



EIDUNED
Escuela
Internacional
de Doctorado

TESIS DOCTORAL

AÑO 2022

The seal of the University of Salamanca is a large, circular emblem in the background. It features a central shield with a crown on top, surrounded by a decorative border with Latin text. The text 'MOBILIBVS' is visible at the top, and 'SALAMANTICENSIS' is visible at the bottom.

**ANÁLISIS Y EVALUACIÓN DEL RIESGO
TOXICOLÓGICO DE EXPOSICIÓN AL
ARSÉNICO DE UNA MUESTRA
POBLACIONAL ESPAÑOLA**

PABLO FERNÁNDEZ RODRÍGUEZ

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS

ROSA MARÍA MARTÍN ARANDA

JOSÉ LUIS LÓPEZ COLÓN

JORGE HURTADO DE MENDOZA

A Cándido y Gloria

*«El conocimiento no es una vasija
que se llena, sino un fuego que
se enciende»*

Plutarco.

AGRADECIMIENTOS

Ha sido una larga andadura desde que se iniciase el proyecto de la tesis que ahora tengo el honor de defender en nombre de la UNED y del Instituto de Toxicología de la Defensa (ITOXDEF). Un verdadero camino de aprendizaje, superación y maduración que no hubiera podido completar sin el apoyo, la comprensión y la ayuda de mis directores Rosa María Martín Aranda, José Luis López Colón y Jorge Hurtado de Mendoza. Ellos pusieron la primera piedra de este proyecto al ofrecerme la oportunidad de iniciar esta tesis, algo por lo que siempre estaré agradecido y que nunca olvidaré. Como mentores, su ejemplo y sus consejos me han servido para meditar y tomar las decisiones más adecuadas durante el desempeño de la misma, así que nuevamente, muchas gracias a los tres.

Gracias también a Mayte Llorente, Carmen Robles, María José Jaén y Beatriz Gallego, por su apoyo, ayuda compromiso y paciencia tanto dentro como fuera del laboratorio, y en general, a todo el personal del Instituto de Toxicología de la Defensa, en especial a Marisa y Silvia, por su amabilidad y cariño, y de la UNED por vuestras muestras de afecto y compañerismo así como por todos los buenos momentos vividos durante este periodo.

No puedo dejar de mencionar a los compañeros y profesores del grupo ACHE (*Analytical Chemistry for Health and Environment*) del Instituto de Química de la Universidad de Graz, Austria, ya que gracias a vuestras continuas enseñanzas pude alcanzar un mayor nivel de conocimiento sobre el arsénico en apenas tres meses.

A un nivel más personal, gracias a mis padres, Cándido y Gloria, y a Justo, Isra, Cris, Fran, Maca, Miguel, Cristian, Sergio, Alejandro, Tomás, Diana y al resto de amigos y familiares por vuestras enseñanzas, vuestra paciencia y vuestro sacrificio en mis días más oscuros, ofreciéndome vuestro consejo, apoyo y ayuda para seguir adelante, y seguir centrado en esta investigación. Sin vosotros no hubiera podido llegar hasta aquí y os estaré eternamente agradecido.

Por último, me gustaría agradecer al Fondo Social Europeo, a la Comunidad de Madrid, y cómo no, a la UNED, por el apoyo económico recibido para la formación de jóvenes doctores a través del proyecto "PEJD-2018-PRE/AMB-8794" así como a la Fundación Santander por otorgarme su beca de movilidad para el curso 2020/2021. Esta última me ha permitido optar a la Mención del Doctorado Internacional.

Me gustaría despedirme con unas palabras y una cita. Primero, las palabras.

¡Muchas gracias a todos los que de una manera u otra habéis contribuido a que esta etapa de mi vida sea inolvidable y llevadera. Gracias de verdad!

