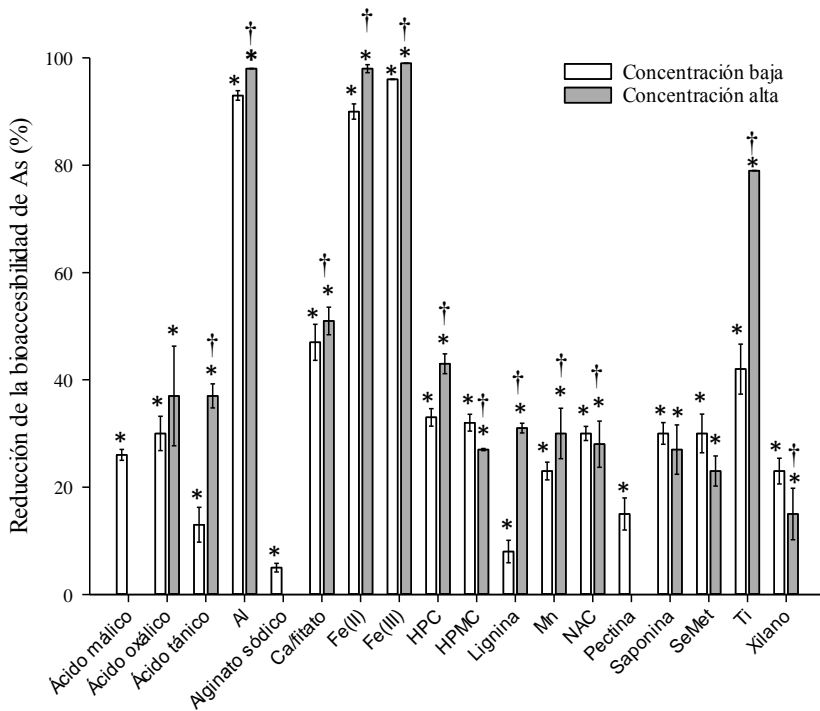


Figura 10. Efecto de los componentes alimentarios sobre la bioaccesibilidad de disoluciones acuosas de As(V). Porcentaje de reducción de la solubilidad de As en una disolución acuosa de As(V) (1 mg/L) tras la aplicación de una digestión gastrointestinal en presencia de componentes alimentarios. Valores expresados como media \pm SD (n=3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a la digestión de la disolución acuosa sin adición del componente alimentario ($p < 0.05$). El símbolo (†) indica una diferencia estadísticamente significativa entre las dos concentraciones ensayadas para cada componente ($p < 0.05$).

2. EFECTO DE LOS COMPONENTES ALIMENTARIOS SOBRE LA BIOACCESIBILIDAD DE ARSÉNICO DESDE ALIMENTOS

Los contenidos de As total en muestras de arroz descritos en la literatura raramente superan 1 mg/kg (EFSA, 2009; Codex, 2012). Para analizar el efecto sobre la bioaccesibilidad de As de los componentes alimentarios se consideró necesario trabajar con arroz cocinado con agua adicionada con As(V) (1 mg/L) para obtener concentraciones detectables en la fase soluble. Este procesado además de incrementar notablemente el contenido de As en el alimento, emula la situación de poblaciones que consumen agua contaminada por este elemento. En este estudio, los arroces blancos cocinados con As(V) presentan una concentración de As total que oscila entre 0.98-1.40 mg/kg (mediana 1.03 mg/kg) similar a la hallada en arroces integrales (1.16-1.79 mg/kg; mediana 1.23 mg/kg). La bioaccesibilidad de los arroces blancos cocinados (73-106%, mediana 95%) es ligeramente superior a la de los arroces integrales (63-95%, mediana 75%). Los contenidos de As en la fracción bioaccesible son elevados para ambos tipos de grano (arroz blanco: 0.72-1.40 mg/kg; arroz integral: 0.81-1.76 mg/kg).

Por lo que respecta a las muestras de algas, es conocido que el alga parda *Hizikia fusiforme* presenta elevados niveles de As, aportados mayoritariamente por el As inorgánico (apartado 2.2, introducción). Así también se evidencia en este capítulo, donde las algas cocinadas presentan concentraciones de As que oscilan entre 6.52 y 10.77 mg/kg (mediana 9.31 mg/kg). También la bioaccesibilidad de As (45-103%, mediana 74%) y los contenidos de As en la fracción bioaccesible de las muestras analizadas son elevados (5.23-9.43 mg/kg), por lo que, a diferencia de los arroces, no se planteó su cocción en agua adicionada con As.

El efecto de los componentes alimentarios sobre la bioaccesibilidad de As en muestras cocinadas de arroz blanco, integral y del alga *Hizikia fusiforme* se

muestra en las figuras 11, 12 y 13 respectivamente. Los resultados obtenidos evidencian un comportamiento similar al observado en los patrones acuosos (apartado 1, presente capítulo), dado que la mayoría de componentes seleccionados producen reducciones en la bioaccesibilidad de As. De las sales empleadas, sólo el óxido de manganeso no conlleva cambios significativos en la bioaccesibilidad de As desde los arroces; sin embargo, reduce la bioaccesibilidad de As en algas a las dos concentraciones ensayadas (24-39%). Es muy destacable la disminución de la bioaccesibilidad de As producida por las dos formas de Fe. La concentración más elevada de Fe (100 mg) disminuye casi por completo el As presente en la fracción soluble de los arroces y conlleva reducciones del 53-58% del As solubilizado en algas. El sulfato de Al y el óxido de Ti son también componentes eficaces reduciendo la bioaccesibilidad de As. La digestión en presencia de la concentración más elevada de Al (50 mg) supone reducciones importantes en las tres matrices alimentarias (arroz blanco 68%; arroz integral 58%; algas 46%). El óxido de Ti, en su concentración más elevada (20 mg), reduce por igual la bioaccesibilidad en los arroces y las algas (45-54%).

En cuanto a los componentes alimentarios de estructura más compleja, su eficacia en la reducción del As bioaccesible es inferior, especialmente para los arroces. Las disminuciones de la bioaccesibilidad son significativas en arroces y algas en presencia de la HPMC (20-23%), HPC (25-35%), saponinas (10-28%) y la combinación calcio/fitato, que a la mayor concentración ensayada (1.4 g/0.28 g) reduce un 30-31% la cantidad de As soluble presente en el arroz y un 49% la del alga cocinada. Por otro lado, la mayor concentración de NAC (300 mg) supone reducciones significativas de la bioaccesibilidad de As en arroz blanco (30%) y algas (26%); sin embargo, no afecta la bioaccesibilidad en el arroz integral.

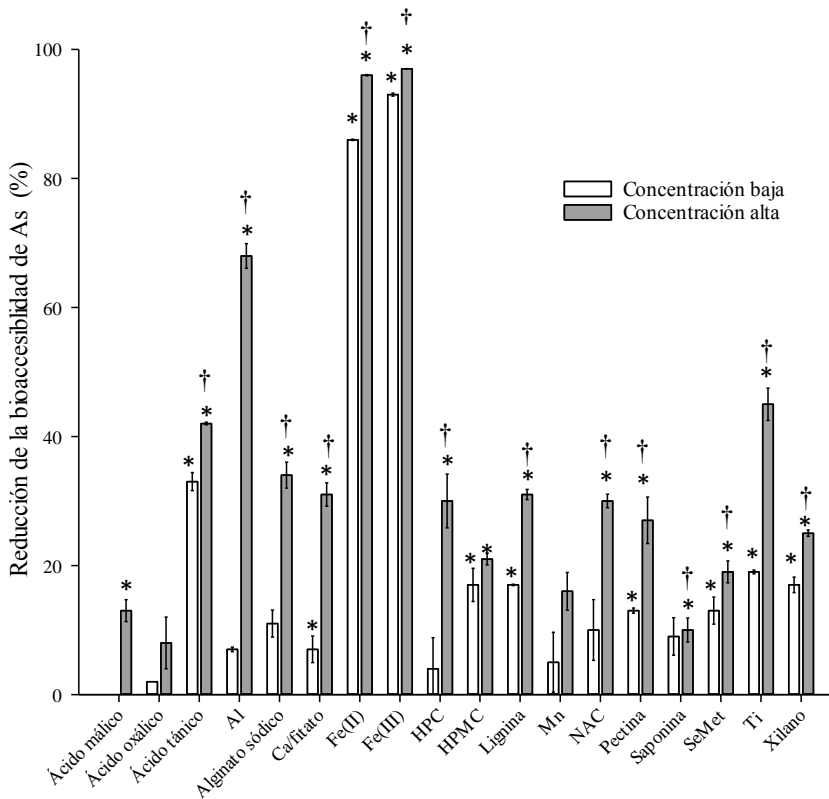


Figura 11. Efecto de los componentes alimentarios sobre la bioaccesibilidad de As en arroz blanco. Porcentaje de reducción de la bioaccesibilidad de As tras la aplicación de una digestión gastrointestinal en presencia de componentes alimentarios. Valores expresados como media \pm SD (n=3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a la digestión del alimento sin adición del componente alimentario ($p < 0.05$). El símbolo (†) indica una diferencia estadísticamente significativa entre las dos concentraciones ensayadas para cada componente ($p < 0.05$).

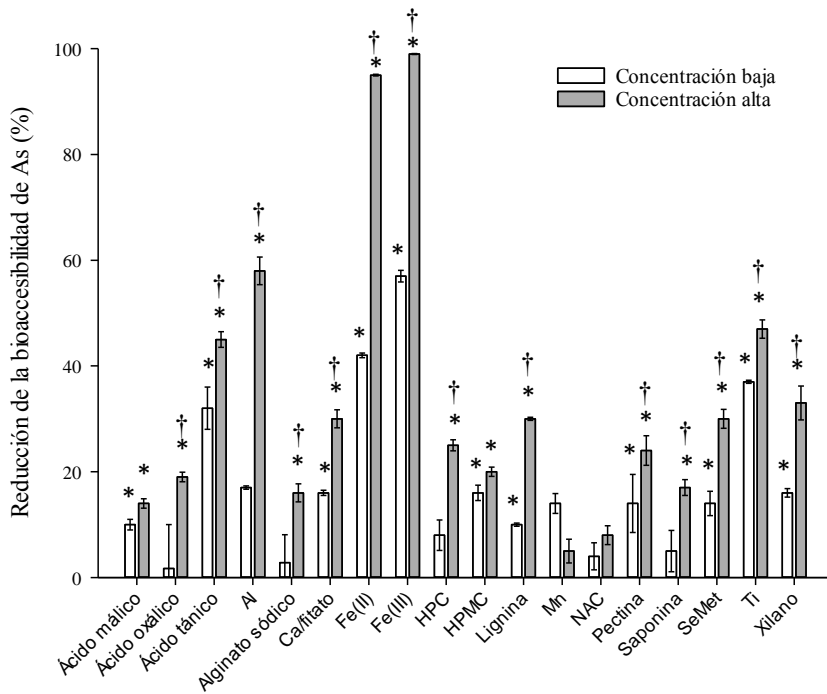


Figura 12. Efecto de los componentes alimentarios sobre la bioaccesibilidad de As en arroz integral. Porcentaje de reducción de la bioaccesibilidad de As tras la aplicación de una digestión gastrointestinal en presencia de componentes alimentarios. Valores expresados como media \pm SD (n=3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a la digestión del alimento sin adición del componente alimentario ($p < 0.05$). El símbolo (†) indica una diferencia estadísticamente significativa entre las dos concentraciones ensayadas para cada componente ($p < 0.05$).

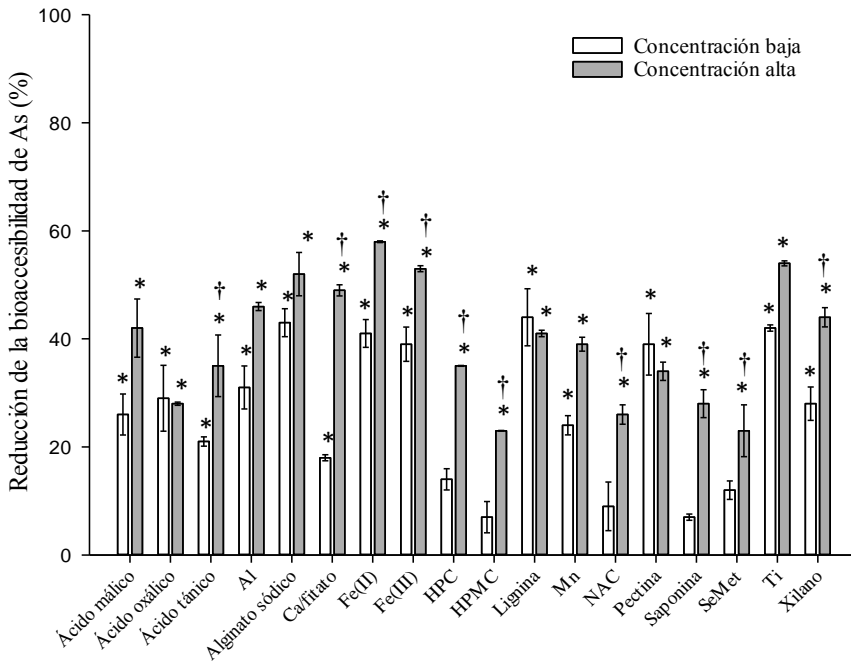


Figura 13. Efecto de los componentes alimentarios sobre la bioaccesibilidad de As en el alga *Hizikia fusiforme*. Porcentaje de reducción de la bioaccesibilidad de As tras la aplicación de una digestión gastrointestinal en presencia de componentes alimentarios. Valores expresados como media \pm SD (n=3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a la digestión del alimento sin adición del componente alimentario ($p < 0.05$). El símbolo (†) indica una diferencia estadísticamente significativa entre las dos concentraciones ensayadas para cada componente ($p < 0.05$).

3. EFECTO DE LOS COMPONENTES ALIMENTARIOS SOBRE LA BIOACCESIBILIDAD DE ELEMENTOS ESENCIALES

Para los componentes alimentarios más eficaces reduciendo la bioaccesibilidad de As desde alimentos se ha estudiado el efecto de su adición sobre la bioaccesibilidad de elementos esenciales, con el fin de buscar estrategias dietéticas que no conlleven efectos negativos sobre la salud en el caso de plantearse su uso en intervenciones poblacionales. La tabla 11 muestra las modificaciones en la bioaccesibilidad de Ca, Mg, K, Fe y P en muestras de arroz blanco, integral y algas tras aplicar la digestión gastrointestinal en presencia de estos componentes alimentarios.

En algas, solamente la presencia de ácido tánico reduce la bioaccesibilidad de K, Fe y P; el resto de componentes no producen reducciones superiores al 24%, y en algunos casos se observan incrementos de concentración posiblemente debido a la composición química del componente dietario ensayado. En las muestras de arroz los minerales más afectados por los componentes son Ca, Fe y P, cuyas reducciones en la bioaccesibilidad varían dependiendo del tipo de arroz. Así, en el arroz blanco hay que destacar las reducciones de Ca por parte del Fe(III) y la HPC, la disminución de Fe por la HPC, la combinación calcio/fitato y el ácido tánico, y la reducción del P por parte del Fe(III) y la combinación calcio/fitato. En el arroz integral, las sales de Fe y Ti reducen las fracciones solubles de Ca y P tras la digestión gastrointestinal, en proporciones que varían entre 38% y 90%.

Tabla 11. Modificación de la bioaccesibilidad de Ca, Mg, K, Fe y P en muestras de alimentos tras aplicar la digestión gastrointestinal en presencia de componentes alimentarios. Valores expresados como porcentajes respecto a las digestiones realizadas sin componentes (media, n=2). Los valores negativos indican reducciones en presencia de estos componentes.

	Componentes	Ca	Mg	K	Fe	P
Arroz blanco	Fe(II)	0.5	-17	-1	2400	68
	Fe(III)	-81	11	-5	721	-80
	TiO ₂	22	-12	-9	100	-6
	HPC	-98	-19	-5	-58	-5
	Calcio/fitato	15468	956	359	-100	-65
	Ácido tánico	316	891	-3	-95	89
Arroz integral	Fe(II)	-63	16	-25	386	-83
	Fe(III)	-90	-7	-37	2064	-54
	TiO ₂	-67	-5	-19	-100	-38
	HPC	-5	-5	19	122	12
	Calcio/fitato	31596	362	69	-70	-91
	Ácido tánico	51	2899	576	-94	979
Algas	Fe(II)	22	4	11	21846	-8
	Fe(III)	4	-2	0.2	24744	11
	TiO ₂	8	18	10	-4	-7
	HPC	-3	-17	-18	-24	-0.4
	Calcio/fitato	12631	169	251	33	36
	Ácido tánico	12	671	-29	-100	-92

DISCUSIÓN

Tras la ingesta del alimento la cantidad del tóxico que llega a la circulación sistémica puede reducirse actuando a distintos niveles. Posiblemente, el empleo de componentes que unan el As solubilizado durante la digestión dando lugar a complejos de baja solubilidad sea una de las aproximaciones más idóneas. En este trabajo se ha utilizado esta aproximación, seleccionando los componentes inorgánicos a ensayar en base a la información publicada sobre estrategias de eliminación del As de aguas residuales o destinadas a consumo humano, donde el As inorgánico es la forma mayoritaria. Los componentes más empleados para este fin son las sales de Fe, Al, Mn y Ti (Bissen y Frimmel, 2003; Mohan y Pittman, 2007). Los resultados obtenidos en el presente capítulo evidencian que, en presencia de Fe, Al y Ti se produce una importante reducción de la cantidad de As soluble tras la digestión gastrointestinal. Este descenso tiene lugar tanto en patrones acuosos como en muestras de alimentos, si bien se observa un claro efecto de la matriz alimentaria. Así, en las algas la reducción de la bioaccesibilidad es menor tras los tratamientos con las sales de Fe y Al, indicando que determinados componentes del alimento podrían interferir en la adsorción/coagulación del As. Este resultado está en línea con los reportados en estudios medioambientales, donde se muestra que la presencia de concentraciones elevadas de fosfatos, sulfatos y silicatos disminuye la eficacia del tratamiento con óxidos de Fe o Al (Jeong *et al.*, 2007; Tuutijärvi *et al.*, 2012).

En muestras de agua se ha comprobado que los adsorbentes/coagulantes en forma de sales actúan con mayor eficacia sobre el As(V) que sobre el As(III), incluso se recomienda como un paso necesario dentro de las estrategias de eliminación la oxidación previa de As(III) a As(V) (Sorlini y Gialdini, 2010). Este efecto, sin embargo, no se observa en patrones de As(III) y As(V) tras el proceso de digestión gastrointestinal, ya que el Fe y el Ti reducen por igual la bioaccesibilidad de ambas especies inorgánicas.

En cuanto a la seguridad del empleo de estas sales como estrategias de intervención poblacional, hay que destacar que todas ellas forman parte de alimentos o son utilizadas como aditivos alimentarios. En la Unión Europea, el dióxido de Ti (E171) está autorizado como colorante en los productos alimenticios (Directiva 94/36/CE). Además, la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA, 2005) ha autorizado el uso de dióxido de Ti en los alimentos, en concentraciones inferiores al 1%. El Al también está autorizado como aditivo. La Unión Europea permite la utilización de aditivos que contienen Al en algunos alimentos; en concreto, se permite el uso de sulfatos de Al (E520-E523) en clara de huevo y en frutas y verduras glasé, confitadas o cristalizadas (Directiva 95/2/CE). En cambio, a diferencia del Ti, el Al puede tener ciertas implicaciones toxicológicas dependiendo de la concentración (EFSA, 2008). El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA, 2007) propone una ingesta diaria provisional tolerable de 0.15 mg/kg pc, lo que supone una ingesta de 9 mg/día para un adulto de 60 kg de peso. En este capítulo, las reducciones significativas de la bioaccesibilidad de As tienen lugar a concentraciones entre 5 y 50 mg, por tanto, aunque el sulfato de Al es eficaz eliminando As de la fracción disponible para la absorción intestinal, las concentraciones necesarias no son adecuadas para garantizar la completa seguridad de la estrategia.

Además del efecto sobre la bioaccesibilidad observado en presencia de las sales anteriormente mencionadas, es interesante destacar la reducción producida por la combinación calcio/fitato (1/5), el ácido tánico y algunas celulosas. El fitato por sí mismo no es capaz de reducir la solubilidad de ninguna de las formas arsenicales, sin embargo, combinado con CaCl_2 produce disminuciones en los patrones acuosos (48-70%) y en las matrices alimentarias (30-49%). La formación de complejos fitato-As inorgánico es difícil de explicar. El grupo fosfato del ácido fítico, cargado negativamente, se une fuertemente a los cationes

metálicos haciéndolos insolubles (Bohn *et al.*, 2008), pero difícilmente pueden formar complejos con aniones. En muestras de alimentos, existe la posibilidad que tras la digestión, una parte del As esté unido a proteínas y pequeños péptidos y en esta forma pueda interactuar con el fitato. Las interacciones proteínas/fitatos son bien conocidas y la reducción de la biodisponibilidad de las proteínas por fitatos es un fenómeno muy estudiado (Cheryan, 1980; Kies *et al.*, 2006). La presencia de un exceso de Ca favorece la precipitación del complejo. Se ha reportado que por encima de pH 6, la mayor precipitación de fitato ocurre a proporciones molares de calcio/fitato entre 4 y 6.5 (Grynspan y Cheryan, 1983), similares a las empleadas en el presente estudio.

El ácido tánico es rico en grupos carboxilo, y por tanto tiende a interactuar con cationes en disolución tales como Cd y Pb (Pekdemir *et al.*, 2000). De hecho, se ha visto que la administración de una disolución al 2% de ácido tánico reduce la acumulación de estos tóxicos en ratas (Winiarska-Mieczan *et al.*, 2013). Sin embargo, la interacción del ácido tánico con las especies arsenicales no puede estar basada en los mismos mecanismos. Al igual que se ha comentado para los fitatos, posiblemente la interacción As-tánico se produzca a través de la unión del As a proteínas u otro tipo de moléculas. El ácido tánico y las proteínas interactúan para formar complejos solubles e insolubles, y estos últimos se ven favorecidos por un pH cercano al punto isoelectrico de la proteína y un exceso de ácido tánico (Van Buren y Robinson, 1969).

Respecto a los derivados de celulosa, HPC y HPMC, posiblemente el efecto se deba a una interacción física. Estos hidrocoloides durante su hidratación forman una red en la que pueden quedar retenidos los componentes solubles en el medio, red que presenta alta resistencia a la digestión gastrointestinal (Sanz y Luyten, 2006). El hecho de que HPC sea más efectiva que HPMC en la reducción de la bioaccesibilidad de As puede deberse a las condiciones de precipitación de esta celulosa. El fenómeno de precipitación aumenta con la cantidad de

sustituyentes hidroxipropilo (Haque *et al.*, 1993; Carotenuto y Grizzuti, 2006), la cual es mayor en el HPC. El empleo de ambos derivados de celulosa en la industria alimentaria está muy extendido; se consideran sustancias GRAS (generally recognised as safe) y su uso como estrategia dietética a las concentraciones adecuadas podría ser viable.

El beneficio que supone la disminución de la bioaccesibilidad de As por parte de las estrategias comentadas no es el único aspecto a valorar. Este trabajo ha puesto de manifiesto que algunos de los componentes ensayados disminuyen significativamente la bioaccesibilidad de minerales, especialmente en muestras de arroz. El impacto de este descenso debe evaluarse en estudios *in vivo* y en el contexto de una dieta completa para determinar si la aplicación de las estrategias conlleva efectos adversos asociados al estado nutricional.

