

**TRABAJO DE FIN DE MÁSTER  
MÓDULO DE QUÍMICA ANALÍTICA****MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN  
DE ARSÉNICO EN ARROZ****Autor/a: Elena María Fernández Rodríguez****Tutor/a: Juan Carlos Bravo Yagüe****FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS ANALÍTICAS  
Septiembre 2020**



## ÍNDICE

TABLAS .....	1
FIGURAS.....	1
GLOSARIO.....	2
RESUMEN .....	5
1.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	5
1.1.- PRESENCIA DEL ARSÉNICO EN EL MEDIO AMBIENTE.....	5
1.2.- OBJETIVOS .....	7
1.3.- TOXICIDAD DEL ARSÉNICO .....	8
1.3.1.- Efectos del arsénico sobre la salud .....	10
1.3.2.- Formas de arsénico inorgánico.....	12
1.3.3.- Formas de arsénico orgánico .....	13
1.4.- EL ARROZ Y EL ARSÉNICO.....	16
1.4.1.- Producción y consumo de arroz en Europa .....	17
1.4.2.- Producción y consumo de arroz en el resto del mundo .....	20
1.4.3.- Presencia de arsénico en arroz .....	21
1.4.4.- Tipos de arroz para el estudio del contenido en arsénico.....	23
1.5.- NORMATIVA REGULADORA.....	24
2.- DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO EN ARROZ.....	27
2.1.- PARTE TEÓRICA .....	27
2.1.1.- Tratamiento de la muestra .....	27
2.1.1.1.- Mineralización .....	27
2.1.1.2.- Extracción .....	29

2.1.1.3.- <i>Preconcentración</i> .....	31
2.1.1.4.- <i>Derivatización</i> .....	32
2.1.2.- <i>Métodos analíticos</i> .....	32
2.1.2.1.- <i>Métodos analíticos para la determinación del contenido de arsénico total</i> .....	32
2.1.2.2.- <i>Métodos analíticos para la determinación de especies de arsénico hidrosolubles</i> .....	35
2.1.2.3.- <i>Métodos analíticos para la determinación de especies de arsénico liposolubles</i> .....	39
2.2.- <b>PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	41
3.- <b>CONCLUSIONES</b> .....	63
4.- <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	64

## **TABLAS**

**Tabla 1.** Especies de arsénico inorgánicas.

**Tabla 2.** Especies de arsénico orgánicas.

**Tabla 3.** Límites máximos de iAs en arroz y productos derivados de arroz (Reglamento (UE) 2015/1006).

**Tabla 4.** Estructuras químicas asignadas a arsenolípidos identificados.

**Tabla 5.** Resumen de las principales técnicas analíticas para la determinación de arsénico en arroz.

## **FIGURAS**

**Figura 1.** Caracterización del elemento químico arsénico.

**Figura 2.** Propuesta de vía del metabolismo del arsénico en humanos (Khairul, 2017).

**Figura 3.** Lesiones en la piel por intoxicación con arsénico.

**Figura 4.** Producción y superficie mundiales de arroz en cáscara (FAOSTAT, 2018).

**Figura 5.** Superficie y producción de arroz en la Unión Europea (MAPAMA, 2017).

**Figura 6.** Superficie y producción de arroz en España (MAPAMA, 2017).

**Figura 7.** Distribución de la superficie de arroz por CCAA 2016/17 (ha).

**Figura 8.** Distribución de la producción de arroz por CCAA 2016/17 (t).

**Figura 9.** Productores de arroz en el mundo (FAOSTAT, 2018).

**Figura 10.** Producción de arroz en cáscara en Asia (FAOSTAT, 2018).

**Figura 11.** Cultivo de arroz.

**Figura 12.** Transporte de la savia bruta desde las raíces a la parte aérea de la planta a través del xilema.

**Figura 13.** Contenido de arsénico total e inorgánico en arroz de diferente origen.

**Figura 14.** Extracción con Soxhlet en el momento en que se produce el sifonamiento del disolvente.

**Figura 15.** Esquema general de un Espectrómetro de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (Radboud University, 2016).

**Figura 16.** Cromatograma obtenido por HPLC-ICP-MS de una muestra de arroz.

**Figura 17.** Esquema del instrumento HG-AFS acoplado con HPLC empleado en la determinación de arsénico (Huerga, 2005).

**Figura 18.** Acoplamiento HPLC-HG-AFS (Sánchez-Rodas, 2018).

## **GLOSARIO**

**AAS** Espectrometría de Absorción Atómica

**AES** Espectrometría de Emisión Atómica

**AFS** Espectrometría de Fluorescencia Atómica

**APL** Leucemia Promielocítica Aguda

**AsB** Arsenobetaína

**As-i o iAs** Arsénico inorgánico

**As-t o tAs** Arsénico total

**AS3MT** Arsénico-3-Metiltransferasa

**CCAA** Comunidades Autónomas

**CE** Comisión Europea

**CMR** Material de Referencia Certificado

**DMA** Ácido Dimetilarsínico

**EC** Electroforesis Capilar

**EEMM** Estados Miembros

**EEUU** Estados Unidos

**EFSA** European Food Safety Authority (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria)

**ESI-MS** Espectrometría de Masas con Ionización mediante Electro-Spray

**ETAAS** Espectrometría de Absorción Atómica Electrotérmica

**FAO** Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)

**FI-HG-AAS** Flow Injection Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry (Espectrometría de Absorción Atómica con Generación de Hidruros con Inyección de Flujo)

**FSA** Food Standard Agency (UK)

**GC** Cromatografía de Gases

**GC-MS** Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas

**GC-MIP-AES** Espectrometría de Emisión Atómica con Plasma Inducido por Microondas acoplado a Cromatografía de gases

**HG** Generación de Hidruros

**HG-AFS** Espectrometría Fluorescencia Atómica con Generación de Hidruros

**HG-ICP-AES** Espectrometría de Emisión Atómica con Plasma acoplado inductivamente con Generación de Hidruros

**HPLC** Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia

**HPLC-HG-AFS** Espectrometría de Fluorescencia Atómica con Generación de Hidruros con Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia

**HPLC-HG-ICP-AES** Espectrometría de Emisión Atómica con Plasma Acoplado Inductivamente con Generación de Hidruros con Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia

**HPLC-ICP-MS** Cromatografía Líquida de Alta Eficacia con Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente

**HR-ICP-MS** Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente de Alta Resolución

**IARC** Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer

**IC** Cromatografía Iónica

**ICP-AES** Espectrometría de Emisión Atómica con Plasma acoplado inductivamente

**IC-ICP-MS** Cromatografía Iónica con espectrometría de masas de plasma acoplado Inductivamente

**ICP-MS** Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente

**ICP-OES** Espectrometría de Emisión Óptica con Plasma Acoplado Inductivamente

**LOD** Límite De Detección

**MAE** Extracción Asistida por Microondas

**MMA** Ácido Monometilarsónico

**PLE** Extracción con Líquidos Presurizados

**SAM** S-Adenosil Metionina

**SMA** Seguimiento del Mercado del Arroz

**SFE** Extracción con Fluidos Supercríticos

**TFA** Ácido Trifluoroacético

**UE** Unión Europea

**UPS** Sonda de Ultrasonidos Focalizada

**UV-VIS** Ultravioleta-Visible

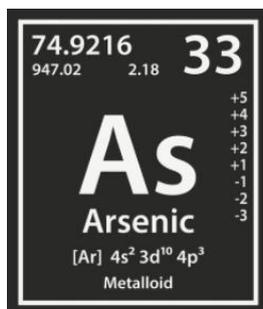
## RESUMEN

El arsénico, elemento químico de número atómico 33, caracterizado como metaloide, se presenta en la naturaleza en forma de compuestos inorgánicos y orgánicos. Resultados de estudios en animales han demostrado que los compuestos de arsénico inorgánico pueden clasificarse como carcinógenos, grupo 1. Este metaloide puede llegar al ser humano por diferentes vías, pero una de las más significativas es a través de la ingesta de arroz, alimento de gran consumo y donde este elemento podría encontrarse en altas concentraciones. Los Estados Miembros de la Unión Europea (EEMM) junto a la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) han recopilado datos sobre la concentración de arsénico en arroz en diferentes partes del mundo con el fin de delimitar la ingesta de seguridad de alimentos a base de arroz. En este trabajo se revisan los métodos analíticos existentes para la determinación de arsénico presente en arroz.

## 1.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

### 1.1.- PRESENCIA DEL ARSÉNICO EN EL MEDIO AMBIENTE

El arsénico, elemento químico de número atómico 33 y masa atómica 74,92 u, descubierto por el químico alemán ahora canonizado San Alberto Magno en el año 1250 aproximadamente, tiene unas propiedades físicas y químicas intermedias entre un metal y un no metal, por lo que suele ser referido como metaloide o semimetal. Pertenece al Grupo 15 de la Tabla Periódica y, puede existir en varios estados de oxidación. Arsenito  $\text{As}^{+3}$  y arseniato  $\text{As}^{+5}$  son los estados de oxidación habituales.



**Figura 1.** Caracterización del elemento químico arsénico.

El arsénico es un metaloide presente en la naturaleza, procedente tanto de fuentes naturales como antropogénicas, y que se presenta en diferentes formas químicas inorgánicas y orgánicas. Es un contaminante ambiental al que los humanos están expuestos habitualmente a través del agua, el aire, el suelo y los alimentos.

Como resultado de la actividad volcánica e industrial el arsénico es emitido al medio ambiente. La minería, la fundición de metales no ferrosos y la quema de combustibles fósiles son las principales fuentes antropogénicas de contaminación por arsénico del aire, el agua y el suelo, principalmente en forma de trióxido de arsénico. El uso histórico de pesticidas que contienen arsénico ha dejado grandes extensiones de tierras agrícolas contaminadas. Por un lado, se estima que las fuentes antropogénicas representan casi 24000 toneladas de arsénico emitidas a la atmósfera global por año, por otro lado, se estima que aproximadamente un tercio del flujo atmosférico global de arsénico proviene de fuentes naturales, unas 7900 toneladas por año. La actividad volcánica es el contribuyente natural más importante, seguido por la volatilización a baja temperatura, los exudados de la vegetación y los polvos arrastrados por el viento (WHO, 2001).

El arsénico se transporta principalmente en el medio ambiente a través del agua. La forma y la concentración de arsénico dependen de varios factores. En condiciones reductoras, por ejemplo, predominan los arsenitos, como los que se encuentran en aguas de pozos profundos. El grado de actividad biológica se asocia con la conversión de arsénico inorgánico a ácidos de arsénico metilado, el tipo de fuente de agua y la proximidad de la fuente de agua a formaciones geológicas ricas en arsénico y otras fuentes antropogénicas, son otros de los factores que influyen en la forma y concentración en que se encuentre el arsénico. La concentración de arsénico en las fuentes superficiales de agua dulce, como ríos y lagos, es generalmente menor de 10 µg/l, aunque puede llegar a 5 mg/l cerca de las fuentes antropogénicas. Las concentraciones de arsénico en el agua de mar abierto y en el agua subterránea se sitúan en el rango 1-2 µg/l, aunque las concentraciones de agua subterránea pueden ser de hasta 3 mg/l en áreas con roca volcánica y depósitos minerales de sulfuro (WHO, 2001).

La exposición a altos niveles de arsénico en el agua potable ha sido reconocida durante muchas décadas en algunos lugares del mundo, especialmente en China, Sur y Sudeste asiático, y algunos países de América Central y del Sur. En la mayoría de estos países, la fuente de agua potable es agua subterránea, contaminada de forma natural por formaciones geológicas ricas en arsénico. Además, minería, fundición y otras actividades industriales han contribuido a elevar las concentraciones de arsénico en las fuentes locales de agua, las principales regiones donde se han medido altas concentraciones de arsénico en el agua

potable incluyen grandes áreas de Bangladés, China, Bengala Occidental (India), áreas más pequeñas de Japón, México, Tailandia, Brasil, Australia y EEUU. De esta manera, los niveles de arsénico en las áreas afectadas pueden variar de decenas a cientos o incluso miles de microgramos por litro, mientras que, en áreas no afectadas, los niveles suelen ser de unos pocos microgramos por litro. El arsénico se presenta en el agua potable principalmente como As (V), aunque en entornos reductores también se ha comprobado que hay concentraciones significativas de As (III), y por lo general, se encuentran trazas de especies de arsénico metilado.

## **1.2.- OBJETIVOS**

El arroz es un alimento importante en cualquier cultura, y en ciertas zonas del planeta se trata de un alimento básico, de consumo diario. Por otro lado, el arroz es especialmente eficaz, en comparación con otros cereales, en la acumulación de arsénico. Debido a esta circunstancia, surge la necesidad de realizar estudios, empleando diferentes técnicas instrumentales de análisis químico, para detectar y cuantificar el arsénico presente en arroz con el fin de regular su ingesta, bien controlando el consumo de arroz, bien tratando el agua de riego previamente.

El objetivo principal del presente trabajo es el estudio de los diferentes métodos analíticos de determinación de arsénico en arroz y que incluye, como objetivos específicos, los siguientes:

- Describir la toxicidad del arsénico en sus diferentes formas orgánicas e inorgánicas por exposición al mismo.
- Exponer la problemática de la presencia de arsénico en el arroz y mostrar la legislación vigente que establece los límites máximos de arsénico en arroz y sus derivados, en la Unión Europea, para reducir el riesgo para la salud humana derivado de la exposición al arsénico a través de la dieta.
- Realizar una revisión bibliográfica exhaustiva de las técnicas instrumentales de análisis químico para la determinación de arsénico en arroz llevadas a cabo en los últimos años.

### **1.3.- TOXICIDAD DEL ARSÉNICO**

En la antigua Grecia, el médico, farmacólogo y botánico Dioscórides catalogó el arsénico como veneno (siglo I d.C.). Desde la Edad Media, su popularidad como veneno se consolidó, por ser, incoloro, insípido, inodoro, fácilmente disponible y, administrado en una sola dosis en alimentos o bebidas, altamente efectivo. Además, los síntomas de envenenamiento por arsénico eran difíciles de detectar, al ingerirlo los malestares se confundían con los del cólera (una enfermedad muy frecuente). Sin embargo, el descubrimiento de una prueba química específica para la detección de arsénico por James Marsh en 1836, puso fin al apogeo de este “rey de los venenos” (Meek, 1955).

Posteriormente, y unos años antes a la introducción de la penicilina a principios de 1940, concretamente en el año 1909, Paul Ehrlich sintetizó un compuesto de organoarsénico que se comercializó un año después bajo la marca Salvarsan, primer medicamento seguro y efectivo para el tratamiento de la sífilis que rápidamente se convirtió en el medicamento más recetado en el mundo. Tras su descubrimiento, se introdujeron otros compuestos organoarsenicales para su uso contra diversas infecciones bacterianas o parasitarias (Lloyd *et al.*, 2005).

Alguna vez se creyó que la tolerancia al arsénico y, por lo tanto, la inmunidad al envenenamiento podría desarrollarse mediante la ingestión regular. Lamentablemente, la exposición diaria crónica a bajos niveles de arsénico, para los millones de personas que actualmente lo beben en su agua potable, confiere mayores tasas de morbilidad y mortalidad que de tolerancia.

Teniendo en cuenta que el arsénico se puede encontrar en varias formas estructurales orgánicas e inorgánicas y en estados de oxidación trivalente o pentavalente, se ha analizado su toxicidad y se ha llegado a la conclusión de que el arsénico inorgánico es más tóxico que el arsénico orgánico para el ser humano y, además, el arsénico trivalente As (III) es toxicológicamente más potente que el arsénico pentavalente As (V) (Mandal *et al.*, 2001). De modo que, el ion arsenito es de 2 a 10 veces más tóxico que el arseniato. El arsenito suprime la actividad de más de 200 enzimas después de unirse con los grupos tiol o sulfhidrilo, afectando a numerosos órganos (Goyer, 2001).

Las formas pentavalentes y trivalentes se pueden interconvertir fácilmente (Andrewes *et al.*, 2004). A pesar de que los compuestos arsenicales inorgánicos son más tóxicos que los orgánicos, hay evidencia de que las especies metiladas monometilarsonato MMA (V) y

dimetilarsinato DMA (V), productos derivados del metabolismo de desintoxicación del arsénico en humanos, son promotores de cáncer (Cameán y Repetto, 2006).

En el cuerpo, el metabolismo del arsénico es un complicado proceso que involucra más de cinco metabolitos y comienza con la metilación de compuestos de arsénico inorgánico (iAs). El arsénico pentavalente en forma de compuesto iAs, se convierte en arsénico trivalente inorgánico. El As (III) inorgánico se metaboliza en una forma unida a proteínas sometida a metilación reductora sucesiva por la enzima arsénico-3-metiltransferasa (AS3MT) que, en presencia de glutatión, lleva a cabo la transferencia de un grupo metilo de S-adenosil metionina (SAM) a arsénico trivalente. En particular, el ácido monometilarsónico trivalente MMA (III), y el ácido dimetilarsínico trivalente DMA (III), son los metabolitos intermedios que unidos a proteínas se oxidan aún más al correspondiente ácido monometilarsónico pentavalente MMA (V), y ácido dimetilarsínico pentavalente DMA (V), que se consideran productos finales menos tóxicos del metabolismo del arsénico.

De este modo, el arsénico inorgánico se absorbe eficientemente en el tracto gastrointestinal y se metaboliza en el cuerpo a través de reacciones de reducción y metilación, como se puede observar en la siguiente figura.

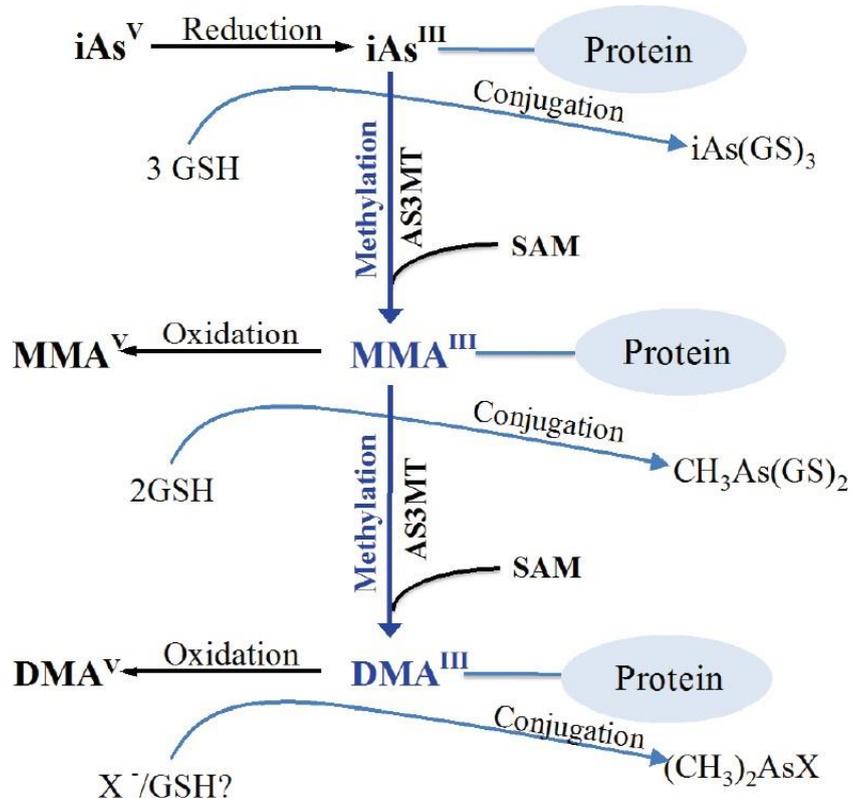


Figura 2. Propuesta de vía del metabolismo del arsénico en humanos (Khairul, 2017).