Y aquí la cita: «Todos cambiamos, si te paras a pensarlo. Somos personas diferentes a lo largo de nuestra vida. Y eso está bien, tienes que seguir avanzando, siempre que recuerdes quiénes solías ser. No olvidaré ni una frase de esto, ni un solo día(...)» Matt Smith (actor, 2013)

Índice

I.-Lista de abreviaturas	14
II.-Resumen.....	18
III.-Abstract.....	21
1.-Introducción.....	24
1.1- Clasificación de las especies de arsénico más relevantes.....	26
a) Especies de arsénico inorgánico.....	26
➤ Ácido arsenioso y sus oxosales.....	26
➤ Ácido arsénico y sus oxosales.....	27
➤ Otras especies inorgánicas	27
b) Especies de arsénico orgánico.....	28
➤ Especies monometiladas	28
➤ Especies dimetiladas	29
➤ Especies trimetiladas.....	30
➤ Arsenoazúcares	30
➤ Arsenolípidos	31
➤ Arsenobetaína y arsenocolina	32
➤ Otras especies orgánicas	33
1.2.- Fuentes naturales y antropogénicas principales de exposición al arsénico	35
a) El arsénico en el medioambiente: el ciclo biogeoquímico.....	36
b) El ser humano y el arsénico: una historia compartida	44
1.3.- El metabolismo del arsénico y sus implicaciones tóxicas	49
a) El metabolismo del arsénico	49
b) Toxicidad del arsénico	56
1.4.- Metodologías analíticas de especiación de arsénico	62
a) Antecedentes	62
b) Fundamentos básicos de cromatografía	68
c) Fundamentos básicos de ICP.....	71

2.-Objetivos/Objectives	77
3.-Parte Experimental	78
3.1.-Reactivos.....	78
a) Reactivos empleados en la metodología de arsénico total:.....	78
b) Reactivos empleados en la metodología de especiación de arsénico:	78
c) Reactivos exclusivos para fines instrumentales (calibración, chequeo diario, etc).....	79
3.2.-Disolventes.....	79
3.3.-Instrumentación	79
a) Cromatografía.....	79
b) Espectroscopía	80
c) Otros	80
3.4.-Material volumétrico.....	80
a) Pipetas y micropipetas.....	80
b) Otros.....	81
3.5.-Preparación de disoluciones.....	81
a) Acetato amónico 20 mM pH=9 (Fase móvil A).....	81
b) Acetato amónico 20 mM pH=5 (Fase móvil B).....	82
c) Preparación de la calibración de arsénico total	82
d) Preparación de la calibración de arsénico especiado	83
e) Preparación de muestra para arsénico total	84
f) Preparación de muestra para arsénico especiado.....	84
g) Patrón interno para arsénico total.....	85
h) Patrón interno para arsénico especiado.....	85
3.6.-Optimización de la señal instrumental.....	85
3.7.-Optimización de la metodología de arsénico total.....	90
3.8.-Optimización de la metodología de arsénico especiado	92

a) Elección del tipo de cromatografía.....	92
b) Estudio de la fase móvil.....	94
c) Diseño experimental de la metodología con fosfatos	96
d) Diseño experimental de la metodología de acetatos	104
4.-Resultados.....	111
4.1.-Validación metodológica del arsénico total en orina.....	111
a) Calibración: rango y linealidad.....	111
b) Precisión y exactitud.....	115
c) Selectividad.....	117
d) Sensibilidad.....	118
4.2.-Validación metodológica de la especiación de arsénico en orina	119
a) Calibración: rango y linealidad.....	119
b) Precisión y exactitud.....	124
c) Selectividad.....	125
d) Sensibilidad.....	126
4.3.-Estudio de los niveles de arsénico en una población	127
a) Estudio del contenido de arsénico: generalidades	130
b) Niveles de arsénico según el país de origen.....	133
c) Niveles de arsénico según la edad y el género.....	137
d) Efecto combinado del país de nacimiento y la edad	138
e) Efecto del consumo de tabaco en los niveles de arsénico...	140
f) Influencia del índice de masa corporal (IMC)	142
g) Influencia de la dieta en los niveles de arsénico	143
4.4.-Análisis de las muestras.....	151
5.-Discusión	153
5.1.-Desarrollo y validación del método de arsénico total.....	153
5.2.-Desarrollo y validación del método de especiación de arsénico	157

5.3.- Estudio de los niveles de arsénico en una muestra poblacional española.....	161
a) Análisis general de las especies de arsénico más relevantes	161
b) Niveles de arsénico según el país de origen.....	165
c) Niveles de arsénico según la edad y el género.....	166
d) Efecto combinado del país de origen y la edad.....	171
e) Consumo de tabaco y niveles de arsénico.....	171
f) Influencia del índice de masa corporal (IMC)	173
g) Influencia de la dieta en los niveles de arsénico	173
6.-Conclusiones/Conclusions.....	179
7.-Bibliografía.....	180
Anexo I.-Lista de figuras	222
Anexo II.-Lista de tablas.....	225