CONCLUSIONES

El empleo de sales férricas, ferrosas o de titanio, la combinación calcio/fitato y la integración de derivados de celulosas o ácido tánico en la dieta, bien en forma de suplementos o bien adicionados a los alimentos, pueden ser estrategias para conseguirlo ya que disminuyen *in vitro* la bioaccesibilidad del As. Estos componentes, que se ingieren de forma habitual con la dieta o son aceptados como aditivos alimentarios, no deberían ser perjudiciales a las concentraciones empleadas en este estudio. Sin embargo, en algunos casos, la adición de estos componentes produce la reducción de la bioaccesibilidad de minerales, especialmente del Ca y Fe en las muestras de arroz.

La eficacia de las estrategias propuestas y su seguridad deben confirmarse *in vivo*, ya que la interacción observada durante la digestión *in vitro* podría verse afectada por otros componentes presentes en el lumen incluida la acción de la microbiota intestinal. Este punto se abordará en el capítulo 5 de la presente tesis.

Capítulo 3

Evaluación del efecto de bacterias lácticas y *Saccharomyces cerevisiae* sobre la bioaccesibilidad de las formas arsenicales

En el capítulo 3 se continúa con la búsqueda de elementos de la dieta que pudieran reducir la bioaccesibilidad de As inorgánico, evaluando en este caso la eficacia del empleo de cepas de bacterias lácticas y de *S. cerevisiae* de uso alimentario. Se trata en ambos casos de microorganismos con status GRAS, que en condiciones normales pueden ser introducidos en la dieta sin problemas derivados de su seguridad alimentaria (JECFA, 2001).

Una de las principales aplicaciones de las bacterias lácticas es su uso en la fermentación de productos lácteos y en la producción de vinos y cervezas. Además de ser buenos conservantes, gracias a la acción microbiana de alguno de los productos finales de su fermentación, también mejoran las características organolépticas y la calidad nutricional del producto. En los últimos años, también se están empleando como suplementos dietéticos o en la fabricación de alimentos funcionales. La mayor parte de microorganismos catalogados como probióticos (microorganismos vivos que se introducen en la dieta y que, tras ser ingeridos en cantidad suficiente, ejercen un efecto beneficioso en la salud) son bacterias acidolácticas, especialmente del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Ljungh y Wadström, 2006).

Las levaduras del género *Saccharomyces*, especialmente *S. cerevisiae*, también han sido empleadas desde la antigüedad en numerosos procesos fermentativos dentro de la industria alimentaria. Recientemente, ciertas cepas de *S. cerevisiae* están siendo usadas como suplementos alimenticios debido a su alto contenido en vitaminas, minerales y proteínas (Ferreira *et al.*, 2010) y como agentes probióticos en el tratamiento de diarreas crónicas, recurrentes o agudas (Czerucka *et al.*, 2007; McFarland, 2010).

Estudios previos muestran que algunas de estas cepas tienen capacidad de unir cationes metálicos, incluso algunos elementos de naturaleza aniónica como el As y el Cr (Monachese *et al.*, 2012; Chiocchetti *et al.*, 2018). La mayoría de estos

estudios se han llevado a cabo por contacto de los microorganismos con agua adicionada con el tóxico y la posterior determinación de la captación celular. La interacción de las bacterias lácticas o levaduras con elementos traza tóxicos en las condiciones en las que se produce la digestión gastrointestinal o en presencia de alimentos sólo se ha confirmado para las formas mercuriales más habituales en alimentos (Jadán-Piedra *et al.*, 2017a, 2017b).

RESULTADOS

1. ESTUDIO SOBRE LA CAPACIDAD DE BACTERIAS LÁCTICAS Y *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* DE UNIR ARSÉNICO INORGÁNICO

Las tablas 12 y 13 muestran la cantidad de As captada por las bacterias lácticas y las levaduras respectivamente tras un contacto con disoluciones salinas (PBS) de As(III) y As(V) (1 mg/L) durante 4 h. Los resultados muestran que ninguna de las cepas evaluadas tiene una elevada capacidad de retención del As inorgánico. Los porcentajes de retención no superan el 6% del As adicionado inicialmente al medio. Este hecho contrasta con los datos obtenidos para otros elementos traza tóxicos (Jadán-Piedra *et al.*, 2017a, 2017b), incluso con las captaciones reportadas para As(III) por *L. acidophilus* (Singh y Sarma, 2010) y *S. cerevisiae* procedente de los residuos de una cervecera (Wu *et al.*, 2012).

Con el fin de incrementar las retenciones obtenidas, se planteó caracterizar el tipo de interacción entre el metaloide y las bacterias y levaduras. Para tal fin se estudiaron diferentes factores que pudiesen influir en la captación (apartado 2, presente capítulo).

Tabla 12. Captación de As inorgánico (1 mg/L) por cepas de bacterias lácticas. Retención celular de As tras exposición de las cepas bacterias lácticas (DO 10) a As(III) y As(V) (1 mg/L, 10 mL) en PBS durante 4 h. Valores expresados como ng As (media \pm SD, n=3) y en porcentaje de retención respecto a la adición de As(III) o As(V).

Cepa	As(III)		As(V)	
	ng	%	ng	%
BL7	56.2 \pm 6.3	0.5	7.2 \pm 0.1	0.1
BL10	183.6 \pm 1.5	1.9	72.0 \pm 16.1	0.8
BL17	317.1 \pm 25.7	3.3	48.9 \pm 2.1	0.6
BL23	61.3 \pm 5.8	1.2	48.8 \pm 15.4	0.9
BL36	314.3 \pm 14.4	3.0	232.2 \pm 4.9	2.9
BL73	225.8 \pm 10.1	2.9	47.8 \pm 8.7	0.5
BL75	229.0 \pm 11.1	3.2	59.8 \pm 6.4	0.6
BL166	101.7 \pm 8.3	1.3	2.6 \pm 0.6	0.1
BL221	140.2 \pm 11.9	1.2	42.4 \pm 12.2	0.4
BL278	96.1 \pm 12.4	1.4	30.2 \pm 9.0	0.3
BL279	115.6 \pm 0.4	1.2	12.6 \pm 0.2	0.1
BL280	211.8 \pm 5.5	2.5	32.0 \pm 3.1	0.5
Lpp ⁺	260.3 \pm 21.2	2.6	438.8 \pm 19.0	5.6

Tabla 13. Captación de As inorgánico (1 mg/L) por cepas de *S. cerevisiae*. Retención celular de As tras exposición de las cepas de levaduras (DO 4) a As(III) y As(V) (1 mg/L, 5 mL) en PBS durante 4 h. Valores expresados como ng As (media \pm SD, n=3) y en porcentaje de retención respecto a la adición de As(III) o As(V).

Cepa	As(III)		As(V)	
	ng	%	ng	%
2	17.8 \pm 0.9	1.3	9.3 \pm 2.3	0.6
3	15.5 \pm 2.1	1.1	7.9 \pm 0.3	0.6
4	21.3 \pm 0.4	0.4	16.3 \pm 1.0	0.3
7	20.1 \pm 3.1	0.4	7.8 \pm 3.0	0.1
8	96.6 \pm 4.1	1.9	27.0 \pm 2.5	0.4
9	246.3 \pm 29.0	5.0	18.9 \pm 2.1	0.3
10	142.8 \pm 1.7	2.9	10.8 \pm 1.0	0.2

2. FACTORES QUE AFECTAN LA CAPTACIÓN DE ARSÉNICO INORGÁNICO

2.1. Concentración de las especies arsenicales

Algunos estudios sobre captación de metales por bacterias o levaduras indican que a medida que aumenta la concentración se reduce la captación del elemento (Chiocchetti *et al.*, 2018). Para determinar si ésta es la razón de la baja acumulación observada en el apartado 1, se ha ensayado una concentración menor de las formas arsenicales (0.1 mg/L frente a 1 mg/L). La tabla 14 muestra la retención celular de las cepas de bacterias lácticas y *S. cerevisiae* tras la exposición.

Tabla 14. Captación de As inorgánico (0.1 mg/L) por cepas de bacterias lácticas y levaduras. Retención celular de As tras exposición de las cepas de bacterias lácticas (DO 10) y levaduras (DO 4) a As(III) y As(V) (0.1 mg/L, 5 mL) en PBS durante 4 h. Valores expresados como ng As (media \pm SD, n=3) y en porcentaje de retención respecto a la adición de As(III) o As(V).

	Cepa	As(III)	As(V)
Bacterias lácticas	BL17	14.0 \pm 1.3 (4.7%)	7.5 \pm 0.2 (1.9%)
	BL36	21.4 \pm 2.1 (7.1%)	19.4 \pm 2.7 (5.4%)
	Lpp ⁺	33.9 \pm 2.3 (11.5%)	12.8 \pm 1.5 (4.4%)
	BL75	9.1 \pm 1.7 (3.1%)	7.7 \pm 0.6 (2.2%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2	27.3 \pm 0.9 (5.5%)	22.6 \pm 0.1 (4.5%)
	3	9.3 \pm 0.1 (1.9%)	17.7 \pm 3.2 (3.6%)
	8	23.4 \pm 1.7 (4.9%)	6.6 \pm 1.1 (1.1%)
	9	27.8 \pm 3.2 (5.8%)	7.4 \pm 1.1 (1.2%)
	10	16.0 \pm 5.2 (3.3%)	6.2 \pm 1.3 (1.0%)

Se observa para ambos tipos de microorganismos un aumento del porcentaje de retención respecto a los obtenidos a la concentración de 1 mg/L (tablas 12 y 13); sin embargo, no se trata de retenciones relevantes (bacterias lácticas: 2-12%; levaduras: 1-6%). Estos datos indican que la baja retención observada a la concentración más alta no se debe a un proceso de saturación, ya que también se evidencia una reducida acumulación a la concentración más baja.

2.2. Viabilidad de los microorganismos

Debido al carácter aniónico del As(III) y del As(V), posiblemente la interacción a superficie sea minoritaria ya que las superficies celulares de ambos microorganismos presentan mayoritariamente cargas negativas. No obstante, para evaluar si la interacción es superficial o requiere de alguna forma de transporte se ha ensayado la captación de As por las bacterias y levaduras tras ser sometidas a un tratamiento térmico que reduce de forma importante su viabilidad. La figura 14 muestra la captación de los microorganismos tratados y no tratados térmicamente

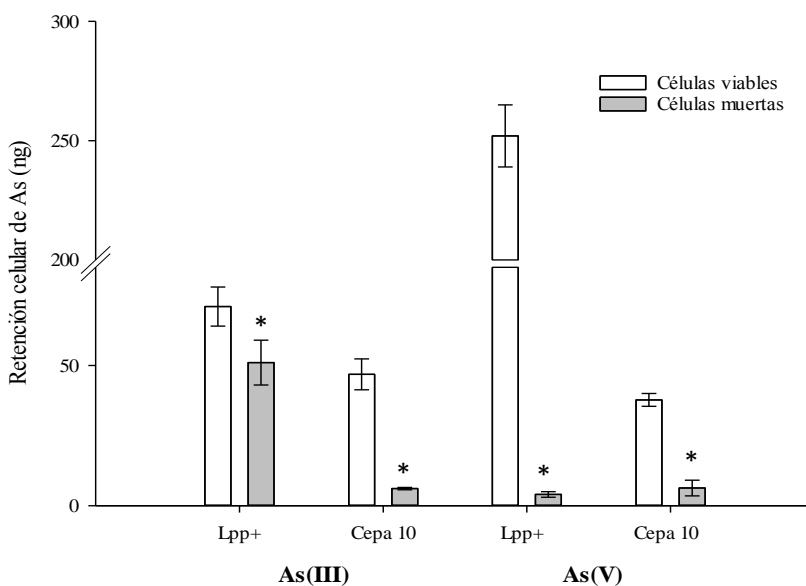


Figura 14. Efecto de la viabilidad de la cepa en la captación de As inorgánico. Captación de As(III) y As(V) (1 mg/L, 5 mL) tras exposición durante 4 h de la cepa bacteriana Lpp⁺ (DO 10) y la cepa 10 de levadura (DO 4) con o sin tratamiento térmico previo. Valores expresados como ng As (media ± SD, n=3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas de la retención por parte de los microorganismos tratados térmicamente respecto a los no tratados ($p < 0.05$).

En cualquiera de las condiciones la captación es baja, si bien la viabilidad favorece la acumulación celular. Estos resultados sugieren que la captación se ve favorecida por algún proceso que precisa del metabolismo/transporte celular, el cual coexiste con un proceso de interacción superficial con componentes celulares, especialmente notable en la captación de As(III) por parte de las bacterias.

2.3. Medio de incubación

Estudios en otros sistemas celulares han evidenciado que parte del transporte de As(V) tiene lugar a través de los transportadores de fosfato debido a la similitud estructural de ambos oxoaniones (Villa Bellosta y Sorribas, 2008; Calatayud *et al.*, 2012a). Para el As(III) se han descrito otro tipo de transportadores; algunas permeasas de glucosa, aquaporinas y transportadores de aniones orgánicos (Liu *et al.*, 2002, 2006; Calatayud *et al.*, 2012a). Por tanto, el transporte de As inorgánico puede verse afectado por la presencia de los sustratos de estos transportadores debido a fenómenos de competencia. Para determinar este punto, se han llevado a cabo incubaciones con diferentes medios. Para ninguno de los medios ensayados se observa cambios de la captación del As(III) por parte de los microorganismos (datos no mostrados). Los cambios de captación observados para As(V) se muestran en la figura 15.

La incubación con medio salino sin fosfato (NaCl 0.9%) incrementa la captación de As(V) en ambas cepas con respecto a los datos obtenidos con PBS. La adición de fosfato inorgánico al medio salino a la misma concentración a la que se encuentra en el PBS (NaCl 0.9% + 10 mM de Pi) reduce significativamente la cantidad de As(V) acumulado por bacterias y levaduras. La presencia de glucosa en el medio sólo aumenta la entrada de As(V) en levaduras (retención: 7-10%).

La inhibición de la acumulación de As(V) en presencia de fosfato sugiere una competencia entre ambos elementos, debido posiblemente al empleo de un transportador común, tal y como se ha evidenciado en otros organismos (apartado 6.1, introducción). El hecho de que la glucosa incremente el transporte de As(V) en levaduras puede deberse a que el transporte al interior celular sea dependiente de energía.

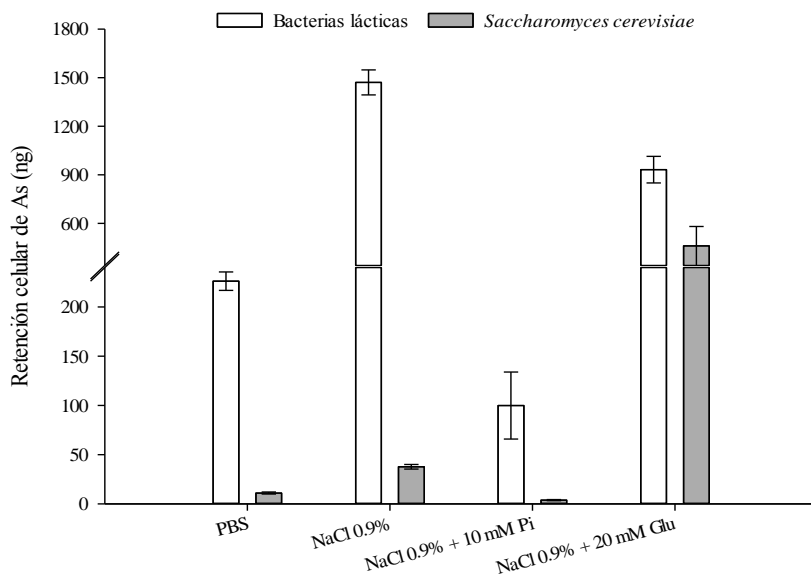


Figura 15. Efecto del medio de incubación sobre la captación de As inorgánico por bacterias lácticas y levaduras. Retención celular de As tras exposición de la cepa bacteriana Lpp⁺ (DO 10) y la cepa 10 de levadura (DO 4) a As(III) y As(V) (1 mg/L, 5 mL) en diferentes medios de incubación durante 4 h. Valores expresados como ng As (media ± SD, n=3).

Adicionalmente se evaluó la concentración de fosfato inorgánico necesaria para producir la reducción de la acumulación celular de As(V) en bacterias y levaduras. La figura 16 muestra la cantidad intracelular de As(V) en ambos

microorganismos en ausencia de fosfato inorgánico y a concentraciones crecientes del mismo en el medio (0.01-10 mM).

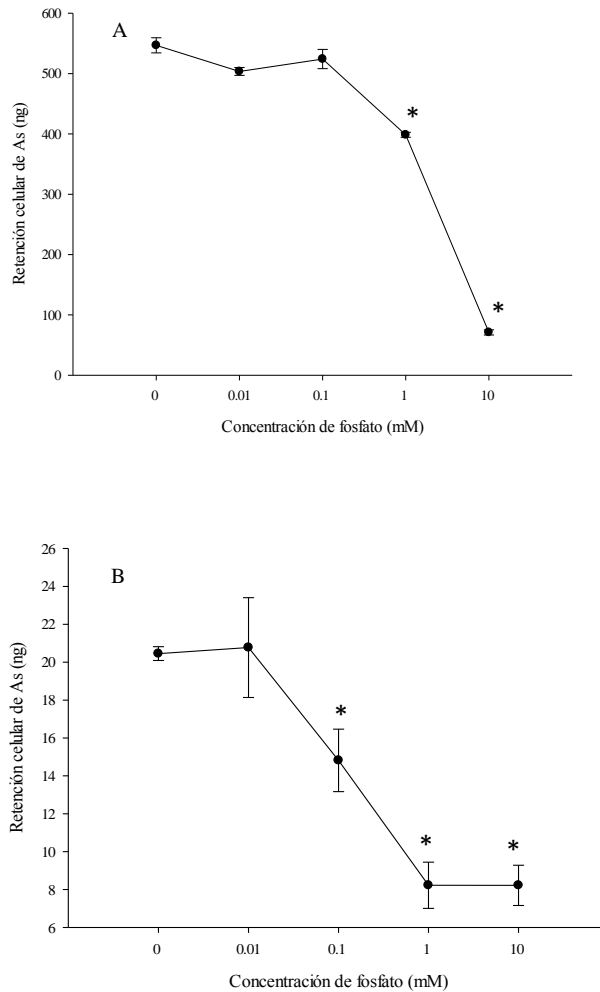


Figura 16. Efecto de la concentración de fosfato inorgánico sobre la captación de As(V). Retención celular de As tras exposición de la cepa Lpp⁺ (DO 10, figura 16A) y la cepa 10 de *S. cerevisiae* (DO 4, figura 16B) a As(V) (1 mg/L, 5 mL) en medio salino (NaCl 0.9%) con diferentes concentraciones de fosfato inorgánico durante 4 h. Valores expresados como ng As (media \pm SD, n=3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto a la retención en ausencia de fosfato ($p < 0.05$).

Los resultados muestran que a partir de 0.1 mM de fosfato inorgánico, la retención de As(V) empieza a reducirse. En bacterias lácticas, se observa un 27% de reducción en la acumulación con 1 mM de fosfato inorgánico y un 88% de reducción en presencia de 10 mM. La retención de As(V) a las concentraciones de fosfato habituales en el plasma de adultos (0.9-1.4 mM, Nadaraja, 2011) son elevadas (38-40%). En *S. cerevisiae*, la reducción es del 28% a la concentración de 0.1 mM de fosfato inorgánico y del 60% para las concentraciones de 1 y 10 mM; sin embargo, incluso en ausencia de fosfato inorgánico los porcentajes de retención en levaduras son bajos.

Los datos muestran que las levaduras no son capaces de captar más de un 10% del As inorgánico adicionado; sin embargo, la cepa bacteriana Lpp⁺ puede llegar a captar cantidades relevantes de As(V) a concentraciones de fosfato en el medio ≤ 1 mM. Para determinar si estas condiciones también favorecen la captación en otras bacterias lácticas, se han incubado las cepas BL36, LGG y BL10 con As(V), empleando un medio con una concentración de fosfato de 1 mM (figura 17). Los resultados muestran que las captaciones son también importantes para BL36 (25%) y BL10 (28%). *L. plantarum* LGG, sin embargo, no presenta una elevada acumulación celular (9%).

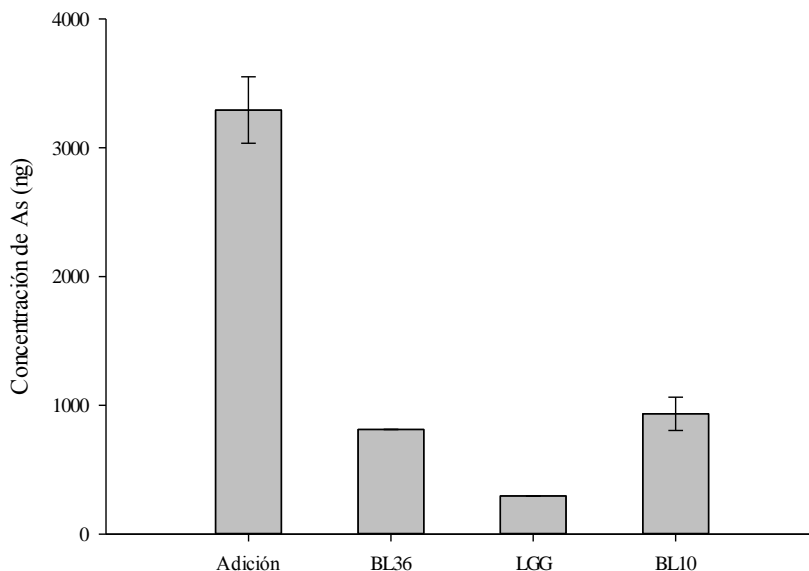


Figura 17. Captación de As(V) por cepas de bacterias lácticas en un medio con fosfato inorgánico 1 mM. Retención celular de As tras exposición de las cepas de bacterias lácticas (DO 10) a As(V) (1 mg/L, 5 mL) en NaCl 0.9% con tampón fosfato sódico 1 mM durante 4 h. Valores expresados como ng As (media \pm SD, n=3).

3. EFECTO DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS Y LEVADURAS SOBRE LA BIOACCESIBILIDAD DE ARSÉNICO INORGÁNICO

Los datos obtenidos en los ensayos de captación muestran que las bacterias lácticas y las levaduras ensayadas no son capaces de captar As inorgánico de forma significativa, a menos que las concentraciones de fosfato inorgánico del medio sean inferiores a 1 mM. Este hecho sugiere que estos microorganismos no son buenas estrategias para conseguir la reducción de la cantidad de As que queda disponible tras la digestión. Sin embargo, debido a que las condiciones del proceso digestivo son diferentes a las empleadas en los estudios de captación y que durante el proceso se adicionan diferentes enzimas con actividades que

podrían modificar la superficie de estos microorganismos, se creyó conveniente determinar la captación de As inorgánico por parte de estos microorganismos durante el proceso digestivo.

La acumulación celular de As(III) y As(V) (1 mg/L) en bacterias y levaduras tras aplicar una digestión gastrointestinal simulada se muestra en las tablas 15 y 16 respectivamente. Los datos muestran que la captación no es relevante para ninguna de las cepas ensayadas (< 9%), y que por tanto estos microorganismos no son adecuados para su empleo como reductores de la cantidad de As bioaccesible. La reducción de la captación observada, especialmente en bacterias, con respecto a los resultados obtenidos cuando se trabaja con un medio con fosfato 1 mM (figuras 16-17) puede ser debido al aporte de fosfato de los diferentes enzimas y sales que se emplean para la digestión gastrointestinal *in vitro*.

Tabla 15. Captación de As inorgánico por cepas de bacterias lácticas durante la digestión gastrointestinal. Retención celular de As tras la digestión gastrointestinal conjunta de cepas de bacterias lácticas (DO 10) con disoluciones de As(III) y As(V) (1 mg/L, 10 mL). Valores expresados como ng As (media ± SD, n=3) y en porcentaje de retención respecto a la adición de As(III) o As(V).