Como se ha podido observar la principal vía metabólica del arsénico es la metilación. La capacidad de metilación del arsénico, también conocida como eficiencia del metabolismo del arsénico, se refiere a la distribución de MMA (V) y DMA (V) en la orina. Se ha comprobado que el metabolito de arsénico más tóxico es MMA, por tanto, los niveles bajos de MMA en comparación con DMA en la orina son beneficiosos para reducir su toxicidad (Smith y Steinmaus, 2009).

El mecanismo tóxico del arsénico es complejo, porque la toxicidad del arsénico se ve afectada por su estado de oxidación y solubilidad, además de numerosos otros factores internos y externos (Centeno *et al.*, 2005).

Por otro lado, se ha confirmado la asociación de la exposición a arsénico con cáncer y en la década de 1980, el arsénico fue oficialmente reconocido como una sustancia cancerígena y registrado en la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) (IARC, 1980).

El arsénico es el único carcinógeno conocido por causar cáncer a través de exposición respiratoria y gastrointestinal (Centeno *et al.*, 2006).

### **1.3.1.- Efectos del arsénico sobre la salud**

Los efectos del arsénico varían desde problemas gastrointestinales hasta la muerte. Los síntomas inmediatos de intoxicación aguda por arsénico incluyen vómitos, dolor abdominal y diarrea. Seguidamente, aparecen otros efectos, como entumecimiento u hormigueo en las manos y los pies o calambres musculares y, en casos extremos, la muerte.

Al estar presente el arsénico en el suelo y aguas subterráneas, todas las plantas y animales lo absorben, de modo que las personas lo ingieren de forma prolongada. Dependiendo de la dosis, la exposición crónica al arsénico puede afectar varios órganos principales (Hughes *et al.*, 2011). Los primeros síntomas de la exposición prolongada a altos niveles de arsénico inorgánico, a través del consumo de agua y alimentos contaminados, se observan generalmente en la piel e incluyen cambios de pigmentación, lesiones cutáneas, durezas y callosidades en las palmas de las manos y las plantas de los pies (hiperqueratosis). Estos efectos se producen tras una exposición mínima de aproximadamente cinco años y pueden ser precursores de cáncer de piel.



**Figura 3.** Lesiones en la piel por intoxicación con arsénico.

Entre los demás efectos perjudiciales para la salud que se pueden asociar a la ingesta prolongada de arsénico destacan, problemas relacionados con el desarrollo, neurotoxicidad, cáncer, diabetes y enfermedades pulmonares y cardiovasculares. En particular, los infartos de miocardio inducidos por el arsénico pueden suponer una importante causa de aumento de la mortalidad. Hasta la fecha, la IARC ha confirmado la asociación de la exposición crónica al arsénico con los cánceres de piel, pulmón y vejiga.

Por otro lado, una amplia relación de estudios indica que el arsénico tiene efectos paradójicos. Aunque estudios epidemiológicos han demostrado que la exposición a largo plazo al arsénico puede aumentar el riesgo de cáncer de pulmón, piel o vejiga en el hombre, probablemente asociado con el metabolismo del arsénico, también la conversión enzimática del arsénico inorgánico As (III) a las especies orgánicas mono y dimetiladas, comentada anteriormente, se ha considerado durante mucho tiempo como una ruta importante para la desintoxicación.

Particularmente el trióxido de arsénico ( $As_2O_3$ ), utilizado como medicamento para el tratamiento de varias enfermedades en la antigua China y Grecia durante más de 3000 años (Swindell *et al.*, 2013), ha sido reconocido recientemente como uno de los medicamentos más efectivos para tratamiento de cierto tipo de cáncer. Se ha demostrado una notable eficacia terapéutica del trióxido de arsénico en pacientes con Leucemia Promielocítica Aguda (APL) (Mathews *et al.*, 2011). Además, se ha comprobado que algunas especies de arsénico orgánico tienen un fuerte efecto anticancerígeno contra ciertos tumores. Por todo ello, cobra gran importancia conocer los mecanismos de reacción que se llevan a cabo en el metabolismo

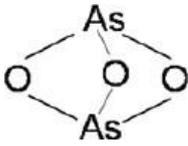
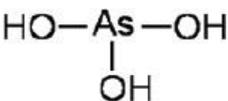
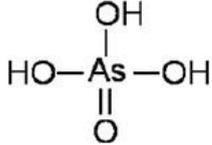
del arsénico y considerar sus metabolitos orgánicos, para dilucidar el papel de diferentes especies de arsénico frente a ciertos tipos de cáncer.

### **1.3.2.- Formas de arsénico inorgánico**

Las especies de arsénico inorgánico comprenden principalmente las formas en estado de oxidación -3, +3, o, +5 (*Tabla 1*). Los analitos, es decir, las especies cuya concentración se determina, generalmente son los oxoaniones arsenito y arseniato. De este modo, en las muestras de alimentos, el arsénico inorgánico se registra como arsenito y arseniato probablemente unidos a grupos -tiol (-SH) en péptidos o proteínas. En general, los productos alimenticios de origen terrestre contienen bajas concentraciones de arsénico total (As-t), es decir, la suma de arsénico inorgánico y arsénico orgánico, y su contenido de arsénico inorgánico también es bajo. Sin embargo, el arroz parece ser una excepción porque contiene cantidades significativas de As-i con concentraciones a menudo desde 0,1 a 0,4 mg/kg de masa seca y, a veces, considerablemente más altas (Sun *et al.*, 2008; Meharg *et al.*, 2009). Aunque el pescado y los mariscos pueden llegar a tener un alto contenido de arsénico total, desde 0.3 a 110 mg/kg peso húmedo, sin embargo, para el arsénico inorgánico, las concentraciones son muy bajas, menores a 0.006 mg/kg en todos los casos (Julshamn *et al.*, 2012). Pero hay algunas excepciones notables, por ejemplo, el alga marina comestible hijiki (*Hizikia fusiforme*), puede contener arsénico inorgánico presente como arseniato, en concentraciones de hasta 60 mg/kg de masa seca (FSA, 2004), y el mejillón azul (*Mytilus edulis*) ha mostrado concentraciones de arsénico inorgánico de hasta 30 mg/kg de masa seca (Sloth y Julshamn, 2008).

Las concentraciones de arsénico en las aguas subterráneas, principales fuentes de agua potable en muchas partes del mundo, generalmente son inferiores a 10 µg/L, pero pueden alcanzar los 5.000 µg/L en algunas áreas (Smedley y Kinniburgh, 2002). Las aguas superficiales también se utilizan como agua potable, pero generalmente contienen concentraciones de arsénico más bajas que las aguas subterráneas. Esencialmente, todo el arsénico en el agua potable está presente como arsénico inorgánico. En condiciones oxigenadas, como las que se encuentran en la mayoría de las aguas superficiales, el arsénico está presente principalmente como arseniato. Sin embargo, en algunas aguas subterráneas, el arsenito puede ser la especie dominante bajo ciertas condiciones ambientales reductoras (Postma *et al.*, 2007). La presencia de arsénico inorgánico en el agua repercute de manera directa en la concentración de este elemento en el arroz.

Tabla 1. Especies de arsénico inorgánicas.

ESTRUCTURA QUÍMICA	NOMBRE	RELEVANCIA
	TRIÓXIDO DE ARSÉNICO	Presente en el aire, el agua y el suelo.
	ÁCIDO ARSENIOSO	Traza hasta niveles bajos en la mayoría de los alimentos, altamente tóxico.
	ÁCIDO ARSÉNICO	Traza hasta niveles bajos en la mayoría de los alimentos, una forma importante en el agua, altamente tóxico.

### 1.3.3.- Formas de arsénico orgánico

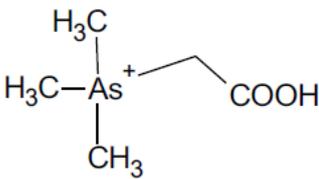
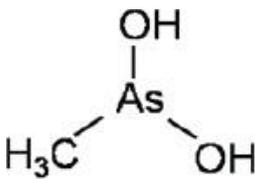
Desde el descubrimiento de la arsenobetaína (AsB) en la langosta en 1977, se han determinado más de 50 compuestos organoarsenicales en organismos marinos, muchos de los cuales se utilizan como alimentos. Sin embargo, la mayoría de estos compuestos, normalmente no se dan a conocer o se presentan solo en niveles traza. La siguiente descripción de compuestos de organoarsénico se centrará en los principales compuestos que se encuentran en los alimentos y sus productos metabólicos significativos.

La arsenobetaína (*Tabla 2*) es la principal forma de arsénico en los peces marinos y en la mayoría de los mariscos. Este compuesto también se ha encontrado en algunos alimentos terrestres, en particular en algunas especies de hongos, aunque generalmente como un compuesto menor (Francesconi y Kuehnelt, 2004). La arsenobetaína aún no se ha detectado en el agua de mar, aunque es probable que esté presente en niveles traza. También ha habido varios informes de AsB en organismos de agua dulce (Slejkovec *et al.*, 2004), aunque los

niveles son generalmente bajos, menores al 0.1 mg/kg de masa seca, mucho más bajos que los encontrados en muestras marinas. Los peces de agua dulce cultivados (productos de acuicultura) pueden contener AsB en concentraciones más altas porque se les proporciona alimento que contiene ingredientes marinos (Soeroes *et al.*, 2005).

Las especies simples de arsénico metilado, es decir, aquellas sin otros sustituyentes alquilo, como son los iones MMA (V) o DMA (V) también se encuentran a menudo en organismos vivos y, por lo tanto, en alimentos, pero generalmente en bajas concentraciones, menores al 0.5 mg/kg de masa seca (Francesconi y Kuehnelt, 2004). MMA (III) y DMA (III) también son metabolitos metilados importantes en el ser humano, generados a partir de las especies de arsénico ingerido.

**Tabla 2.** Especies de arsénico orgánicas.

ESTRUCTURA QUÍMICA	NOMBRE	RELEVANCIA
	<p>ARSENOBETAÍNA AsB</p>	<p>Principal especie de arsénico en la mayoría de los mariscos, no tóxico.</p>
	<p>ÁCIDO MONOMETIL- ARSONOSO MMA (III)</p>	<p>Generalmente no se detecta en alimentos, detectado en algunas muestras de orina humana como metabolito de iAs, una especie tóxica que se piensa es importante para el mecanismo de acción tóxica del arsénico.</p>

$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{HO}-\text{As}-\text{OH} \\    \\ \text{O} \end{array}$	<p>ÁCIDO MONOMETIL- ARSÓNICO MMA (V)</p>	<p>Traza en algunos alimentos marinos.</p>
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{As} \\ / \quad \backslash \\ \text{HO} \quad \text{CH}_3 \end{array}$	<p>ÁCIDO DIMETIL- ARSINOSO DMA (III)</p>	<p>No detectado en alimentos, detectado en algunas muestras de orina humana como metabolito de iAs, una especie muy inestable muy difícil de medir, sumamente tóxica que algunos investigadores consideran esencial para el mecanismo de acción tóxica del arsénico.</p>
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{HO}-\text{As}-\text{CH}_3 \\    \\ \text{O} \end{array}$	<p>ÁCIDO DIMETIL- ARSÍNICO DMA (V)</p>	<p>Forma de arsénico menor en mariscos y algunos alimentos terrestres.</p>

La mayoría de los datos obtenidos sobre arsénico en los alimentos, describen el contenido de arsénico total, suma de arsénico inorgánico y orgánico. Los análisis de As-t que proporcionan estos datos pueden ser llevados a cabo fácilmente en laboratorios analíticos equipados para determinaciones de elementos traza. Por otro lado, los análisis que proporcionan información

sobre las especies de arsénico son mucho más difíciles de realizar, y relativamente pocos laboratorios son capaces de proporcionar estos datos.

#### 1.4.- EL ARROZ Y EL ARSÉNICO

El arroz es un cereal de gran importancia en la alimentación a nivel mundial, representa el alimento básico en la dieta de más de la mitad de la población del mundo, especialmente en países en vías de desarrollo y, además, en personas celiacas, diabéticas y niños.

Como se puede observar en la figura se aprecia un aumento progresivo en la producción y superficie de arroz en cáscara a nivel mundial.



**Figura 4.** Producción y superficie mundiales de arroz en cáscara (FAOSTAT, 2018).

El origen del arroz se sitúa en Asia, probablemente en India, hace unos 10.000 años, pero el desarrollo del cultivo del mismo tuvo lugar en China. De Asia pasó a Europa oriental sobre el año 800 a.C., llegando a España con la invasión musulmana y difundiéndose desde aquí a la Europa mediterránea y más tarde al continente americano.

El arroz es un alimento con propiedades beneficiosas ya que aporta al organismo energía de forma gradual debido a su riqueza en hidratos de carbono, entre ellos el más abundante es el almidón, que tiene la ventaja de absorberse con lentitud. Aunque posee menos proteínas

que el trigo (8% frente a 11,5%), se trata de proteínas muy aprovechables y digeribles, pero la gran ventaja es que estas proteínas no contienen gluten, por lo que es perfectamente tolerado por celíacos y personas sensibles.

Por otro lado, el arroz es uno de los alimentos que mayor cantidad de arsénico presenta, y debido al elevado consumo del mismo, surge la necesidad de determinar y cuantificar la concentración de arsénico en arroz mediante las técnicas de análisis químico correspondientes, con el fin de establecer una normativa reguladora para controlar su ingesta, y con ello tratar de reducir el riesgo para la salud derivado de la exposición al arsénico a través de la dieta.

Por lo anterior, se hace necesario realizar un estudio sobre la producción y consumo de arroz en Europa y en el mundo, analizar las condiciones que favorecen la elevada concentración de arsénico en arroz, y seleccionar tipos de arroz bajo diferentes parámetros para analizar el contenido de arsénico presente en los mismos.

#### 1.4.1.- Producción y consumo de arroz en Europa

La Unión Europea registró una producción superior a 2,6 millones de toneladas de arroz en la cosecha de 2015 según información elaborada con datos de la Comisión Europea (CE), como muestra la siguiente figura.

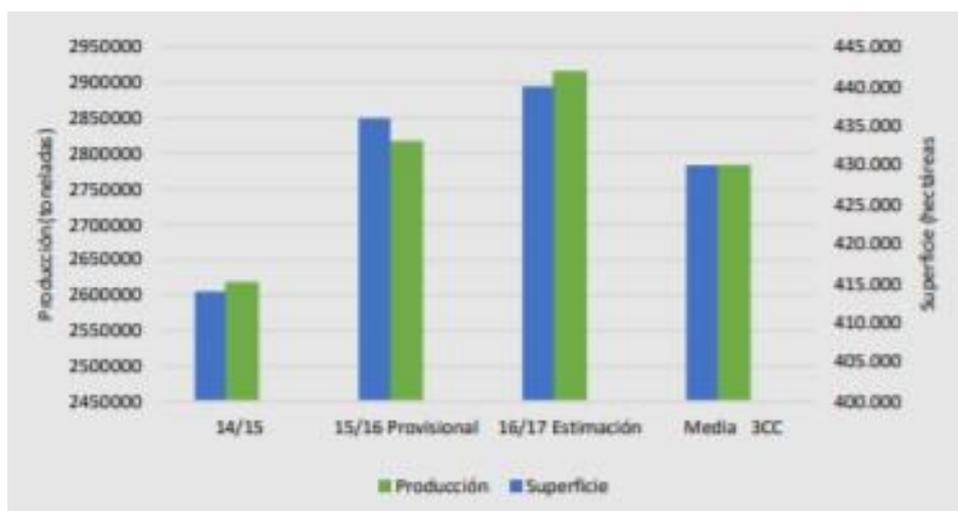
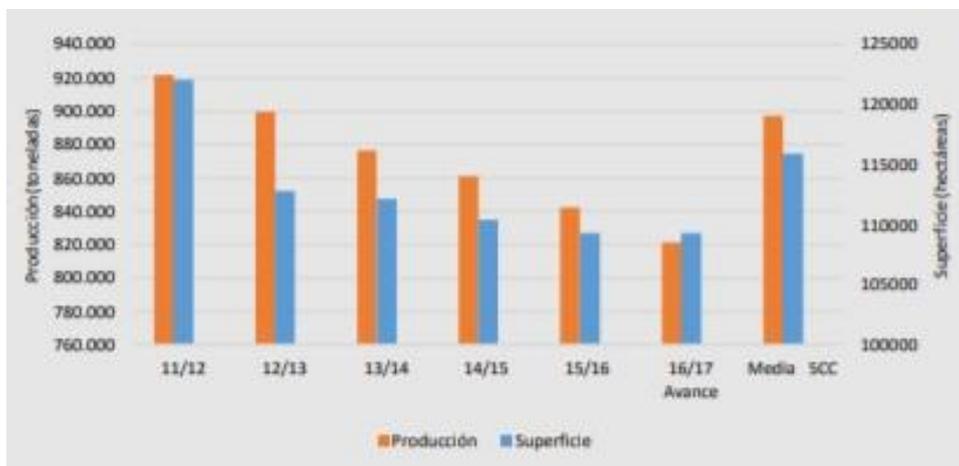


Figura 5. Superficie y producción de arroz en la Unión Europea (MAPAMA, 2017).

En la Unión Europea (UE), Italia es el primer productor de arroz con un 50% aproximadamente de la producción total, seguido de España, con un porcentaje en torno al 29% de la misma, se sitúan más alejados, Grecia con solo el 7%, Portugal con el 6,6%, Francia con un 3.2%, seguido de Rumanía, Bulgaria, y Hungría en último lugar (MAPAMA, 2017).

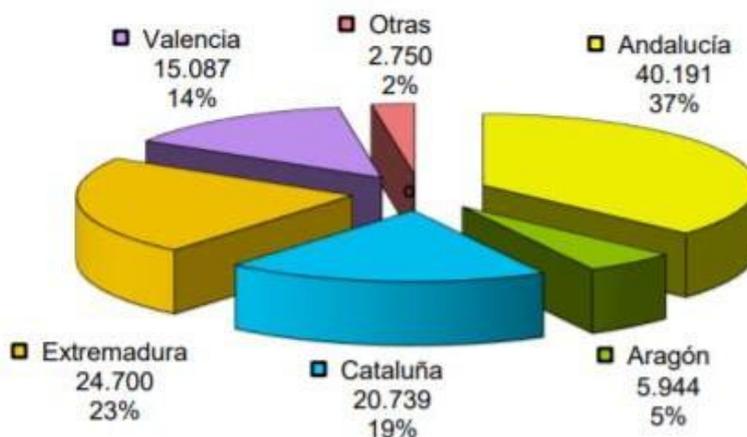
En España el cultivo de arroz se realiza fundamentalmente en cinco Comunidades Autónomas (CCAA), Andalucía, Extremadura, Cataluña, Valencia y Aragón, que disponen de zonas de elevada salinidad y caracterizadas por ciertas condiciones medioambientales, como es el caso de deltas y marismas próximas a parques naturales, y suelos con propensión al encharcamiento.