I.-Lista de abreviaturas

α : Factor de selectividad

As^{III}: Ácido arsenioso, arsenito o As(III)

As^V: Ácido arsénico, arseniato o As(V)

ⁱAs: Arsénico inorgánico

AB: Arsenobetaína

AC: Arsenocolina

AcONH₄: Acetato amónico

ALDH: Aldehído deshidrogenasa

AM: Media aritmética

AMD: Drenado ácido de minas

APL: Leucemia promielocítica aguda

AsSug: Arsenoazúcar

AsLip: Arsenolípido

AsHCs: Arsenohidrocarburos

AsFAs: Arsenoácidos grasos

AsPCs: Arsenofosfatidilcolinas

AsPLs: Arsenofosfolípidos

As3MT: Arsénico-3 metiltransferasa

ATP: Adenosín trifosfato

BER: Base Excision Repair

CCD: Charge-coupled device

Correlación de Pearson (r): Factor de evaluación de la tendencia entre dos variables

CV(%): Coeficiente de variación

DARB: Dissimilatory Arsenic-Respiring Bacteria

DIRB: Dissimilatory Iron-Respiring Bacteria

DMA^V: Ácido dimetilarsínico o ácido cacodílico

DMAA: Ácido dimetilarsenoacético

DMTA^V: Ácido dimetilmonotioarsínico

DRC: Celda dinámica de reacción

GM: Media geométrica

GSH: Glutathion

GSTO: Glutathion-S-transferasa-omega o Glutathion-S-transferasa- ω

HFO: Oxihidróxidos de hierro

HNO₃: Ácido nítrico

IC: Cromatografía de intercambio iónico

IMC: Índice de masa corporal

INSPQ: Instituto nacional de salud pública de Quebec

IS: Patrón interno

k: Factor de retención

KED: Discriminación por energía cinética

LD₅₀: Dosis letal 50

LOD: Límite de detección

LOQ: Límite de cuantificación

m: Valor de la pendiente del calibrado

MDR: Proteínas multirresistentes a drogas

MeOH: Metanol

MMA^V: Ácido monometilarsónico

MMTA^V: Ácido monometilmonotioarsónico

N: Número total de observaciones

NaBH₄: Borohidruro sódico

NaCNBH₃: Cianoborohidruro sódico

NER: Nucleotide Excision Repair

NHANES: National Health and Nutrition Examination Survey

NH₄H₂PO₄: Fosfato monobásico de amonio

(NH₄)₂HPO₄: Fosfato dibásico de amonio

PDH: Piruvato deshidrogenasa

PMI: Índice primario de metilación

PSDVB: Poliestireno divinil benceno

PTS: Proficiency Testing Samples

r²: Coeficiente de correlación de la pendiente del calibrado

R_s: Factor de resolución cromatográfica

ROS: Especies reactivas de oxígeno

Sig (bilateral): P-value, medida de la significancia estadística de una correlación

SAM: S-adenosil meteonina

SMI: Índice secundario de metilación

t_R: Tiempo de retención

TAs: Concentración de arsénico total medido por ICP/MS

TSA_s: Suma total de las concentraciones de las especies de arsénico medido por HPLC-ICP/MS

TMAO: Óxido de trimetilarsénico

Tio-AsSug: Tioarsenoazúcar

Tio-DMAA: Ácido monotiodimetilarsenoacético

UA: Unidades de área

II.-Resumen

El arsénico es un elemento altamente reactivo que se encuentra en el medioambiente de manera frecuente y abundante, principalmente en forma de minerales, disuelto en medios acuosos y unido a la materia particulada de la atmósfera. Desde estos medios puede incorporarse a la cadena trófica a través de la captura de nutrientes en diferentes tipos de semillas y ciertos vegetales. Además, su presencia en el agua de ríos, mares y océanos le permite introducirse fácilmente en el organismo de los animales marinos, biomagnificándose a lo largo de la cadena trófica. Si bien normalmente su presencia en el medioambiente se conoce y está regulada por un ciclo biogeoquímico, la actividad del ser humano, principalmente en la industria y la minería ha ocasionado la alteración del mismo contribuyendo al vertido incontrolado de este semimetal en entornos terrestres y acuosos, así como la emisión a la atmósfera de derivados de arsénico en mucha mayor proporción que la que se encuentra de manera natural.