Cepas	As(III)		As(V)	
	ng	%	ng	%
BL36	327 ± 22	8	13 ± 1	0.3
BL10	329 ± 30	8	17 ± 2	0.5
Lpp ⁺	388 ± 28	9	20 ± 5	0.5

Tabla 16. Captación de As inorgánico por cepas de *S. cerevisiae* durante la digestión gastrointestinal. Retención celular de As tras la digestión gastrointestinal conjunta de cepas de levaduras (DO 4) con disoluciones de As(III) y As(V) (1 mg/L, 25 mL). Valores expresados como ng As (media \pm SD, n=3) y en porcentaje de retención respecto a la adición de As(III) o As(V).

Cepas	As(III)		As(V)	
	ng	%	ng	%
2	1455 \pm 181	4	834 \pm 7	3
3	1375 \pm 59	4	1262 \pm 37	4
9	1815 \pm 46	5	779 \pm 78	3

DISCUSIÓN

El empleo de microorganismos por su capacidad de captar elementos traza tóxicos se ha extendido en los últimos años. Su uso como estrategia de bioremediación ha dado resultados satisfactorios. La concentración de elementos como As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni y Pb se ha reducido de forma considerable en suelos y aguas contaminadas tras aplicar métodos convencionales coadyuvados por microorganismos normalmente inmovilizados sobre diferentes tipos de materiales o mediante el empleo de bacterias y levaduras sin otro tratamiento complementario (Dixit *et al.*, 2015; de Alencar *et al.*, 2017, Niloofar *et al.*, 2017). Estas aplicaciones, inicialmente sólo medioambientales, se han extendido a otros campos. Así, Zhai *et al.* (2016) han conseguido reducir considerablemente (46-62%) el Cd presente en zumos vegetales empleando *L. plantarum* CCFM8610 (10^7 UFC/mL). Da Silva y Gonzaga do Prado-Filho (1999) también ponen de manifiesto una captación de Cd por parte de *S. cerevisiae* (10%) durante el proceso de fermentación del mosto de la caña de azúcar.

La captación de metales/metaloides por bacterias y levaduras se produce principalmente a través de dos mecanismos: adsorción del elemento a superficie y/o internalización. La superficie de las bacterias lácticas está compuesta por una capa gruesa de peptidoglucanos, ácidos (lipo) teicoicos, proteínas y polisacáridos. Algunas cepas también pueden producir exopolisacáridos. Estas estructuras contienen varios grupos con carga negativa que pueden favorecer la unión a superficie de cationes metálicos. Teemu *et al.* (2008) ponen de manifiesto que la unión de Cd y Pb a *L. fermentum* ME3 y *Bifidobacterium longum* 46 se reduce cuando las cargas negativas de los grupos carboxilo y fosforilo se neutralizan químicamente, hecho que evidencia la participación de estos grupos funcionales en la adsorción de ambos metales. El papel de los grupos carboxilo de las

proteínas de la capa S de *L. kefir* también se ha evidenciado importante para la captación de metales como el Cd, Zn, Pb y Ni (Gerbino *et al.*, 2011).

La pared celular de la levadura también se compone de varias capas que contienen grupos aniónicos. La capa interna, que consiste en β -D-glucanos [β (1,3)- y β (1,6) -D-glucanos] y quitina, representa 50-60% del peso seco de la pared. La capa externa está formada por manoproteínas fuertemente glicosiladas. Se ha identificado el papel de los fosfomananos y los grupos carboxilo de las proteínas de la pared celular de la levadura *S. cerevisiae* en la unión de cationes metálicos (Seki *et al.*, 2005).

Esta estructura superficial capaz de interaccionar con cationes metálicos; no resulta tan favorable para la captación de elementos aniónicos como el As inorgánico. Halttunen *et al.* (2007) muestran la baja capacidad de unión de As inorgánico por parte de las bacterias lácticas, que requieren de modificaciones químicas de la superficie (adición de grupos amino) para conseguir acumulaciones relevantes de As(V) ($38 \pm 9\%$). Sin embargo, otros estudios ponen de manifiesto captaciones importantes de las formas inorgánicas en disoluciones acuosas empleando *L. plantarum* y *S. cerevisiae* (Singh y Sarma, 2010; Roy *et al.*, 2013). En el presente estudio, no se ha conseguido una captación elevada de As(III) bajo ninguna condición y sólo algunas cepas de *Lactobacillus* son capaces de captar cantidades de As(V) relevantes (25-40%) cuando las concentraciones de fosfato en el medio no superan 1 mM; situación que no es esperable en el lumen intestinal.

Los diferentes ensayos apuntan a una escasa interacción superficial y a la participación de algún mecanismo de internalización, ya que los microorganismos tratados térmicamente presentan una menor acumulación. La internalización de elementos traza tóxicos también se ha descrito en bacterias y levaduras, y se han identificado algunos transportadores partícipes en la misma. Shen *et al.* (2012)

ponen de manifiesto que la sobreexpresión del transportador de fosfato Pho84 en cepas de *Saccharomyces* aumenta un 50% el transporte de As(V). Shah *et al.* (2010) muestran que las células de *S. cerevisiae* que sobreexpresan la aquagliceroporina Fps1p eliminan un 40% más de As(III) del medio extracelular. También se han identificado transportadores de As inorgánico en bacterias. En *Escherichia coli*, el As(V) se internaliza mediante dos transportadores de fosfato, PST y Pit. PST es un sistema de alta afinidad y baja capacidad inducido por situaciones de deficiencia de fosfato, mientras que el Pit es un sistema constitutivo de baja afinidad y alta capacidad (Yang *et al.*, 2012).

En el presente estudio se evidencia que el transporte de As(V) se reduce en presencia de fosfato en el medio, especialmente en *Lactobacillus*. Este hecho sugiere que el As(V) se acumula en las bacterias lácticas evaluadas gracias a la participación del transportador de fosfato, tal y como indican los trabajos previamente citados (apartado 6.1, introducción). Esta competencia reduce las posibilidades de emplear las bacterias lácticas y las levaduras del género *Saccharomyces* para intentar reducir la cantidad de As que queda soluble tras la digestión (bioaccesibilidad), ya que en el lumen intestinal existen contenidos elevados de fosfato.

CONCLUSIONES

A diferencia de lo que ocurre con otros elementos traza, la adsorción/internalización del As inorgánico en bacterias lácticas y *S. cerevisiae* es baja y esto hace que su eficacia reduciendo la bioaccesibilidad de estas formas arsenicales sea mínima. Estos datos indican que en principio no son alternativas adecuadas para ser empleadas en la reducción de la biodisponibilidad de este metaloide. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la reducción de la biodisponibilidad se puede lograr a través de diferentes vías; por ese motivo no

se ha descartado el uso de estos microorganismos como estrategias de reducción. Así, en el capítulo 4 de la presente tesis se muestran los ensayos realizados con el fin de determinar si estos microorganismos son efectivos reduciendo el transporte intestinal del tóxico, otra vía para disminuir la biodisponibilidad oral.

Capítulo 4

Evaluación del efecto de los componentes alimentarios, las cepas de bacterias lácticas y *Saccharomyces cerevisiae* sobre el transporte intestinal de las formas arsenicales

Los capítulos 2 y 3 han evaluado la posibilidad de reducir la cantidad de As que tras la ingesta llega a la circulación sistémica mediante el empleo de componentes alimentarios o microorganismos de grado alimentario capaces de disminuir la cantidad de elemento que queda soluble tras la digestión y que por tanto está disponible para la absorción. Otra forma de abordar el objetivo de reducir la llegada del tóxico a la circulación sistémica es actuando directamente sobre la absorción intestinal, es decir, sobre el transporte del tóxico a través de la pared gastrointestinal.

La absorción intestinal depende de las características fisicoquímicas de la sustancia y de sus interacciones con los distintos elementos del lumen y la superficie del epitelio gastrointestinal. El proceso de absorción puede verse afectado por diversos mecanismos: la unión del contaminante con compuestos que reducen su solubilidad o su paso a través del epitelio, la competencia entre el contaminante y los compuestos dietéticos por los mecanismos de entrada al epitelio o una modulación de la permeabilidad paracelular del epitelio por acción de estos compuestos (Vázquez *et al.*, 2015).

El objetivo de este capítulo es la búsqueda de estrategias basadas en componentes de la dieta y suplementos, cepas de bacterias lácticas y *S. cerevisiae* capaces de reducir la cantidad de As que se transporta a través de la pared intestinal. El modelo celular empleado ha consistido en un co-cultivo NCM-460/HT29-MTX, ambos tipos celulares procedentes del epitelio colónico humano. Esta combinación trata de emular la composición celular mayoritaria del epitelio intestinal, cuyos tipos celulares más abundantes son los enterocitos (representados por las NCM-460) y las células mucosecretoras (representadas por las HT29-MTX).

RESULTADOS

1. EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LA MONOCAPA CELULAR EN LOS ENSAYOS DE TRANSPORTE

Se llevaron a cabo ensayos de viabilidad previos al diseño de los estudios de transporte con el fin de trabajar en condiciones subletales. Los resultados de viabilidad de las monocapas expuestas a concentraciones entre 0.5 y 2 mg/L de As(III) y As(V) durante 4 h indican que no existen reducciones importantes de la actividad mitocondrial (datos no mostrados). En los ensayos de transporte se ha trabajado a tiempos inferiores a 2 h y concentraciones de 0.75 mg/L, por tanto en condiciones que no afectan la viabilidad celular.

Por otra parte, en todos los ensayos presentados en este capítulo, la permeabilidad de LY de los co-cultivos se ha mantenido dentro de los límites establecidos para considerar la monocapa íntegra (apartado 10.3.4, metodología). Atendiendo a estos resultados, se puede decir que se ha trabajado con monocapas íntegras y que los cambios observados al variar las condiciones de ensayo no son debidos a una desestructuración de la monocapa celular o a una pérdida de viabilidad, si no al propio efecto del tratamiento.

2. COEFICIENTES DE PERMEABILIDAD APARENTE DEL MODELO CELULAR EMPLEADO

El modelo celular empleado en la presente tesis no había sido previamente usado para estudios de transporte de As inorgánico. Las monocapas formadas por los co-cultivos NCM-460/HT29-MTX tienen una mayor apertura intercelular que las producidas por las células Caco-2. Esta mayor apertura implica un aumento en el transporte paracelular, que puede favorecer el transporte de las dos formas inorgánicas de As debido a la importante participación de la vía paracelular en su transporte (apartado 8.1.2, introducción).

La tabla 17 muestra los coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app}) y la retención en células y mucus de las formas inorgánicas de As en el co-cultivo NCM-460/HT29-MTX. El P_{app} obtenido es mayor que el evidenciado por otros autores en monocultivos Caco-2 (Calatayud *et al.*, 2010, 2011). La acumulación celular es baja (< 4%) y no se observa una retención notable en el mucus (< 6%). Este modelo resulta más conveniente que el monocultivo Caco-2 porque incorpora las células mucossecretoras y además presenta una mayor permeabilidad, hecho que facilitará la detección del metaloide.

Tabla 17. Coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}) y retención en células y mucus en el modelo celular ensayado. Valores de P_{app} ($\times 10^{-5}$, cm/s) y acumulación en células y mucus (ng) en co-cultivos NCM-460/HT29-MTX (80/20) expuestos a As(III) y As(V) (0.75 mg/L; 1 μ M) durante 2 h. Valores expresados como media \pm SD (n = 3).

Especie	P_{app} ($\times 10^{-5}$, cm/s)	Retención celular (ng)	Retención mucus (ng)
As(III)	3.8 \pm 0.01	13 \pm 3	13 \pm 2
As(V)	2.8 \pm 0.05	14 \pm 2	18 \pm 5

3. EFECTO DE LOS COMPONENTES ALIMENTARIOS SOBRE LA PERMEABILIDAD DE ARSÉNICO INORGÁNICO

Los componentes de la dieta ensayados (n=25; tabla 7) se han elegido por presentar características que podrían favorecer la reducción del transporte de As inorgánico a través de la monocapa celular mediante los mecanismos previamente descritos (introducción, capítulo 4).

3.1. Efecto de los componentes alimentarios sobre la permeabilidad de disoluciones acuosas de As(III) y As(V)

Las figuras 18 y 19 muestran las reducciones del P_{app} debidas a la adición de los componentes alimentarios en co-cultivos NCM-460/HT29-MTX para As(III) y As(V) respectivamente. El número de tratamientos que reducen significativamente el transporte es elevado para ambas especies [As(III) 84%, As(V) 76%]. En general, se observan mayores reducciones del P_{app} para el As(III), las cuales son destacables en presencia de curcumina (53%), Fe(II) (46%), Cys (44%), fosfato (43%), quercetina (42%), epigallocatequina (41%) y Mg(II) (41%). En el caso de As(V), las reducciones más notables se producen tras la adición de Zn(II) (41%), Ca(II) (40%) y cisteína (36%).

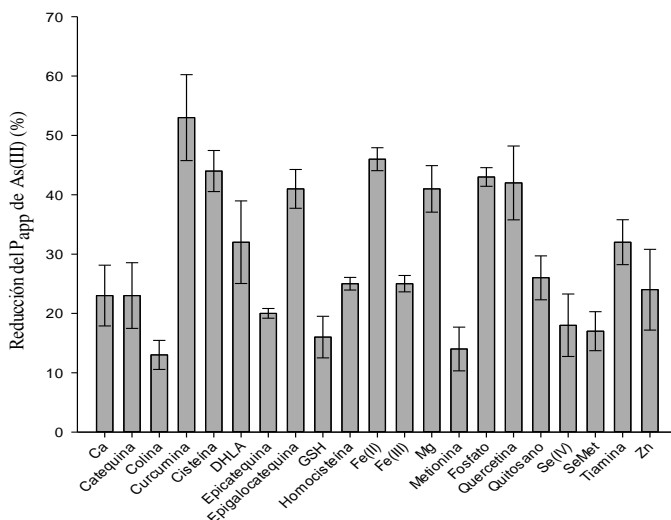


Figura 18. Efecto de los componentes alimentarios sobre el transporte de As(III) en co-cultivos NCM-460/HT29-MTX. Las barras representan los porcentajes de reducción de los coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app}) en co-cultivos NCM-460/HT29-MTX (80/20) co-expuestos a As(III) (0.75 mg/L) y los compuestos alimentarios (37 °C, 2 h). Resultados expresados como media \pm SD (n=3). La figura muestra únicamente las reducciones estadísticamente significativas con respecto al ensayo realizado sin compuestos alimentarios ($p < 0.05$).

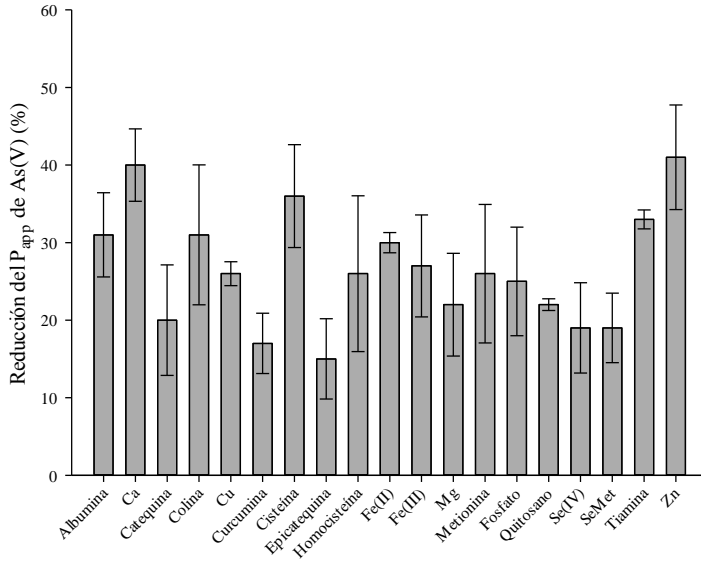


Figura 19. Efecto de los componentes alimentarios sobre el transporte de As(V) en co-cultivos NCM-460/HT29-MTX. Las barras representan los porcentajes de reducción de los coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app}) en co-cultivos NCM-460/HT29-MTX (80/20) co-expuestos a As(V) (0.75 mg/L) y los compuestos alimentarios (37 °C, 2 h). Resultados expresados como media \pm SD (n=3). La figura muestra únicamente las reducciones estadísticamente significativas con respecto al ensayo realizado sin compuestos alimentarios ($p < 0.05$).

3.2. Influencia de suplementos dietéticos y extractos vegetales en la permeabilidad de As(III) y As(V)

Los extractos vegetales y suplementos utilizados (n=7; tabla 8) han sido seleccionados por tratarse de fuentes importantes de los componentes alimentarios que se han mostrado más eficaces reduciendo la permeabilidad de As(III) y As(V) en las disoluciones estándar (apartado 3.1, presente capítulo). Así, se ha evaluado la reducción de la absorción de patrones de As(III) y As(V) en presencia de extractos ricos en polifenoles (té verde, cacao, semilla de uva), en grupos tiol (extracto de ajo, brócoli, alcachofa) y tras la adición de suplementos

de Fe. La figura 20 muestra las reducciones de la permeabilidad de As(III) y As(V) en co-cultivos NCM-460/HT29-MTX.

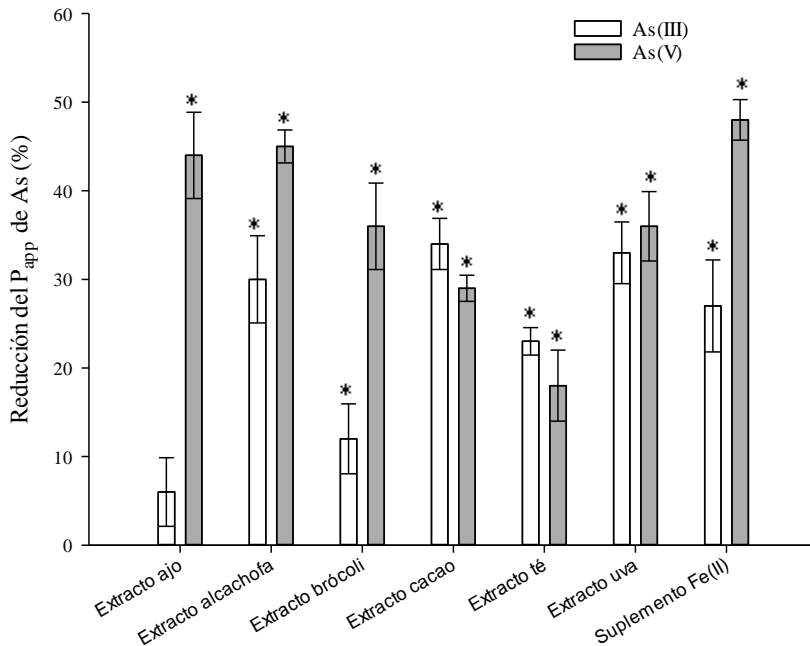


Figura 20. Efecto de los suplementos dietéticos y extractos vegetales sobre el transporte de As(III) y As(V) en co-cultivos NCM-460/HT29-MTX. Las barras representan los porcentajes de reducción de los coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app}) en co-cultivos NCM-460/HT29-MTX co-expuestos a As(III) o As(V) (0.75 mg/L) y los extractos vegetales o suplementos dietéticos (37 °C, 2 h). Resultados expresados como media \pm SD (n=3). Los asteriscos indican reducciones estadísticamente significativas con respecto al ensayo realizado sin extractos o suplementos ($p < 0.05$).

Las reducciones del P_{app} son similares para ambas especies [As(III): 12-34%; As(V): 18-48%]. Hay que destacar las reducciones en presencia de extracto de alcachofa [As(III): 30 ± 5 %; As(V): 45 ± 2 %] y de uva [As(III): 33 ± 4 %;

As(V): 36 ± 4 %]. Adicionalmente se ha evidenciado una reducción elevada del P_{app} de As(V) con el suplemento de Fe (48 ± 2 %).

3.3. Influencia de los componentes alimentarios, suplementos y extractos vegetales sobre la permeabilidad del arsénico presente en alimentos

Para la evaluación de la permeabilidad en alimentos se han seleccionado algas pardas *Hizikia fusiforme* (hijiki) previamente cocinadas y arroz blanco sometido a un proceso de cocción con agua adicionada con As(V). Las muestras de algas presentan contenidos de As total en la fracción soluble (5.6 ± 1.2 mg/kg) que suponen un 45% del As presente en el alga cocinada. En cuanto al arroz, la cantidad de As extraída tras la aplicación del proceso digestivo oscila entre 0.9-1.1 mg/kg, indicando que la mayor parte del As está bioaccesible (74-98%).

Los compuestos alimentarios y los extractos y suplementos seleccionados para el estudio en alimentos fueron los que produjeron reducciones superiores al 35% en la permeabilidad de los estándares de As(III) y/o As(V) (apartados 3.1 y 3.2, presente capítulo). Las tablas 18 y 19 muestran las disminuciones del P_{app} del As para arroz y algas respectivamente en co-cultivos NCM-460/HT29-MTX tras la co-exposición con los componentes alimentarios, extractos o suplementos seleccionados.

Tabla 18. Efecto de los componentes alimentarios, los suplementos dietéticos y extractos vegetales sobre el transporte de As desde arroz. Contenido de As en la fracción bioaccesible añadida a los cultivos celulares (adición), coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}) del As y porcentajes de reducción de P_{app} (media \pm SD, $n=3$). Co-cultivos NCM-460/HT29-MTX (80/20) expuestos durante 90 min a la fracción bioaccesible de muestras de arroz en ausencia o presencia de los componentes alimentarios, extractos o suplementos. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas en los valores de P_{app} con respecto al ensayo realizado sin los compuestos ($p < 0.05$).

	Adición (ng As)	P_{app} ($\times 10^{-5}$ cm/s)	Reducción P_{app} (%)
Componentes alimentarios			
Sin componente	915	1.22	
Cisteína	773	0.68	44 \pm 7 *
Cloruro de Mg	753	0.91	26 \pm 3 *
Curcumina	740	0.37	70 \pm 7 *
Epigallocatequina	913	0.73	40 \pm 6 *
Fosfato de amonio	755	0.77	37 \pm 5 *
Quercetina	707	0.79	35 \pm 1 *
Sulfato de Fe(II)	908	0.97	21 \pm 2 *
Extractos y suplementos			
Sin extracto/suplemento	759	0.33	
Extracto de alcachofa	818	0.15	54 \pm 8 *
Extracto de uva	716	0.13	62 \pm 8 *
Suplemento de Fe(II)	720	0.16	53 \pm 5 *

Tabla 19. Efecto de los componentes alimentarios, los suplementos dietéticos y extractos vegetales sobre el transporte de As desde el alga *Hizikia fusiforme*. Contenido de As en la fracción bioaccesible añadida a los cultivos celulares (adicción), coeficiente de permeabilidad aparente del As (P_{app}) y porcentajes de reducción de P_{app} (media \pm SD, n=3). Co-cultivos NCM-460/HT29-MTX (80/20) expuestos durante 90 min a la fracción bioaccesible de muestras de algas en ausencia o presencia de los componentes alimentarios, extractos o suplementos. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas en los valores de P_{app} con respecto al ensayo realizado sin los compuestos ($p < 0.05$).