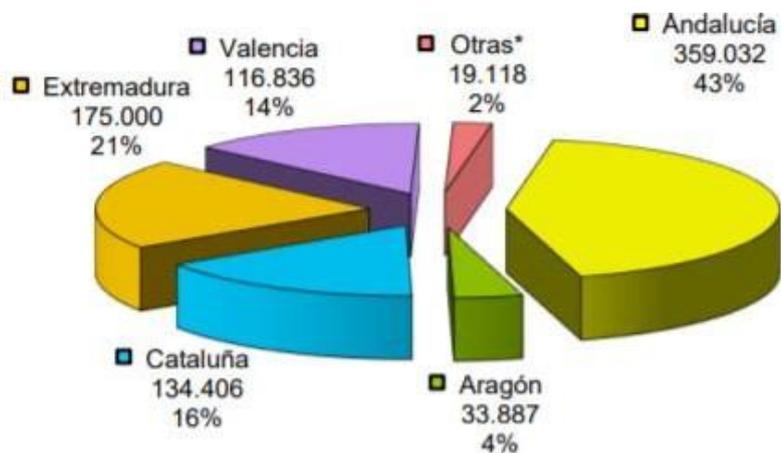
**Figura 6.** Superficie y producción de arroz en España (MAPAMA, 2017).

La mayor parte de este tipo de suelos se encuentra en Andalucía y Extremadura, que representan más de la mitad de la producción total de arroz en España (MAPAMA, 2017).

En las siguientes figuras se pueden observar la distribución de la superficie y la distribución de la producción de arroz en España por CCAA (MAPAMA, 2016).



**Figura 7.** Distribución de la superficie de arroz por CCAA 2016/17 (ha).

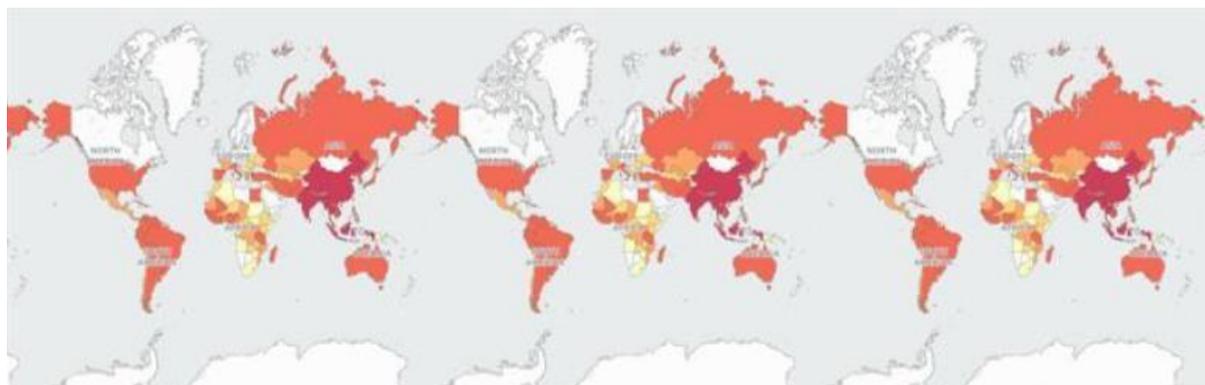


**Figura 8.** Distribución de la producción de arroz por CCAA 2016/17 (t).

En cuanto al consumo, en 2017 los españoles consumieron 46,7 millones de kg de arroz, lo que significa una media en torno a 1,0 kg por persona y año, teniendo en cuenta que durante este año el consumo total de alimentos fue de 440,9 kg por persona, el arroz representó el 0,23% del total por persona y año (MAPAMA, 2018).

#### 1.4.2.- Producción y consumo de arroz en el resto del mundo

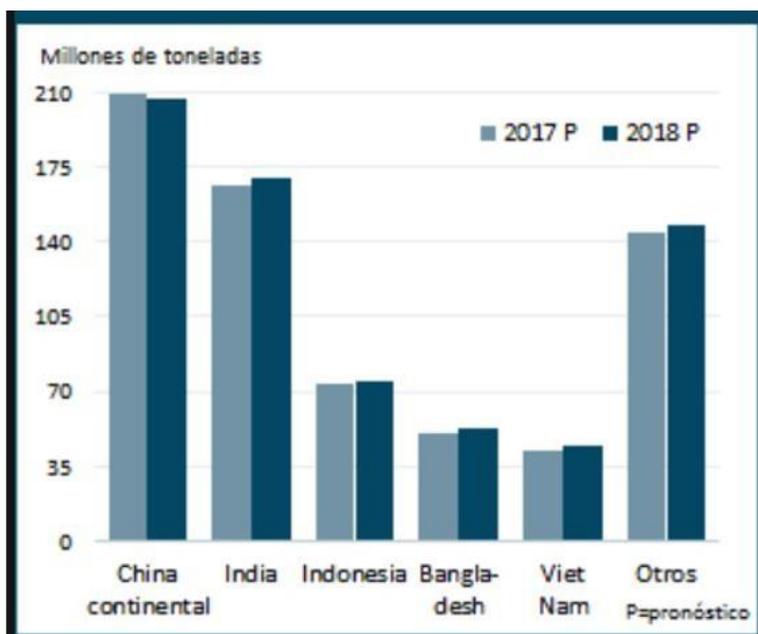
La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), sitúa Asia como una de las grandes productoras de arroz en el mundo.



■ *Grandes productores* ■ *Medianos productores* ■ *Pequeños productores* □ *Muy pequeños productores.*

**Figura 9.** Productores de arroz en el mundo (FAOSTAT, 2018).

El Seguimiento del Mercado del Arroz (SMA) de la FAO, proporciona un análisis de las novedades más recientes en el comercio mundial del arroz, así como los pronósticos a corto plazo. Como se puede observar en la figura, Asia es el principal productor a nivel mundial de arroz en cáscara (FAO, 2018).



**Figura 10.** Producción de arroz en cáscara en Asia (FAOSTAT, 2018).

En cuanto al consumo, como país más poblado del mundo China es además de la mayor productora, la mayor consumidora de arroz a nivel mundial, seguida de India, que ocupa el segundo lugar.

#### 1.4.3.- Presencia de arsénico en arroz

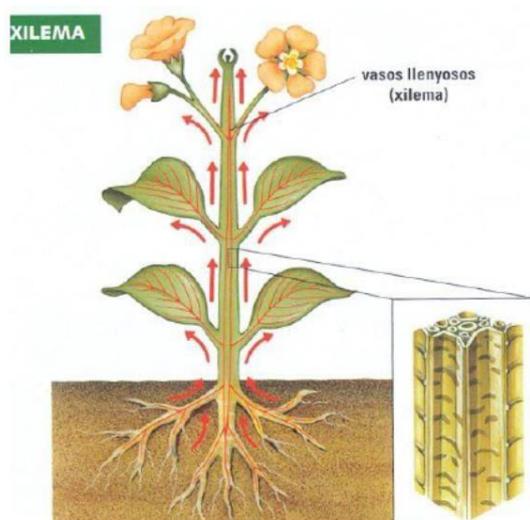
La siembra del arroz se realiza en suelo inundado por lo que el arroz absorbe el arsénico presente en el suelo y agua de sus cultivos.



**Figura 11.** Cultivo de arroz.

El arroz en cáscara (*Oryza sativa*) es particularmente efectivo, en comparación con otros cereales, en la acumulación de arsénico en el brote y el grano. El cultivo del arroz se realiza en llanuras inundadas, y se ha demostrado que la planta bioacumula 10 veces más As-i que otros granos como el trigo y la cebada (Ma *et al.*, 2008; Meharg *et al.* 2009; Williams *et al.*, 2005). Las condiciones anaeróbicas del suelo favorecen la movilización de As como arsenito, donde bajo sistemas aeróbicos domina como arseniato. Por tanto, la presencia de arsénico en arroz frente a otros tipos de cereales se debe a su forma de cultivo por inundación, (Signes-Pastor *et al.*, 2016), que conlleva, que el arsénico presente en el suelo se disuelva en el agua de riego absorbido por la planta. El As en arroz se especia predominantemente como As inorgánico y como especies metiladas DMA con niveles variables, y niveles bajos de MMA, es decir, estas especies también son absorbidas por las plantas de arroz, aunque a un ritmo mucho más lento que el As inorgánico.

Por otro lado, el arseniato absorbido por la raíz, es rápidamente reducido a arsenito. El proceso está mediado por arseniato reductasas (Xu *et al.*, 2007). La mayoría de las plantas parecen tener altos niveles de actividad arseniato reductasa, lo que explica la predominancia de especies de arsenito en las raíces. El As reducido entra en el xilema, se ha observado que del arsénico presente en la savia del xilema, la mayor parte es arsenito (Xu *et al.*, 2007). La movilidad del arsenito de la raíz al resto de la planta se asume que se hace a través del mismo sistema de transportadores que actúan en la raíz (Zhao *et al.*, 2010).

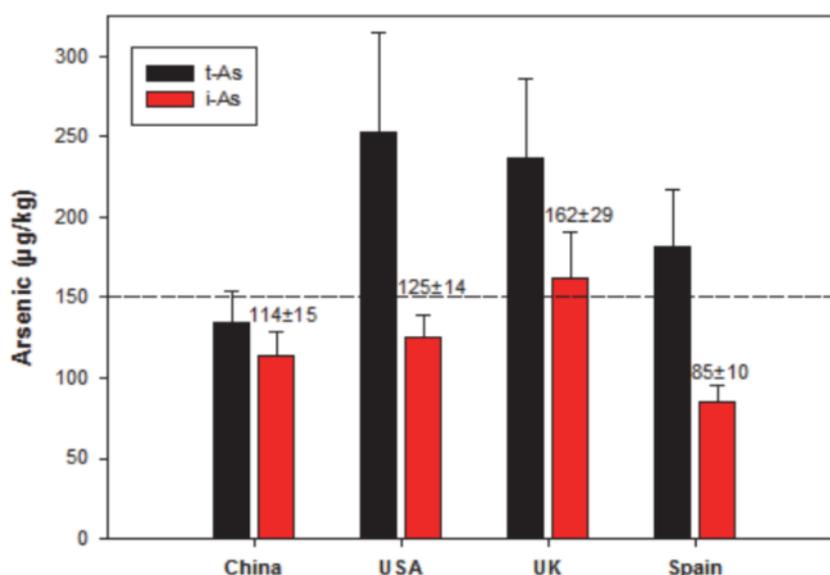


**Figura 12.** Transporte de la savia bruta desde las raíces a la parte aérea de la planta a través del xilema.

#### 1.4.4.- Tipos de arroz para el estudio del contenido en arsénico

Como se ha comentado anteriormente el arroz absorbe cantidades significativas de arsénico, pero factores ambientales (pH, clima, biología, hidrología, materia orgánica, etc.), o alteraciones en el contenido mineral (disolución-precipitación, oxidación-reducción, formación de complejos de disociación, adsorción-desorción) pueden alterar la disponibilidad de un elemento (Moreno-Jiménez *et al.*, 2012).

Se ha demostrado que la especiación de arsénico en arroz varía entre distintas regiones, presentando un contenido más alto de arsénico inorgánico en función de su origen como se observa en la siguiente figura (Carbonell-Barrachina *et al.*, 2012).



**Figura 13.** Contenido de arsénico total e inorgánico en arroz de diferente origen.

Por otro lado, Williams *et al.* analizaron 51 muestras de arroz sin descascarillar producido en Europa, Asia y los EE.UU., los resultados mostraron una variación de arsénico inorgánico entre el 10% y el 86%. En estos estudios observaron también que la concentración media de arsénico inorgánico es 1,7-1,8 veces superior en arroz integral que en arroz blanco (2005). También Meharg *et al.* en sus estudios sobre especiación y localización de arsénico en granos de arroz blanco e integral, observaron que el arroz integral presentaba una mayor proporción de arsénico inorgánico que el arroz blanco (2008).

Otros estudios han analizado la presencia de arsénico en productos sin gluten fundamentalmente elaborados a base de arroz, destinados a consumidores adultos celíacos. El estudio demostró que estos productos a base de arroz contenían concentraciones importantes de As-t, hasta 120 µg/kg, y As-i, hasta 85,8 µg/kg. Se estimó que el contenido de As-t y As-i en el arroz utilizado como ingrediente principal de estos alimentos podía alcanzar valores de hasta 235 µg/kg y 198 µg/kg, respectivamente (Munera-Picazo *et al.*, 2014).

También se ha estudiado la especiación de arsénico en arroz crudo y arroz cocido en países del Sur y Sudeste de Asia, donde el arroz es el alimento básico para la gente que habita en ellos. En estas zonas, el agua subterránea contaminada con arsénico se ha utilizado no solo para beber y cocinar, sino también para el cultivo de arroz. Además, cocinar arroz con agua contaminada por arsénico aumenta la carga de arsénico en arroz. El arsénico inorgánico es la principal especie en arroz del Sur y Sudeste asiático (80 a 91% del arsénico total), y la concentración de esta especie tóxica aumenta en el arroz cocido con agua contaminada por arsénico inorgánico. Los habitantes de Bangladés y Bengala Occidental (India), los puntos calientes de las zonas con mayor presencia de arsénico en el mundo, comen un promedio de 450 g de arroz al día. Por lo tanto, además del agua potable, la ingesta alimentaria de arroz como alimento básico en la dieta, supone otra fuente potencial de exposición a arsénico para la población de los países del Sur y Sudeste asiático (Rahman y Hasegawa, 2011).

## **1.5.- NORMATIVA REGULADORA**

Aunque el potencial carcinogénico del arsénico fue establecido en la década de 1980 por la IARC, en la Unión Europea no se evaluó el riesgo por exposición al mismo a través de la dieta hasta el año 2004, y en aquel momento, con los datos disponibles de los Estados Miembros de la UE, se identificó el pescado como la principal fuente de exposición dietética al arsénico para la población adulta media. Sin embargo, este estudio estaba centrado en análisis de arsénico total ya que los métodos de análisis para la determinación de diferentes especies químicas de arsénico (especiación) no estaban demasiado desarrollados. Actualmente sabemos que el arsénico está presente en el pescado en sus formas orgánicas, las menos tóxicas.

Posteriormente, en julio de 2008, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria solicitó a los EEMM, datos referentes a arsénico en alimentos y agua lo cual dio lugar a la publicación de un trabajo de EFSA sobre el arsénico en alimentos en el año 2009.

En la Comisión Europea, tras la publicación del informe científico de EFSA de 2009, la primera acción que se llevó a cabo fue fomentar la generación de datos de cara a la fijación de límites máximos de arsénico inorgánico en alimentos, con la finalidad de dar respuesta a la recomendación de EFSA de reducir la exposición a arsénico a través de la dieta (EFSA, 2009). Dichos límites máximos fueron fijados en el Reglamento (UE) 2015/1006 de la Comisión, por el que se modifica el Reglamento (CE) 1881/2006 en cuanto al contenido máximo de arsénico inorgánico en los productos alimenticios, y que entró en vigor a partir del 1 de enero de 2016.

En la siguiente tabla se recogen los límites máximos de arsénico inorgánico en arroz y productos derivados de arroz establecidos en el Reglamento (UE) 2015/1006.

**Tabla 3.** Límites máximos de iAs en arroz y productos derivados de arroz [Reglamento (UE) 2015/1006].

Variedad de arroz	iAs (mg/kg)
Arroz elaborado (pulido o blanco)	0.20
Arroz vaporizado y arroz integral	0,25
Tortitas, obleas, galletitas y pasteles de arroz	0,30
Arroz destinado a la producción de alimentos para lactantes y niños de corta edad	0,10

Haciendo una serie de observaciones sobre la contribución de arsénico inorgánico respecto a arsénico total, se puso de manifiesto que cereales y derivados eran los alimentos que más contribuían a la exposición a arsénico inorgánico y que, aunque el arroz y los derivados de arroz tenían los niveles más altos, la contribución a la dieta de los demás cereales también era importante por su alta incidencia en la misma debido a su elevado consumo.

Por otro lado, se estableció que los grandes consumidores de arroz en Europa, como determinados grupos étnicos y los niños menores de tres años de edad, eran quienes estaban más expuestos al arsénico inorgánico procedente de los alimentos. En general, se calcula que la exposición alimentaria a arsénico inorgánico de los niños menores de tres años de edad, fundamentalmente procedente de alimentos elaborados a base de arroz, es del doble al triple que la correspondiente a los adultos.

Por todo lo anterior, EFSA hizo una serie de recomendaciones de las que tenemos que destacar las siguientes:

-Debe reducirse la exposición a arsénico en la dieta.

-Para poder refinar la evaluación del riesgo por arsénico inorgánico es necesario disponer de datos sobre las distintas especies de arsénico presentes en los alimentos.

EFSA recomienda seguir recopilando datos de arsénico en los alimentos para reducir las incertidumbres del cálculo de exposición, sobre todo en los alimentos que más contribuyen a la exposición dietética, como arroz, productos derivados de arroz o productos derivados de trigo.

El establecimiento de límites máximos en la legislación es la medida de gestión más eficaz para reducir la exposición a un contaminante en la población general. Estos límites máximos son revisados periódicamente adaptándose a la evidencia científica.

Además de establecerse límites máximos, la Comisión Europea, con el objeto de dar respuesta a la recomendación de EFSA de recopilar más información sobre la presencia de arsénico y sus compuestos en los alimentos que más contribuyen a la exposición, estableció un programa a nivel europeo que ha abarcado los años 2016, 2017 y 2018 (AECOSAN, 2018).

Más allá de los límites de los EEMM, y debido a que el arroz es un alimento básico para más de la mitad de la población mundial, se han realizado análisis para determinar la contaminación por arsénico de las aguas subterráneas en muchos países de todo el mundo, especialmente en el Sudeste asiático, Bangladés y Bengala Occidental.

La contaminación por arsénico en arroz es especialmente preocupante en algunos países asiáticos donde los arrozales se riegan con agua subterránea que contiene sedimentos ricos en arsénico (FAO, 2014).

El problema en Bangladés ha sido descrito como "el mayor envenenamiento de una población en la historia". Se estima que el número de personas con riesgo de exposición a concentraciones de arsénico superiores al estándar nacional de 50 µg/litro en agua potable, y al valor guía de la Organización Mundial de la Salud, 10 µg/litro, ronda en Bangladés los 20 millones y los 45 millones de personas, respectivamente (Flanagan *et al.*, 2012). Como el arroz es un alimento básico en Bangladés, que proporciona hasta el 70% de la ingesta calórica diaria (Ninno y Dorosh, 2001), el consumo de arroz contaminado unido al consumo de agua potable contaminada puede representar una importante vía de exposición a As.

Estudios realizados han demostrado que la concentración de arsénico en arroz varía entre 0,03 y 1,83 mg/kg, y los mayores contenidos se encuentran en Bangladés, India y Estados Unidos (Meharg, 2004, Williams *et al.*, 2005).

## **2.- DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO EN ARROZ**

### **2.1.- PARTE TEÓRICA**

#### **2.1.1.- Tratamiento de la muestra**

El tratamiento de la muestra viene condicionado principalmente por el estado físico de ésta. En cuanto a las muestras sólidas, según las necesidades analíticas, podemos hablar de disolución completa de la muestra cuando se pretende determinar el contenido total de un analito en la misma, o de extracción cuando queremos evaluar el contenido de un analito asociado de determinada manera al sólido.