El principal problema asociado a su facilidad para moverse por el medioambiente radica en que tras cada proceso se transforma en especie de arsénico u otra, incluso a través del propio metabolismo de los seres vivos que lo ingieren. En base a esto, se pueden clasificar las diferentes especies de arsénico en función de su naturaleza (arsénico inorgánico y arsénico orgánico) y de su estado de oxidación (especies de arsénico trivalentes y especies de arsénico pentavalentes).

Todo lo anterior, unido al hecho de que cada especie de arsénico presenta una toxicidad determinada, hace preciso el desarrollo de una metodología de especiación de arsénico para poder identificar y cuantificar los tipos y la concentración de cada una de las especies de arsénico presentes en las muestras a analizar. En este estudio, el tipo de matriz seleccionada ha sido la orina, mientras que la técnica analítica utilizada para llevar a cabo la especiación ha sido LC-ICP/MS (cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas mediante un plasma de acoplamiento inductivo) por su selectividad, sensibilidad y resolución cromatográfica.

Concretamente las dos fases móviles utilizadas han sido AcONH_4 20 mM a pH 5 y 9, utilizando para ello un modo gradiente de pH, seleccionado a partir de un estudio sistemático de los tiempos de retención estudiando cuatro valores de pH (5, 7, 9 y 11) y cuatro valores de concentración de la fase móvil (5, 10, 20 y 40 mM).

La columna utilizada fue una Hamilton PRP X-100 (4,6 x 250 mm x 5 μm) de intercambio aniónico fuerte. En estas condiciones se llevó a cabo la validación obteniendo unos valores de precisión y veracidad $<6\%$ para las seis especies analizadas, las cuales son, AB, AC, As^{III} , As^{V} , DMA^{V} y MMA^{V} . En cuanto a la selectividad, no se observó rastro de la interferencia poliatómica $^{75}\text{ArCl}^+$. Por lo que respecta a la sensibilidad, el LOQ para cada especie estuvo en torno a 0,3 $\mu\text{g/l}$ aproximadamente.

Alternativamente a todo esto, se ha validado, también, una metodología de arsénico total por ICP/MS para utilizarla como valor de referencia de la concentración total de arsénico en orina. Para ello se utilizó una ecuación de corrección para la eliminación de la mencionada interferencia poliatómica. Por lo que respecta a la validación, la precisión y la veracidad fueron $\leq 4\%$ y $\leq 3\%$, respectivamente. No se observó rastro de la señal del $^{75}\text{ArCl}^+$. Por último, el LOQ obtenido fue de 0,53 $\mu\text{g/l}$.

Una vez validadas ambas técnicas, se ha seleccionado una muestra poblacional española (N=706) sobre la que se han estudiado una serie de variables de carácter demográfico (edad, género, país de nacimiento), además de otras variables asociadas a factores de riesgo como el IMC o el consumo de tabaco. Por último, la variable más relevante en este estudio fue la dieta, catalogada en base al consumo de pescado y de arroz. Mediante el análisis del contenido de arsénico total y especiado, se han elegido una serie de biomarcadores para analizar estadísticamente la relación entre éstos y las variables estudiadas. Estos biomarcadores fueron la concentración de arsénico total y especiado, la de cada una de las especies así como los índices primario y secundario de metilación (PMI y SMI, respectivamente).

Los resultados de este estudio poblacional revelaron que la especie de arsénico más abundante fue la AB, que no presenta toxicidad, representando el 90% del contenido total de arsénico. El 10% restante estuvo constituido por DMA^{V} (9%) y MMA^{V} (1%).

No se encontró rastro de arsénico inorgánico, la forma más tóxica de arsénico. Además, se demostró la existencia de una tendencia estadísticamente significativa en función del país de origen de los sujetos, explicada como consecuencia de la diferente dieta propia de cada nación. La capacidad de metilación fue superior para niños que para niñas, y para aquellos sujetos con mayor IMC.