	Adición (ng As)	P_{app} ($\times 10^{-5}$ cm/s)	Reducción P_{app} (%)
Componentes alimentarios			
Sin componente	404	1.58	
Cisteína	410	0.98	38 \pm 3 *
Cloruro de Mg	404	1.04	34 \pm 6 *
Curcumina	426	0.94	40 \pm 2 *
Epigallocatequina	405	0.74	53 \pm 4 *
Fosfato de amonio	381	0.75	53 \pm 4 *
Quercetina	425	1.12	29 \pm 3 *
Sulfato de Fe(II)	400	0.63	59 \pm 2 *
Extractos y suplementos			
Sin extracto/suplemento	562	1.10	
Extracto de alcachofa	574	0.93	15 \pm 6 *
Extracto de uva	571	1.03	6 \pm 2
Suplemento de Fe(II)	577	1.03	6 \pm 3

Los datos muestran importantes reducciones en el transporte del As presente en la fracción bioaccesible de los alimentos en presencia de los compuestos ensayados. En arroz, hay que destacar el descenso en el P_{app} ($> 44\%$) en presencia de curcumina y Cys, así como con los extractos de uva y alcachofa y el suplemento de Fe. En algas, los componentes alimentarios son también eficaces,

con reducciones medias que oscilan entre 29 y 59%; sin embargo, los extractos y el suplemento de Fe no producen este efecto. Posiblemente para esta matriz se requieran concentraciones más elevadas.

4. INFLUENCIA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS Y SACCHAROMYCES SOBRE LA PERMEABILIDAD DE ARSÉNICO INORGÁNICO

Se realizaron ensayos preliminares para determinar el tipo de exposición más adecuado para conseguir la reducción de la permeabilidad de las especies arsenicales: una pre-incubación con las bacterias o levaduras durante 2 h y un posterior tratamiento con As(III) o una co-exposición As(III)/microorganismo. Los resultados muestran que para las bacterias sólo la pre-incubación favorece la reducción de la permeabilidad ($33 \pm 18\%$); mientras que para las levaduras se obtiene reducciones similares (pre-incubación: $25 \pm 7\%$; co-exposición: $17 \pm 4\%$). Atendiendo a estos resultados, las bacterias se ensayaron con pre-incubación y las levaduras con co-exposición, en este último caso debido a que este tipo de tratamiento es más sencillo.

4.1. Efecto de las bacterias lácticas sobre la permeabilidad de disoluciones acuosas de As(III) y As(V)

Los ensayos con las bacterias lácticas tras la pre-incubación durante 2 h muestran reducciones importantes del transporte a través de la monocapa intestinal (tabla 20). Las reducciones son mayores para As(III) (33-58%) que para As(V) (15-32%). Son destacables las reducciones de permeabilidad de As(III) observadas con las bacterias BL36, LGG y Lpp⁺.

Tabla 20. Efecto de las bacterias lácticas sobre el transporte de As(III) y As(V). Reducciones de los coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app}) del As en co-cultivos NCM-460/HT29MTX pre-incubados con bacterias (DO 0.6) durante 2 h y posteriormente expuestos a As(III) o As(V) (0.75 mg/L) durante 2 h. Valores expresados como porcentajes de reducción respecto a los ensayos realizados sin pre incubación con bacterias (media \pm SD; n=4). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a los ensayos sin bacterias ($p < 0.05$).

Cepa	Reducción del P_{app} As(III) (%)	Reducción del P_{app} As(V) (%)
BL17	33 \pm 53*	16 \pm 2*
BL36	44 \pm 10*	32 \pm 12*
LGG	48 \pm 16*	25 \pm 5*
Lpp ⁺	58 \pm 12*	15 \pm 4*

4.2. Efecto de las cepas de Saccharomyces sobre la permeabilidad de disoluciones acuosas de As(III) y As(V)

La tabla 21 muestra las reducciones del P_{app} en co-cultivos NCM-460/HT29-MTX para As(III) y As(V) tras la adición de las cepas de levadura (DO 1). La mayoría de las cepas ensayadas reducen significativamente la permeabilidad celular de ambas formas arsenicales. En este caso ocurre lo contrario que con las bacterias lácticas; las mayores reducciones se observan sobre el transporte de As(V), siendo especialmente destacables las producidas por las cepas 2 y 9.

Tabla 21. Efecto de las cepas de Saccharomyces sobre el transporte de As(III) y As(V). Reducciones de los coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app}) de As en co-cultivos NCM-460/HT29MTX co-expuestos a As(III) o As(V) (0.75 mg/L) y levaduras (DO 1) durante 2 h. Valores expresados como porcentajes de reducción respecto a los ensayos realizados sin levaduras (media \pm SD; n=4). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a los ensayos sin levaduras ($p < 0.05$).

Cepa	Reducción del P_{app} As(III) (%)	Reducción del P_{app} As(V) (%)
Cepa 2	32 \pm 3*	49 \pm 1*
Cepa 3	11 \pm 2*	34 \pm 7*
Cepa 9	21 \pm 4*	45 \pm 6*
Cepa 10	21 \pm 4*	22 \pm 4*

4.3. Efecto de las bacterias lácticas y Saccharomyces sobre la permeabilidad del arsénico presente en alimentos

La figura 21 muestra los P_{app} del As presente en las fracciones bioaccesibles de muestras de arroz tras exponer los co-cultivos NCM-460/HT29-MTX en presencia de las cepas de bacterias y levaduras seleccionadas de los ensayos con disoluciones acuosas (apartado 4.1 y 4.2, presente capítulo). Los datos evidencian una reducción significativa de la permeabilidad del As en arroz para la cepa bacteriana Lpp⁺ (45 \pm 13%) y para todas las cepas de levaduras ensayadas (19-27%).

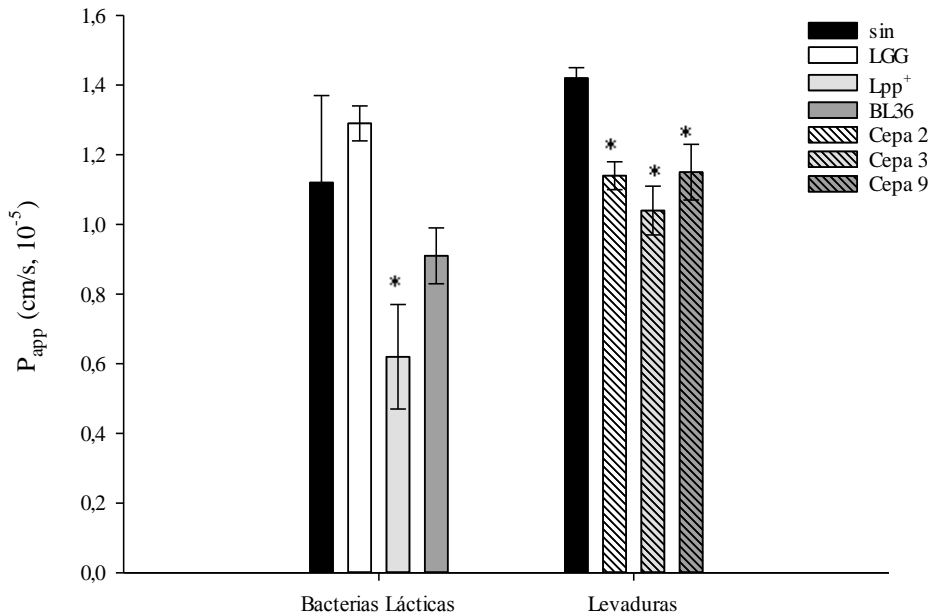


Figura 21. Efecto de las cepas de bacterias lácticas y levaduras sobre el transporte de As desde arroz. Coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app}) de As en co-cultivos NCM-460/HT29-MTX expuestos durante 75 min a las fracciones bioaccesibles en presencia o ausencia de las cepas de bacterias lácticas y levaduras (media \pm SD; n=6). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas en los valores de P_{app} con respecto a los ensayos de permeabilidad realizados sin microorganismos ($p < 0.05$).

DISCUSIÓN

En el presente capítulo se ha continuado con la búsqueda de estrategias dietéticas encaminadas a reducir la biodisponibilidad de As; en este caso buscando compuestos que tuvieran un efecto directo sobre el transporte a través del epitelio. Independiente de la especie inorgánica de As ensayada, el Fe y la Cys reducen de forma muy notable la cantidad de As transportado a través de la monocapa epitelial. Otros componentes son también eficaces, si bien no en todas las condiciones de ensayo; este es el caso del GSH, la quercetina, algunas catequinas, la curcumina y de elementos como el P, Mg y Zn. La reducción se pone de manifiesto tanto en el transporte del As en disolución acuosa como del existente en las fracciones bioaccesibles de alimentos (arroz y algas), indicando que estos compuestos pueden ser la base de estrategias para disminuir la biodisponibilidad oral del As inorgánico presente en cualquier tipo de matriz.

La reducción del transporte intestinal observada en estos ensayos puede ser consecuencia de diferentes mecanismos de acción dependiendo del compuesto considerado. En el caso del Fe, el efecto está relacionado probablemente con su capacidad de formar sales de baja solubilidad con el As, tal y como se ha evidenciado en el capítulo 2, donde se demuestra una reducción de la solubilidad del As cuando la digestión gastrointestinal se realiza en presencia de este mineral.

En referencia a los compuestos con grupos sulfhidrilo (GSH y Cys), también está ampliamente documentada la formación de complejos con las formas inorgánicas de As. Alonzo *et al.* (1984) muestran que los complejos formados por el As(III) y el aminoácido Cys son insolubles en el rango de pHs de 4 a 8. Este hecho explicaría, al menos en parte, que la presencia de Cys conlleve una reducción del paso de As inorgánico a través de la monocapa de células intestinales. Por su parte, los complejos As-GSH se ha visto que son sustratos de las proteínas de resistencia a múltiples drogas (MRP), que median la eliminación

de los compuestos del interior celular, reduciendo de esta forma la acumulación celular y en nuestro caso posiblemente el paso al lado basolateral.

Estos compuestos tiolados además de estar presentes en numerosos alimentos, se emplean como aditivos alimentarios o suplementos. El Comité Científico de Alimentos de la Unión Europea ha autorizado el uso de Cys en el tratamiento de la harina (SCF, 1991). También figura en la legislación de la Comunidad Europea como sustancia que puede utilizarse con fines nutricionales en alimentos elaborados a base de cereales y alimentos para lactantes y niños de corta edad (Directiva 96/5/CE) y en alimentos destinados a usos nutricionales particulares (Directiva 2001/15/CE). La seguridad de la Cys ha sido evaluada por varios organismos y no se ha expresado ninguna preocupación toxicológica en relación con su uso como aditivo alimentario (EFSA, 2006).

En cuanto al GSH, existen en la actualidad numerosos suplementos en el mercado que se han evidenciado beneficiosos en diferentes situaciones. La suplementación con GSH aumenta los niveles de GSH en tejidos y sangre, por tanto, aumenta los efectivos de la maquinaria antioxidante corporal (Sinha *et al.*, 2018). Además, ayuda a reducir el daño tisular causado por las infecciones bacterianas en humanos (De Bruyne *et al.*, 2016). También se ha puesto de manifiesto que mejora el metabolismo lipídico y la acidificación en los músculos esqueléticos durante el ejercicio, lo que supone una menor fatiga muscular (Aoi *et al.*, 2015). Un estudio de toxicidad aguda oral de GSH en ratones evidenció una LD₅₀ superior a 5 g/kg, cantidades muy superiores a la dosis de suplementación normal (250-500 mg/día). En ensayos clínicos, no se han observado reacciones adversas mencionables (Weschawalit *et al.*, 2017).

La quercetina, curcumina y epigallocatequina posiblemente afecten el transporte de As por su efecto sobre la permeabilidad paracelular. Estudios previos han mostrado que las formas inorgánicas de As presentan un importante

transporte a través del espacio paracelular (Calatayud *et al.*, 2010, 2011). Cualquier compuesto que module las uniones estrechas entre células afecta este tipo de transporte. Un aumento de la resistencia eléctrica transepitelial (RET) de la monocapa celular supone un mayor ensamblaje de las uniones estrechas y por tanto un menor paso de los compuestos que se mueven por la vía paracelular. Se ha documentado que estos compuestos polifenólicos pueden llevar a cabo este tipo de modulación. Amasheh *et al.* (2008) demuestran *in vitro* que la quercetina induce un aumento dosis-dependiente de la RET, el cual sugieren es debido al incremento de la expresión de la proteína claudin-4, componente de las uniones estrechas. Los extractos ricos en epigallocatequinas también incrementan la RET de monocapas intestinales diferenciadas (Redan y Ferruzzi, 2015). El efecto directo de la curcumina sobre la permeabilidad celular no se ha evaluado, sin embargo, algunos estudios ponen de manifiesto que revierte la acción de determinados tóxicos que aumentan la permeabilidad paracelular (Wang *et al.*, 2012; Kim y Kim, 2014). La reducción del paso paracelular por parte de estos compuestos también se ha comprobado en el presente capítulo. El P_{app} del LY en co-cultivos tratados únicamente con As ($1.2-1.4 \times 10^{-5}$ cm/s) es mayor que el medido en las monocapas co-expuestas con epigallocatequina ($7.0-6.4 \times 10^{-6}$ cm/s), quercetina ($7.8-6.7 \times 10^{-6}$ cm/s) y curcumina ($4.7-5.7 \times 10^{-6}$ cm/s), indicando una reducción del espacio intercelular.

En cuanto al uso de estos polifenoles como suplementos dietéticos hay que destacar que todos derivan de alimentos, mayoritariamente de vegetales, por tanto, forman parte de la dieta; además se consideran sustancias GRAS. La curcumina también ha sido autorizada como aditivo alimentario por la Unión Europea con niveles máximos permitidos de uso que varían de 20 a 500 mg/kg de alimento (Directiva 94/36/CE). El Comité JECFA ha asignado una ingesta diaria aceptable de hasta 3 mg/kg de peso corporal (JEFCA, 2004). Las concentraciones de curcumina utilizadas en el presente estudio se encuentran

dentro de estos niveles. La quercetina y el galato de epigallocatequina no tienen limitaciones en su consumo. Tras una evaluación crítica de la literatura disponible sobre los efectos de la quercetina, Harwood *et al.* (2007) concluyen que, a los niveles de ingesta habituales, no debe producir efectos adversos para la salud. Diferentes estudios también han demostrado la seguridad del galato de epigallocatequina como suplemento (Chow *et al.*, 2003; Isbrucker *et al.*, 2006).

Otro hecho destacable derivado del presente estudio es que no solo los compuestos puros son eficaces reduciendo la absorción de As inorgánico por las células intestinales, también lo son los extractos vegetales ricos en grupos tiol o en catequinas y los suplementos de Fe. La ingesta de estos suplementos además puede aportar una importante actividad antioxidante y antiinflamatoria (Borek, 2001; Thring *et al.*, 2011), actuando sobre algunos de los efectos tóxicos atribuidos al As inorgánico (Calatayud *et al.*, 2013, 2014). Las reducciones observadas con el uso de estos extractos o suplementos son muy relevantes (hasta 70%), incluso en muestras de arroz.

Además de la eficacia de determinados compuestos de origen alimentario, también se ha evidenciado una reducción del transporte en presencia de microorganismos de uso alimentario. Los estudios de transporte realizados empleando bacterias lácticas y levaduras muestran reducciones importantes con la cepa bacteriana Lpp⁺ y algunas cepas de *S. cerevisiae*. Estas reducciones se producen cuando el As inorgánico está en disolución acuosa y cuando éste forma parte de un alimento. La reducción de la absorción podría ser consecuencia de la formación de un complejo As/microorganismo que no se absorba o bien de una modulación de la permeabilidad de la monocapa celular por parte de los microorganismos que reduzca el transporte. En el capítulo 3 se ha evidenciado que el As no interacciona con las bacterias y levaduras ensayadas, por tanto, la reducción del transporte tiene que ser consecuencia del efecto de estos microorganismos sobre las células intestinales. Se ha puesto de manifiesto que las

bacterias lácticas pueden aumentar la expresión de las proteínas de las uniones intercelulares y modular la permeabilidad de las monocapas intestinales en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Ulluwishewa *et al.*, 2011). También algunas cepas de *S. cerevisiae*, especialmente la variedad boulardii (cepa 7 de nuestro estudio, tabla 6), favorecen la restauración de las uniones estrechas y la permeabilidad de la barrera intestinal tras infecciones bacterianas (Moslehi-Jenabian *et al.*, 2010). Estos estudios demuestran que ambos tipos de microorganismos son capaces de modular el paso paracelular que tiene lugar entre células; por tanto, su acción puede ser similar a la sugerida para la curcumina, epigallocatequina y quercetina.

CONCLUSIONES

Los datos obtenidos en el presente capítulo evidencian que el consumo de probióticos, compuestos con grupos tiol, flavonoides como la quercetina, polifenoles como la epigallocatequina o extractos vegetales o suplementos ricos en los mismos, puede ser una estrategia adecuada para reducir la biodisponibilidad oral de As. Según muestran los resultados, serían útiles tanto si el As se vehicula a través del agua de bebida como de alimentos. Son necesarios estudios *in vivo* para confirmar estos resultados *in vitro*, investigación que constituye el objetivo del capítulo 5.

Capítulo 5

Efecto *in vivo* de los componentes alimentarios sobre la toxicocinética de las disoluciones acuosas de arsénico inorgánico

En los capítulos anteriores se han identificado compuestos y microorganismos de uso alimentario que podrían ser efectivos reduciendo la biodisponibilidad oral de As inorgánico, bien por su capacidad para disminuir la bioaccesibilidad o por su efecto sobre el transporte a través de la monocapa epitelial de células intestinales. Así, en el capítulo 2 se han demostrado la eficacia de algunas sales de Fe, el ácido tánico, la lignina y algunas celulosas como reductores de la bioaccesibilidad del As inorgánico presente en agua y alimentos. En el capítulo 4 se ha evidenciado que algunos compuestos con grupos tiol (Cys, GSH), la curcumina, la epigallocatequina y la quercetina; así como, algunas cepas de bacterias lácticas y *S. cerevisiae* pueden reducir la cantidad de As transportado por las células intestinales.

Los efectos de estos compuestos observados *in vitro* podrían no tener lugar en modelos animales, donde entran en juego muchos otros factores no presentes en los modelos *in vitro*, los cuales podrían modificar las interacciones o modulaciones puestas de manifiesto en los capítulos anteriores. Por tanto, para confirmar la idoneidad de los compuestos seleccionados como futuras estrategias de intervención población, son necesarios ensayos *in vivo*. En este capítulo se han seleccionado algunos de los compuestos más efectivos en la reducción de la bioaccesibilidad y el transporte (sales férricas, ácido tánico y GSH) para determinar *in vivo* el efecto de los mismos sobre la biodisponibilidad y acumulación tisular, empleando para ello ratones BALB/c dosificados mediante sonda gástrica. Adicionalmente se ha determinado si alguno de estos compuestos tiene un efecto negativo en dosificación continuada sobre la biodisponibilidad de elementos esenciales mediante la evaluación de su contenido hepático.

RESULTADOS

1. ESTUDIOS PRELIMINARES PARA LA SELECCIÓN DE LA DOSIS A ENSAYAR

Inicialmente se realizaron ensayos para determinar la dosis que administrada por vía intragástrica permitía obtener valores plasmáticos detectables. Se ensayaron 3 dosis: 0.1, 0.5 y 2 mg/kg pc/día. La elección de estas dosis se basó en estudios previos que apuntaban a este rango de concentraciones como niveles donde no aparecían efectos adversos en exposiciones inferiores a 15 días (ATSDR, 2007). Los resultados obtenidos para ambas especies se muestran en las figuras 22 [As(III)] y 23 [As(V)].

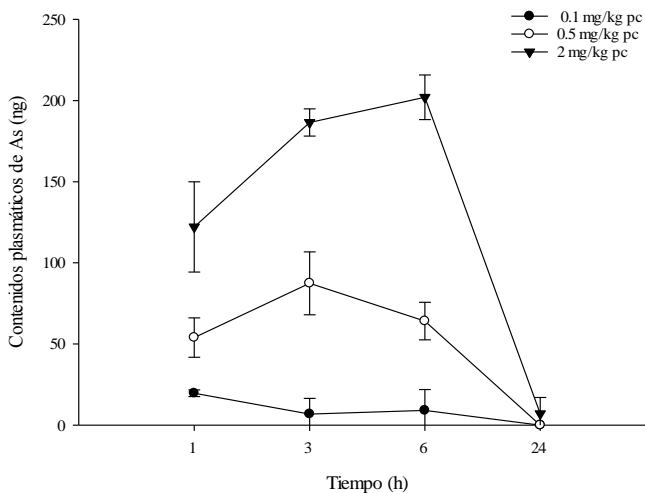


Figura 22. Concentración plasmática de As(III) en función de la dosis administrada. Datos obtenidos tras la administración de una dosis de As(III) (0.1, 0.5 o 2 mg/kg pc) por sonda gástrica. Valores expresados como ng As (media \pm SD, n=3).

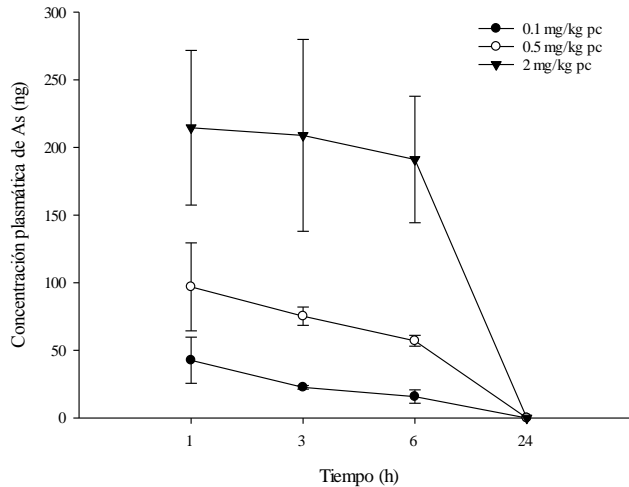


Figura 23. Concentración plasmática de As(V) en función de la dosis administrada. Datos obtenidos tras la administración de una dosis de As(V) (0.1, 0.5 o 2 mg/kg pc) por sonda gástrica. Valores expresados como ng As (media \pm SD, n=3).

Los datos muestran que, a las dosis más bajas, los valores en plasma están próximos al límite de detección en algunos tiempos. Por otro lado, la dosis más elevada genera en algunos casos una alta variabilidad que podría indicar cierto efecto negativo sobre la permeabilidad. Se decide realizar el resto de ensayos con una dosis de 1 mg/kg pc para poder observar diferencias si los tratamientos son efectivos y evitar, por otro lado, cualquier efecto tóxico sobre el epitelio.

2. EFECTO DE LOS COMPONENTES ALIMENTARIOS SOBRE LA BIODISPONIBILIDAD DE ARSÉNICO INORGÁNICO

Los datos de concentración plasmática obtenidos tras la dosificación de los animales con As(III) (1 mg/kg pc) o As(V) (1 mg/kg pc) combinado con los tres

componentes alimentarios seleccionados [Fe(III), tánico y GSH] se muestran en las figuras 24 y 25 respectivamente.

Los datos del área debajo de la curva (AUC) indican que los animales tratados con GSH (4 mmol/kg pc) presentan concentraciones menores de As en sangre para ambas formas arsenicales. Los tratamientos con ácido tánico y Fe(III) no suponen reducciones estadísticamente significativas de los niveles plasmáticos de As(III); sin embargo, conllevan reducciones significativas de los niveles de As(V).