El tratamiento de la muestra permite adecuar la cantidad de muestra, así como minimizar las posibles interferencias de la matriz para llevar a cabo el análisis correspondiente (Dietz *et al.*, 2007; Ramos, 2012).

La mayoría de las técnicas analíticas utilizadas para la determinación de analitos requieren disponer de la muestra en disolución, muy pocas son capaces de permitir llevar a cabo el análisis directo en muestras sólidas (fluorescencia de rayos X, ablación por láser, absorción infrarroja, etc.).

Hay que resaltar que el tratamiento de una misma muestra será totalmente distinto cuando se pretenda llevar a cabo la determinación del contenido total de un elemento, o del contenido de las diferentes especies que éste puede presentar. En este último caso, el tratamiento de la muestra tendrá que garantizar la conservación de la forma química de las especies.

##### **2.1.1.1.- Mineralización**

La mineralización es una etapa orientada a la preparación de la muestra para, convertir cualquier muestra sólida o líquida en una solución acuosa, destruir la materia orgánica y evitar, por tanto, añadir interferencias a las muestras. Para ello, el proceso puede llevarse a cabo de distintas maneras como son, digestión por vía húmeda con o sin reacción química, mineralización por vía seca con posterior digestión por vía húmeda, o descomposición por fusión con posterior digestión por vía húmeda.

Debido a que la gran mayoría de materiales naturales u orgánicos son insolubles en agua, se requiere el uso de ácidos o sales de fusión para llevarlos a la solución. De este modo, la disolución se consigue normalmente través de un proceso de oxidación-reducción que deja los elementos constituyentes en una forma más soluble.

La mineralización por vía seca es un método importante de eliminación de materia orgánica, y requiere la posterior digestión del residuo inorgánico por tratamiento vía húmeda. Hay distintos procesos para la mineralización de muestras por vía seca, en plasma de oxígeno a bajas temperaturas, por combustión en frasco de oxígeno, con calentamiento en horno a elevadas temperaturas, siendo este último el más común y sencillo. Para realizar la eliminación de la materia orgánica presente y retener el analito en el residuo inorgánico, se utiliza nitrato de magnesio con óxido de magnesio y horno de mufla, de este modo se produce la oxidación completa de la materia orgánica. En este proceso existe riesgo de pérdidas de analito por formación de compuestos volátiles y adsorción en las paredes del crisol, ya que implica combustión en fase sólida en sistemas abiertos a temperaturas elevadas (400 - 800 °C), durante periodos de tiempo largos (5 -10 horas) (Boutakhrit *et al.*, 2005).

La mineralización por vía húmeda implica el empleo de ácidos oxidantes, solos o con agentes oxidantes auxiliares con la finalidad de destruir la materia orgánica y transformar la muestra en residuo inorgánico. Fundamentalmente, se emplea ácido nítrico o mezclas de éste con agua o con peróxido de hidrógeno como oxidante auxiliar. Este procedimiento es el más utilizado para la determinación de arsénico en muestras de arroz y se puede llevar a cabo mediante digestión ácida en vaso abierto o cerrado, presentando diferencias significativas en la temperatura del proceso, como se describe a continuación.

La digestión ácida en vaso abierto o digestión ácida tradicional, se realiza por calentamiento de la muestra en disolución, en matraz Erlenmeyer, a través de mechero Bunsen, placa caliente, horno o mufla. Este calor, llega inmediatamente a las partes de la solución en contacto directo con la fuente de calor, y se transfiere después a toda la solución por convección. La temperatura máxima del proceso se corresponde con la temperatura del punto de ebullición del reactivo ácido empleado, con el fin de minimizar la pérdida de ácido por vaporización. Como consecuencia de lo anterior, se trata de un proceso lento que puede durar desde horas hasta días para que se lleve a cabo la descomposición de la muestra, además del uso de altas cantidades de reactivos debido a la pérdida de los ácidos empleados durante el proceso, pérdida de elementos volátiles de la muestra, así como mayor riesgo de contaminación de la muestra, sin olvidar la continua supervisión por parte del analista. Aunque muchos laboratorios siguen empleando esta técnica por no disponer de material necesario, la

mejora a los inconvenientes citados se obtiene mediante la realización del proceso por digestión ácida con microondas.

La digestión ácida asistida por microondas se realiza en recipiente cerrado, es uno de los métodos más usados para la disolución de muestras sólidas, permite disolver un número elevado de muestras en un periodo de tiempo reducido, disminuyendo la pérdida de elementos volátiles, reduciendo el gasto de los reactivos ácidos, así como, el riesgo de contaminación de los analitos. La muestra es calentada en vasos cerrados de material polimérico inerte a los reactivos empleados junto con los ácidos utilizados para su degradación dependiendo del tipo de muestra, como ácido nítrico, ácido clorhídrico, ácido perclórico y mezclas oxidantes como el agua regia. En el horno microondas se alcanza la temperatura máxima del proceso, mayor a la temperatura de ebullición del ácido empleado, a través de un proceso automatizado con un programa de aumento gradual de temperatura y control de presión en función del tiempo, la radiación microondas penetra en el recipiente y se disipa térmicamente en la propia muestra generando calor en todas las direcciones. De este modo se consigue en un menor tiempo, una digestión adecuada de la muestra para su posterior análisis.

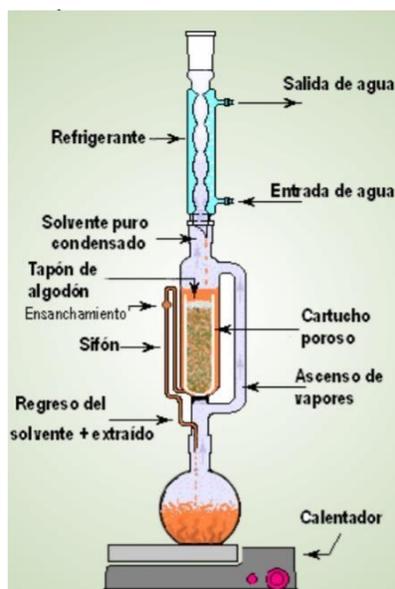
### **2.1.1.2.- Extracción**

La etapa de extracción tiene como finalidad separar la sustancia o sustancias a determinar de la matriz sólida o líquida. La técnica de extracción a emplear va a depender, por tanto, de las características físico-químicas de los compuestos a determinar, de la composición de la matriz (McSheehy *et al.*, 2003) y de las interferencias potenciales, así como de la técnica de separación, cromatográfica o no cromatográfica, elegida.

Uno de los sistemas clásicos de extracción, es la extracción sólido-líquido o lixiviación, que consiste en poner en contacto una cantidad determinada de la muestra sólida con un disolvente apropiado para disolver el compuesto a extraer. Las técnicas más utilizadas para este fin son las siguientes:

-Agitación. En esta técnica se somete a agitación manual, mecánica o magnética la mezcla de la muestra y el disolvente. La eficiencia de la agitación puede ser mejorada considerablemente utilizando ultrasonidos. Una vez finalizado el proceso, el disolvente que contiene el analito, se separa de la matriz mediante filtración.

-Extracción Soxhlet. La muestra se pone en contacto de forma continua con disolvente “fresco” condensado procedente de un matraz de destilación. El procedimiento consiste en el lavado sucesivo de una mezcla sólida con un determinado disolvente que va extrayendo de la mezcla, los componentes más solubles en él, y el disolvente con el analito disuelto, es devuelto al matraz de destilación mediante un sifón. Este proceso se va repitiendo hasta conseguir la extracción completa del analito normalmente durante un tiempo entre 6 y 24 horas.



**Figura 14.** Extracción con Soxhlet en el momento en que se produce el sifonamiento del disolvente.

-Extracción asistida por microondas (MAE). La muestra sólida se coloca en un recipiente de teflón generalmente cerrado junto con el disolvente, y se somete a radiación microondas. De este modo, se calienta el disolvente con lo que se consigue una extracción eficiente en un tiempo corto.

-Extracción acelerada con disolvente. Esta técnica emplea disolventes a presión y temperatura elevadas para conseguir extraer los analitos de la matriz sólida con alta eficiencia.

Los procedimientos analíticos estándar de extracción en muestras sólidas suelen emplear los sistemas clásicos de extracción sólido-líquido mediante agitación mecánica o magnética, o extracción Soxhlet (Gómez-Ariza *et al.*, 2000; Brisbin y Caruso, 2002). Estos métodos suelen requerir elevados tiempos de tratamiento de muestra y de cantidades de muestra y extractantes, que pueden dar lugar a la contaminación y/o pérdida de analito, y como consecuencia aumentar el riesgo de error (Dietz *et al.*, 2007; Ramos, 2012).

Algunos métodos de extracción requieren menores tiempos de tratamiento de muestra y de consumo de muestra y extractante, como la extracción con líquidos presurizados (PLE) empleada en análisis de especiación de arsénico en alimentos (Heitkemper *et al.*, 2001; Vela y Heitkemper, 2004), o la extracción con fluidos supercríticos (SFE) (Brisbin y Caruso, 2002).

Otro método de extracción es la hidrólisis enzimática, caracterizado por su elevada selectividad, evita posibles pérdidas de analito por volatilización y/o transformación de especies debido a las suaves condiciones de pH y temperatura de trabajo.

Por otro lado, la técnica de extracción a través de energía de ultrasonidos se basa en la extracción total o parcial de los analitos presentes en una muestra sólida cuando ésta se encuentra en el seno de un disolvente sometido a ultrasonidos, es una técnica muy útil que disminuye el tiempo de extracción respecto a los sistemas clásicos de extracción sólido-líquido mediante agitación mecánica o magnética (Dietz *et al.*, 2007). El empleo de sonda de ultrasonidos focalizada (UPS) aumenta la eficacia de la técnica de extracción a través de ultrasonidos y reduce aún más el tiempo de extracción, debido a que la energía se focaliza en una zona concreta de la muestra (Sanz *et al.*, 2005).

De acuerdo con Bermejo *et al.*, la hidrólisis enzimática combinada con UPS permite disminuir el tiempo de tratamiento de muestra de horas a minutos, o incluso segundos (2004).

### **2.1.1.3.- Preconcentración**

En ocasiones, el tratamiento de la muestra incluye una etapa de preconcentración de los analitos con el objetivo de mejorar la sensibilidad del método, favorecer la selectividad mediante la eliminación de las posibles interferencias, eliminar los efectos de matriz y facilitar la detección de los analitos en el nuevo medio, principalmente.

La preconcentración de los analitos se requiere cuando la cantidad presente en la muestra se encuentra a niveles de concentración excepcionalmente bajos, o bien en casos en los que la sensibilidad del detector empleado no es suficiente y se hace necesario mejorar los límites de detección aumentando la cantidad de muestra por unidad de volumen. Para llevar a cabo el procedimiento de preconcentración de arsénico en la muestra se emplean fundamentalmente procesos de evaporación y redisolución (Anawar *et al.*, 2012), y procesos de extracción en fase sólida (Gómez-Ariza *et al.*, 2001).

Se puede realizar una etapa de purificación o clean-up, para conseguir la eliminación de posibles interferencias de la matriz, especialmente en el caso de matrices complejas que

puedan afectar el rendimiento de la extracción, así como interferir en la detección (Radke *et al.*, 2012). Además, los procesos de clean-up permiten aislar y preconcentrar determinados compuestos de arsénico, como especies inorgánicas en alimentos, así como especies liposolubles en muestras biológicas (Francesconi y Kuehnelt, 2004).

#### **2.1.1.4.- Derivatización**

La derivatización es una operación orientada hacia la transformación de los analitos en otras especies más compatibles con la técnica analítica empleada, o que presenten mejores características para su detección.

En el caso de usar técnicas cromatográficas en el proceso de separación, esta etapa consigue fundamentalmente, mejorar la estabilidad térmica de los analitos, así como, la resolución cromatográfica entre picos y modificar indirectamente la sensibilidad del detector introduciendo en las moléculas grupos orgánicos adecuados que incrementan su respuesta.

Cuando la técnica analítica a emplear requiera la introducción de la muestra en fase gaseosa, es necesario realizar la etapa de derivatización, de este modo, el empleo de la técnica de generación de hidruros (HG) acoplada a detectores atómicos que implica la entrada de la muestra en estado gaseoso directamente en el atomizador, requiere llevar a cabo métodos de derivatización previamente en la muestra.

La etapa de derivatización también consigue eliminar interferencias y mejorar los límites de detección, por lo que resulta necesario aplicarla cuando el arsénico se encuentra a niveles bajos de concentración en la muestra (Radke *et al.*, 2012).

#### **2.1.2.- Métodos analíticos**

##### **2.1.2.1.- Métodos analíticos para la determinación del contenido de arsénico total**

Analizar el contenido de arsénico total en muestras sólidas de arroz requiere realizar previamente el tratamiento de la muestra como se ha indicado anteriormente, y a continuación, aplicar la técnica analítica apropiada.

La determinación de arsénico total combina dos técnicas, en primer lugar, se realiza la mineralización de la muestra por digestión húmeda y, en segundo lugar, se lleva a cabo la aplicación de sistemas de detección mediante la técnica analítica adecuada.

La etapa de mineralización puede realizarse mediante digestión ácida en vaso abierto, o bien, por digestión ácida en vaso cerrado asistida por microondas, ambos procedimientos han sido descritos anteriormente, siendo este último el más habitual por las ventajas que presenta respecto a la digestión ácida en vaso abierto.

Los sistemas de detección se fundamentan en técnicas espectroscópicas específicas de absorción, emisión o masas. Entre estas técnicas destaca la espectrometría de absorción atómica (AAS), que consiste en la interacción de radiación específica para cada elemento a analizar haciéndola pasar a través de vapor de átomos de analito, midiéndose posteriormente la radiación absorbida, proporcional a la cantidad de átomos presentes; esta técnica tiene como variantes principales la AAS con llama (FAAS) y la AAS electrotérmica (ETAAS). La técnica FAAS se basa en el uso de la energía que proporciona una llama para producir el vapor atómico o la atomización de la muestra, es una técnica sencilla y selectiva para la determinación de arsénico, sin embargo, los límites de detección con esta técnica no son lo suficientemente bajos. Por otro lado, la técnica ETAAS emplea un atomizador electrotérmico en horno de grafito, presentando ventajas frente al atomizador con llama como, gran sensibilidad, apenas hay consumo de la muestra y permite realizar análisis de trazas, resultando una técnica adecuada para llevar a cabo análisis de determinación de arsénico en muestras de arroz alcanzando límites de detección del orden de  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

El acoplamiento de un generador de hidruros al espectrómetro de absorción atómica (HG-AAS) aporta la sensibilidad requerida, mejorando los límites de detección de arsénico de 10 a 100 veces. La técnica HG-AAS se basa en la generación y volatilización del hidruro, la transferencia del mismo y su posterior atomización en el espectrómetro de AA. Puede considerarse un proceso en tres etapas, en la primera etapa se produce la generación del hidruro volátil adicionando una solución acuosa acidificada de la muestra a un volumen pequeño de una disolución acuosa de borohidruro de sodio o tetrahidruroborato de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ) en un frasco de vidrio, lo que requiere previamente realizar una etapa de derivatización de analitos para transformar especies de arsénico en As (III), y obtener trihidruro de arsénico ( $\text{AsH}_3$ ):



En la segunda etapa, se produce el transporte de arsina ( $\text{AsH}_3$ ) volátil generada que es arrastrada por un gas inerte, en la tercera etapa se lleva a cabo la atomización del hidruro, donde la arsina se descompone dando lugar a átomos de arsénico. Por otro lado, el empleo de esta técnica por inyección en flujo (FI-HG-AAS) aporta ciertas mejoras al método analítico tales como reducción del volumen de reactivos, menor manipulación de la muestra o disminución del volumen de muestra consumido, ya que permite la inserción de un volumen de muestra muy preciso, reproducible y variable dentro de un amplio intervalo, en la corriente portadora sin tener que interrumpir el flujo.

Otra técnica de análisis espectroscópico es la espectrometría de fluorescencia atómica (AFS), se basa en la medición de la intensidad de luz fluorescente que emiten ciertos elementos para determinar la cantidad de analito presente. Esta técnica acoplada con generación de hidruros resulta apropiada para la determinación de arsénico total (Qian *et al.*, 2010), así como para análisis de especiación (Matos-Reyes *et al.*, 2007).

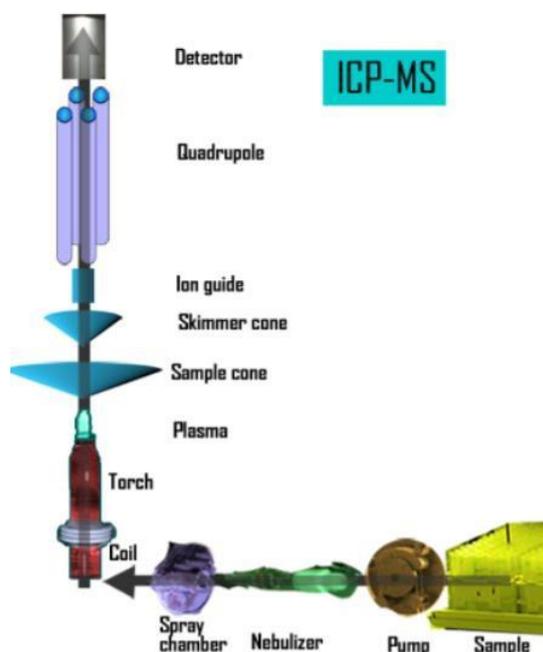
Entre las técnicas espectroscópicas de emisión, la espectrometría de emisión atómica (AES) mide la radiación de longitud de onda característica emitida por los átomos del elemento a determinar habiendo sido éstos previamente excitados, siendo la intensidad de la radiación proporcional a la concentración del elemento en la muestra. Entre estas técnicas se encuentra la espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES), con esta técnica se puede determinar con gran precisión y exactitud el arsénico total presente en una muestra. Otra técnica de análisis muy empleada es la espectrometría de masas (MS), que se describe a continuación.

La espectrometría de masas, técnica de amplia utilización para la determinación de estructuras orgánicas, se basa en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa que se separan de acuerdo con su masa y su carga, y posteriormente se detectan por medio de un dispositivo adecuado. Asimismo, esta técnica puede emplearse en el análisis elemental inorgánico si se combina la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), resultando una técnica de análisis muy especial y robusta.

La técnica de detección ICP-MS es altamente sensible, capaz de determinar de forma cuantitativa casi todos los elementos presentes en la tabla periódica que tengan un potencial de ionización menor que el potencial de ionización del argón a concentraciones muy bajas (ng/Kg).

El sistema ICP-MS resulta de la unión de dos instrumentos, un plasma de argón acoplado inductivamente para producir iones monovalentes, y un espectrómetro de masas, que a

continuación separa y detecta los iones monovalentes generados en función de su relación masa/carga. El esquema de un ICP-MS se indica en la siguiente figura.



**Figura 15.** Esquema general de un Espectrómetro de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (Radbound University, 2016).

La principal limitación de la técnica ICP-MS consiste en que solo permite el empleo de fases móviles acuosas o con un bajo contenido de disolventes orgánicos, ya que estos suelen producir una elevada inestabilidad en el plasma, así como deriva instrumental por formación de depósitos carbonosos en la antorcha y en los conos muestreador y Skimmer de la interfase, pudiendo llegar incluso a bloquear el sistema.