Por otro lado, se demostró que el consumo del tabaco, un factor asociado históricamente con los niveles de arsénico, no fue una variable estadísticamente relevante que contribuyó a explicar la concentración y distribución de especies encontradas. La variable más relevante fue, por tanto, la dieta, debido al elevado consumo de raciones de origen marino y de arroz. En resumen, se han desarrollado dos metodologías de arsénico, una de arsénico total, y otra de especiación de arsénico, precisas, veraces y adecuadas para su uso previsto. Mediante el empleo de éstas se ha podido estudiar y concluir que la población estudiada no presenta ningún riesgo toxicológico y que el perfil de especiación de arsénico obtenido es compatible con el consumo de pescado de la región.

III.-Abstract

Arsenic is a highly reactive element that is ubiquitous in the environment, mainly present in the form of minerals, dissolved in aqueous media and bound to particulate matter in the atmosphere. From these media it can be incorporated into the trophic chain through nutrient uptake in different types of seeds and certain vegetables. In addition, its presence in rivers, seas and oceans let it easily enter into the organisms of marine animals, biomagnifying itself along the trophic chain. Although its presence in the environment is normally known and regulated by a biogeochemical cycle, human activity, mainly in industry and mining, has caused the alteration of this cycle, contributing to the uncontrolled dumping of this semi-metal in terrestrial and aqueous environments, as well as the emission into the atmosphere of arsenic derivatives in much higher proportions than those found naturally. The main problem associated with its ease of movement through the environment is that after each process it is transformed into one arsenic species or another, including through the metabolism of the living beings that ingest it. On this basis, the different arsenic species can be classified according to their nature (inorganic arsenic and organic arsenic) and their oxidation state (trivalent arsenic species and pentavalent arsenic species).

All of the above, along with the fact that each arsenic species has a specific toxicity, makes it necessary to develop an arsenic speciation methodology in order to identify and quantify the types and concentration of each of the arsenic species present in the samples to be analyzed. In this study, the type of matrix selected was urine, while the analytical technique used to carry out the speciation was LC-ICP/MS (liquid chromatography coupled to mass spectrometry by inductively coupled plasma) due to its selectivity, sensitivity and chromatographic resolution.

Specifically, the two mobile phases used were AcONH₄ 20 mM at pH 5 and 9, using a pH gradient mode, selected from a systematic study of retention times by studying four pH values (5, 7, 9 and 11) and four mobile phase concentration values (5, 10, 20 and 40 mM). The column used was a strong anion exchange column Hamilton PRP X-100 (4.6 x 250 mm x 5 μm).

Under these conditions the validation was carried out obtaining precision and trueness values <6% for the six species analyzed, which are AB, AC, As^{III}, As^V, DMA^V and MMA^V.

As for the selectivity, no trace of the polyatomic $^{75}\text{ArCl}^+$ interference was observed. Regarding sensitivity, the LOQ for each species was around $0.3 \mu\text{g/l}$ approximately.

Alternatively, a methodology for total arsenic by ICP/MS has also been validated for use as a reference value for total arsenic concentration in urine. For this purpose, a correction equation was used to eliminate the aforementioned polyatomic interference. As far as validation is concerned, precision and trueness were $\leq 4\%$ and $\leq 3\%$, respectively. No trace of the $^{75}\text{ArCl}^+$ signal was observed. Finally, the LOQ obtained was $0.53 \mu\text{g/l}$.

Once both techniques were validated, a Spanish population sample was selected (N=706) on which a series of demographic variables were studied (age, gender, country of birth), in addition to other variables associated with risk factors such as BMI or tobacco consumption. Finally, the most relevant variable in this study was diet, catalogued on the basis of fish and rice consumption. By analyzing total and spicy arsenic content, a series of biomarkers were chosen to statistically analyze the relationship between these and the variables studied. These biomarkers were the concentration of total and spiced arsenic, that of each of the species as well as the primary and secondary methylation indexes (PMI and SMI, respectively).

The results of this population study revealed that the most abundant arsenic species was AB, which does not present toxicity, representing 90% of the total arsenic content. The remaining 10% consisted of DMA^{V} (9%) and MMA^{V} (1%).

No trace of inorganic arsenic, the most toxic form of arsenic, was found. In addition, a statistically significant trend was demonstrated depending on the country of origin of the subjects, explained as a consequence of the different diets of each nation. The methylation capacity was higher for boys than for girls, and for those subjects with a higher BMI.