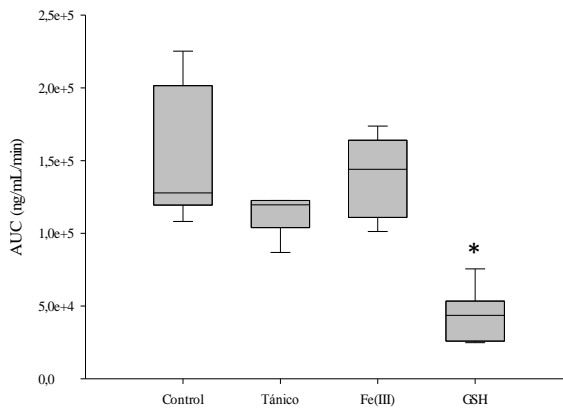


Figura 24. Área debajo de la curva (AUC) de ratones tratados con As(III) y componentes alimentarios. Datos obtenidos tras una única dosis (1 mg/kg pc) de As(III) por sonda gástrica en ausencia o presencia de componentes alimentarios. Valores expresados como ng As/mL/min (media \pm SD, n=7). Los asteriscos muestran reducciones significativas con respecto a los animales expuestos sólo a As ($p < 0.05$).

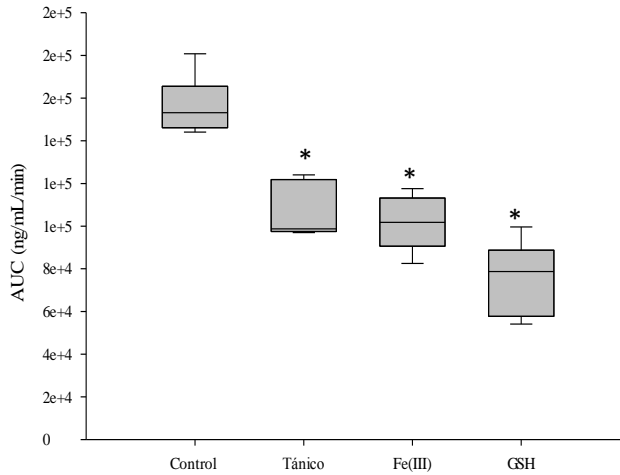


Figura 25. Área debajo de la curva (AUC) de ratones tratados con As(V) y componentes alimentarios. Datos obtenidos tras una única dosis (1 mg/kg pc) de As(V) por sonda gástrica en ausencia o presencia de componentes alimentarios. Valores expresados como ng As/mL/min (media \pm SD, n=7). Los asteriscos muestran reducciones significativas con respecto a los animales expuestos sólo a As ($p < 0.05$).

Las biodisponibilidades relativas, calculadas al comparar las áreas de las co-exposiciones con las de los controles tratados sólo con As (ecuación 3), se muestran en la tabla 22. Todos los tratamientos reducen significativamente la biodisponibilidad de As(V) [tánico: $31 \pm 8\%$; Fe(III): $34 \pm 8\%$; GSH: $51 \pm 10\%$]. Para el As(III), sin embargo, sólo el tratamiento con GSH reduce de forma significativa la biodisponibilidad oral del tóxico (75 %).

Tabla 22. Biodisponibilidad relativa (F) del As(III) y As(V) en animales co-expuestos a las formas arsenicales y los componentes alimentarios. Datos obtenidos tras una única dosis (1 mg/kg pc) de As(III) o As(V) por sonda gástrica en ausencia o presencia de componentes alimentarios. Valores expresados como media \pm SD (n=7). Los asteriscos muestran reducciones significativas con respecto a los animales expuestos sólo a As ($p < 0.05$).

	F% [As(III)]	F% [As(V)]
Ácido tánico	93 \pm 19	69 \pm 8*
Fe(III)	75 \pm 9	66 \pm 8*
GSH	25 \pm 8*	49 \pm 10*

3. EFECTO DE LOS COMPONENTES ALIMENTARIOS SOBRE LA EXCRECIÓN FECAL DE ARSÉNICO INORGÁNICO

La tabla 23 muestra la excreción fecal de ratones expuestos a As(III) y As(V) en presencia o ausencia de los componentes alimentarios tras 15 días de exposición. La variabilidad entre los individuos de un mismo tratamiento es muy elevada en los animales tratados con As(V); esto hace que no se observen diferencias significativas entre tratamientos. Se pueden apreciar, sin embargo, diferencias importantes en las medianas del control y las co-exposiciones con algunos componentes. Este hecho evidencia que para estos tratamientos hay un número importante de animales que presentan una mayor excreción fecal que el control. Para el As(III) si se observan diferencias en la excreción fecal. Esta excreción aumenta significativamente para los animales tratados con Fe(III) y GSH (2.3 veces) con respecto a los animales tratados sólo con As(III).

Tabla 23. Excreción fecal en ratones expuestos a As inorgánico y componentes alimentarios. Concentración de As en heces de animales tratados con As(III) o As(V) (1 mg/kg pc) por sonda gástrica en ausencia o presencia de componentes alimentarios. Valores expresados como ng As/g de heces [rango (mediana), n=7]. Los asteriscos indican aumentos significativos con respecto a los animales expuestos sólo a As ($p < 0.05$).

	Tratamiento	Excreción fecal (ng/g)
As(III)	Sin componentes	172-377 (236)
	Ácido tánico	105-269 (199)
	Fe(III)	199-1176 (649)*
	GSH	385-537 (488)*
As(V)	Sin componentes	235-564 (403)
	Ácido tánico	309-2302 (896)
	Fe(III)	469-2377 (911)
	GSH	279-1763 (541)

4. EFECTO DE LOS COMPONENTES ALIMENTARIOS SOBRE LA ACUMULACIÓN TISULAR DE ARSÉNICO INORGÁNICO

Las figuras 26A, 26B y 26C muestran respectivamente la acumulación en hígado, pulmones e intestino delgado tras 15 días de exposición a As(III) y As(V) en presencia o ausencia de los componentes alimentarios ensayados. La acumulación hepática e intestinal es similar para ambas especies arsenicales, hecho que contradice algunos de los estudios previos que muestran una mayor acumulación tisular en los animales dosificados con As(III) (U.S. EPA, 2009). La acumulación en pulmones si sigue la tendencia de los estudios previos, al existir mayor acumulación en los animales dosificados con As(III).

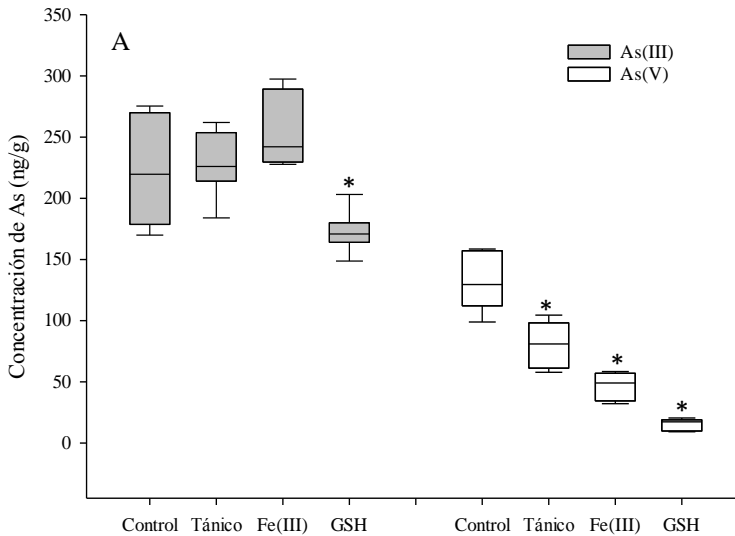


Figura 26. Acumulación tisular de As en ratones expuestos a As(III) o As(V) y componentes alimentarios. Concentración de As en hígado (26A), pulmones (26B) e intestino delgado (26C) de animales tratados con As(III) o As(V) (1 mg/kg pc) por sonda gástrica en ausencia (control) o presencia de componentes alimentarios. Valores expresados como ng As/g de tejido (media \pm SD, n=7). Los asteriscos muestran reducciones significativas con respecto a los animales control ($p < 0.05$).

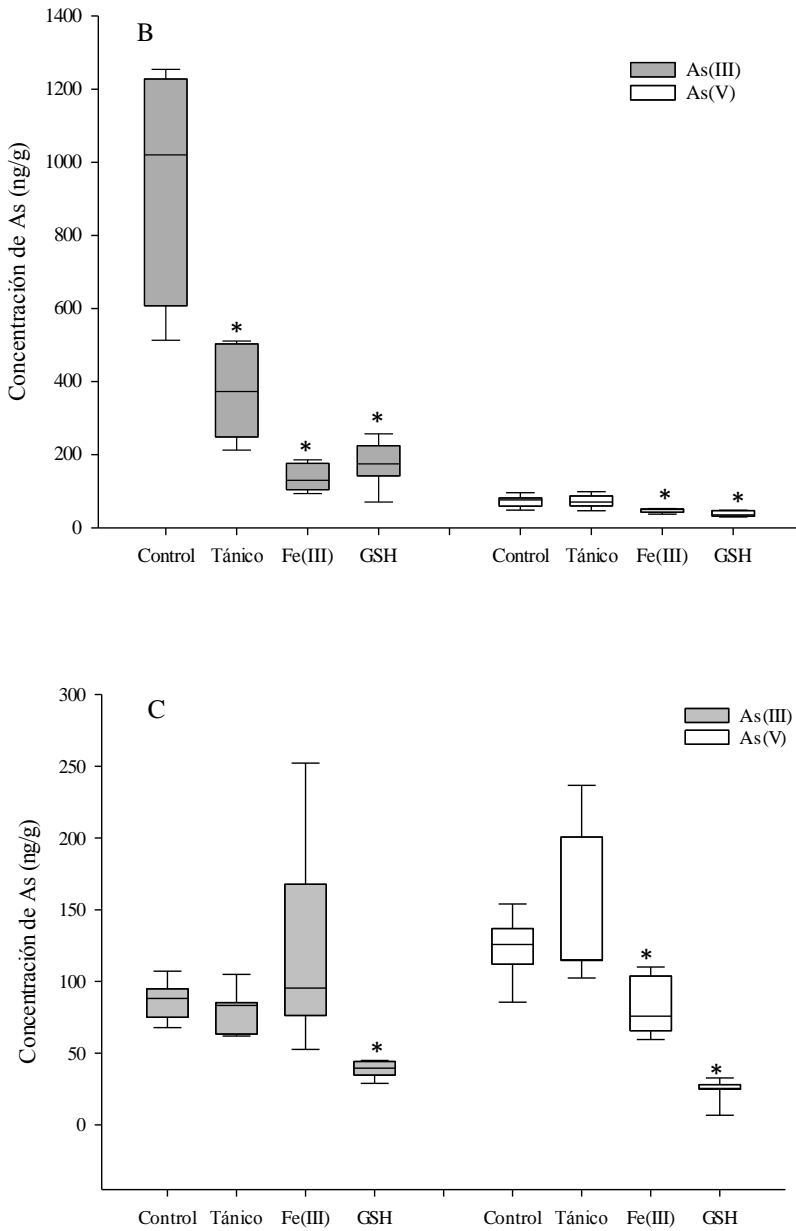


Figura 26. Continuación.

Las modificaciones observadas en la acumulación hepática (figura 26A) coinciden con las observadas en plasma, es decir, todos los tratamientos que conllevan una reducción de la biodisponibilidad relativa (apartado 2, presente capítulo) producen una disminución de los niveles hepáticos del tóxico. Las reducciones en hígado son de mayor magnitud para los animales tratados con As(V) [tánico: $39 \pm 14\%$; Fe(III): $65 \pm 9\%$; GSH: $88 \pm 4\%$] que para los expuestos a As(III) (GSH: $26 \pm 7\%$).

Las reducciones de la acumulación pulmonar (figura 26B) e intestinal (figura 26C) no son completamente coincidentes con los datos de biodisponibilidad relativa. En los animales tratados con As(III) hay reducciones significativas del contenido en pulmones con todos los tratamientos [tánico: $79 \pm 22\%$; Fe(III): $82 \pm 7\%$; GSH: $86 \pm 4\%$], mientras que en las exposiciones a As(V) se observan reducciones sólo en presencia de Fe(III) ($33 \pm 8\%$) y GSH ($47 \pm 11\%$). En el intestino delgado se observan reducciones con GSH ($55 \pm 7\%$) para los animales expuestos a As(III) y con Fe(III) ($38 \pm 7\%$) y GSH ($78 \pm 3\%$) para los animales tratados con As(V).

En general, se puede hablar de una reducción de la acumulación en los órganos con la mayoría de tratamientos ensayados. En el caso de hígado y pulmones, ambos considerados órganos diana del As inorgánico, esta menor acumulación puede deberse a la reducción de la entrada del metaloide en el torrente sanguíneo. Para el intestino, la causa de la reducción quizá sea la formación de complejos en el lumen que se transportan y acumulan en menor medida en el epitelio intestinal.

5. EFECTO DE LOS COMPONENTES ALIMENTARIOS SOBRE LA ACUMULACIÓN HEPÁTICA DE ELEMENTOS MAYORITARIOS

La tabla 24 muestra las concentraciones de elementos mayoritarios en muestras de hígado de animales tratados sólo con As inorgánico o co-expuestos con Fe(III)

y GSH, las dos estrategias más eficaces reduciendo la biodisponibilidad y acumulación tisular de As. En ninguno de los tratamientos con componentes existe un cambio de los niveles hepáticos de Ca, K, P y Fe respecto a los animales tratados sólo con As inorgánico. Señalar, sin embargo, que los resultados *in vitro* (tabla 11, capítulo 2) evidenciaban una reducción en la bioaccesibilidad de Ca, P y K en el arroz integral tras aplicar una digestión gastrointestinal en presencia de Fe(III), que posiblemente se ve modulada por aspectos inherentes al estudio *in vivo* (modelo animal, dieta completa). Así, Fe(III) y GSH son estrategias que no conllevan cambios en los contenidos corporales de los minerales estudiados y por tanto, en lo referente a este aspecto, se pueden considerar estrategias seguras.

Tabla 24. Acumulación hepática de elementos mayoritarios en ratones expuestos a As inorgánico y componentes alimentarios. Concentración de Ca, K, Fe y P en hígado de animales tratados con As inorgánico (1 mg/kg pc) por sonda gástrica en ausencia o presencia de Fe(III) o GSH. Valores expresados como ng/g de tejido [media \pm SD, (mediana), n=7].

Tratamiento	Ca	K	Fe	P
As	183 \pm 123 (138)	2570 \pm 1292 (2278)	104 \pm 28 (97)	3397 \pm 881 (3100)
As + Fe(III)	214 \pm 82 (169)	2009 \pm 696 (1794)	135 \pm 51 (115)	4168 \pm 1716 (3375)
As + GSH	141 \pm 23 (131)	1519 \pm 446 (1470)	94 \pm 17 (92)	3056 \pm 477 (2889)

DISCUSIÓN

La posibilidad de reducir la exposición a un tóxico empleando componentes alimentarios o suplementos dietéticos es una estrategia que presenta una serie de ventajas. Además de tratarse de compuestos que a las concentraciones habituales en la dieta no son perjudiciales para la salud, muchos de ellos presentan propiedades funcionales. Estos compuestos bioactivos normalmente pueden contribuir a la mejora de los problemas de salud que derivan de exposiciones continuadas al tóxico.

La exposición crónica a As inorgánico a través del agua de bebida es posiblemente uno de los problemas de exposición a elementos traza tóxicos que más preocupa a los organismos internacionales. Numerosos estudios epidemiológicos han reportado efectos adversos para la salud y han mostrado el gran número de afectados. En las poblaciones expuestas a As inorgánico, los biomarcadores de exposición evidencian que una parte importante del tóxico ingerido es absorbida y posteriormente eliminada tras sufrir un proceso metabólico (Valenzuela *et al.*, 2005). Se considera que una vez en la circulación sistémica, la capacidad del organismo para metabolizar el As inorgánico a DMA facilita la excreción y reduce la acumulación del tóxico. Por ese motivo, algunos estudios han ensayado en poblaciones expuestas compuestos para mejorar el porcentaje de metilación del As inorgánico (apartado 7.3, introducción).

El objetivo de la presente tesis ha sido también modificar la toxicocinética, pero actuando a nivel de absorción intestinal, para disminuir la llegada del tóxico a la circulación sistémica. Este tipo de intervención es más proteccionista que actuar sobre el metabolismo una vez el metaloide ha llegado ya al torrente sanguíneo. Los resultados obtenidos son prometedores para los tratamientos con GSH y sales férricas, que además de reducir la biodisponibilidad de As inorgánico y su acumulación tisular, no reducen los contenidos hepáticos de elementos

esenciales. El As es un anión como el fosfato, elemento esencial para la producción de energía. A la hora de emplear una estrategia para reducir la entrada de As en la circulación sanguínea hay que asegurarse que no tiene el mismo efecto sobre el fosfato o cualquier otro mineral esencial. Estos resultados abren el camino a nuevas investigaciones para determinar si este mismo efecto se pone de manifiesto cuando se administran suplementos dietéticos ricos en Fe y GSH o incluso cuando se administran alimentos con altos contenidos de ambos compuestos.

La menor biodisponibilidad observada en los animales tratados con As(V) y Fe(III) puede deberse a que tras la co-ingesta de estos elementos, durante su paso a través del lumen, se formen sales de reducida solubilidad, las cuales no pueden ser absorbidas a través de la pared intestinal. La formación de complejos insolubles As(V)-Fe se ha puesto de manifiesto en numerosas ocasiones en muestras medioambientales (Farrell and Chaudhary, 2013; Nicomel *et al.*, 2016). En la presente tesis también se ha evidenciado como las sales férricas reducen la solubilidad del As(V) en las condiciones de la digestión gastrointestinal (capítulo 2) y como dificultan el transporte en modelos celulares de epitelio intestinal (capítulo 4). El tratamiento con Fe(III) no reduce la biodisponibilidad de As(III), aunque sí afecta la acumulación tisular y su excreción fecal. En muestras medioambientales, se ha reportado que la remediación es más efectiva si previamente se oxida el As(III) a As(V) (Nicomel *et al.*, 2016); puede que un fenómeno similar ocurra a nivel intestinal. Esta diferencia, sin embargo, no se evidencia en ensayos *in vitro*, donde el Fe(III) reduce por igual la bioaccesibilidad (capítulo 2) y el transporte intestinal (capítulo 4) de ambas formas arsenicales.

A diferencia del Fe, la interacción de GSH y As se puede producir a distintos niveles. El GSH une especies arsenicales a través del resto cisteinilo, formando complejos solubles (Kanaki y Pergantis, 2008), cuyo transporte a través de la pared intestinal, su llegada a la circulación sistémica y su excreción podrían ser

distintas a las de las formas inorgánicas de As. De hecho, la reducción del transporte a través del epitelio *in vitro* en presencia de GSH se ha evidenciado en el capítulo 4. Además, el GSH participa como compuesto reductor durante la conversión del As inorgánico pentavalente en trivalente (Waters *et al.*, 2004), este último sustrato del enzima responsable del proceso metabólico que da lugar a DMA. En consecuencia, el GSH favorece el metabolismo del As inorgánico y por tanto su excreción. Kala *et al.* (2000) indican que el transportador de resistencia a múltiples drogas MRP2 y el GSH son esenciales para la excreción biliar de As inorgánico y sus metabolitos, por tanto, también puede facilitar la excreción de As a este nivel. Atendiendo a estos datos previos, las reducciones plasmáticas y tisulares producidas por el GSH en el presente capítulo podrían ser resultado de la combinación de todos estos efectos. Por otro lado, algunos estudios muestran que, tras la ingesta, el GSH se transforma parcialmente a Cys en el lumen gastrointestinal (Favilli *et al.*, 1997). De ser así posiblemente la Cys sea también responsable de los efectos observados en el presente estudio en los animales tratados con GSH. De hecho, este aminoácido se ha evidenciado más efectivo que el GSH reduciendo el transporte de As inorgánico en los estudios *in vitro* realizados con modelos celulares (capítulo 4).

Finalmente hay que indicar que, tal y como se ha reportado ya en otros capítulos, algunos compuestos pueden tener un papel protector frente a la toxicidad del As inorgánico, más allá de su capacidad para reducir su entrada a la circulación sistémica y por tanto se pueden considerar estrategias que tienen un valor añadido. Así, Liu *et al.* (2013) ponen de manifiesto tras exponer ratones por vía oral simultáneamente a As (3 mg/L) y Fe (5 mg/L) durante 90 días, que el Fe reduce los cambios de los perfiles transcriptómicos hepáticos y los perfiles metabólicos séricos y urinarios causados por la exposición a la forma inorgánica del metaloide. Por su parte el GSH desempeña un papel fundamental en la

protección de las células contra el daño oxidativo y la toxicidad de los xenobióticos (Wierzbicka *et al.*, 1989).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio evidencian las posibilidades que presentan el GSH y las sales férricas como estrategias para la disminución de la exposición a As inorgánico. Se requieren ampliar los ensayos a otros compuestos como la Cys y algunos polifenoles y cepas bacterianas y de levaduras cuya capacidad para quelar el As inorgánico durante la digestión o evitar su transporte celular ha sido confirmada en los capítulos anteriores. Incluso se puede plantear el uso de combinaciones de estrategias para que aumente la eficacia del tratamiento. Esto permitirá disponer de un mayor abanico de posibilidades para reducir la exposición oral a As inorgánico.

Por otro lado, no hay que olvidar que los estudios *in vivo* sólo se han llevado a cabo dosificando disoluciones acuosas de las formas arsenicales, pero los alimentos, especialmente los cocinados con agua contaminada, también producen un aporte importante de As inorgánico a la dieta. Hay, por tanto, que encontrar *in vivo* también aquellas estrategias eficaces reduciendo la absorción y acumulación del As ingerido con los alimentos. Los datos procedentes de los capítulos anteriores han puesto de manifiesto que no siempre se pueden extrapolar los datos obtenidos en disoluciones acuosas a alimentos.

Finalmente hay que indicar que el uso de los componentes de la dieta se considera una estrategia viable, ya que en la mayoría de los casos existen suplementos dietéticos o extractos vegetales en el mercado con un elevado contenido de los mismos (capítulo 4), los cuales pueden tomarse de forma continuada sin que ello suponga un problema para el consumidor. La eficacia de

estos suplementos o extractos también debe ser comprobado *in vivo*, ya que presentan una composición muy diferente a la de los compuestos puros.

Conclusiones generales

Los resultados obtenidos en la presente tesis han dado lugar a las siguientes conclusiones para cada uno de los objetivos parciales planteados:

1. Caracterización del riesgo derivado de la ingesta de agua y alimentos contaminados con As inorgánico

- La ingesta de As inorgánico derivada del consumo de agua y alimentos en zonas del norte de Argentina con contaminación por As muestra una situación alarmante, con valores que superan ampliamente los límites recomendados.
- El cocinado con agua contaminada con As(V) supone el aumento de la concentración de As inorgánico en el alimento, donde parte del mismo aparece como As(III). Esta transformación supone un aumento del riesgo asociado, ya que la forma reducida es más tóxica que el As(V) presente inicialmente en el agua.
- El proceso de digestión gastrointestinal de los alimentos cocinados con agua contaminada muestra un importante porcentaje de As en forma de As(III), en ocasiones superior al observado tras el cocinado, sugiriendo que durante el proceso digestivo puede haber también una transformación de la forma inorgánica pentavalente.
- Las transformaciones de As(V) a As(III) observadas durante el cocinado y la digestión pueden ser resultado de la presencia de sustancias reductoras en el alimento.
- Todos estos datos indican la necesidad de reducir la llegada del As inorgánico a la circulación sistémica tras la ingesta de agua o alimentos contaminados.