### **2.1.2.2.-Métodos analíticos para la determinación de especies de arsénico hidrosolubles**

Tal y como se comentó en la introducción de este trabajo, las propiedades tóxicas del arsénico dependen en gran medida de la forma química en que esté presente, por tanto, resulta insuficiente determinar solo el contenido de arsénico total en muestras de interés.

Las formas químicas de arsénico reconocidas por su mayor toxicidad, especies inorgánicas y orgánicas metiladas, son solubles en medio acuoso, por lo que el análisis se ha

centrado principalmente en la determinación de estas especies. Las investigaciones para la determinación de dichas especies se han dirigido hacia el empleo de técnicas cromatográficas o no cromatográficas, en tándem con detectores específicos.

La combinación de una técnica analítica de separación con un detector elemental, sensible y específico de absorción, emisión o masas, constituyen las técnicas de análisis acopladas, que se definen como dos o más instrumentos que actúan de forma automática y conjunta, integrados en una unidad o bien a través de una interfaz. De acuerdo con esta definición, una de las principales ventajas de los métodos acoplados es facilitar que el tratamiento de la muestra, la separación y la detección, puedan realizarse en un único sistema.

En general, hay dos vías principales para llevar a cabo la separación y detección de especies arsenicales hidrosolubles, como se describe a continuación:

*a) Separación no cromatográfica de especies arsenicales y detección con sistemas específicos acoplados.*

La separación no cromatográfica mediante extracción selectiva, se basa en las diferentes propiedades químicas de cada una de las especies arsenicales.

Una de las técnicas no cromatográficas de separación y detección que resulta adecuada para llevar a cabo análisis de especiación, por tratarse de un procedimiento simple, sensible, así como por los bajos límites de detección que se consiguen con ella, es la espectrometría de fluorescencia atómica con generación de hidruros (HG-AFS). Para la determinación de especies arsenicales está bien documentado que As (V) puede reaccionar con  $\text{NaBH}_4$  con una velocidad de reacción más baja que As (III) y que la señal producida por la especie pentavalente depende de las condiciones de generación de hidruros. Por tanto, ha sido posible determinar la presencia de ambas especies en la misma muestra empleando la técnica HG-AFS una vez llevada a cabo la reducción cuantitativa de arsénico al estado trivalente. Asimismo, este método no cromatográfico se ha utilizado para diferenciar las especies tóxicas de arsénico, As (III), As (V), MMA y DMA, usando cuatro reducciones en diferentes condiciones de generación de hidruros (Matos-Reyes *et al.*, 2007).

*b) Separación cromatográfica de especies arsenicales y detección con sistemas específicos acoplados.*

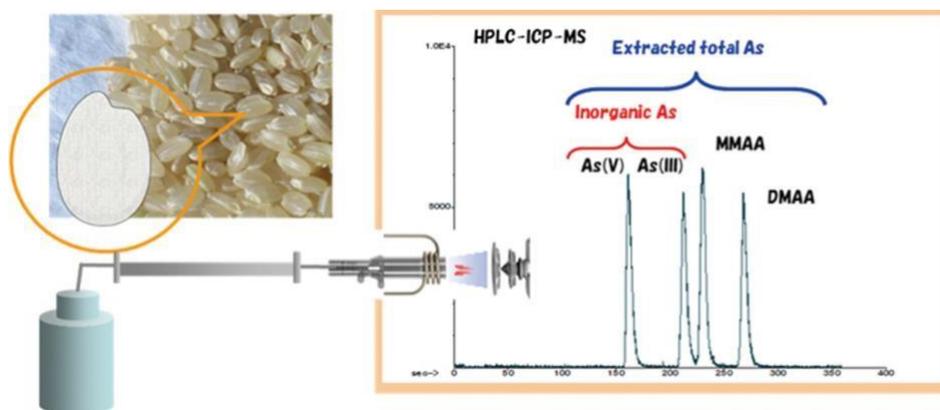
Estos métodos de separación suelen utilizar diferentes técnicas cromatográficas, como la electroforesis capilar (EC), la cromatografía iónica (IC), la cromatografía de gases (GC) o la cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC). Los sistemas de detección más comúnmente empleados en su acoplamiento a sistemas cromatográficos corresponden a

detectores atómicos como, AAS, AES, AFS y la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente, mencionados anteriormente.

Los métodos cromatográficos han sido los más empleados para llevar a cabo la separación de especies arsenicales, aunque la más habitual es la técnica cromatográfica HPLC. Además, destaca la técnica de acoplamiento del sistema de separación cromatográfico HPLC con el detector ICP-MS, como método ampliamente utilizado en análisis de especiación.

La cromatografía líquida de alta eficacia, junto con la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (HPLC-ICP-MS), es una técnica de detección muy robusta y de elevada sensibilidad, muy adecuada tanto para muestras acuosas como para extractos acuosos de muestras biológicas y medioambientales (Maher *et al.*, 2012), esto explica que desde su desarrollo en los años 80 por los grupos de investigación de Houk y Gray (Houk *et al.*, 1980; Date y Gray, 1981), las aplicaciones del método analítico ICP-MS para la determinación de elementos traza hayan sido extensas.

Por otro lado, el método HPLC-ICP-MS requiere el uso de instrumentación sofisticada y no todos los laboratorios están equipados con este tipo de instrumentación. Sin embargo, este acoplamiento analítico, se encuentra entre las técnicas más utilizadas en la determinación de especies de arsénico hidrosolubles en muestras de arroz.



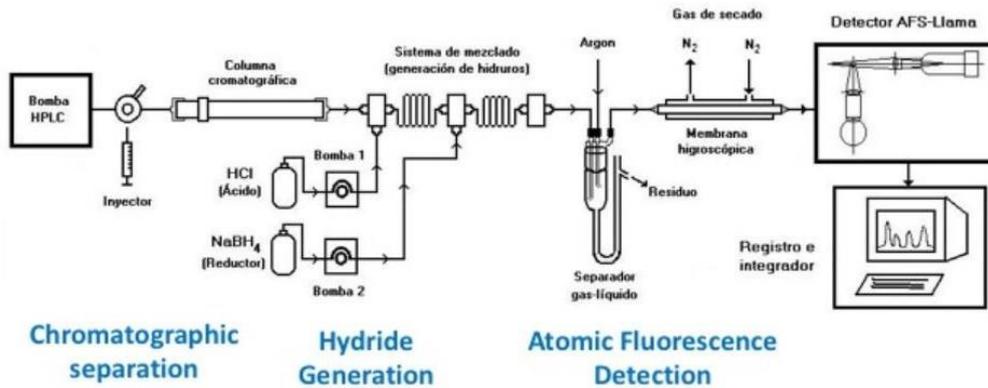
**Figura 16.** Cromatograma obtenido por HPLC-ICP-MS de una muestra de arroz.

Asimismo, la determinación de especies de arsénico también se ha llevado a cabo mediante acoplamiento de HPLC con, ICP-AES, HG-ICP-AES y HG-AFS.

El acoplamiento HPLC-HG-AFS, resulta un sistema adecuado para determinar especies arsenicales hidrosolubles con capacidad para generar hidruros como, As (III), As (V), MMA y

DMA. Además, el uso de esta técnica analítica resuelve el problema del posible solapamiento de la especie As (III) con especies catiónicas o neutras que pudieran estar presentes en las muestras, debido a que solo As (III) puede generar arsina bajo las condiciones establecidas.

En la siguiente figura se puede observar un esquema del sistema generador de hidruros acoplado a un detector AFS y a un equipo HPLC para llevar a cabo análisis de especiación.



**Figura 17.** Esquema del instrumento HG-AFS acoplado con HPLC empleado en la determinación de especies de arsénico (Hurga, 2005).

El detector AFS presenta una elevada sensibilidad, con límites de detección de  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Sánchez-Rodas, 2018), lo que representa una alternativa al HPLC-ICP-MS cuyo empleo implica mayor coste económico.



**Figura 18.** Acoplamiento HPLC-HG-AFS (Sánchez-Rodas, 2018).

En los últimos años, los detectores más empleados en su acoplamiento con HPLC para llevar a cabo estudios de especiación de arsénico, han sido los sistemas ICP-MS y AFS (Sánchez-Rodas *et al.*, 2010; Maher *et al.*, 2012), alcanzando límites de detección del orden de ng/kg.

### **2.1.2.3.- Métodos analíticos para la determinación de especies de arsénico liposolubles**

Las especies de arsénico liposolubles o arsenolípidos han sido analizadas fundamentalmente en muestras de origen marino como, aceite de pescado, de hígado de bacalao (Schmeisser *et al.*, 2005; Rumpler *et al.*, 2008; Arroyo-Abad *et al.*, 2010) o algas (García, 2013), pero el conocimiento de dichas especies es limitado comparado con el de las especies arsenicales hidrosolubles.

Las investigaciones llevadas a cabo por Lunde sobre especies de arsénico liposolubles se consideran pioneras en el estudio de arsenolípidos, aunque no consiguió dilucidar ninguna de sus estructuras (1974). Los estudios que realizó sobre aceites de hígado de bacalao y de arenque, después de su fraccionamiento en columnas de sílice y elución secuencial con hexano, benceno, dietiléter y metanol, mostraron que los arsenolípidos presentes en la fracción de metanol presentaban características químicas similares a las de fosfolípidos ya conocidos (Lunde, 1968), concluyendo que al menos dos arsenolípidos estaban presentes en aceites de procedencia marina (Lunde, 1972). En los últimos años se han producido avances relativos a la estructura de arsenolípidos, si bien en los años 1970 y 1980 ya se propusieron las estructuras de algunos de estos compuestos.

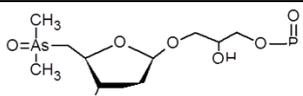
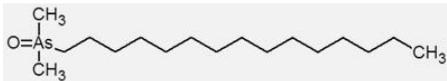
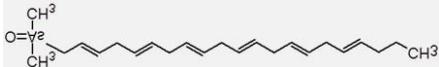
La técnica ICP-MS, extensamente empleada en análisis de determinación de arsénico total y especies de arsénico hidrosolubles, presenta limitaciones en estudios de arsenolípidos, ya que como se ha comentado anteriormente, el empleo de disolventes orgánicos en esta técnica puede causar la desestabilización del plasma de argón. Por otro lado, se han introducido ciertas modificaciones en el sistema ICP-MS como, la utilización de caudales pequeños en fase móvil o la introducción de corriente de oxígeno en el nebulizador, que han permitido el uso de ICP-MS con fases móviles orgánicas superando las limitaciones que presentaba (Kovacevic *et al.*, 2004).

Otros métodos empleados en la determinación de especies de arsénico liposolubles, han sido cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) (Raber *et al.*, 2009), cromatografía de gases acoplada con ICP-MS y con espectrometría de emisión atómica con plasma inducido por microondas (GC-MIP-AES) (Arroyo-Abad *et al.*, 2010) o, la técnica HPLC en fase inversa con ICP-MS y con ionización por electro-spray (ESI-MS) que

ha permitido elucidar la estructura molecular de hasta catorce especies de arsénico liposolubles (García, 2013).

En la siguiente tabla se pueden observar algunas estructuras propuestas de arsenolípidos.

**Tabla 4.** Estructuras químicas asignadas a arsenolípidos identificados.

NOMBRE	ESTRUCTURA MOLECULAR PROPUESTA	MATRIZ	REFERENCIA
As-PL958		Alga parda Wakame	Morita y Shibata, 1988
As-HC332		Aceite de capelán y atún  Hígado de bacalao  Capelán	Taleshi <i>et al.</i> , 2008 y 2010;  Arroyo-Abad <i>et al.</i> , 2010;  Amayo <i>et al.</i> , 2011
As-HC404		Aceite de capelán y atún  Hígado de bacalao  Capelán	Taleshi <i>et al.</i> , 2008 y 2010;  Arroyo-Abad <i>et al.</i> , 2010;  Amayo <i>et al.</i> , 2011

## 2.2.- PARTE EXPERIMENTAL

A continuación, se presenta una recopilación de estudios en los que se llevan a cabo determinaciones de arsénico en muestras de arroz mediante diferentes métodos analíticos.

Laparra *et al.* (2005) llevaron a cabo la determinación de arsénico total y arsénico inorgánico en doce muestras de varios tipos de arroz de diferentes fabricantes adquiridos en tiendas de alimentación en la ciudad de Valencia, España. Todas las muestras fueron analizadas en estado crudo y cocido. El arroz fue cocinado usando agua desionizada o agua desionizada con diferentes niveles de As (V) (0.2-1.0 µg/ml). En la extracción de As-t se utilizó el procedimiento seguido por Laparra *et al.* (2003), donde se llevó a cabo la digestión ácida con ácido nítrico al 50% y horno de mufla a 450 °C con aumento gradual de la temperatura. La determinación de As-t se llevó a cabo por FI-HG-AAS, los resultados obtenidos en el arroz crudo, en el arroz cocido con agua desionizada y con agua desionizada con 0,5 µg/ml de As (V), se encontraban en el rango (0,29-0,41) µg/g peso seco, (0,25-0,44) µg/g peso seco y (1,41-2,25) µg/g peso seco. La extracción de As-i se realizó con ácido nítrico concentrado, bajo las condiciones descritas para la determinación de As-t. Se empleó la técnica analítica FI-HG-AAS y el límite de detección (LOD) del método fue 2 ng/g. Los resultados mostraron que las concentraciones en el arroz crudo, en el arroz cocido con agua desionizada y con agua desionizada con 0,5 µg/ml de As (V), se encontraban en el rango (0,1-0,20) µg/g peso seco, (0,13-0,17) µg/g peso seco y (1,06-2,02) µg/g peso seco.

Williams *et al.* (2005) realizaron análisis para determinar la concentración de arsénico total y especiación en muestras de arroz procedente de Bangladés, Europa, India y EEUU. El procedimiento de extracción para arsénico total, se llevó a cabo en tubos de digestión de vidrio con ácido nítrico, se dejaron reposar durante la noche a temperatura ambiente, las muestras se digirieron a 120 °C, hasta que aclararon y luego se evaporaron hasta sequedad a 160 °C, el residuo se disolvió en ácido nítrico. Por otro lado, la extracción para el análisis de especiación se realizó con ácido trifluoroacético (TFA), que hidroliza el almidón en el grano durante la digestión, lo que puede resultar en una recuperación más exitosa que una extracción de metanol/agua; se llevó a cabo con TFA 2M en tubos de digestión, la mezcla se dejó reposar durante la noche, luego se colocaron los tubos en un bloque calefactor a 100 °C durante 6 h. El digerido se evaporó hasta sequedad a 160 °C y hasta un peso de 10 g con agua destilada. Para determinar el arsénico total se empleó la técnica ICP-MS, el valor calculado del LOD fue 0,01 µg/g, y las concentraciones medias de las muestras de arroz procedente de Bangladés, Europa, India y EEUU fueron 0,13 µg/g; 0,18 µg/g; 0,05 µg/g y 0,26 µg/g, respectivamente. En la determinación de las especies de arsénico la técnica utilizada

fue HPLC-ICP-MS, y las concentraciones medias obtenidas para arroz de Bangladés, Europa, India y EEUU fueron, 0,08 µg/g; 0,08 µg/g; 0,03 µg/g y 0,08 µg/g, respectivamente.

Matos-Reyes *et al.* (2007) propusieron la determinación de arsenito, arseniato, ácido monometilarsónico y ácido dimetilarsínico en arroz procedente de supermercados de Valencia (España) mediante la técnica HG-AFS, método analítico no cromatográfico rápido, sensible y simple para el análisis de especiación de especies de arsénico tóxico en muestras de arroz. Se llevó a cabo la digestión ácida de la muestra con HNO<sub>3</sub> y posteriormente horno de mufla a 450 °C con incremento gradual de la temperatura. Se realizó una extracción asistida por ultrasonidos de las especies de arsénico con 1 mol/L H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> y 0,1% (m / v) Triton XT-114. Después de la extracción, las concentraciones de As (III), As (V), DMA y MMA se determinaron mediante la técnica HG-AFS). Los límites de detección del método fueron 1,3; 0,9; 1,5 y 0,6 (ng/g) para As (III), As (V), DMA y MMA, respectivamente, expresados en términos de peso seco de la muestra. Las recuperaciones siempre fueron superiores al 90%, y no se produjo interconversión de especies. Los resultados obtenidos para As (III), As (V), DMA y MMA se hallaron en el rango (22-149; 23-152; 1,7-103; 1,6-104) ng/g respectivamente. El análisis de especiación de un material de referencia de harina de arroz certificado para arsénico total condujo a resultados coherentes, que también estaban de acuerdo con otros estudios de especiación realizados sobre el mismo material de referencia certificado.

Signes *et al.* (2008) analizaron el arsénico total en arroz integral, descascarillado mediante dos procedimientos diferentes (húmedo y seco), procedente de mercados y granjas de Bengala Occidental (India). Para la digestión de las muestras se utilizó HNO<sub>3</sub> al 65%, y posteriormente, horno de mufla hasta alcanzar progresivamente 450 °C, temperatura a la que se mantuvo durante 12 h. Se utilizó material de referencia certificado internacionalmente (CRM) para evaluar la precisión y exactitud del análisis. Se empleó la técnica analítica HG-AAS para la determinación de As-t y se utilizó NaBH<sub>4</sub> como agente reductor en NaOH, para la generación del hidruro AsH<sub>3</sub>. El valor LOD del método se calculó en 0,004 mg/kg. Los resultados mostraron que, las concentraciones de As-t en arroz con cáscara, en arroz integral descascarillado mediante procedimiento húmedo y mediante procedimiento seco, alcanzaron valores de, 373 ± 2 µg/kg, 332 ± 1 µg/kg y 290 ± 16 µg/kg, respectivamente.

Sun *et al.* (2008) analizaron muestras de arroz integral, blanco y salvado de arroz procedente de China y Bangladés. Para llevar a cabo la determinación de As-t, se realizó la extracción con ácido nítrico concentrado y posteriormente las muestras fueron digeridas en microondas con un programa de aumento gradual de temperatura en tres etapas: la etapa 1 mantuvo las muestras en 55 °C durante 10 min, la etapa 2 a 75 °C durante 10 min y etapa 3 a 95 °C durante 30 min. Para determinar As-t se empleó la técnica ICP-MS, los resultados

obtenidos en el arroz procedente de China, blanco, integral y salvado, fueron (0,26-0,44; 0,33-0,89; 1,68-3,61) mg/kg, respectivamente, y en el arroz de Bangladés, blanco, integral y salvado, fueron (0,28-0,53; 0,28-0,82; 1,17-2,01) mg/kg, respectivamente. La extracción para el análisis de As-i se llevó a cabo por digestión ácida con ácido nítrico y microondas empleando el mismo programa que se utilizó para determinar As-t. Los extractos se analizaron usando HPLC junto con ICP-MS, los resultados obtenidos en el arroz de China, blanco, integral y salvado, fueron (0,17-0,33; 0,25-0,76; 1,56-3,47) mg/kg, respectivamente, y en el arroz de Bangladés, blanco, integral y salvado, fueron (0,17-0,22; 0,23-0,39; 1,09-1,75) mg/kg, respectivamente. Todas las especies de arsénico se encontraron por encima del límite de detección 0,01 mg/kg, excepto la especie MMA en arroz blanco e integral.