On the other hand, it was shown that tobacco consumption, a factor historically associated with arsenic levels, was not a statistically relevant variable that contributed to explain the concentration and distribution of species found. The most relevant variable was, therefore, diet, due to the high consumption of marine and rice rations. In summary, two arsenic methodologies have been developed, one for total arsenic and the other for arsenic speciation, which are accurate, reliable and suitable for their intended use.

By using these methodologies, it has been possible to study and conclude that the population studied does not present any toxicological risk and that the arsenic speciation profile obtained is compatible with the consumption of fish from the region.

1.-Introducción

El objetivo de la investigación llevada a cabo en esta tesis gira en torno a un tema de actual relevancia: los metales pesados, un grupo de elementos químicos notorios por sus propiedades contaminantes y tóxicas, como consecuencia de su prevalencia y estabilidad en medios críticos para el desarrollo de los seres vivos. Entre los diferentes miembros que conforman esta clasificación, sin duda uno de los más representativos lo constituye el arsénico, quintaesencia de las características de este grupo, si bien es un metaloide y no un metal propiamente dicho.

La labor de investigación que aquí se presenta se puede dividir en dos partes bien diferenciadas. La primera consta del desarrollo metodológico de una novedosa estrategia de especiación de arsénico por cromatografía de líquidos de intercambio iónico acoplada a espectrometría de masas (IC-ICP/MS) para la determinación de los seis analitos de arsénico más relevantes: arsenocolina (AC), arsenobetaina (AB), ácido dimetilarsénico (DMA^{V}), ácido monometilarsónico (MMA^{V}), ácido arsenioso (As^{III}) y ácido arsénico (As^{V}). De manera similar, se llevó a cabo un método de cuantificación de arsénico total por ICP/MS de manera complementaria a la especiación, cuyo objetivo se basa principalmente en servir como metodología referencia a la hora de cuantificar el valor total de las muestras a analizar, además de utilizarse para conocer la incertidumbre en la medida de la técnica de especiación. Dentro de esta parte, por tanto, se encuentran todos aquellos procesos y experimentos relacionados con la optimización instrumental, la obtención de las variables cromatográficas, espectroscópicas y físico-químicas más adecuadas, la preparación de la muestra y las condiciones experimentales más favorables para ambas metodologías.

La segunda parte comprende la aplicación de esta metodología de trabajo para el análisis, y posterior evaluación, del contenido de arsénico total y especiado en muestras de orina, con el objetivo de diseñar un estudio epidemiológico en una muestra poblacional española ($N=706$) y compararlos con los valores medios poblacionales de la base de datos internacional NHANES, y poder así determinar el riesgo actual existente para la población española utilizando diferentes biomarcadores.

Aunque el estudio del arsénico abarca una gran variedad de ramas científicas, el enfoque principal a la hora de abordar esta tesis ha sido eminentemente toxicológico, apoyándose en los fundamentos de la química analítica y en la química clínica para definir el marco instrumental, tóxico y legal de esta investigación.

En definitiva, y debido a la complejidad y multidisciplinariedad de esta investigación, para poder entender todos los pormenores de esta tesis, la presente introducción se va a dividir en cinco bloques bien diferenciados, cuyo hilo conductor comprenderá todas las etapas incluidas en el proceso de exposición a un agente tóxico. Esto es, identificar su origen, su naturaleza, el efecto que provoca en el cuerpo humano, y si aplica, su excreción. Aplicando esto a nuestra investigación, en este primer apartado se van a explicar todos los procesos existentes desde las fuentes de exposición principales hasta que se introduce en la cadena trófica incluyendo procesos biogeoquímicos, el metabolismo asociado y la sintomatología descrita, acompañada de una breve descripción de la legislación vigente.

No obstante, y dado que las especies de arsénico son muchas y muy variadas, pero no todas son tan abundantes como para suponer un riesgo toxicológico, en el primer bloque se definirán las especies de arsénico más relevantes existentes en el medioambiente y se dará una breve descripción sobre las fuentes en las que se encuentran. Esto enlazará con el segundo bloque dónde se ahondará con más detalle en las fuentes y depósitos naturales de arsénico en el medioambiente, centrando el foco en los procesos más relevantes que permiten su movilización por la corteza terrestre, la hidrosfera y la atmósfera, centrando el foco en las especies predominantes en cada medio. Así mismo, se comentarán brevemente los principales usos y aplicaciones que el ser humano ha dado al arsénico a lo largo de la historia hasta nuestros días. En definitiva, dónde se encuentran los focos principales de exposición, que especies lo componen y cómo entran en contacto con los seres vivos.