2. Búsqueda de componentes alimentarios o cepas de *Lactobacillus* o *S. cerevisiae* que reduzcan la bioaccesibilidad de As

- Mediante la aplicación de una digestión gastrointestinal *in vitro* se han identificado los sulfatos ferroso y férrico, el ácido tánico, la lignina y algunas celulosas como compuestos capaces de reducir la bioaccesibilidad de As inorgánico.
- Las reducciones observadas se ponen de manifiesto cuando el As se presenta en forma de disolución acuosa o cuando forma parte de un alimento y pueden deberse a la formación de complejos de baja solubilidad y por tanto de difícil absorción.
- Contrariamente a lo observado con los componentes alimentarios, las bacterias lácticas y las cepas de *S. cerevisiae* no son capaces de unir significativamente las formas inorgánicas de As, a excepción del As(V) cuando las concentraciones de fosfato son inferiores a 1 mM. Esta unión a As(V) no se mantiene en las condiciones de digestión gastrointestinal. Por lo tanto, estos microorganismos no son útiles para reducir la bioaccesibilidad del As inorgánico
- La adsorción del As a la superficie de bacterias lácticas o levaduras es en general baja, pues ambos microorganismos presentan una carga superficial neta negativa y las formas inorgánicas de As son oxoaniones. Esta puede ser una de las causas de la baja capacidad de unión de As inorgánico de estos microorganismos.
- El empleo de los componentes alimentarios seleccionados podría ser una estrategia adecuada para reducir la biodisponibilidad oral de As inorgánico, sin embargo, en algunos casos producen también una reducción de la bioaccesibilidad de elementos esenciales.

3. Búsqueda de componentes alimentarios o cepas de *Lactobacillus* o *S. cerevisiae* que reduzcan *in vitro* el transporte de As a través del epitelio intestinal

- Los ensayos con modelos celulares de epitelio intestinal muestran reducciones importantes del transporte de las formas inorgánicas presentes en disoluciones acuosas y en alimentos con el uso de compuestos con grupos tiol (Cys y GSH), algunos polifenoles (curcumina, epigallocatequina y quercetina) y suplementos o extractos vegetales ricos en estos compuestos (extracto de uva y de alcachofa o suplementos de Fe).
- La reducción del transporte intestinal también se evidencia en presencia de cepas de bacterias lácticas y *S. cerevisiae*.
- Los compuestos con grupos tiol posiblemente formen complejos con el As inorgánico cuya absorción sea reducida; mientras que para los polifenoles y los microorganismos el mecanismo de reducción del transporte puede estar relacionado con una modulación de las uniones intercelulares, que podría conllevar reducciones del transporte paracelular de las formas inorgánicas de As.
- Todos estos compuestos y cepas podrían ser buenas estrategias para reducir la biodisponibilidad del As inorgánico en poblaciones expuestas a través del agua y los alimentos.

4. Confirmación *in vivo* de la eficacia de algunas de las estrategias exitosas *in vitro*

- Los ensayos en ratones BALB/c confirman la eficacia de las sales férricas y el GSH como compuestos reductores de la biodisponibilidad oral y la acumulación tisular del As inorgánico ingerido en forma de disolución acuosa.
- Los tratamientos con GSH y Fe no conllevan reducciones de los contenidos hepáticos de elementos mayoritarios (Ca, K, P y Fe).
- Estos datos sugieren que la suplementación con GSH y Fe podría ser empleada en zonas con arsenicismo crónico endémico como estrategia para reducir la exposición al metaloide y los efectos tóxicos derivados de la misma.
- En esta tesis se ha identificado una amplia variedad de compuestos y microorganismos de uso alimentario que podrían, al igual que el GSH y el Fe, ser efectivo *in vivo* y que, por tanto, deberían ser ensayados en un futuro. Además, sería de interés determinar si los suplementos ricos en estos compuestos cuyo consumo está aprobado, son también eficaces reduciendo la biodisponibilidad oral de As inorgánico.
- Todos estos resultados deben finalmente ser constatados en poblaciones expuestas crónicamente a As inorgánico. Las ventajas de esta suplementación deben evaluarse a través de los contenidos de As en los biomarcadores de exposición y efecto habitualmente empleados en estudios epidemiológicos.

Bibliografía

- Alava, P. (2012). Modulation of arsenic speciation and bioavailability upon processing and gastrointestinal digestion of arsenic contaminated rice. Tesis Doctoral. Facultad de Bioscience Engineering, Ghent University, Ghent, Bélgica.
- Alava, P., Tack, F., Laing, G. D. & Van de Wiele, T. (2013). Arsenic undergoes significant speciation changes upon incubation of contaminated rice with human colon microbiota. *Journal of Hazardous Materials*, 262, 1237–1244.
- Almela, C., Algora, S., Benito, V., Clemente, M. J., Devesa, V., Súnier, M. A., Vélez, D. & Montoro, R. (2002). Heavy metal, total arsenic, and inorganic arsenic contents of algae food products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 918–923.
- Almela, C., Laparra, J. M., Vélez, D., Barberá, R., Farré, R. & Montoro, R. (2005). Arsenosugars in raw and cooked edible seaweed: Characterization and bioaccessibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(18), 7344–7351.
- Alonzo, G., Bertazzi, N. & Consiglio, M. (1984). Arsenic, antimony and bismuth complexation by L-cysteine in water. *Inorganica Chimica Acta*, 85, L35–L37.
- Amasheh, M., Schlichter, S., Amasheh, S., Mankertz, J., Zeitz, M., Fromm, M. & Schulzke, J. D. (2008). Quercetin enhances epithelial barrier function and increases claudin-4 expression in Caco-2 cells. *Journal of Nutrition*, 138, 1067–1073.
- Andrahennadi, R., Fu, J., Pushie, M. J., Wiramanaden, C. I. E., George, G. N., Pickering, I. J. (2009). Insect excretes unusual six-coordinate pentavalent arsenic species. *Environmental Chemistry*, 6, 298–304.
- ANSES. (2011). French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety. Second French Total Diet Study (TDS 2) Report 1 Inorganic contaminants, minerals, persistent organic pollutants, mycotoxins and phytoestrogens.
<https://www.anses.fr/en/system/files/PASER2006sa0361Ra1EN.pdf>.

- Aoi, W., Ogaya, Y., Takami, M., Konishi, T., Sauchi, Y., Park, E. Y., Wada, S., Sato, K. & Higashi, A. (2015). Glutathione supplementation suppresses muscle fatigue induced by prolonged exercise via improved aerobic metabolism. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 12(7), 1–8.
- Arnich, N., Sirot, V., Rivière, G., Jean, J., Noël, L., Guérin, T. & Leblanc, J. C. (2012). Dietary exposure to trace elements and health risk assessment in the 2nd French Total Diet Study. *Food and Chemical Toxicology*, 50(7), 2432–2449.
- Artursson, P., Palm, K. & Luthman, K. (2001). Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46, 27–43.
- ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2007). Toxicological profile for arsenic. Draft for Public Comment. Atlanta: Department of Health and Human Services, U.S. Available at URL: <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp.asp?id=22&tid=3> Last accessed 1.14.08.
- Bettley, F. R. & O'Shea, J. A. (1975). The absorption of arsenic and its relation to carcinoma. *British Journal of Dermatology*, 92, 563–568.
- Bisanz, J., Enos, M., Mwanga, J., Chungalucha, J., Jeremy, P., Burton, J. P., Gloor, G. B. & Reid, G. (2014). Randomized open-label pilot study of the influence of probiotics and the gut microbiome on toxic metal levels in Tanzanian pregnant women and school children. *American Society for Microbiology*, 5, e01580–14.
- Bissen, M. & Frimmel, F. H. (2003). Arsenic – a Review. Part II: Oxidation of arsenic and its removal in water treatment. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 31, 97–107.

- Blanquet, S., Zeijdner, E., Beyssac, E., Meunier, J. P., Denis, S., Havenaar, R. & Alric, M. A. (2004). Dynamic artificial gastrointestinal system for studying the behaviour of orally administered drug dosage forms under various physiological conditions. *Pharmaceutical Research*, 21, 585–591.
- Bloom, M. S., Surdu, S., Neamtii, I. A. & Gurzau, E. S. (2014). Maternal arsenic exposure and birth outcomes: A comprehensive review of the epidemiologic literature focused on drinking water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 217, 709–719.
- Bogdan, K. & Schenk, M. K. (2008). Arsenic in rice (*Oryza sativa* L.) related to dynamics of arsenic and silicic acid in daddy soils. *Environmental Science and Technology*, 42, 7885–7890.
- Bohn, L., Meyer, A. S. & Rasmussen, S. K. (2008). Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. *Journal of Zhejiang University Science B*, 9, 165–191.
- Borek, C. (2001). Antioxidant health effects of aged garlic extract. *Journal of Nutrition*, 131, 1010S–1015S.
- Brammer, H. (2009). Mitigation of arsenic contamination in irrigated paddy soils in South and South-East Asia. *Environmental International*, 35, 856–863.
- Buchet, J. P., Lauwerys, R. & Roels, H. (1981). Comparison of the urinary excretion of arsenic metabolites after a single dose of sodium arsenite, monomethylarsonate or dimethylarsinate in man. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 48, 71–179.
- Bundschuh, J., Litter, M. I., Parvez, F., Román-Ross, G., Nicolli, H. B., Jean, J. S., Liu, C.W., López, D., Armienta, M. A. & Guilherme, L. R. (2012). One century of arsenic exposure in Latin America: a review of history and occurrence from 14 countries. *Science of the Total Environment*, 429, 2–35.

- Calatayud, M., Gimeno, J., Vélez, D., Devesa, V. & Montoro, R. (2010). Characterization of the intestinal absorption of arsenate, monomethylarsonic acid, and dimethylarsinic acid using the Caco-2 cell line. *Chemical Research in Toxicology*, 23, 547–556.
- Calatayud, M., Devesa, V., Montoro, R. & Vélez, D. (2011). In vitro study of intestinal transport of arsenite, monomethylarsonous acid, and dimethylarsinous acid by Caco-2 cell line. *Toxicology Letters*, 204, 127–133.
- Calatayud, M., Barrios, J. A., Vélez, D. & Devesa, V. (2012a). In vitro study of transporters involved in intestinal absorption of inorganic arsenic. *Chemical Research in Toxicology*, 25, 446–453.
- Calatayud, M. (2012b). Estudios in vitro de mecanismos de transporte y toxicidad de especies arsenicales a nivel intestinal. Tesis Dctoral. Universidad de Valencia.
- Calatayud, M., Vélez, D. & Devesa, V. (2012c). Metabolism of inorganic arsenic in intestinal epithelial cell lines. *Chemical Research in Toxicology*, 25(11), 2402–2411.
- Calatayud, M., Vázquez, M., Devesa, V. & Vélez, D. (2012d). In vitro study of intestinal transport of inorganic and methylated arsenic species by Caco-2/HT29-MTX cocultures. *Chemical Research in Toxicology*, 25, 2654–2662.
- Calatayud, M., Bralatei, E., Feldmann, J., Devesa, V. & Vélez, D. (2013). Transformation of arsenic species during in vitro gastrointestinal digestion of vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 12164–12170.
- Calatayud, M., Gimeno-Alcañiz, J. V., Vélez, D. & Devesa, V. (2014). Trivalent arsenic species induce changes in expression and levels of proinflammatory cytokines in intestinal epithelial cells. *Toxicology Letters*, 224, 40–46.
- Carey, A. M., Lombi, E., Donner, E., de Jonge, M. D., Punshon, T., Jackson, B. P., Guerinot, M. L., Price, A. H. & Meharg, A. A. (2012). A review of recent developments in the speciation and location of arsenic and selenium in rice grain. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402, 3275–3286.

- Carey, M., Jiu Jin, X., Gomes Farias, J. & Meharg, A. A. (2015). Rethinking rice preparation for highly efficient removal of inorganic arsenic using percolating cooking water. *Plos One*, DOI:10.1371/journal.pone.0131608.
- Carotenuto, C. & Grizzuti, N. (2006). Thermoreversible gelation of hydroxypropylcellulose aqueous solutions. *Rheologica Acta*, 45, 468–473.
- Castor, J. M., Portugal, L., Ferrer, L., Hinojosa-Reyes, L., Guzmán-Mar, J. L., Hernández-Ramírez, A. & Cerdà, V. (2016). An evaluation of the bioaccessibility of arsenic in corn and rice samples based on cloud point extraction and hydride generation coupled to atomic fluorescence spectrometry. *Food Chemistry*, 204, 475–482.
- Chen, C. J., Chen, C. W., Wu, M. M. & Kuo, T. L. (1992). Cancer potential in liver, lung, bladder and kidney due to ingested inorganic arsenic in drinking-water. *British Journal of Cancer*, 66, 888–892.
- Chen, S., Shen, X., Cheng, S., Li, P., Du, J., Chang, Y. (2013). Meng, H. Evaluation of garlic cultivars for polyphenolic content and antioxidant properties. *PLoS One*, 8, e79730.
- Chen, A. Y. Y. & Olsen, T. (2016). Chromated copper arsenate-treated wood: a potential source of arsenic exposure and toxicity in dermatology. *International Journal of Women's Dermatology*, 2(1), 28–30.
- Cheryan, M. (1980). Phytic acid interactions in food systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 13, 297–335.
- Cheyns, K., Waegeneers, N., Van de Wiele, T. & Ruttens, A. (2017). Arsenic release from foodstuffs upon food preparation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 2443–2453.
- Chiocchetti, G. M., Jadán-Piedra, C., Monedero, V., Zúñiga, M., Vélez, D. & Devesa, V. (2018). Use of lactic acid bacteria and yeasts to reduce exposure to chemical food contaminants and toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–12. doi: 10.1080/10408398.2017.1421521.

- Chow, H. H., Cai, Y., Hakim, I. A., Crowell, J. A., Shahi, F., Brooks, C. A., Dorr, R. T., Hara, Y. & Alberts, D. S. (2003). Pharmacokinetics and safety of green tea polyphenols after multiple-dose administration of epigallocatechin gallate and polyphenon E in healthy individuals. *Clinical Cancer Research*, 9, 3312–3319.
- CFIA. (2012). Canadian Food Inspection Agency. Inorganic arsenic and hijiki seaweed consumption. <http://www.inspection.gc.ca/food/information-for-consumers/fact-sheets-and-infographics/products-and-risks/chemical-hazards/inorganic-arsenic/eng/1332268146718/1332268231124>
- Circu, M. L. & Aw, T. Y. (2012). Intestinal redox biology and oxidative stress. *Seminars in Cell Developmental Biology*, 23, 729–737.
- Codex. (2012). Codex Alimentarius Commission. Proposed draft maximum levels for arsenic in rice. Committee CX/CF 12/6/8. JOINT FAO/WHO Food standards programme. Codex committee on contaminants in foods. Sixth session. Maastricht, The Netherlands, 26 – 30 March 2012.
- Cohen, S. M., Ohnishi, T., Arnold, L. L. & Le, X. C. (2007). Arsenic-induced bladder cancer in an animal model. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 222, 258–263.
- Concha, G., Nermell, B. & Vahter, M. (1998). Metabolism of inorganic arsenic in children with chronic high arsenic exposure in northern Argentina. *Environmental Health Perspectives*, 106, 355–359.
- Cornejo, L., Lienqueo, H., Arenas, M., Acarapi, J., Contreras, D., Yañez, J. & Mandilla, H. D. (2008). In field arsenic removal from natural water by zero-valent iron assisted by solar radiation. *Environmental Pollution*, 156, 827–831.
- Cubadda, F., D'Amato, M., Aureli, F., Raggi, A. & Mantovani, A. (2016). Dietary exposure of the Italian population to inorganic arsenic: The 2012–2014 Total Diet Study. *Food and Chemical Toxicology*, 98, 148–158.

- Cubadda, F., Jackson, B. P., Cottingham, K. L., Van Horne, Y. O. & Kurzius-Spencer, M. (2017). Human exposure to dietary inorganic arsenic and other arsenic species: State of knowledge, gaps and uncertainties. *Science of the Total Environment*, 579, 1228–1239.
- Cullen, W. R. & Reimer, K. J. (1989). Arsenic speciation in the environment. *Chemical Reviews*, 89, 713–764.
- Czerucka, D., Piche, T. & Rampal, P. (2007). Review article: yeast as probiotics *Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 26, 767–778.
- Da Silva, S. M. & Gonzaga do Prado-Filho, L. (1999). Accumulation of cadmium by *Saccharomyces cerevisiae* in sugar cane must contaminated with cadmium acetate. *Scientia Agricola*, 56, 407–411.
- De Alencar, F. L. S., Navoni, J. A. & Do Amaral, V. S. (2017). The use of bacterial bioremediation of metals in aquatic environments in the twenty-first century: a systematic review. *Environmental Science and Pollution Research International*, 24, 16545–16559.
- De Bruyne, E., Ducatelle, R., Foss, D., Sanchez, M., Joosten, M., Zhang, G., Smet, A., Pasmans, F., Freddy Haesebrouck, F. & Flahou, B. (2016). Oral glutathione supplementation drastically reduces *Helicobacter* induced gastric pathologies. *Scientific Reports*, 6(20169), 1–13.
- Del Razo, L. M., Garcia-Vargas, G. G., Vargas, H., Albores, A., Gonsebatt, M. E., Montero, E., Ostrosky-Wegman, P., Kelsh, M. & Cebrian, M. E. (1997). Altered profile of urinary arsenic metabolites in adults with chronic arsenicism: A pilot study. *Archives of Toxicology*, 71, 211–217.
- Del Razo, L. M., Garcia-Vargas, G. G., Garcia-Salcedo, J., Sanmiguel, M. F., Rivera, M., Hernandez, M. C. & Cebrian, M. E. (2002). Arsenic levels in cooked food and assessment of adult dietary intake of arsenic in the Region Lagunera, Mexico. *Food and Chemical Toxicology*, 40, 1423–1431.

- Demirkol, O., Adams, C., Ercal, N. (2004). Biologically important thiols in various vegetables and fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 8151–8154.
- Devesa V., Martínez A., Súañer M. A., Benito V., Vélez D. & Montoro R. (2001). Kinetic study of transformations of arsenic species during heat treatment. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 49, 2267–2271.
- Dhankher, O. P., Paulose, B., Chhikara, S., Kumar, K. & Mosa, K. A. (2010). Engineering plants for arsenic containment: what we know and where should we go? International Conference on Green Remediation (Environment, Energy, Economics), University of Massachusetts Amherst, Massachusetts, USA, June 15–17.
- Díaz, O. P., Leyton, I., Muñoz, O., Núñez, N., Devesa, V., Suñer, M. A., Vélez, D. & Montoro, R. (2004). Contribution of water, bread and vegetables (raw and cooked) to dietary intake of inorganic arsenic in a rural village of Northern Chile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1773–1779.
- Díaz, O. P., Arcos, R., Tapia, Y., Pastene, R., Velez, D., Devesa, V., Montoro, R., Aguilera, V. & Becerra, M. (2015). Estimation of arsenic intake from drinking water and food (raw and cooked) in a rural village of northern Chile. Urine as a biomarker of recent exposure. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12, 5614–5633.
- Directiva 94/36/CE. European Parliament and Council Directive 94/36/CE of 30 June 1994 on colours for use in foodstuffs. Official Journal of the European Communities. No L 237/13.
- Directiva 95/2/CE. European Parliament and Council Directive No 95/2/CE of 20 February 1995 on food additives other than colours and sweeteners.
- Directiva 96/5/CE. Commission Directive 96/5/CE, EURATOM of 16 February 1996 on processed cereal-based foods and baby foods for infants and young children. OJ L 49, 17–28.

- Directiva 2001/15/CE. Commission Directive 2001/15/CE of 15 February 2001 on substances that may be added for specific nutritional purposes in foods for particular nutritional uses. OJ L 52, 19–25.
- Directiva 2003/2/CE de la Comisión de 6 de enero de 2003 que limita la comercialización y uso del arsénico (décima adaptación al progreso técnico de la Directiva 76/769/CEE del Consejo).
- Dixit, R., Wasiullah; Malaviya, D., Pandiyan, K., Singh, U. B., Sahu, A., Shukla, R., Singh, B. P., Rai, J. P., Sharma, P. K., Lade, H. & Paul, D. (2015). Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: an overview of principles and criteria of fundamental processes. *Sustainability*, 7, 2189–2212.
- Drobná, Z., Naranmandura, H., Kubachka, K. M., Edwards, B. C., Herbin-Davis, K., Styblo, M., Le, X. C. & Thomas, D. J. (2009). Disruption of the arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase gene in the mouse alters the phenotype for methylation of arsenic and affects distribution and retention of orally administered arsenate. *Chemical Research in Toxicology*, 22, 1713–1720.
- Drobná, Z., Walton, F. S., Harmon, A. W., Thomas, D. J. & Styblo, M. (2010). Interspecies differences in metabolism of arsenic by cultured primary hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 245(1), 47–56.
- EFSA. (2004). European Food Safety Agency. Opinion of the scientific panel on additives and products or sub in animal feed on a request from the Commission related to the safety of Nitarsone (4-nit stances used e preliminary assessment of t rophenylarsonic acid), as a feed additive in accordance with Regulation (EC) N°178/2002 and Regulation , article 15. (Question N° EFSA-Q-2004-014). *EFSA Journal*, 121, 1–13.
- EFSA. (2006). European Food Safety Agency. Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food. The use of L-cysteine in foods intended for infants and young children, Question no. EFSA Q-2005-083, 390, 1–7.

- EFSA. (2008). European Food Safety Authority. Safety of aluminium from dietary intake. Scientific opinion of the panel on food additives, flavourings, processing aids and food contact materials (AFC). *EFSA Journal*, 754, 1–34.
- EFSA. (2009). European Food Safety Authority. Scientific opinion on arsenic in food. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). *EFSA Journal*, 7(10):1351, 1–199.
- EFSA. (2014). European Food Safety Authority. Dietary exposure to inorganic arsenic in the European population. Scientific Report of EFSA. *EFSA Journal*, 2(3), 3597.
- Egger, L., Ménard, O., Delgado-Andrade, C., Alvito, P., Assunção, R., Balance, S., Barberá, R., Brodkorb, A., Cattenoz, T., Clemente, A., Comi, I., Dupont, D., Garcia-Llatas, G., Lagarda, M. J., Le Feunteun, S., JanssenDuijghuijsen, L., Karakaya, S., Lesmes, U., Mackie, A. R., Martins, C., Meynier, A., Miralles, B., Murray, B. S., Pihlanto, A., Picariello, G., Santos, C. N., Simsek, S., Recio, I., Rigby, N., Rioux, L-E., Stoffers, H., Tavares, A., Tavares, L., Turgeon, S., Ulleberg, E. K., Vegarud, G. E., Vergères, G., Portmann, R. (2016). The harmonized INFOGEST in vitro digestion method: From knowledge to action. *Food Research International*, 88, 217–225.
- Fan, R., Yuan, F., Wang, N., Gao, Y., Huang Y. (2015). Extraction and analysis of antioxidant compounds from the residues of *Asparagus officinalis* L. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 2690–2700.
- Farrell, J. & Chaudhary, B. K. (2013). Understanding arsenate reaction kinetics with ferric hydroxides. *Environmental Science & Technology*, 47 (15), 8342–8347.
- Farzan, S. F, Li, Z., Korrick, S. A., Spiegelman, D., Enelow, R., Nadeau, K., Baker, E. & Karagas, M. R. (2016). Infant infections and respiratory symptoms in relation to in utero arsenic, exposure in a U.S. cohort. *Environmental Health Perspectives*, 124, 840–847.