Heitkemper *et al.* (2009) llevaron a cabo análisis de arsénico total y especiación en muestras de arroz procedente de Texas, Luisiana, Arkansas y California. Para la digestión de la muestra en el análisis de arsénico total se empleó HNO<sub>3</sub> concentrado y posteriormente microondas hasta alcanzar la temperatura de 200 °C durante 10 minutos, se mantuvo 15 minutos, se dejó enfriar y se ventiló. Para el tratamiento de las muestras en el análisis de especiación se empleó TFA 0,5 M, se centrifugaron durante 1 hora a 200 rpm y a continuación la extracción fue asistida por microondas. Durante el procedimiento de extracción, la temperatura se incrementó a 85 °C durante 20 minutos, se mantuvo durante 10 minutos a 80 °C, se dejó enfriar y se ventiló. En el análisis de As-t se utilizó un ICP-MS, el límite de detección del método fue de 12 ng/g. Para el análisis de especiación, se usó una HPLC con un ICP-MS. Los resultados obtenidos de arsénico total se encontraron en los siguientes rangos: Texas, 119-1000 ng/g; Luisiana, 46-340 ng/g; Arkansas, 65-435 ng/g y California, 26-89 ng/g; siendo los valores medios: Texas, 445±342 ng/g; Luisiana, 167±76 ng/g; Arkansas, 184±127 ng/g; California, 62±21 ng/g. Los análisis de especiación con un LOD en el rango (2-5) ng/g, reportaron los siguientes valores de iAs, DMA y MMA para el arroz procedente de Luisiana (105±32; 74±54; 2±7) ng/g; Arkansas (79±21; 121±131; 1±5) ng/g; California (61±23; 20±22; nd) ng/g y Texas (111±17; 319±315; 8±8) ng/g. Los valores medios y rangos de iAs y DMA fueron, 91±32 ng/g; (25-157) ng/g y 125±167 ng/g; (6-900) ng/g; respectivamente, MMA fue detectado en 13 de 60 muestras con concentraciones en el rango (5-21) ng/g.

Meharg *et al.* (2009) llevaron a cabo la determinación de arsénico total en 901 muestras de arroz blanco procedente de 10 países pertenecientes a 4 continentes. En los análisis de determinación de arsénico total la extracción se realizó en tubos de digestión de vidrio con ácido nítrico, se dejaron reposar durante la noche a temperatura ambiente, las muestras se digirieron a 120 °C, hasta que aclararon y luego se evaporaron hasta sequedad a 160 °C, el residuo se disolvió en ácido nítrico. Para la determinación de iAs se llevó a cabo la extracción

con TFA 2M en tubos de digestión, la mezcla se dejó reposar durante la noche, luego se colocaron los tubos en un bloque calefactor a 100 °C durante 6 h. El digerido se evaporó hasta sequedad a 160 °C y hasta un peso de 10 g con agua destilada. Se empleó la técnica analítica ICP-MS para la determinación de As-t y la técnica HPLC-ICP-MS para los análisis de especiación. Se obtuvieron los siguientes resultados relativos a la concentración media de arsénico total procedente de Egipto, India, EEUU e Italia, 0,05 mg/kg, 0,07 mg/kg, 0,25 mg/kg y 0,15 mg/kg, respectivamente; los valores de concentración media de As-i fueron para India, EEUU e Italia, 0,03 mg/kg, 0,10 mg/kg y 0,11 mg/kg, respectivamente.

Qian *et al.* (2010) llevaron a cabo, durante el periodo 2005-2008, un estudio de los niveles de arsénico en 712 muestras de arroz molido de más de 20 provincias de China. La extracción se llevó a cabo con HNO<sub>3</sub> al 65% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% y posteriormente horno microondas. Después de la digestión, se enfrió en un baño de hielo. Las concentraciones de arsénico total en las muestras se determinaron por HG-AFS. El valor LOD del método fue de 8 µg/kg. Los niveles medios encontrados de As total fueron, 0,119 mg/kg.

Carbonell-Barrachina *et al.* (2012) estudiaron el arroz español sin gluten, los cereales con gluten y los alimentos para bebés en puré, para analizar el contenido de As-t y especiación, empleando las técnicas de análisis, ICP-MS y HPLC-ICP-MS, respectivamente. El cálculo del límite de detección aportó un valor de 0,03 mg/kg. Además, también se analizó arroz infantil de China, Estados Unidos y Reino Unido. El contenido de As-t y As-i fue significativamente mayor en el arroz sin gluten que en las mezclas de cereales con gluten. Aproximadamente el 77% de las muestras de arroz infantil puro mostraron contenidos por debajo de 0,150 mg/kg (límite chino). Los resultados obtenidos en muestras de arroz infantil procedente de China, Estados Unidos, Reino Unido y España, para concentraciones de As-t fueron (0,070-0,353; 0,164-0,496; 0,137-0,394; 0,036-0,315) mg/kg, para As-i (0,052-0,247; 0,093-0,159; 0,107-0,267; 0,010-0,111) mg/kg y (0,021-0,063; 0,035-0,334; 0,028-0,265; 0,025-0,178) mg/kg, respectivamente.

Raber *et al.* (2012) llevaron a cabo la determinación de As-t y especies arsenicales en diez muestras de trigo, atún y arroz de diferentes tipos y lugares de procedencia. Para determinar la cantidad de As-t en arroz se realizó la digestión ácida de las muestras con ácido nítrico y horno microondas hasta una temperatura de 250 °C durante 30 minutos. Las concentraciones de As-t se determinaron por el método ICP-MS. El límite de detección del método fue 1 µg/kg de As masa seca. Por otro lado, propusieron un método mejorado de la técnica HPLC-ICP-MS para llevar a cabo el análisis de especiación en arroz. En primer lugar utilizaron, para la digestión de las muestras, el calentamiento de las mismas asistido por microondas, pero además, algunas de ellas fueron calentadas en baño de agua. Las muestras

calentadas por microondas fueron sometidas a digestión ácida con TFA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y horno microondas empleando un programa de temperatura de una etapa hasta alcanzar 95 °C en 10 minutos y manteniendo esta temperatura durante 1 hora. Los resultados de concentración media para As-t, As-i, DMA y MMA, fueron 121,5 µg/kg, 83,41 µg/kg, 27,82 µg/kg, 1,36 µg/kg, respectivamente.

Kim *et al.* (2013) estudiaron la determinación de especies de arsénico en granos de arroz procedentes de Corea y EEUU, utilizando HPLC-ICP-MS. Se extrajeron especies de arsénico en muestras de arroz usando HNO<sub>3</sub> al 1% con un horno microondas a 80 °C durante 30 minutos, como medio de digestión optimizado. Se utilizó un patrón de harina de arroz certificado para validar el análisis. Los valores LOD del método para As (III), As (V), DMA y MMA fueron (0,0001; 0,0003; 0,0001; 0,0001) mg/kg, respectivamente. Se obtuvieron los siguientes resultados para 30 muestras de arroz procedente de Corea, As (III), 0,08 mg/kg; As (V), 0,005 mg/kg, DMA, 0,03 mg/kg y MMA, 0,002 mg/kg; y para 30 muestras de arroz procedente de EEUU, As (III), 0,06 mg/kg; As (V), 0,005 mg/kg; DMA, 0,04 mg/kg, y MMA, 0,003 mg/kg.

Pasias *et al.* (2013) propusieron tres métodos completamente validados para la determinación de arsénico total, arsénico inorgánico total y especies de arsénico inorgánico mediante la técnica ETAAS en muestras de arroz y harina de arroz. Para realizar la extracción de iAs y tAs se utilizó HNO<sub>3</sub> 1 M, se comprobó que después de un tratamiento con ultrasonidos de 20 minutos, la extracción se había cumplido. La extracción de As (III) se llevó a cabo con HNO<sub>3</sub> 1 M y un programa de microondas. As (V) se determinó por diferencia del contenido iAs menos el contenido de As (III). Los valores LOD calculados para tAs, iAs y As (III) fueron (22,1; 30,1; 19,0) µg/kg, respectivamente. Las muestras se analizaron por triplicado y los resultados mostraron que los contenidos de tAs, iAs, As (III) y As (V) se encontraban en los rangos (42-270,8; 30-147; 19-97,1 y 19-76,2) (µg/kg) respectivamente, para muestras de arroz y, en los rangos (22,1-170; 30,1-107; 19-91,2 y 15,8-30,1) µg/kg respectivamente, para muestras de harina de arroz. Los métodos totalmente validados se aplicaron para la determinación de arsénico total y arsénico inorgánico en muestras de arroz (n = 15) y harina de arroz (n = 3) de diferentes marcas y variedades recolectadas de locales supermercados en la ciudad de Lamia, Grecia. Fue probado que tAs y iAs se detectaron en casi todas las muestras de arroz y harina de arroz.

Sommella *et al.* (2013) analizaron muestras de tipos de arroz procedente de distintos lugares de Italia, Lombardía, Piamonte, Emilia-Romaña y Calabria, para determinar la concentración de As-t y As-i. La extracción se llevó a cabo con ácido nítrico concentrado y a continuación, peróxido de hidrógeno, y luego las muestras se digirieron en un horno de

microondas con aumento gradual de temperatura. La determinación de As-t se llevó a cabo por ICP-MS, el cálculo LOD del método fue 0,016 mg/kg. La extracción para el análisis de especiación se realizó con HNO<sub>3</sub> al 1% y posteriormente horno de microondas con aumento gradual de temperatura como en As-t, por último, se mezcló con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La especiación de arsénico se cuantificó por HPLC acoplada a ICP-MS el cálculo LOD dio como resultado 0,01 mg/kg. Los resultados de concentraciones medias de As-t según la región de procedencia se hallaron entre, 0,11 mg/kg (Calabria) y 0,28 mg/kg (Emilia-Romaña), y los resultados de concentraciones medias de As-i se encontraron entre, 0,06 mg/kg (Calabria) y 0,10 mg/kg (Lombardía).

Cano-Lamadrid (2014) llevó a cabo el análisis de 15 muestras de arroz procedentes de diferentes zonas de Irán. En el análisis de As-t se empleó mineralización ácida con ácido nítrico concentrado, y posteriormente horno de mufla con aumento gradual de temperatura hasta alcanzar 450 °C, temperatura a la que permaneció durante 6 horas. La determinación de As-t se realizó por medio de la técnica analítica HG-AAS. Para la determinación de especies arsenicales, As (III), As (V), MMA y DMA, el método analítico para la extracción consistió en el empleo de TFA, baño de agua a 100 °C durante 6 horas, y centrifugación a 20000 rpm durante 20 minutos, posteriormente se empleó el acoplamiento de un generador de hidruros en un equipo HPLC con un detector de fluorescencia atómica, HPLC-HG-AFS, para la detección de las especies arsenicales. Para la generación de hidruros se utilizó HCl como medio ácido y, NaBH<sub>4</sub> con NaOH como agente reductor. Se utilizó material de referencia para evaluar la eficacia de los métodos empleados. Los resultados obtenidos fueron, la concentración de As-t en las 15 muestras tomó valores comprendidos en el rango (50,8-248) µg/kg, siendo el valor medio 122 µg/kg, las cantidades de As (III), DMA, MMA y As (V) determinadas estuvieron comprendidas en los rangos (27,3-92,1) µg/kg, (11,2-120) µg/kg, (6,30-14,4) µg/kg y (10,3-33,9) µg/kg, respectivamente; con valores medios de 61,0 µg/kg, 34,0 µg/kg, 9,00 µg/kg y 26,7 µg/kg, respectivamente.

Munera-Picazo *et al.* (2014) analizaron la cantidad de arsénico en siete grupos de productos sin gluten elaborados fundamentalmente a base de arroz, destinados a consumidores adultos celíacos y adquiridos en supermercados de las provincias de Alicante y Murcia (España). Para la determinación de As-t, las muestras sólidas homogeneizadas fueron pesadas y digeridas utilizando el método descrito por primera vez por Muñoz *et al.* (2000), que se llevó a cabo añadiendo 5 ml de HNO<sub>3</sub> al 50% (v/v) y a continuación se evaporó en un baño de arena hasta sequedad total. A continuación, la muestra se mineralizó por vía seca y se disolvió en HCl. Para la determinación de As-t se utilizó la técnica HG-AAS, se empleó NaBH<sub>4</sub> como agente reductor y el cálculo del LOD del método fue 1,2 µg/kg. Para la

extracción de especies de arsénico se utilizó TFA, la mezcla permaneció durante 6 horas a 100 °C. Para evaluar la precisión y exactitud del análisis se incluyó un CMR en cada lote analítico. Los análisis de especiación se llevaron a cabo mediante la técnica HPLC-HG-AFS. Los resultados obtenidos mostraron que, los productos para celíacos contenían importantes concentraciones de As-t, hasta 120 µg/kg, con un valor medio de 41,0 µg/kg, y As-i, hasta 85,8 µg/kg, con un valor medio de 31,9 µg/kg; las concentraciones de As-t y As-i en arroz utilizado para la elaboración de esos productos se hallaban en el rango de 0-235 µg/kg and 0-198 µg/kg, respectivamente, con valores medios de 120 µg/kg and 100 µg/kg, respectivamente.

Narukawa *et al.* (2014) analizaron las concentraciones de 16 elementos en 10 muestras de harina de arroz y granos de arroz de los cuales se obtuvo la harina. Para la determinación de As-t se llevó a cabo la digestión ácida de las muestras con HNO<sub>3</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que fueron calentadas por microondas aplicando un programa de aumento de potencia respecto de tiempo. Se emplearon las técnicas analíticas ICP-MS e ICP-OES. Para el análisis de especiación, se llevó a cabo la digestión ácida de la muestra con HNO<sub>3</sub> y bloque calefactor hasta una temperatura de 100 °C durante 2 horas. Se empleó la técnica analítica HPLC-ICP-MS. Se determinaron las concentraciones de iAs, MMA y DMA y su distribución en los granos de arroz. Se molieron y pulieron porciones del arroz integral en diferentes grados para obtener muestras molidas y muestras de arroz pulido o blanco. Los resultados mostraron los siguientes valores de arsénico total: arroz integral, 0,239 mg/kg; arroz pulido 90%, 0,141 mg/kg; arroz pulido 70%, 0,069 mg/kg; arroz pulido 50%, 0,032 mg/kg; arroz molido 10%, 0,095 mg/kg; arroz molido 30%, 0,158 mg/kg; arroz molido 50%, 0,215 mg/kg; arroz pulido 90% + arroz molido 10%, 0,235 mg/kg; arroz pulido 70% + arroz molido 30%, 0,227 mg/kg; arroz pulido 50% + arroz molido 50%, 0,247 mg/kg. Los resultados obtenidos del análisis de la harina de arroz blanco, determinados por ICP-MS e ICP-OES una vez llevada a cabo la digestión asistida por microondas fueron 0,098 mg/kg y 0,099 mg/kg respectivamente; las especies As (III), As (V), DMA determinadas por HPLC-ICP-MS fueron 0,0714 mg/kg, 0,0134 mg/kg y 0,0133 mg/kg respectivamente.

Segura *et al.* (2016) analizaron muestras de arroz integral y arroz pulido o blanco cultivados de forma orgánica y tradicional en Brasil, y los resultados se compararon con los límites máximos de FAO/Codex. La determinación total y de especiación del arsénico se llevaron a cabo por ICP-MS y HPLC-ICP-MS, respectivamente. Los resultados no mostraron diferencias significativas en la concentración de As total en arroz pulido orgánico (157,7 ± 56,1 ng/g) frente a arroz pulido convencional (137,4 ± 46,6 ng /g), y tampoco en arroz integral orgánico (227,7 ± 95,5 ng/g) frente a arroz integral convencional (217,7 ± 60,9 ng/g). Sin

embargo, el As inorgánico fue 45% más alto en arroz blanco orgánico que en arroz blanco convencional y 41% más alto en arroz integral orgánico que en arroz integral convencional. En cuanto a los niveles máximos adoptados por el Codex para iAs (200 ng/g), no se encontró ninguna violación.

Signes-Pastor *et al.* (2016) llevaron a cabo análisis de especiación en arroz de arrozales y comercial de la península Ibérica. Se incluyeron muestras de material de referencia certificado de arroz (CRM). El tratamiento de la muestra se llevó a cabo con ácido nítrico concentrado al 1% y luego las muestras fueron digeridas en microondas aumentando gradualmente la temperatura hasta 95 °C, a la que se mantuvo a durante 30 minutos. El valor LOD calculado para la especiación fue de 0,002 mg/kg. Los análisis de especiación de arsénico se realizaron mediante IC-ICP-MS. El contenido de iAs en las muestras de granos de arroz recolectados en el campo tuvo la siguiente concentración media y rango según la región: (0,100; 0,061-0,130) mg/kg (Andalucía); (0,120; 0,074-0,150) mg/kg (Catalunya), (0,075; 0,063-0,161) mg/kg (Murcia) y (0,093; 0,063-0,097) mg/kg (Valencia). La media y el rango de la concentración de iAs para el arroz blanco fue (0,071 y 0,027-0,175) mg/kg, respectivamente. Se encontró que la concentración media más alta de iAs fue para Extremadura/Portugal (0,087 mg/kg), mientras que los contenidos medios más bajos de iAs fueron para Andalucía (0,054 mg/kg), Valencia (0,063 mg/kg) y Murcia (0,057 mg/kg), el rango de la concentración en arroz integral fue (0,053-0,247) mg/kg.

Bolan *et al.* (2017) investigaron la determinación de arsénico total en muestras de arroz cultivado en Bangladés, Corea e India, regado con agua contaminada por  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . El tratamiento de la muestra se llevó a cabo mediante digestión ácida con agua regia ( $\text{HNO}_3$ -HCl) y digestión asistida por microondas. Para determinar la concentración de arsénico en las muestras se empleó la técnica analítica ICP-MS, los resultados obtenidos se encontraron dentro del rango 0,456-1,095 mg/kg.

De la Calle *et al.* (2017) llevaron a cabo la determinación de arsénico inorgánico empleando como método la generación de hidruros para el análisis de especiación de arsénico, acoplado a un detector atómico espectroscópico. El método consiste en la extracción selectiva de arsénico inorgánico en cloroformo después de la digestión de las proteínas con ácido nítrico y ácido clorhídrico concentrado. La mineralización de la muestra se llevó a cabo por digestión ácida con  $\text{HNO}_3$  y a continuación, horno de mufla a una temperatura inicial no superior a 150 °C, aumentado progresivamente hasta  $425 \pm 25$  ° C a razón de 50 °C / h, se mantuvo a 425 ° C durante 12 h, y posteriormente se realizó la disolución de las cenizas obtenidas en ácido clorhídrico. Como técnica analítica se empleó FI-HG-AAS del iAs extraído. El cálculo del límite de detección proporcionó un valor de 3 µg/kg de peso en

seco, que permite la cuantificación de arsénico inorgánico en una gran cantidad de matrices de alimentos, entre ellas el arroz. Se obtuvieron los siguientes resultados, arroz blanco, (56±9-113±18) µg/kg; arroz integral, (125±20 - 275±44) µg/kg; arroz cocido, (134±21 - 159±25) µg/kg; obleas de arroz, (127±20 - 162±26) µg/kg.