A continuación, se abordará un tercer bloque vertebrado por dos grandes ejes: el papel del metabolismo en la toxicidad de las especies de arsénico y en la sintomatología descrita.

En resumidas cuentas, qué especies de entre todos los focos de exposición existentes son más relevantes y qué toxicidad presentan.

Esto es relevante para, a la postre, elaborar perfiles toxicológicos que permitan asignar fehacientemente la etiología de una intoxicación por arsénico.

Finalmente, se incidirá en un cuarto bloque en las metodologías analíticas de especiación más adecuadas, haciendo un repaso histórico de las técnicas analíticas utilizadas, culminando en una breve descripción de los pormenores de la instrumentación utilizada para la presente tesis.

1.1- Clasificación de las especies de arsénico más relevantes

Desde un punto de vista químico, las especies de arsénico se catalogan en dos grandes grupos: arsénico inorgánico y arsénico orgánico. De manera general, y de acuerdo a las normas dictadas por la Química, las especies inorgánicas son todas aquellas que constan de un átomo de arsénico unido a uno o varios heteroátomos pero exentas de carbono en su composición, a excepción de ciertos carbonatos que contienen arsénico como impureza en su red cristalina. Por el contrario, las especies orgánicas cuentan con, al menos, un enlace As—C en su estructura.

Por otro lado, los dos estados de oxidación principales del arsénico son positivos, +3 y +5, aunque en las arsinas (AsR_3) el arsénico suele estar enlazado con valencia -3. Además de éstas, en ciertas estructuras cristalinas, se pueden encontrar otras valencias menos comunes como +1, +2 o +4 o incluso +6, especialmente en el caso de los sulfuros de arsénico¹.

Estas dos grandes clasificaciones van a ser importantes durante toda la investigación, pues a nivel toxicológico, la biodisponibilidad, la toxicidad y su prevalencia va a depender en gran medida de su estado de oxidación y de su estructura química, además evidentemente de otros factores como la concentración o el grado de exposición.

a) Especies de arsénico inorgánico

➤ Ácido arsenioso y sus oxosales

Conocido comúnmente como As(III), As^{+3} o arsenito, presenta carácter ácido (Figura 1) y es la forma inorgánica más común en entornos hídricos reductores y faltos de oxígeno, aunque termodinámicamente es menos estable que el ácido arsénico². Con respecto a su reactividad, tiene una extremada afinidad por los átomos de azufre y los puentes bisulfuro³.

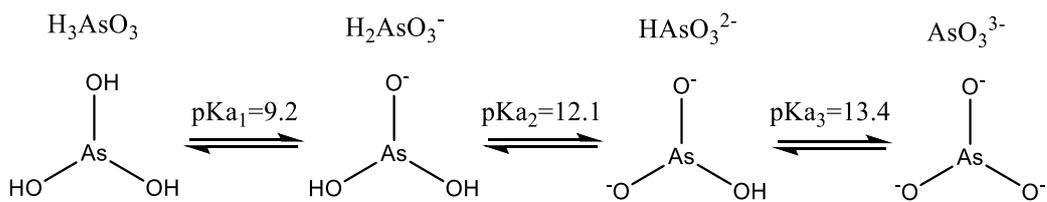


Figura 1. Equilibrios de disociación de ácido arsenioso

Estas formas se encuentran eminentemente en muestras mediambientales⁴, alimenticias⁵ y biológicas⁶.

➤ *Ácido arsénico y sus oxosales*

Denominado también arseniato, As(V) o As⁺⁵ se forma predominantemente en ambientes con abundancia de oxígeno, y por tanto, oxidantes. También presenta carácter ácido (Figura 2). Constituye la especie inorgánica más estable desde el punto de vista de la termodinámica. Tiene una alta afinidad por la queratina y posee un tamaño similar al grupo fosfato, precursor del ATP⁷.

Similarmente a su homólogo trivalente, se encuentra predominantemente en el agua, pero también en el arroz⁸ y los moluscos⁹.