- Favilli, F., Marraccini, P., Iantomasi, T. & Vincenzini, M. T. (1997). Effect of orally administered glutathione on glutathione levels in some organs of rats: role of specific transporters. *British Journal of Nutrition*, 78(2), 293–300.
- FDA. (2005). Food and Drug Administration. Titanium dioxide. United States Code of Federal Regulations, Title 21, Volume 1. Revised as of April 1, 2014. Section 73.575.
- Ferreira, I. M. P., Pinho, O., Vieira, E. & Taveira, J. G. (2010). Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. *Trends Food Science and Technology*, 21, 77–84.
- Flanagan, S. V., Johnston, R. B., & Zheng, Y. (2012). Arsenic in tube well water in Bangladesh: health and economic impacts and implications for arsenic mitigation. *Bulletin of the World Health Organization*, 90, 839–846.
- Fontcuberta, M., Calderon, J., Villalbí, J. R., Centrich, F., Portaña, S., Espelt, A., Duran, J. & Nebot, M. (2011). Total and inorganic arsenic in marketed food and associated health risks for the Catalan (Spain) population. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 10013–10022.
- Francesconi, K. A. & Kuehnelt, D. (2004). Determination of arsenic species: A critical review of methods and applications, 2000–2003. *Analyst*, 129, 373–395.
- Freeman, G. B., Schoof, R. A., Ruby, M. V., Davis, A. O., Dill, J. A., Liao, S. C., Lapin, C. A. & Bergstrom, P. D. (1995). Bioavailability of arsenic in soil and house dust impacted by smelter activities following oral administration in cynomolgus monkeys. *Fundamental and Applied Toxicology*, 28, 215–222.
- FSA. (2010). Food Standard Agency Consumers advised not to eat hijiki seaweed. <http://www.food.gov.uk/news/newsarchive/2010/aug/hijikiseaweed>
- FSAI. (2016). Food Safety Authority of Ireland. Report on a Total Diet Study carried out by the Food Safety Authority of Ireland in the period 2012–2014.

- FSANZ. (2011). Food Standards Australia New Zealand. 23rd Australian Total Diet Study. http://www.foodstandards.gov.au/publications/documents/FSANZ%2023rd%20ATDS_v8_.pdf
- Gailer, J., George, G. N., Pickering, I. J., Prince, R. C., Ringwald, S. C., Pemberton, J. E., Glass, R. S., Younis, H. S., DeYoung, J. D. W. & Aposhian, H. V. (2000). A metabolic link between arsenite and selenite: The seleno-bis(S-glutathionyl) arsinium ion. *Journal of the American Chemical Society*, 122, 4637–4639.
- Gamble, M. V., Liu, X., Ahsan, H., Pilsner, J. R., Ilievski, V., Slavkovich, V., Parvez, F., Chen, Y., Levy, D., Factor-Litvak, P. & Graziano, J. H. (2006). Folate and arsenic metabolism: a double-blind, placebo-controlled folic acid-supplementation trial in Bangladesh. *American Journal of Clinical Nutrition*, 84, 1093–1101.
- García-Sartal, C., Barciela-Alonso, M. D. C. & Bermejo-Barrera, P. (2012). Effect of the cooking procedure on the arsenic speciation in the bioavailable (dialyzable) fraction from seaweed. *Microchemical Journal*, 105, 65–71.
- Gerbino, E., Mobili, P., Tymczynsyn, E., Fausto, R. & Gomez-Zavaglia, A. (2011). FTIR spectroscopy structural analysis of the interaction between L. kefir S-layers and metal ions. *Journal of Molecular Structure*, 987, 186–192.
- Ghosal, A., Jellbauer, S., Kapadia, R., Raffatellu, M. & Said, H. M. (2015). Salmonella infection inhibits intestinal biotin transport: cellular and molecular mechanisms. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 309, G123–G131.
- Gimou, M. M., Charrondière, U. R., Leblanc, J.C., Noël, L., Guérin, T. & Pouillot, R. (2013). Dietary exposure and health risk assessment for 11 minerals and trace elements in Yaoundé: The Cameroonian Total Diet Study. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 30(9), 1556–1572.

- González, M. J., Aguilar, M. V. & Martínez Para, M. C. (1995). Gastrointestinal absorption of inorganic arsenic (V): The effect of concentration and interactions with phosphate and dichromate. *Veterinary and Human Toxicology*, 37, 131–136.
- González, A., Llorens, A., Cervera, M. L., Armenta, S. & de la Guardia, M. (2009). Nonchromatographic speciation of inorganic arsenic in mushrooms by hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *Food Chemistry*, 115, 360–364.
- Gregus, Z., Gyurasics, A., & Koszorús, L. (1998). Interactions between selenium and group Va-metalloids (arsenic, antimony and bismuth) in the biliary excretion. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 5, 89–99.
- Gress, J. K., Lessl, J. T., Dong, X. & Ma, L. Q. (2014). Assessment of children's exposure to arsenic from CCA-wood staircases at apartment complexes in Florida. *Science of the Total Environment*, 476–477, 440–446.
- Grynspan, F. & Cheryan, M. (1983). Calcium phytate: Effect of pH and molar ratio on in vitro solubility. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 60, 1761–1764.
- Halder, D., Biswas, A., Slejkovec, Z., Chatterjee, D., Nriagu, J., Jacks, G. & Bhattacharya, P. (2014). Arsenic species in raw and cooked rice: Implications for human health in rural Bengal. *Science of the Total Environment*, 497–498, 200–208.
- Hall, L.L., George, S. E., Kohan, M. J., Styblo, M. & Thomas, D. J. (1997). In vitro methylation of inorganic arsenic in mouse intestinal cecum. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 147, 101–109.
- Hall, M., Gamble, M., Slavkovich, V., Liu, X., Levy, D., Cheng, Z., van Geen, A. & Graziano, J. (2007). Determinants of arsenic metabolism: Blood arsenic metabolites, plasma folate, cobalamin, and homocysteine concentrations in maternal-newborn pairs. *Environmental Health Perspectives*, 115, 1503–1509.

- Halttunen, T., Salminen, S. & Tahvonen, R. (2007). Rapid removal of lead and cadmium from water by specific lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 114, 30–35.
- Hanaoka, K., Goessler, W., Ohno, H., Irgolic, K. J. & Kaise, T. (2001). Formation of toxic arsenical in roasted muscles of marine animals. *Applied Organometallic Chemistry*, 15, 61–66.
- Haque, A., Richardson, R. K., Morris, E. R., Gidley, M. J. & Caswell, D. C. (1993). Thermogelation of methylcellulose. Part II: effect of hydroxypropyl substituents. *Carbohydrate Polymers*, 22, 175–186.
- Harwood, M., Danielewska-Nikiel, B., Borzelleca, J. F., Flamm, G. W., Williams, G. M. & Lines, T. C. (2007). A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 2179–2205.
- Heck, J. E., Gamble, M. V., Chen, Y., Graziano, J. H., Slavkovich, V., Parvez, F., Baron, J. A., Howe, G. R. & Ahsan, H. (2007). Consumption of folate-related nutrients and metabolism of arsenic in Bangladesh. *American Journal of Clinical Nutrition*, 85, 1367–1374.
- Heck, J. E., Nieves, J. W., Chen, Y., Parvez, F., Brandt-Rauf, P. W., Graziano, J. H., Slavkovich, V., Howe, G. R. & Ahsan, H. (2009). Dietary intake of methionine, cysteine, and protein and urinary arsenic excretion in Bangladesh. *Environmental Science & Technology*, 117(1), 99–104.
- Hider, R. C., Liu, Z. D., Khodr, H. H. (2001). Metal chelation of polyphenols. *Methods in Enzymology*, 335, 190–203.
- Hilgendorf, C., Spahn-Langguth, H., Regårdh, C. G., Lipka, E., Amidon, G. L. & Langguth, P. (2000). Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX co-cultured cell lines: permeabilities via diffusion, inside- and outside-directed carrier-mediated transport. *Journal of Pharmaceutical Science*, 89, 63–75.

- IARC. (2004). International Agency for Research on Cancer. Summaries & evaluations: Arsenic in drinking-water (Group 1). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic.
- IARC. (2012). International Agency for Research on Cancer. Arsenic and arsenic compounds. IARC Monographs Volume 100C. Arsenic, metals, fibres and dusts. <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono100C.pdf>
- Ichikawa, S., Kamoshida, M., Hanaoka, K., Hamano, M., Maitani, T. & Kaise, T. (2006). Decrease of arsenic in edible brown algae *Hijikia fusiforme* by the cooking process. *Applied Organometallic Chemistry*, 20, 585–590.
- IPCS. (2001). Arsenic and arsenic compounds. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (Environmental Health Criteria 224).
- Isbrucker, R. A., Bausch, J., Edwards, J. A. & Wolz, E. (2006). Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. Part 1: genotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 626–635.
- Islam, S., Rahman, M. M., Duan, L., Islam, M. R., Kuchel, T. & Naidu, R. (2017). Variation in arsenic bioavailability in rice genotypes using swine model: An animal study. *Science of the Total Environment*, 599–600, 324–331.
- Jadán-Piedra, C., Alcántara, C., Zúñiga, M., Monedero, V., Vélez, D. & Devesa, V. (2017a). The use of lactic acid bacteria to reduce mercury bioaccessibility. *Food Chemistry*, 228, 158–166.
- Jadán-Piedra, C., Baquedano, M., Puig, S., Vélez, D. & Devesa, V. (2017b). Use of *Saccharomyces cerevisiae* to reduce the bioaccessibility of mercury from food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(13), 2876–2882.
- Jara, E. A. & Winter, C. K. (2014). Dietary exposure to total and inorganic arsenic in the United States, 2006–2008. *International Journal of Food Contamination*, 1, 3.

- JECFA. (2001). Joint FAO/WHO Expert Committee. Probiotics in food. Health and nutrition properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. FAO Food and nutrition paper 85, Córdoba, Argentina.
- JECFA. (2004). Joint FAO/WHO Expert Committee. Evaluation of certain food additives and contaminants; Sixty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO Technical Report Series 922, Geneva.
- JECFA. (2007). Joint FAO/WHO Expert Committee. Safety evaluation of certain additives and contaminants. Sixty-seventh meeting of JEFCA. International Programme on Chemical Safety. WHO Food additive series 58, Geneva.
- JECFA. (2011). Joint FAO/WHO Expert Committee. Safety evaluation of certain contaminants in food. Seventy-second meeting of JEFCA. FAO JEFCA Monographs 8, Rome.
- Jeong, Y., Fan, M., Van Leeuwen, J. & Belczyk, J. F. (2007). Effect of competing solutes on arsenic (V) adsorption using iron and aluminum oxides. *Journal of Environmental Sciences*, 19, 910–919.
- Jomova, K., Jenisova, Z., Feszterova, M., Baros, S., Liska, J. & Hudecova, D. (2011). Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. *Journal of Applied Toxicology*, 31, 95–107.
- Juhasz, A. L., Smith, E., Weber, J., Rees, M., Rofe, A., Kuchel, T., Sansom, L. & Naidu, R. (2006). In vivo assessment of arsenic bioavailability in rice and its significance for human health risk assessment. *Environmental Health Perspectives*, 114, 1826–1831.
- Juhasz, A. L., Smith, E., Weber, J., Rees, M., Rofe, A., Kuchel, T., Sansom, L. & Naidu, R. (2008). Application of an in vivo swine model for the determination of arsenic bioavailability in contaminated vegetables. *Chemosphere*, 71, 1963–1969.
- Julshamn, K., Nilsen, B. M., Frantzen, S., Valdernes, S., Maage, A., Nedreaas, K. & Sloth, J. J. (2012). Total and inorganic arsenic in fish samples from Norwegian waters. *Food Additives & Contaminants B*, 5(4), 229–235.

- Kala, S. V., Neely, M. W., Kala, G., Prater, C. I., Atwood, D. W., Rice, J. S. & Lieberman, M. W. (2000). The MRP2/cMOAT transporter and arsenic-glutathione complex formation are required for biliary excretion of arsenic. *Journal of Biological Chemistry*, 275(43), 33404–33408.
- Kanaki, K. & Pergantis, S. A. (2008). Development of mass spectrometric methods for detecting arsenic-glutathione complexes. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 19 (10), 1559–1567.
- Kenyon, E. M., Hughes, M. F. & Levander, O. A. (1997). Influence of dietary selenium on the disposition of arsenate in the female B6C3F1 mouse. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 51, 279–299.
- Kenyon, E. M., Hughes, M. F., Adair, B. M., Highfill, J. H., Crecelius, E. A., Clewell, H. J. & Yager, J. W. (2008). Tissue distribution and urinary excretion of inorganic arsenic and its methylated metabolites in C57BL6 mice following subchronic exposure to arsenate in drinking water. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 232, 448–455.
- Kies, A. K., De Jonge, L. H., Kemme, P. A. & Jongbloed, A. W. (2006). Interaction between protein, phytate, and microbial phytase. In vitro studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1753–1758.
- Kim, C. Y. & Kim, K. H. (2014). Curcumin prevents leptin-induced tight junction dysfunction in intestinal Caco-2 BBe cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 25, 26–35.
- Koch, I., Moriarty, M., Sui, J. & Reimer, K. J. (2011). Methodological artefacts in the XANES analysis of hexa-coordinated pentavalent arsenic. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 26, 1897–1899.
- Koch, I., Dee, J., House, K., Sui, J., Zhang, J., McKnight-Whitford, A. & Reimer, K. J. (2013). Bioaccessibility and speciation of arsenic in country foods from contaminated sites in Canada. *Science of the Total Environment*, 449, 1–8.

- Kramar, U., Norra, S., Berner, Z., Kiczka, M. & Chandrasekharam, D. (2017). On the distribution and speciation of arsenic in the soil-plant-system of a rice field in West-Bengal, India: A μ -synchrotron techniques based case study. *Applied Geochemistry*, 77, 4–14.
- Kubachka, K. M., Kohan, M. C., Herbin-Davis, K., Creed, J. T. & Thomas, D. J. (2009). Exploring the in vitro formation of trimethylarsine sulfide from dimethylthioarsinic acid in anaerobic microflora of mouse cecum using HPLC–ICP-MS and HPLC–ESI-MS. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 239, 137–143.
- Kuroda, K., Yoshida, K., Yoshimura, M., Endo, Y., Wanibuchi, H., Fukushima, S. & Endo, G. (2004). Microbial metabolite of dimethylarsinic acid is highly toxic and genotoxic. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 198, 345–353.
- Lantz, R. C. & Hays, A. M. (2006). Role of oxidative stress in arsenic-induced toxicity. *Drug Metabolism Reviews*, 38, 791–804.
- Laparra, J. M., Vélez, D., Montoro, R., Barbera, R. & Farré, R. (2003). Estimation of arsenic bioaccessibility in edible seaweed by an in vitro digestion method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6080–6085.
- Laparra, J. M., Vélez, D., Barberá, R., Montoro, R. & Farré, R. (2007). Bioaccessibility and transport by Caco-2 cells of organoarsenical species present in seafood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5892–5897.
- Le Ferrec, E., Chesne, C., Artusson, P., Brayden, D., Fabre, G., Gires, P., Guillou, F., Rousset, M., Rubas, W. & Scarino, M.L. (2001). In vitro models of the intestinal barrier. The report and recommendations of ECVAM Workshop 46. European Centre for the Validation of Alternative methods. *Alternative to Laboratory Animals*, 29, 649–668.
- Leufroy, A., Noël, L., Beauchemin, D. & Guérin, T. (2012). Use of continuous leaching method to assess the oral bioaccessibility of trace elements in seafood. *Food Chemistry*, 135, 623–633.

- Li, R. Y., Stroud, J. L., Ma, J. F., McGrath, S. P. & Zhao, F. J. (2009). Mitigation of arsenic accumulation in rice with water management and silicon fertilization. *Environmental Science and Technology*, 43, 3778–3783.
- Li, H., Lin, J., Li, Y., Yan, J., Li, B., Zhang, W., Dong, Z. & Chen, C. (2013). Distribution of arsenic species and its DNA damage in subchronic arsenite-exposed mice. *Journal of Hygiene Research*, 42, 764–776.
- Liao, W., Wang, G., Li, K., & Zhao, W. (2018). Change of arsenic speciation in shellfish after cooking and gastrointestinal digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66, 7805–7814.
- Lin, S., Shi, Q., Nix, F. B., Styblo, M., Beck, M. A., Herbin-Davis, K. M., Hall, L. L., Simeonsson, J. B. & Thomas, D. J. (2002). A novel S-adenosyl-l-methionine: arsenic(III) methyltransferase from rat liver cytosol. *Journal of Biological Chemistry*, 107, 10795–10803.
- Liu, Z., Shen, J., Carbrey, J. M., Mukhopadhyay, R., Agre, P. & Rose, B. P. (2002). Arsenite transport by mammalian aquaglyceroporins AQP7 and AQP9. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 99, 6053–6058.
- Liu, Z., Sánchez, M. A., Jiang, X., Boles, E., Landfear, S. M. & Rosen, B. P. (2006). Mammalian glucose permease GLUT1 facilitates transport of arsenic trioxide and methylarsonous acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 351, 424–430.
- Liu, S., Guo, X., Zhang, X., Cui, Y., Zhang, Y. & Wu, B. (2013). Impact of iron precipitant on toxicity of arsenic in water: a combined in vivo and in vitro study. *Environmental Science & Technology*, 47(7), 3432–3438.
- Ljungh, A. & Wadström, T. (2006). Lactic acid bacteria as probiotics. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 7, 73–89.
- Lu, W. J., Tamai, I., Nezu, J., Lai, M. L. & Huang, J. D. (2006). Organic anion transporting polypeptide-C mediates arsenic uptake in HEK-293 cells. *Journal of Biomedical Science*, 13, 525–533.

- Lynch, H. N., Greenberg, G. I., Pollock, M. C. & Lewis, A. S. (2014). A comprehensive evaluation of inorganic arsenic in food and considerations for dietary intake analyses. *Science of the Total Environment*, 496, 299–313.
- Llorente-Mirandes, T., Ruiz-Chancho, M. J., Barbero, M., Rubio, R. & López-Sánchez, J. F. (2011). Determination of water-soluble arsenic compounds in commercial edible seaweed by LC-ICPMS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 12963–12968.
- Llorente-Mirandes, T., Barbero, M., Rubio, R. & López-Sánchez, J. F. (2014). Occurrence of inorganic arsenic in edible Shiitake (*Lentinula edodes*) products. *Food Chemistry*, 158, 207–215.
- Maher, W., Foster, S., Krikowa, F., Donner, E. & Lombi, E. (2013). Measurement of inorganic arsenic species in rice after nitric acid extraction by HPLC-ICPMS: Verification using XANES. *Environmental Science and Technology*, 47, 5821–5827.
- Makris, K. C., Quazi, S., Punamiya, P., Sarkar, D. & Datta, R. (2008). Fate of arsenic in swine waste from concentrated animal feeding operations. *Journal of Environmental Quality*, 37(4), 1626–3163.
- Marin, S., Pardo, O., Báguena, R., Font, G. & Yusà, V. (2017). Dietary exposure to trace elements and health risk assessment in the region of Valencia, Spain: a total diet study. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 34(2), 228–240.
- Matschullat, J. (2000). Arsenic in the geosphere - a review. *Science of the Total Environment*, 249, 297–312.
- Maulvault, A. L., Machado, R., Afonso, C., Lourenço, H. M., Nunes, M. L., Coelho, I., Langerholc, T. & Marques, A. (2011). Bioaccessibility of Hg, Cd and As in cooked black scabbard fish and edible crab. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 2808–2815.
- McCarty, K. M., Hanh, H. T. & Kim, K. W. (2011). Arsenic geochemistry and human health in South East Asia. *Reviews on Environmental Health*, 26, 71–78.

- McFarland, L. V. (2010). Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. *World Journal of Gastroenterology*, 16, 2202–2222.
- Meyer, J., Michalke, K., Kouril, T. & Hensel, R. (2008). Volatilisation of metals and metalloids: an inherent feature of methanoarchaea? *Systematic and Applied Microbiology*, 31, 81–87.
- Michalke, K., Schmidt, A., Huber, B., Meyer, J., Sulkowski, M., Hirner, A. V., Boertz, J., Mosel, F., Dammann, P., Hilken, G., Hedrich, H. J., Dorsch, M., Rettenmeier, A. W. & Hensel, R. (2008). Role of intestinal microbiota in transformation of bismuth and other metals and metalloids into volatile methyl and hydride derivatives in humans and mice. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 3069–3075.
- Minekus, M., Smeets-Peeters, M., Bernalier, A., Marol-Bonnin, S., Havenaar, R., Marteau, P., Alric, M., Fonty, G. & Huis in't Veld, J. H. (1999). A computer-controlled system to simulate conditions of the large intestine with peristaltic mixing, water absorption and absorption of fermentation products. *Applied and Microbiology Biotechnology*, 53, 108–114.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D. J., Ménard, O., Recio, I., Santos, C. N., Singh, R. P., Vegarud, G. E., Wickham, M. S. J., Weitschiesaa, W. & Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food & Function*, 5, 1113–1124.
- Mohan, D. & Pittman, C. U. (2007). Arsenic removal from water/wastewater using adsorbents. A critical review. *Journal of Hazardous Materials*, 142, 1–53.

- Monachese, M., Burton, J. P. & Reid, G. (2012). Bioremediation and tolerance of humans to heavy metals through microbial processes: a potential role for probiotics? *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 6397–6404.
- Moreda-Piñeiro, J., Moreda-Piñeiro, A., Romarís-Hortas, V., Moscoso-Pérez, C., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Bermejo-Barrera, P. & Prada-Rodríguez, D. (2011). In-vivo and in-vitro testing to assess the bioaccessibility and the bioavailability of arsenic, selenium and mercury species in food samples. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 30, 324–345.
- Moslehi-Jenabian, S., Pedersen, L. L. & Jespersen, L. (2010). Beneficial effects of probiotic and food borne yeasts on human health. *Nutrients*, 2, 449–473.
- Moyer, M. P., Manzano, L. A., Merriman, R. L., Stauffer, J. S. & Tanzer, L. R. (1996). NCM-460, a normal human colon mucosal epithelial cell line. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, 32, 315–317.
- Mukhopadhyay, R., Bhattacharjee, H. & Rosen, B. P. (2014). Aquaglyceroporins: generalized metalloid channels. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840, 1583–1591.
- Muñoz, O., Vélez, D. & Montoro, R. (1999). Optimization of the solubilization, extraction and determination of inorganic arsenic [As (III) + As (V)] in seafood products by acid digestion, solvent extraction and hydride generation atomic absorption spectrometry. *Analyst*, 124, 601–607.
- Muñoz, O., Devesa, V., Suñer, M. A., Vélez, D., Montoro, R., Urieta, I., Macho, M. L. & Jalón, M. (2000). Total and inorganic arsenic in fresh and processed fish products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4369–4376.
- Muñoz, O., Díaz, O. P., Leyton, I., Núñez, N., Devesa, V., Suñer, M. A., Vélez, D. & Montoro, R. (2002). Vegetables collected in the cultivated Andean area of Northern Chile. Total and inorganic arsenic contents in raw vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 642–647.

- Nabokina, S. M., Inoue, K., Subramanian, V. S., Valle, J. E., Yuasa, H. & Said, H.M. (2014). Molecular identification and functional characterization of the human colonic thiamine pyrophosphate transporter. *Journal of Biological Chemistry*, 289, 4405–4416.
- Nachman, K. E., Love, D. C., Baron, P. A., Nigra, A. E., Murko, M., Raber, G., Francesconi, K. A. & Navas-Acien, A. (2017). Nitarstone, inorganic arsenic, and other arsenic species in turkey meat: exposure and risk assessment based on a 2014 U.S. market basket sample. *Environmental Health Perspectives*, 125, 363–369.
- Nadaraja, S. P. (2011). Regulation of pathways involved in intestinal phosphate transport. Tesis doctoral en ciencias. Universidad de Londres. 296 pp.
- Naujokas, M. F., Anderson, B., Ahsan, H., Aposhian, H. V., Graziano, J. H., Thompson, C. & Suk, W. A. (2013). The broad scope of health effects from chronic arsenic exposure: update on a worldwide public health problem. *Environmental Health Perspectives*, 121, 295–302.
- Nearing, M. M., Koch, I. & Reimer, K. J. (2014a). Complementary arsenic speciation methods: A review. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, 99, 150–162.
- Nearing, M. M., Koch, I. & Reimer, K. J. (2014b). Arsenic speciation in edible mushrooms. *Environmental Science Technology*, 48, 14203–14210.
- Nicomel, N. R., Leus, K., Folens, K., Van Der Voort, P. & Du Laing, G. (2016). Technologies for arsenic removal from water: current status and future perspectives. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13, 62.
- Niloofer, N., Morteza, Z. & Seyyed, A. S. (2017). Immobilization techniques for microbial bioremediation of toxic metals, en: Handbook of metal-microbe interactions and bioremediation. Ed. CRC Press, Taylor & Francis group.
- NRC. (1999). United States National Research Council. Arsenic in drinking water, National Academy Press, Washington, DC.