Cámara (2018) llevó a cabo el estudio de 14 muestras de arroz adquirido en supermercados de la provincia de Jaén de conocidas marcas específicas y blancas, para determinar la cantidad de arsénico total presente en las mismas. Las muestras se sometieron a digestión ácida asistida por microondas, empleando en primer lugar, HNO<sub>3</sub> al 65% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%, posteriormente se trataron en horno de microondas con un programa de aumento gradual de temperatura. La técnica analítica empleada en la determinación fue ICP-MS, los valores de As-t estuvieron comprendidos entre 80,46 µg/kg, correspondiente a una marca blanca, y 408,2 µg/kg perteneciente a una conocida marca, el valor medio de concentración de As-t en las muestras fue 178,1 µg/kg.

Cano-Ferrer (2018) llevó a cabo el análisis en 8 muestras de arroz de diferentes tipos y procedencias adquiridos en supermercados de la zona de Orihuela (Alicante), arroz basmati de Europa e India, arroz largo de Europa y España, arroz jazmín-thai de Tailandia, arroz redondo de España, redondo-cocido y arroz integral de Valencia. La digestión de la muestra se llevó a cabo con agente mineralizante (MgNO<sub>3</sub> + MgO) y HNO<sub>3</sub> concentrado, y posteriormente horno de mufla aumentando la temperatura gradualmente hasta alcanzar 450 °C, temperatura a la que se mantuvo durante unas 6 horas. En la determinación de As-t se empleó la técnica analítica HG-AAS, se utilizó material de referencia para evaluar la eficacia de los métodos utilizados. Los resultados obtenidos estuvieron comprendidos entre 21 µg/kg (basmati, India) y 165 µg/kg (largo, Europa), situándose el valor medio en 100 µg/kg.

Marín *et al.* (2018) llevaron a cabo la evaluación de niveles de metales en arroz de la Comunidad Valenciana (España). Para la determinación de tAs, se realizó la digestión ácida de las muestras con ácido nítrico al 65%, y calentamiento por microondas hasta 250 °C, bajo una presión de 40 bars. Se empleó la técnica analítica ICP-MS, el límite de detección fue 0,005 mg/kg. El análisis de iAs en muestras de arroz se realizó por digestión ácida con HNO<sub>3</sub>, evaporación en baño de arena y posteriormente se llevó a horno de mufla hasta 425 °C durante 12 horas. La técnica analítica empleada fue FI-HG-AAS. Para la generación de hidruros se utilizó HCl, y KI con ácido ascórbico como solución reductora. El límite de detección calculado del método fue 0,003 mg/kg. Los resultados mostraron los siguientes valores medios de concentración para tAs, 0,1468 mg/kg e iAs, 0,0740 mg/kg de masa fresca.

Cruz (2019) analizó la determinación de As-t, en 16 muestras de arroz de diferentes procedencias, arroz redondo extra de Sevilla, Valencia, Madrid y Tarragona; arroz cocido de

Portugal; arroz integral de Valencia; arroz largo de Madrid; arroz bomba de Murcia; arroz basmati de Tailandia y arroz arborio de Italia; adquiridos en varias cadenas de supermercados de Jaén. La extracción se llevó a cabo con HNO<sub>3</sub> (69%) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (33%), y posteriormente asistida por microondas. En la determinación se empleó la técnica analítica ICP-MS y se utilizó material de referencia para evaluar la eficacia de los métodos utilizados. Los resultados obtenidos se encontraron en el rango (0,111-0,422) mg/kg siendo el valor medio 0,211 mg/kg. El valor mínimo perteneció al arroz redondo extra procedente de Madrid y el máximo al arroz arborio de Italia.

**Tabla 5.** Resumen de las principales técnicas analíticas para la determinación de arsénico en arroz.

MUESTRA	TÉCNICA ANALÍTICA	TRATAMIENTO DE LA MUESTRA	ANALITO	LOD (mg/kg)	NIVELES DETECTADOS CONCENTRACIÓN As (mg/kg)	REFERENCIA
Arroz Bangladesh, Corea, India, regado con agua contaminada	ICP-MS	Digestión: agua regia (HNO <sub>3</sub> -HCl) Microondas	As-t	n.d.	0,456-1,095	Bolan <i>et al.</i> (2017)
Arroz blanco Jaén (España)	ICP-MS	Digestión: HNO <sub>3</sub> al 65% y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30% Microondas	As-t	n.d.	0,1781	Cámara (2018)
Arroz blanco Orihuela-Alicante (España)	HG-AAS	Digestión: HNO <sub>3</sub> concentrado Horno de mufla 450 °C, 6 horas	As-t	n.d.	0,100	Cano-Ferrer (2018)

Métodos analíticos para la determinación de arsénico en arroz

Arroz Irán	HG-AAS	Digestión: Ácido nítrico concentrado Horno de mufla 450 °C, 6 horas	As-t	n.d.	0,122	Cano-Lamadrid (2014)
	HPLC-HG-AFS	Extracción: TFA Baño de agua 100 °C, 6 h	As (III)		0,0610	
			As (V)		0,0267	
			MMA		0,00900	
			DMA		0,0340	
Arroz infantil comercial	ICP-MS	Digestión: HNO <sub>3</sub> / H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Microondas	As-t	0,03	0,070-0,353	Carbonell-Barrachina <i>et al.</i> (2012)
China					0,164-0,496	
EEUU					0,137-0,394	
Reino Unido					0,036-0,315	
España						
China					0,052-0,247	
EEUU	HPLC-ICP-MS	HNO <sub>3</sub> Microondas	As-i		0,093-0,159	
Reino Unido					0,107-0,267	
España					0,010-0,111	

Métodos analíticos para la determinación de arsénico en arroz

China			DMA		0,021-0,063	
EEUU					0,035-0,334	
Reino Unido					0,028-0,265	
España					0,025-0,178	
Arroz blanco Supermerca dos Jaén (España)	ICP-MS	Digestión: HNO <sub>3</sub> / H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Microondas	As-t	n.d.	0,211	Cruz (2019)
Arroz blanco	FI-HG-AAS	Digestión: HNO <sub>3</sub> Horno de mufla hasta 425 °C, durante 12 h.	As-i	0,003	0,056-0,113	De la Calle <i>et al.</i> (2017)
Arroz integral					0,125-0,275	
Arroz cocido					0,134-0,159	
Obleas de arroz					0,127-0,162	
Arroz Texas	ICP-MS	Digestión: HNO <sub>3</sub> Microondas	As-t	0,012	0,445	Heitkemper <i>et al.</i> (2009)
Arroz Luisiana					0,167	
Arroz Arkansas					0,184	

Métodos analíticos para la determinación de arsénico en arroz

Arroz California					0,062	
Arroz Texas	HPLC-ICP-MS	TFA Microondas	As-i	0,002- 0,005	0,111	
Arroz Luisiana					0,105	
Arroz Arkansas					0,079	
Arroz California					0,061	
Arroz Corea	HPLC-ICP-MS	Digestión: HNO <sub>3</sub> Microondas	As (III)	0,0001	0,08	Kim <i>et al.</i> (2013)
			As (V)	0,0003	0,005	
			DMA	0,0001	0,03	
			MMA	0,0001	0,002	
Arroz EEUU			As (III)	0,0001	0,06	
			As (V)	0,0003	0,005	

Métodos analíticos para la determinación de arsénico en arroz

			DMA	0,0001	0,04	
			MMA	0,0001	0,003	
Arroz crudo	FI-HG-AAS	Digestión: Ácido nítrico Horno de mufla, 450 °C	As-t	0,002	0,29-0,41	Laparra <i>et al.</i> (2005)
Arroz cocido con agua desionizada					0,25-0,44	
Arroz cocido con agua desionizada con As (V)					1,41-2,25	
Arroz crudo			As-i		0,1-0,20	
Arroz cocido con agua desionizada					0,13-0,17	
Arroz cocido con agua					1,06-2,02	

Métodos analíticos para la determinación de arsénico en arroz

desionizada con As (V) Valencia (España)						
Arroz blanco Valencia (España)	ICP-MS	Digestión: HNO <sub>3</sub> Microondas, 250 °C	As-t	0,005	0,1468	Marín <i>et al.</i> (2018)
	FI-HG-AAS	HNO <sub>3</sub> Horno de mufla, 425 °C, 12 h	As-i	0,003	0,0740	
Arroz Valencia (España)	HG-AFS	Digestión: HNO <sub>3</sub> Horno de mufla, 450 °C Extracción: Ultrasonidos	As (III)	0,0013	0,022-0,149	Matos-Reyes <i>et al.</i> (2007)
			As (V)	0,0009	0,023-0,152	
			DMA	0,0015	0,0017-0,103	
			MMA	0,0006	0,0016-0,104	
Arroz blanco Egipto	ICP-MS	Digestión: Ácido nítrico	As-t	n.d.	0,05	Meharg <i>et al.</i> (2009)

Métodos analíticos para la determinación de arsénico en arroz

India		120 °C			0,07	
EEU					0,25	
Italia					0,15	
Egipto	HPLC-ICP-MS	TFA	As-i		n.d.	
India		100 °C, 6h			0,03	
EEUU					0,10	
Italia					0,11	
Arroz	HG-AAS	Digestión:	As-t	0,0012	0,120	Munera-Picazo <i>et al.</i> (2014)
Productos de arroz		HNO <sub>3</sub> Mineralización por vía seca			0,0410	
Arroz	HPLC-HG-AFS	TFA	As-i		0,100	
Productos de arroz		100 °C, 6h			0,0319	
Harina de arroz blanco	ICP-MS	Digestión: HNO <sub>3</sub> / H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	As-t	n.d.	0,098	Narukawa <i>et al.</i> (2014)

Métodos analíticos para la determinación de arsénico en arroz

	ICP-OES	Microondas			0,099	
	HPLC-ICP-MS	HNO <sub>3</sub> 100 °C, 2h	As (III) As (V) DMA		0,0714 0,0134 0,0133	
Arroz Grecia	ETAAS	Digestión: Microondas HNO <sub>3</sub>	As-t As-i As (III) As (V)	0,0221 0,0301 0,0190	0,042-0,2708 0,030-0,147 0,019-0,0971 0,019-0,0762	Pasias <i>et al.</i> (2013)
Harina de arroz Grecia			As-t As-i As (III) As (V)		0,0221-0,170 0,0301-0,107 0,019-0,0912 0,0158-0,0301	

Métodos analíticos para la determinación de arsénico en arroz

Arroz China	HG-AFS	Digestión: HNO <sub>3</sub> / H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Horno microondas	As-t	0,008	0,119	Qian <i>et al.</i> (2010)
Arroz	HPLC-ICP-MS	Digestión: HNO <sub>3</sub> Microondas  Ácido trifluoroacético / H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Microondas	As-t  As-i DMA MMA	0,001	0,122  0,0834 0,0278 0,00136	Raber <i>et al.</i> (2012)
Arroz blanco Brasil	ICP-MS  HPLC-ICP-MS	Digestión: HNO <sub>3</sub> Calentamiento 2h en digestor de bloques  HNO <sub>3</sub> Baño termostático 95°C, 2h	As-t  As (III) + As (V) DMA + MMA	n.d.	0,0336-0,1962  0,0224-0,0926 0,01652-0,1068	Segura <i>et al.</i> (2016)

Métodos analíticos para la determinación de arsénico en arroz

Arroz en cáscara	HG-AAS	Digestión: HNO <sub>3</sub> 65% Horno de mufla, 450 °C, 12h	As-t	0,004	0,373	Signes <i>et al.</i> (2008)
Arroz integral (Húmedo)					0,332	
Arroz integral (Seco)					0,290	
Arroz Península ibérica	IC-ICP-MS	Digestión: HNO <sub>3</sub> / H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Microondas	As-i	0,002		Signes-Pastor <i>et al.</i> (2016)
Campo Blanco					0,061-0,161	
Integral					0,027-0,175 0,053-0,247	
Arroz Italia	ICP-MS	Digestión: HNO <sub>3</sub> / H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Horno microondas	As-t	0,016	0,11-0,28	Sommella <i>et al.</i> (2013)

	HPLC-ICP-MS	HNO <sub>3</sub> / H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Horno microondas	As-i	0,01	0,06-0,10	
<u>China</u>	ICP-MS	Digestión: HNO <sub>3</sub> Microondas	As-t	0,01	0,26-0,44	Sun <i>et al.</i> (2008)
Arroz blanco					0,33-0,89	
Arroz integral					1,68-3,61	
Salvado de arroz					0,17-0,33	
Arroz blanco	HPLC-ICP-MS		As-i		0,25-0,76	
Arroz integral					1,56-3,47	
Salvado de arroz						
<u>Bangladés</u>						
Arroz blanco	ICP-MS		As-t		0,28-0,53	
Arroz integral					0,28-0,82	
Salvado de arroz					1,17-2,01	
Arroz blanco	HPLC-ICP-MS		As-i		0,17-0,22	
Arroz integral					0,23-0,39	
Salvado de arroz					1,09-1,75	

Métodos analíticos para la determinación de arsénico en arroz

Arroz	ICP-MS	Digestión:	As-t	0,01		Williams <i>et al.</i> (2005)
Bangladés		Ácido nítrico			0,13	
Europa		120 °C			0,18	
India					0,05	
EEUU					0,26	
Bangladés			As-i		0,08	
Europa	HPLC-ICP-	TFA			0,08	
India	MS	100 °C, 6h			0,03	
EEUU					0,08	

n.d.: no determinado

### **3.- CONCLUSIONES**

Las conclusiones de este trabajo se exponen a continuación.

- Las especies de arsénico hidrosolubles, inorgánicas As (III) y As (V), y metiladas MMA y DMA, han sido descritas como sustancias tóxicas arsenicales frente a las formas organoarsenicales, cuya toxicidad no ha sido demostrada. Por tanto, las especies hidrosolubles han sido las determinadas en los análisis de especiación realizados.
- Con el paso del tiempo, la digestión asistida por microondas se ha confirmado como la técnica de mineralización por excelencia.
- Los límites de detección menores han sido proporcionados por las técnicas de HPLC-ICP-MS y HG-AFS, llegando en ambos casos a valores de 0,1 µg/kg.
- Se han determinado mayores concentraciones de iAs en arroz integral que en arroz blanco, y se han superado los límites establecidos en la normativa europea (0,25 mg/kg) en arroz integral procedente de China y Bangladés. Asimismo, el salvado de arroz también ha superado los límites establecidos y ha presentado mayor concentración de iAs que el arroz integral. Por otro lado, también se ha observado que tanto el arroz cocido como las obleas de arroz han presentado concentraciones de iAs superiores a las determinadas en arroz blanco, aunque en estos casos no se han superado los límites contemplados en la normativa europea.
- El arroz destinado a alimentos para niños de corta edad ha mostrado cantidades significativas de iAs, superando los límites establecidos en la normativa europea (0,10 mg/kg) en arroz infantil procedente de China, EEUU, Reino Unido y España, siendo este último el que presenta los niveles más bajos.
- Se ha observado que el arroz blanco e integral procedente de Europa no supera los límites máximos de arsénico inorgánico establecidos en la normativa europea, 0,20 mg/kg y 0,25 mg/kg, respectivamente.
- La técnica ICP-MS ha sido la más utilizada para la determinación de arsénico en arroz frente a otras técnicas espectrométricas, sin embargo, la técnica HG-AFS ha proporcionado excelentes resultados mostrando también una elevada sensibilidad a menor coste económico.

#### 4.- BIBLIOGRAFÍA

- [AECOSAN] Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. *Arsénico*; Ministerio de Sanidad Consumo y Bienestar Social, Gobierno Es, marzo de 2018.
- Amayo, K.O.; Petursdottir, A.; Newcombe, C.; Gunnlaugsdottir, H.; Raab, A.; Krupp, E.M.; Feldmann, J. Identification and quantification of arsenolipids using reversed-phase HPLC coupled simultaneously to high-resolution ICPMS and high-resolution electrospray MS without species-specific standards. *Anal. Chem.* **2011**, 83, 3589-3595.
- Anawar, H.M.; García-Sánchez, A.; Hossai, M.N.; Akter, S. Evaluation of health risk and arsenic levels in vegetables sold in markets of Dhaka (Bangladesh) and Salamanca (Spain) by hydride generation atomic absorption spectroscopy. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2012**, 89, 620-625.
- Arroyo-Abad, U.; Mattusch, J.; Mothes, S.; Möder, M.; Wennrich, R.; Elizalde-González, M.P.; Matysik, F.M. Detection of arsenic-containing hydrocarbons in canned cod liver tissue. *Talanta* **2010**, 82, 38-43.
- Bolan, S.; Kunhikrishnan, A.; Seshadri, B. Comparative analysis of speciation and bioaccessibility of arsenic in rice grains and complementary medicines. *Chemosph.* **2017**, 182, 433-440
- Boutakhrit, K.; Claus, R.; Bolle, F.; Degroodt, J.M.; Goeyens, L. Open digestion under reflux for the determination of total arsenic in seafood by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry with hydride generation. *Talanta* **2005**, 66, 1042-1047.
- Brisbin, J. A.; Caruso, J. A. Comparison of extraction procedures for the determination of arsenic and other elements in lobster tissue by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analyst* **2002**, 127, 921-929.
- Cámara-Arroyo, M. J. Determinación de residuos de metales tóxicos en arroz mediante ICP-MS. Trabajo Fin de Grado, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén, julio de 2018.
- Cameán, A. M.; Repetto, M. *Toxicología alimentaria*. Ediciones Díaz de Santos. España, 2006.
- Cano-Ferrer, G. Efecto del lavado en el contenido de arsénico de diferentes tipos de arroz (*Oryza sativa*). Trabajo Fin de Grado, Universidad Miguel Hernández de Elche, septiembre de 2018.

Cano-Lamadrid, M. Control de la toxicidad en arroz de procedencia iraní. Trabajo Fin de Grado, Universidad Miguel Hernández de Elche, julio de 2014.

Carbonell-Barrachina, A. A.; Xiangchun, W.; Ramírez-Gandolfo, A.; Norton-Gareth, J.; Burló, F.; Deacon, C.; Meharg A. A. Inorganic arsenic contents in rice-based infant foods from Spain, UK, China and USA. *Environ. Pollut.* **2012**,163, 77-83.

Centeno, J. A.; Gray, M. A.; Mullick, F. G.; Tchounwou, P. B.; Tseng, C. Arsénico en agua potable y problemas de salud. *Christchurch: Resolutionz Press*, **2005**, 195-219.

Centeno, J. A.; Tchounwou, P. B.; Patlolla, A. K.; Mullick, F. G.; Murakata, L., Meza, E. Patología ambiental y efectos en la salud del envenenamiento por arsénico: una revisión crítica. *Collingwood: Publicación CSIRO*, **2006**, 311-327.

Cruz-Fuentes L. Determinación y estudio de residuos de contaminantes inorgánicos en alimentos de origen vegetal. Trabajo Fin de Grado, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén, julio de 2019.

Date, A.R.; Gray, A.L. Plasma source-mass spectrometry using an inductively coupled plasma and a high-resolution quadrupole mass filter. *Analyst.* **1981**, 106, 1255-1267.