- NZFS. (2016). New Zealand Food Safety. 2016 New Zealand Total Diet Study. ISBN: 978-1-77665-806-0.
- OMS. (2011). Organización Mundial de la Salud. Arsenic in drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality.
- OMS. (2017). Organización Mundial de la Salud. Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating the first addendum. World Health Organization, Genova, 4th edition, 631.
- Pekdemir, T., Tokunaga, S., Ishigami, Y. & Hong, K. J. (2000). Removal of cadmium or lead from polluted water by biological amphiphiles. *Journal Surfactants and Detergents*, 3, 43–46.
- Perelló, G. I. Martí-Cid, R., Llobet, J. M. & Domingo, J. L. (2008). Effects of various cooking processes on the concentrations of arsenic, cadmium, mercury, and lead in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(23), 11262–11269.
- Petrick, J. S., Jagadish, B., Mash, E. A. & Aposhian, H. V. (2001). Monomethylarsonous acid (MMA^{III}) and arsenite: LD₅₀ in hamsters and *in vitro* inhibition of pyruvate dehydrogenase. *Chemical Research in Toxicology*, 14, 651–656.
- Pizarro, I., Gómez-Gómez, M., León, J., Román, D. & Palacios, M. A. (2016). Bioaccessibility and arsenic speciation in carrots, beets and quinoa from a contaminated area of Chile. *Science of the Total Environment*, 565, 557–563.
- Pomroy, C., Charbonneau, S. M., McCullough, R. S. & Tam, G. K. (1980). Human retention studies with ⁷⁴As. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 53, 550–556.
- Raab, A., Baskaran, C., Feldmann, J. & Meharg, A. A. (2009). Cooking rice in a high water to rice ratio reduces inorganic arsenic content. *Journal of Environmental Monitoring*, 11(1), 41–44.

- Rahman, A. K. M. A., Vahter, M., Smith, A. H., Nermell, B., Yunus, M., El Arifeen, S., Persson, L. & Ekström, E. (2008). Arsenic exposure during pregnancy and size at birth: a prospective cohort, study in Bangladesh. *American Journal of Epidemiology*, 169, 304–312.
- Rasheed, H., Kay, P., Slack, R., Gong, Y. Y. & Carter, A. (2017). Human exposure assessment of different arsenic species in household water sources in a high-risk arsenic area. *Science of the Total Environment*, 584–585, 631–641.
- Rasheed, H., Kay, P., Slack, R. & Gong, Y. Y. (2018). Arsenic species in wheat, raw and cooked rice: Exposure and associated health implications. *Science of the Total Environment*, 634, 366–373.
- Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. BOE, num 34, viernes 8 de febrero de 2013. Sec. I. Pág. 11370.
- Redan, B. & Ferruzzi, M. (2015). Differentiated Caco-2 cell monolayers exhibit differential adaptation to chronic exposure of green tea and grape seed extracts rich in flavan-3-ols. *FASEB Journal*, 29, Supplement 249.4.
- Rehman, Z. U., Khan, S., Qin, K., Brusseau, M. L., Shah, M. T. & Din, I. (2016). Quantification of inorganic arsenic exposure and cancer risk via consumption of vegetables in southern selected districts of Pakistan. *Science of the Total Environment*, 550, 321–329.
- Rocha, R. A., Calatayud, M., Devesa, V. & Vélez, D. (2017). Evaluation of exposure to fluoride in child population of North Argentina. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(27), 22040–22047.
- Roberts, S. M., Weimar, W. R., Vinson, J. R., Munson, J. W. & Bergeron, R. J. (2002). Measurement of arsenic bioavailability in soil using a primate model. *Toxicological Sciences*, 67, 303–310.

- Rose, M., Lewis, J., Langford, N., Baxter, M., Origgi, S., Barber, M., MacBain, H. & Thomas, K. (2007). Arsenic in seaweed-Forms, concentration and dietary exposure. *Food and Chemical Toxicology*, 45(7), 1263–1267.
- Rose, M., Baxter, M., Brereton, N. & Baskaran, C. (2010). Dietary exposure to metals and other elements in the 2006 UK total diet study and some trends over the last 30 years. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 27(10), 1380–1404.
- Roy, D., Gaur, P., Verma, N., Pathireddy, M. & Sing, K. P. (2013). Bioremediation of arsenic (III) from water using baker yeast *Sacchomyces cerevisiae*. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, 1(1), 14–19.
- Ruby, M. V., Davis, A., Schoof, R., Eberle, S. & Seelstone, C. M. (1996). Estimation of lead and arsenic bioavailability using a physiologically based extraction test. *Environmental Science and Technology*, 30, 422–430.
- Sanz, T. & Luyten, H. (2006). Effect of thickening agent in the in vitro mouth, stomach and intestine release of tyrosol from enriched custards. *Food Hydrocolloids*, 20, 703–711.
- SCF. (1991). Scientific Committee for Food. First addendum to the Reports of the Scientific Committee on Food concerning the essential requirements of infant formulae and follow-up milks based on cow's milk proteins and the minimum requirements for soya-based infant formulae and follow-up milks; Reports of the Scientific Committee for Food, 24th series.
- Seki, H., Suzuki, A. & Maruyama, H. (2005). Biosorption of chromium(VI) and arsenic(V) onto methylated yeast biomass. *Journal of Colloid and Interface Science*, 281, 261–266.
- Seo, M. N., Lee, S. G., Eom, S. Y., Kim, J., Oh, S. Y., Kwon, H. J., Kim, H., Choi, B. S., Yu, I. J. & Park, J. D. (2016). Estimation of total and inorganic arsenic intake from the diet in korean adults. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 70, 647–656.

- Shah, D., Shen, M. W., Chen, W. & Da Silva, N. A. (2010). Enhanced arsenic accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* overexpressing transporters Fps1p or Hxt7p. *Journal of Biotechnology*, 150, 101–107.
- Sharma, A. K., Tjell, J. C., Sloth, J. J., Holm, P. E. (2014). Review of arsenic contamination, exposure through water and food and low cost mitigation options for rural areas. *Applied Geochemistry*, 41, 11–13.
- Shen, M. W., Shah, D., Chen, W. & Da Silva, N. (2012). Enhanced arsenate uptake in *Saccharomyces cerevisiae* overexpressing the Pho84 phosphate transporter. *Biotechnology Progress*, 28(3), 654–661.
- Signes-Pastor, A. J., Mitra, K., Sarkhel, S., Hobbes, M., Burló, F., de Groot W. T. & Carbonell-Barrachina, A. A. (2008). Arsenic speciation in food and estimation of the dietary intake of inorganic arsenic in a rural village of West Bengal, India. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9469–9474.
- Signes-Pastor, A. J., Al-Rmalli, S. W., Jenkins, R. O., Carbonell-Barrachina, A. A. & Haris, P. I. (2012). Arsenic bioaccessibility in cooked rice as affected by arsenic in cooking water. *Journal of Food Science*, 7(11), T201–T206.
- Signes-Pastor, A. J., Carey, M. & Meharg, A. A. (2017). Inorganic arsenic removal in rice bran by percolating cooking water. *Food Chemistry*, 234, 76–80.
- Singh, A. L. & Sarma, P. N. (2010). Removal of arsenic(III) from waste water using *Lactobacillus acidophilus*. *Bioremediation Journal*, 14, 92–97.
- Sinha, R., Sinha, I., Calcagnotto, A., Trushin, N., Haley, J. S., Schell, T. D. & Richie, J. P. (2018). Oral supplementation with liposomal glutathione elevates body stores of glutathione and markers of immune function. *European Journal of Clinical Nutrition*, 72, 105–111.
- Slekovec, M. & Irgolic, K. J. (1996). Uptake of arsenic by mushrooms from soil. *Chemical Speciation and Bioavailability*, 8, 67–73.

- Sloth, J. J. & Julshamn, K. (2008). Survey of total and inorganic arsenic content in blue mussels (*Mytilus edulis* L.) from Norwegian fiords: revelation of unusual high levels of inorganic arsenic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 1269–1273.
- Smith, A. H., Hopenhayn-Rich, C., Bates, M., Goeden, H., Hertz-Picciotto, I., Duggan, H., Wood, R., Kosnett, M. J. & Smith, M. (1992). Cancer risks from arsenic in drinking water. *Environmental Health Perspectives*, 97, 259–267.
- Smith, A. H., Biggs, M. L., Moore, L., Haque, R., Steinmaus, C., Chung, J., Hernandez, A. & Lopipero, P. (1999). Cancer risks from arsenic in drinking water: implication for drinking water standards. In *Arsenic exposure and health effects*. Eds. Chappell, W. R., Abernathy, C. O., Calderon, R. L. Elsevier Science, 191–206.
- Smith, A. H., Lingas, E. O. & Rahman, M. (2000). Contamination of drinking-water by arsenic in Bangladesh: a public health emergency. *Bulletin of the World Health Organization*, 78(9), 1093–1103.
- Smith, P. G., Koch, I., Gordon, R. A., Mandoli, D. F., Chapman, B. D. & Reimer, K. J. (2005). X-ray absorption near-edge structure analysis of arsenic species for application to biological environmental samples. *Environmental Science and Technology*, 39, 248–254.
- Smith, N. M., Lee, R., Heitkemper, D.T., De Nicola, C., Haque, A., Henderson, A.K. (2006a). Inorganic arsenic in cooked rice and vegetables from Bangladeshi households. *Science of the Total Environment*, 370(2-3), 294–301.
- Smith, A. H., Marshall, G., Yuan, Y., Ferreccio, C., Liaw, J., Ehrenstein, O., Steinmaus, C., Bates, M. N. & Selvin, S. (2006b). Increased mortality from lung cancer and bronchiectasis in young adults after exposure to arsenic in utero and in early childhood. *Environmental Health Perspectives*, 114, 1293–1296.

- Sorlini, S. & Gialdini, F. (2010). Conventional oxidation treatments for the removal of arsenic with chlorine dioxide, hypochlorite, potassium permanganate and monochloramine. *Water Research*, 44, 5653–5659.
- Storelli, M. M. & Marcotrigiano, G. O. (2000). Organic and inorganic arsenic and lead in fish from the South Adriatic Sea, Italy. *Food Additives and Contaminants*, 17(9), 763–768.
- Subramanian, V. S., Ghosal, A., Kapadia, R., Nabokina, S. M. & Said, H. M. (2015). Molecular mechanisms mediating the adaptive regulation of intestinal riboflavin uptake process. *PLoS One*, 10, e0131698.
- Sugano, K., Kansy, M., Artursson, P., Avdeef, A., Bendels, S., Di, L., ; Ecker, G. F., Faller, B., Fischer, H., Gerebtzoff, G., Lennernaes, H., Senner, F. (2010). Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9, 597–614.
- Sun, G. X., Williams, P. N., Zhu, Y. G., Deacon, C., Carey, A. M., Raab, A., Feldmann, J. & Meharg, A. A. (2009). Survey of arsenic and its speciation in rice products such as breakfast cereals, rice crackers and Japanese rice condiments. *Environment International*, 35, 473–475.
- Sun, G.X., Van De Wiele, T., Alava, P., Tack, F. & Du Laing, G. (2012). Arsenic in cooked rice: Effect of chemical, enzymatic and microbial processes on bioaccessibility and speciation in the human gastrointestinal tract. *Environmental Pollution*, 162, 241–246.
- Suñer, M. A., Devesa, V., Clemente, M. J., Vélez, D., Montoro, R., Urieta, I., Jalón, M. & Macho, M. L. (2002). Organoarsenical species contents in fresh and processed seafood products. *Journal Agricultural and Chemistry*, 50, 924–932.
- Symonowicz, M. & Kolanek, M. (2012). Flavonoids and their properties to form chelate complexes. *Food Science and Biotechnology*, 76, 35–41.
- Teemu, H., Seppo, S., Jussi, M., Raija, T. & Kalle, L. (2008). Reversible surface binding of cadmium and lead by lactic acid and bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 125, 170–175.

- Terlecka, E. (2005). Arsenic speciation analysis in water samples: a review of the hyphenated techniques. *Environmental Monitoring and Assessment*, 107, 259–284.
- Thring, T. S. A., Hili, P. & Naughton, D. P. (2011). Antioxidant and potential anti-inflammatory activity of extracts and formulations of white tea, rose, and witch hazel on primary human dermal fibroblast cells. *Journal of Inflammation*, 8(1), 27.
- 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.
- Tseng, C. H. (2007). Arsenic methylation, urinary arsenic metabolites and human diseases: current perspective. *Journal of Environmental Science and Health Part C*, 25, 1–22.
- Tuutijärvi, T., Repo, E., Vahala, R., Sillanpää, M. & Chen, G. (2012). Effect of competing anions on arsenate adsorption onto maghemite nanoparticles. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 20, 505–514.
- Tyler, C. R. & Allan, A. M. (2014). The effects of arsenic exposure on neurological and cognitive dysfunction in human and rodent studies: a review. *Current Environmental Health Reports*, 1, 132–147.
- Ulluwishewa, D., Anderson, R. C., McNabb, W. C., Moughan, P. J., Wells, J. M. & Roy, N. C. (2011). Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. *Journal of Nutrition*, 141, 769–776.
- U.S. EPA. (2002). Environmental Protection Agency. Notice of Receipt of Requests to Cancel Certain Chromated Copper Arsenate (CCA) Wood Preservative Products and Amend to Terminate Certain Uses of CCA Products, 67, 36.
- U. S. EPA. (2009). U.S. Environmental Protection Agency. Toxicological review of inorganic arsenic (CAS No. 7440-38-2). In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS). U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, 2009.

- U. S. EPA. (2010) Environmental Protection Agency. Federal Register/Vol75 No.215/8 November 2010/Rules and Regulations.
- USGS. (2018). U.S. Geological Survey. Mineral Commodity Summaries. <https://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/arsenic/mcs-2018-arsen.pdf>
- Vahter, M., Marafante, E. & Dencker, L. (1984). Tissue distribution and retention of 74As-dimethylarsinic acid in mice and rats. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 13, 259–264.
- Vahter, M. (1994). Species differences in the metabolism of arsenic compounds. *Applied Organometallic Chemistry*, 8, 175–182.
- Valenzuela, O. L., Borja-Aburto, V. H., Garcia-Vargas, G. G., Cruz-Gonzalez, M. B., Garcia-Montalvo, E. A., Calderon-Aranda, E. S. & Del Razo, L. M. (2005). Urinary trivalent methylated arsenic species in a population chronically exposed to inorganic arsenic. *Environmental Health Perspectives*, 113(3), 250–254.
- Valenzuela, A., Balladares, E., Cordero, D. & Sánchez, M. (2006). Arsenic management in the metallurgical industry: Chilean experience, 2006. TMS Fall Extraction and Processing Division. Sohn International Symposium, 9, 407–422.
- Van Buren, J. P. & Robinson, W. B. (1969). Formation of complexes between protein and tannic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 17, 772–777.
- Vázquez, M., Devesa, V. & Vélez, D. (2015). Characterization of the intestinal absorption of inorganic mercury in Caco-2 cells. *Toxicology in Vitro*, 29, 93–102.
- Vetter, J. (2004). Arsenic content of some edible mushroom species. *European Food Research and Technology*, 219, 71–74.

- Villa-Bellosta, R. & Sorribas, V. (2008). Role of rat sodium/phosphate cotransporters in the cell membrane transport of arsenate. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 232, 125–134.
- Villa-Bellosta, R. & Sorribas, V. (2010). Arsenate transport by sodium/phosphate cotransporter type IIb. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 247, 36–40.
- Wang, N., Wang, G., Hao, J., Ma, J., Wang, Y., Jiang, X. & Jiang, H. (2012). Curcumin ameliorates hydrogen peroxide-induced epithelial barrier disruption by upregulating heme oxygenase-1 expression in human intestinal epithelial cells. *Digestive Diseases and Sciences*, 57, 1792–1801.
- Waters, S. B., Devesa, V., Del razo, L. M., Styblo, M. & Thomas, D. J. (2004). Endogenous reductants support the catalytic function of recombinant rat cyt19, an arsenic methyltransferase. *Chemical Research in Toxicology*, 17, 404–409.
- Waxman, S. & Anderson, K. C. (2001). History of the development of arsenic derivatives in cancer therapy. *Oncologist*, 6 (Suppl. 2), 3–10.
- Webb, S. M., Gaillard, J. F., Ma, L. Q. & Tu, C. (2003). XAS speciation of arsenic in a hyper-accumulating fern. *Environmental Science and Technology*, 37, 754–760.
- Wei, M., Wanibuchi, H., Morimura, K., Iwai, S., Yoshida, K., Endo, G., Nakae, D. & Fukushima, S. (2002). Carcinogenicity of dimethylarsinic acid in male F344 rats and genetic alterations in induced urinary bladder tumors. *Carcinogenesis*, 23, 1387–1397.
- Wei, C., Li, W., Zhang, C., Van Hulle, M., Cornelis, R. & Zhang, X. (2003). Safety evaluation of organoarsenical species in edible *Porphyra* from the China Sea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(17), 5176–5182.
- Weis, C. P. & LaVelle, J. M. (1991). Characteristics to consider when choosing an animal model for the study of lead bioavailability. *Chemical Speciation & Bioavailability*, 3, 113–119.

- Weschawalit, S., Thongthip, S., Phutrakool, P. & Asawanonda, P. (2017). Glutathione and its antiaging and antimelanogenic effects. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 10, 147–153.
- Whaley-Martin, K. J., Koch, I., Reimer, K. J. (2013). Determination of arsenic species in edible periwinkles (*Littorina littorea*) by HPLC-ICPMS and XAS along a contamination gradient. *Science of the Total Environment*, 456–457, 148–153.
- Wierzbicka, G.T., Hagen, T. M. & Tones, D. P. (1989). Glutathione in food. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2(4), 327–337.
- Williams, P. N., Price, A. H., Raab, A., Hossain, S. A., Feldmann, J. & Meharg, A. A. (2005). Variation in arsenic speciation and concentration in paddy rice related to dietary exposure. *Environmental Science and Technology*, 39, 5531–5540.
- Winiarska-Mieczan, A., Krusiński, R. & Kwiecień, M. (2013). Tannic acid influence on lead and cadmium accumulation in the hearts and lungs of rats. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 22, 615–620.
- Wong, W. W. K., Chung, S. W. C., Chan, B. T. P., Ho, Y. Y. & Xiao, Y. (2013). Dietary exposure to inorganic arsenic of the Hong Kong population: Results of the first Hong Kong Total Diet Study. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 379–385.
- Wragg, J. & Cave, M. R. (2002). In-vitro methods for measurement of the oral bioaccessibility of selected metals and metalloids in solids. A critical review. R&D Technical Report P5–062. ISBN 1857059867.
- Wu, Y., Wen, Y., Zhou, J., Dai, Q. & Wu, Y. (2012). The characteristics of waste *Saccharomyces cerevisiae* biosorption of arsenic(III). *Environmental Science and Pollution Research International*, 19, 3371–3379.
- Yamauchi, H. & Yamamura, Y. (1985). Metabolism and excretion of orally administrated arsenic trioxide in the hamster. *Toxicology*, 34, 113–121.

- Yang, H. C., Fu, H. L., Lin, Y. F. & Rosen, B. P. (2012). Pathways of arsenic uptake and efflux. *Current Topics in Membranes*, 69, 325–358.
- Yee, S. (1997). In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man-fact or myth. *Pharmaceutical Research*, 14, 763–766.
- Yoshida, K., Kuroda, K., Inoue, Y., Chen, H., Date, Y., Wanibuchi, H., Fukushima, S. & Endo, G. (2001). Metabolism of dimethylarsinic acid in rats: production of unidentified metabolites in vivo. *Applied Organometallic Chemistry*, 15 (6), 539–547.
- Yu, H., Wu, B., Zhang, X. X., Liu, S., Yu, J., Cheng, S., Ren, H. Q. & Ye, L. (2016). Arsenic metabolism and toxicity influenced by ferric iron in simulated gastrointestinal tract and the roles of gut microbiota. *Environmental Science & Technology*, 50, 7189–7197.
- Yunus, F. M., Khan, S., Chowdhury, P., Milton, A. H., Hussain, S. & Rahman, M. (2016). A review of groundwater arsenic contamination in Bangladesh: the millennium development goal era and beyond. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(2), 215.
- Zavala Y. I. & Duxbury J. M. (2008). Arsenic in rice: I. Estimating normal levels of total arsenic in rice grain. *Environmental Science and Technology*, 42, 3856–3860.
- Zhao, F. J., Ma, J. F., Meharg, A. A. & McGrath, S. P. (2009). Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytologist*, 181, 777–794.
- Zhao, Y. F., Wu, J. F., Shang, D. R., Ning, J. S., Ding, H. Y. & Zhai, Y. X. (2014). Arsenic species in edible seaweeds using in vitro biomimetic digestion determined by high-performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry. *International Journal of Food Science & Technology*, 2014, 1–12.

- Zhai, Q., Tian, F., Wang, G., Zhao, J., Liu, X., Cross, K., Zhang, H., Narbad, A. & Chen, W. (2016). The cadmium binding characteristics of a lactic acid bacterium in aqueous solutions and its application for removal of cadmium from fruit and vegetable juices. *RSC Advances*, 6, 5990–5998.
- Zhang, J., Li, T., Yang, Y. L., Liu, H. G. & Wang, Y. Z. (2015). Arsenic concentrations and associated health risks in Laccaria mushrooms from Yunnan (SW China). *Biological Trace Element Research*, 164, 261–266.

Anexo

Listado de publicaciones

La presente tesis doctoral ha dado lugar a 3 publicaciones científicas en revistas del primer cuartil del área de Ciencia de los Alimentos y a tres publicaciones en vías de publicación:

Clemente, M.J., Devesa, V., Vélez, D. (2016). Dietary strategies reduce the bioaccessibility of arsenic from food matrices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64 (4), 923-931.

Clemente, M.J., Devesa, V., Vélez, D. (2017). *In vitro* reduction of arsenic bioavailability using dietary strategies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65 (19), 3956-3964.

Jadán-Piedra, C., Matuoka Chiocchetti, G., **Clemente, M.J.**, Vélez, D., Devesa, V. (2018). Dietary compounds as modulators of metals and metalloids toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58, 2055-2067.

Clemente, M.J., Serrano, S., Devesa, V., Vélez, D. Arsenic speciation in food using X-ray absorption spectroscopy. En vías de publicación (*Environmental Science and Technology*).

Clemente, M.J., Vivó, M.A., Puig, S., Zúñiga, M., Monedero, V., Devesa, V., Vélez, D. *In vitro* evaluation of the effectiveness of lactic acid bacteria and yeast for reducing the oral bioavailability of inorganic arsenic. En vías de publicación (*Food Chemistry*).

Clemente, M.J., Cimbalo, A., Chiocchetti, G., Devesa, V., Vélez, D. Dietary strategies to reduce *in vivo* inorganic arsenic bioavailability. En vías de publicación (*Journal of Agricultural and Food Chemistry*).