De la Calle, M. B., Devesa, V., Fiamegos, Y., Vélez, D. Determination of Inorganic Arsenic in a Wide Range of Food Matrices using Hydride Generation - Atomic Absorption Spectrometry. *J. Vis. Exp.* **2017**, (127):55953. Publicado el 1 de septiembre de 2017 doi:10.3791 / 55953.

Dietz, C.; Sanz, J.; Sanz, E.; Muñoz-Olivas, R.; Cámara, C. Current perspectives in analyte extraction strategies. *J. Chromatogr., A.* **2007**, 1153, 114-129.

[EFSA] European Food Safety Authority. Panel on Contaminants in the Food Chain. 2009. Scientific opinion on arsenic in food. *EFSA J.* **2009**, 7:1351.

[FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. UN strengthens regulations on lead in infant formula and arsenic in rice. *Publicaciones* 17 julio **2014**.

[FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Seguimiento del mercado del arroz. *Publicaciones* 27 abril **2018**.

Flanagan, S. V.; Johnston, R. B.; Zheng, Y. Arsenic in tube well water in Bangladesh: health and economic impacts and implications for arsenic mitigation. *Bull World Health Organ.* **2012**, 90, 839-846.

Francesconi, K.A.; Kuehnelt, D. Determination of arsenic species: A critical review of methods and applications, 2000-2003. *Analyst.* **2004**, 129, 373-395.

[FSA] Food Standards Agency. Arsenic in seaweed. [Online] **2004**, <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/arsenicseaweed.pdf>, p. 4.

García-Salgado, S. Estudios de especiación de arsénico y acumulación de metales en muestras de interés medioambiental. Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Madrid, febrero de 2013.

Gómez-Ariza, J. L.; Sánchez-Rodas, D.; Giráldez, I.; Morales, E. Comparison of biota sample pretreatments for arsenic speciation with coupled HPLC-HG-ICP-MS. *Analyst*. **2000**, 125, 401-407.

Gómez-Ariza, J. L.; Morales, E.; Giráldez, I.; Sánchez-Rodas, D.; Velasco, A. Sample treatment in chromatography-based speciation of organometallic pollutants. *J. Chromatogr., A* **2001**, 938, 211-224.

Goyer, R. A. Efectos tóxicos de los metales. En: Casarett LJ, Doull J, Klaassen CD, editores. *La toxicología de Casarett y Doull: la ciencia básica de los venenos*. McGraw-Hill: Nueva York, 2001; pp 811-867.

Heitkemper, D.T.; Vela, N.P.; Stewart, K.R.; Westphal, C.S. Determination of total and speciated arsenic in rice by ion chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **2001**, 16, 299-306.

Heitkemper, D.T.; Kubachka, K.M.; Halpin, P.R.; Allen, M.N.; Shockey, N.V. Survey of total arsenic and arsenic speciation in US-produced rice as a reference point for evaluating change and future trends. *Food Addit. Contam. B.* **2009**, 2, 112-120.

Houk, R.S.; Fassel, V.A.; Flesch, G.D.; Svec, H.J.; Gray, A.L.; Taylor, C.E. Inductively coupled argon plasma as an ion-source for mass-spectrometric determination of trace-elements. *Anal. Chem.* **1980**, 52, 2283-2289.

Huerga, A.; Lavilla, I.; Bendicho, C. Speciation of the immediately mobilisable As(III), As(V), MMA and DMA in river sediments by high performance liquid chromatography-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry following ultrasonic extraction. *Anal. Chim. Act.* **2005**, 534, 121-128.

Hughes, M. F.; Beck, B. D.; Chen, Y.; Lewis, A. S.; Thomas, D. J. Arsenic exposure and toxicology: A historical perspective. *Toxicol. Sci.* **2011**, 123, 305-332.

[IARC] International Agency for Research on Cancer. Arsenic and arsenic compounds. *Monogr. Eval Carcinog. Risk. Chem. Hum.* **1980**, 23, 39-141.

Julshamn, K.; Nilsen, B. M.; Frantzen, S.; Valdernes, S.; Maage, A.; Nedreaas, K. Total and inorganic arsenic in fish samples from Norwegian waters. *Jour. Food Addit. Contam.* **2012**, *5*, 229-235.

Khairul, I.; Wang, Q.Q.; Jiang, Y. H.;1,3, Chao Wang, C.; Naranmandura, H. Metabolism, toxicity and anticancer activities of arsenic compounds. *Oncotar.* **2017**, *8*, 23905-23926.

Kim, J.Y.; Kim, W. I.; Kunhikrishnan, A.; Kang, D.W.; Kim, D.H.; Lee, Y. J.; Young-Jun Kim, Y.J.; Kim, C.T. Determination of Arsenic Species in Rice Grains using HPLC-ICP-MS. *Food Sci. Biotechnol.* **2013**, *22*, 1509-1513.

Kohlmeyer, U.; Jantzen, E.; Kuballa, J.; Jakubik, S. Benefits of high resolution IC-ICP-MS for the routine analysis of inorganic and organic arsenic species in food products of marine and terrestrial origin. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *377*, 6-13.

Kovacevic, M.; Leber, R.; Kohlwein, S.D.; Goessler, W. Application of inductively coupled plasma mass spectrometry to phospholipid analysis. *J. Anal. At. Spectrom.* **2004**, *19*, 80-84.

Laparra, J. M.; Vélez, D.; Montoro, R.; Barberá, R.; Farré, R. Estimation of arsenic bioaccessibility in edible seaweed by an in vitro digestion method. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 6080-6085.

Laparra, J.M.; Velez, D.; Barbera, R.; Farre, R.; Montoro, R. Bioavailability of inorganic arsenic in cooked rice: practical aspects for human health risk assessments. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 8829-8833.

Lloyd, N.; Morgan, H. W.; Nicholson, B. K.; Ronimus, R. S.; Riethmiller, S. Salvarsan the first chemotherapeutic compound. *N Z Chemistry.* **2005**, *69*, 24-27.

Lunde, G. Analysis of arsenic in marine oils by neutron activation: Evidence of arseno organic compounds. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1968**, *45*, 331-332.

Lunde, G. Analysis of arsenic and bromine in marine and terrestrial oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1972**, *49*, 44-47.

Lunde, G. The analysis and characterization of trace elements, in particular bromine, selenium and arsenic in marine organisms. Blindern, Oslo, University of Oslo, Norway, 1974.

Ma, J. F.; Yamaji, N.; Mitani, N.; Xu, X.Y.; Su, Y.H.; McGrath, S. P.; Zhao, F.J. Transporters of arsenite in rice and their role in arsenic accumulation in rice grain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2008**, *105*, 9931-9935.

Maher, W.; Krikowa, F.; Ellwood, M.; Foster, S.; Jagtap, R.; Raber, G. Overview of hyphenated techniques using an ICP-MS detector with an emphasis on extraction techniques for measurement of metalloids by HPLC-ICPMS. *Microchem. J.* **2012**, 105, 15-31.

Mandal, B. K.; Ogra, Y.; Suzuki, K. T. Identificación de ácidos dimetilarsinosos y monometilanosos en la orina humana de las áreas afectadas por arsénico en Bengala Occidental, India. *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, 14, 4, 371-378.

[MAPAMA] *Producciones Agrícolas*; Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Gobierno, Es, julio de 2016.

[MAPAMA] *Producciones Agrícolas. Arroz*; Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Gobierno, Es, mayo de 2017.

[MAPAMA] *Informe del consumo de alimentación en España*; Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Gobierno, Es, julio de 2018.

Mathews, V.; Chendamarai, E.; George, B.; Viswabandya, A.; Srivastava A. Treatment of Acute Promyelocytic Leukemia with Single-Agent Arsenic Trioxide. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* **2011**; 3(1): e2011056, doi:10.4084/MJHID.2011.056

Matos-Reyes, M. N.; Cervera, M. L.; Campos, R. C.; de la Guardia, M. Determination of arsenite, arsenate, monomethylarsonic acid and dimethylarsinic acid in cereals by hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *Spectrochim. Act. B.* **2007**, 62, 1078-1082.

Matos-Reyes, M.N.; Cervera, M.L.; Campos, R.C.; de la Guardia, M. Non- chromatographic speciation of toxic arsenic in vegetables by hydride generation-atomic fluorescence spectrometry after ultrasound-assisted extraction. *Talanta.* **2008**, 75, 811-816.

Marín, S.; Pardo, O.; Sánchez, A.; Sanchis, Y.; Vélez, D.; Devesa, V.; Font, G.; Yusá, V. Assessment of metal levels in foodstuffs from the Region of Valencia (Spain). *Toxicol. Rep.* **2018**, 5, 654-670.

Meek WJ. The gentle art of poisoning. *Jama.* **1955**, 158, 335-339.

Meharg, A. A. Arsenic in rice understanding a new disaster for South East Asia. *Trends Plant. Sci.* **2004**, 9, 415-417.

Meharg, A. A.; Lombi, E.; Williams, P. N.; Scheckel, K. G.; Feldmann, J.; Raab, A.; Zhu, Y.; Islam, R. Speciation and localization of arsenic in white and brown rice grains. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, 42, 1051-1057.

Meharg, A. A.; Williams, P. N.; Adomako, E.; Lawgali. Y. Y.; Deacon, C.; Villada, A.; Cambell, R. C. J.; Sun, G.; Zhu, Y. G.; Feldmann, J.; Raab, A.; Zhao, F.J.; Islam, R.; Hossain, S.; Yanai,

- J. Geographical variation in total and inorganic arsenic content of polished (white) rice. *Environ. Scien. Technol.* **2009**, 43, 1612-1617.
- McSheehy, S.; Szpunar, J.; Morabito, R.; Quevauviller, Ph. The speciation of arsenic in biological tissues and the certification of reference materials for quality control. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2003**, 22, 191-209.
- Monasterio, R. P.; Londonio, J. A.; Farias, S. S.; Smichowski, P.; Wuilloud, R. G. Organic solvent-free reversed-phase ion-pairing liquid chromatography coupled to atomic fluorescence spectrometry for organoarsenic species determination in several matrices. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 59, 3566-3574.
- Moreno-Jiménez, E.; Esteban, E.; Peñalosa, J. The fate of arsenic in soil-plant systems. *Rev. Environ.* **2012**, 215.
- Morita, M.; Shibata, Y. Isolation and identification of arseno-lipid from a brown alga, *Undaria pinnatifida* (Wakame). *Chemosph.* **1988**, 17, 1147-1152.
- Munera-Picazo, S.; Burló, F.; Carbonell-Barrachina, A. A. Arsenic speciation in rice-based food for adults with celiac disease. *Food Addit. Contam. A.* **2014**, 31, 1358-1366.
- Muñoz, O.; Devesa, V.; Suñer, M. A.; Vélez, D.; Montoro, R.; Urieta, I.; Macho, M. L.; Jalón, M. Total and inorganic arsenic in fresh and processed fish products. *J. Agric Food Chem.* **2000**, 48, 4369-4376.
- Narukawa, T.; Matsumoto, E.; Nishimura, T.; Akiharu, H. Determination of Sixteen Elements and Arsenic Species in Brown, Polished and Milled Rice. *Anal. Scien.* **2014**, 30, 245-250.
- Ninno, C.; Dorosh, P. A. Averting a food crisis: private imports and public targeted distribution in Bangladesh after the 1998 flood. *Agric. Econom.* **2001**, 25, 337-346
- Pasias, I. N.; Thomaidis, N. S.; Efrosini, A. Piperaki, E. A. Determination of total arsenic, total inorganic arsenic and inorganic arsenic species in rice and rice flour by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Microchem. J.* **2013**, 108, 1-6.
- Pizarro, I.; Gómez, M.; Cámara, C.; Palacios, M.A. Arsenic speciation in environmental and biological samples. Extraction and stability studies. *Anal. Chim. Act.* **2003**, 495, 85-98.
- Postma, D.; Larsen, F.; Hue, N. T. M.; Duc, M. T.; Viet, P. H.; Nhan, P. Q. Jessen S. Arsenic in groundwater of the Red River floodplain, Vietnam: Controlling geochemical processes and reactive transport modeling. *Geochim. Cosmochim. Act.* **2007**, 71, 5054-5071.

Qian, Y.; Chen, C.; Zhang, Q.; Li, Y.; Zhijun Chen, Z.; Li, M. Concentrations of cadmium, lead, mercury and arsenic in Chinese market milled rice and associated population health risk. *Food Cont.* **2010**, 21, 1757-1763.

Raber, G.; Khoomrung, S.; Taleshi, M.S.; Edmonds, J.S.; Francesconi, K.A. Identification of arsenolipids with GC/MS. *Talanta*. **2009**, 78, 1215-1218.

Raber, G.; Stock, N.; Hanel, P.; Murko, M.; Navratilova, J.; Francesconi, K.A. An improved HPLC-ICPMS method for determining inorganic arsenic in food: Application to rice, wheat and tuna fish. *Food Chem.* **2012**, 134, 524-532.

Radbound University. ICP-MS. [On line] **2016**, <http://www.ru.nl/science/gi/facilities/elemental-analysis/icp-ms/> (visitado 20 de may. de 2016).

Radke, B.; Jewell, L.; Namieśnik, J. Analysis of arsenic species in environmental samples. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2012**, 42, 162-183.

Rahman, M. A.; Hasegawa, H. High levels of inorganic arsenic in rice in areas where arsenic-contaminated water is used for irrigation and cooking. *Sci. Total Environ.* **2011**, 409, 4645-4655.

Ramos, L. Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques. *J. Chromatogr. A.* **2012**, 1221, 84-98.

Reglamento (CE) 1881/2006 sobre los niveles máximos de arsénico inorgánico en los productos alimenticios. Diario oficial de la Unión Europea 26 junio 2015. L 161/14.

Reglamento (UE) 2015/1006 de la Comisión, de 25 de junio de 2015, por el que se modifica el Reglamento (CE) nº 1881/2006 en cuanto al contenido máximo de arsénico inorgánico en los productos alimenticios.

Rumpler, A.; Edmonds, J. S.; Katsu, M.; Jensen, K. B.; Goessler, W.; Raber, G.; Gunnlaugsdottir, H.; Francesconi, K. A. Arsenic-containing long-chain fatty acids in cod-liver oil: A result of biosynthetic infidelity. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 2665-2667.

Sánchez-Rodas, D.; Corns, W.T.; Chen, B.; Stockwell, P.B. Atomic Fluorescence Spectrometry: A suitable detection technique in speciation studies for arsenic, selenium, antimony and mercury. *J. Anal. At. Spectrom.* **2010**, 25, 933-946.

Sánchez-Rodas, D.; González de las Torres, A.; Giráldez, I.; Martínez, F.; Palencia, P. Acumulación y especiación de As en fresas. *Actual. Anal.* **2018**, 61, 13.

Sanz, E.; Muñoz-Olivas, R.; Cámara, C. Evaluation of a focused sonication probe for arsenic speciation in environmental and biological samples. *J. Chromatogr. A.* **2005**, 1097, 1-8.

Schmeisser, E.; Goessler, W.; Kienzl, N.; Francesconi K.A. Direct measurement of lipidsoluble arsenic species in biological samples with HPLC-ICPMS. *Analyst*. **2005**, 130, 948-955.

Segura, F.R.; Oliveira-Souza, J.; Silva de Paula, E.; Cunha-Martins, A.; Cavalheiro-Paulelli, A.; Barbosa, F.; Lemos-Batista, B. Arsenic speciation in Brazilian rice grains organically and traditionally cultivated: Is there any difference in arsenic content? *Food Resear. Internat*. **2016**, 89, 169-176.

Signes, A.; Mitra, K.; Burló, F.; Carbonell-Barrachina, A. A. Effect of two different rice dehulling procedures on total arsenic concentration in rice. *Eur. Food Res. Technol*. **2008**, 226, 561-567.

Signes-Pastor, A. J.; Carey, M.; Carbonell-Barrachina, A.; Moreno-Jiménez, E.; Green-Andy, J.; Meharg A. A. Geographical variation in inorganic arsenic in paddy field samples and commercial rice from the Iberian Peninsula. *Food Chem*. **2016**, 202, 356-363.

Sloth, J. J.; Julshamn, K. Survey of total and inorganic arsenic content in blue mussels (*Mytilus edulis* L.) from Norwegian fiords: revelation of unusual high levels of inorganic arsenic. *J. Agric. Food Chem*. **2008**, 56 (4), 1269-1273.

Smedley, P. L.; Kinniburgh, D. G. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Appl. Geochem*. **2002**, 17 (5), 517-568.

Smith, A.; Steinmaus, C. Health Effects of Arsenic and Chromium in Drinking Water: Recent Human Findings. *Annu. Rev. Public. Health*. **2009**, 30, 107-22.

Soeroes, C.; Walter, G.; Francesconi, K. A.; Kienzl, N.; Schaeffer, R.; Fodor, P.; Doris Kuehnelt, D. Arsenic Speciation in Farmed Hungarian Freshwater Fish. *J. Agric. Food Chem*. **2005**, 53, 23, 9238-9243.

Sommella, A.; Deacon, C.; Norton, G.; Pigna, M.; Violante, A.; Meharg, A.A. Total arsenic, inorganic arsenic, and other elements concentrations in Italian rice grain varies with origin and type. *Environ. Pollut*. **2013**, 181, 38-43.

Swindell, E. P.; Hankins, P. L.; Chen, H.; Miodragović, Đ. U.; O'Halloran, T. V. Anticancer Activity of Small Molecule and Nanoparticulate Arsenic (III) Complexes. *Inorg. Chem*. **2013**, 52, 12292-12304.

Sun, G. X.; Williams, P. N.; Carey, A. M.; Zhu, Y. G.; Deacon, C.; Raab, A.; Feldmann, J.; Islam, R. M.; Meharg, A. A. Inorganic arsenic in rice bran and its products are an order of magnitude higher than in bulk grain. *Environ. Sci. and Technol*. **2008**, 42, 7542-7546.

Taleshi, M.S.; Jensen, K.B.; Raber, G.; Edmonds, J.S.; Gunnlaugsdottir, H.; Francesconi, K.A. Arsenic-containing hydrocarbons: natural compounds in oil from the fish capelin, *Mallotus villosus*. *Chem. Commun.* **2008**, Unassigned, 4706-4707.

Taleshi, M.S.; Edmonds, J.S.; Goessler, W.; Ruiz-Chancho, M.J.; Raber, G.; Jensen, K.B.; Francesconi, K.A. Arsenic-containing lipids are natural constituents of sashimi tuna. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, 44, 1478-1483.

Vela, N.P.; Heitkemper, D.T. Total arsenic determination and speciation in infant food products by ion chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *J. AOAC Int.* **2004**, 87, 244-252.

[WHO] World Health Organization. Arsenic and arsenic compounds; WHO, Geneva, Switzerland, **2001**.

Williams, P. N.; Prince, A. H.; Raab, A.; Hossain, S. A.; Feldmann, J.; Meharg, A. A. Variation in arsenic speciation and concentration in paddy rice related to dietary exposure. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, 39, 5531-5540.

Xu, X. Y.; McGrath, S. P.; Zhao, F. J. Rapid reduction of arsenate in the medium mediated by plant roots. *New Phytolog.* **2007**, 176, 590-599.

Zhao, F. J.; McGrath, S. P.; Meharg, A. A. Arsenic as a food chain contaminant: mechanisms of plant uptake and metabolism and mitigation strategies. *Ann. Rev. Plant. Biol.* **2010**, 61, 535-559.