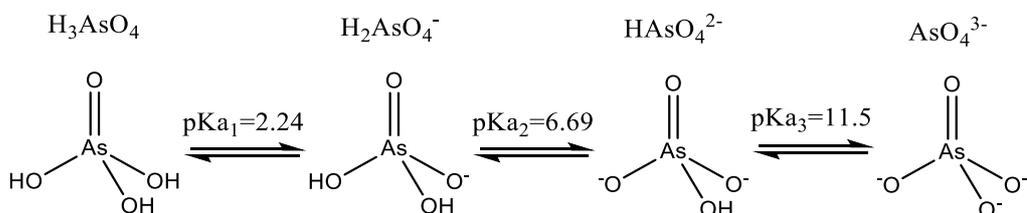


Figura 2. Equilibrios de disociación del ácido arsénico

➤ *Otras especies inorgánicas*

Si bien las dos primeras especies son las más relevantes porque entran en contacto con los seres vivos en mayor medida a través de medios críticos para la vida, y adicionalmente, poseen una mayor toxicidad, existen otras familias como los sulfuros¹⁰, los óxidos¹¹ o las arsinas¹², entre otros (Tabla 1), generados a partir de diferentes procesos de evaporación, precipitación, movilización, disolución y/o deposición que permiten movilizar este elemento hacia otros medios como el acuático o el aéreo¹³.

Sin embargo, la abundante proporción de agua y su química combinada con ciertos procesos naturales de este planeta termina eventualmene por transformar sendas familias en los oxoácidos trivalentes y pentavalentes, y en muchísima menor medida, ciertas especies orgánicas, como se discutirá más adelante.

Tabla 1. Principales familias de compuestos inorgánicos de arsénico

Familia	Fórmula química	Nomenclatura	Fuente principal
Sulfuros	FeAsS	Arsenopirita ¹⁴	Suelos, yacimientos
	As ₄ S ₃	Dimorfita ¹⁵	Suelos, yacimientos
Óxidos	As ₂ O ₅	Pentóxido de diarsénico ²	Residuos mineros
	As ₂ O ₃	Trióxido de diarsénico ²	Residuos mineros
Sulfatos	PbFe ₃ (AsO ₄)(SO ₄)(OH) ₆	Beudantita ¹⁶	Residuos mineros
	Fe ₆ (AsO ₃) ₄ (SO ₄)(OH) ₄ ·4H ₂ O	Tooeleita ¹⁷	Residuos mineros
Arsinas	AsH ₃	Arsina ¹⁸	Aire, materia particulada
	As ₂ H ₄	Diarsina ¹⁹	Aire, materia particulada

b) Especies de arsénico orgánico

➤ *Especies monometiladas*

Se generan como consecuencia del metabolismo de los seres vivos, a partir del ácido arsenioso y/o arsénico, respectivamente, sustituyendo un grupo hidroxilo en la estructura correspondiente por un grupo metilo, lo que facilita su excreción pero también su bioaccesibilidad dentro del organismo. En secciones posteriores se comentará detalladamente las etapas de este proceso metabólico, pero a grandes rasgos, consiste en la sustitución oxidativa y gradual de los grupos hidroxilo de las moléculas inorgánicas por grupos metilos, sintetizándose en la primera etapa los monometilados²⁰.

Los compuestos monometilados reciben el nombre de ácido metilarsonico o ácido metilarsonico (V) y ácido metilarsonico (III), aunque su nombre común se encuentra abreviado como MMA^V y MMA^{III}, respectivamente (Figura 3).

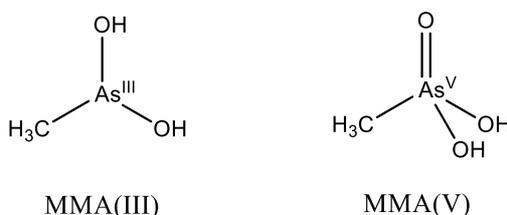


Figura 3. Especies monometiladas de arsénico más relevantes.

De manera similar a sus homólogos inorgánicos, el MMA^{III} es menos estable que el MMA^V, por lo que no se encuentra de manera exógena en el medioambiente, sino más bien endógena, aunque su rol en los organismos vivos no está del todo claro aún²¹. La forma pentavalente, sin embargo, puede aparecer en aguas²² y en suelos que cuenten con microorganismos cercanos que sean capaces de asimilar el arsénico, como sucede con las plantas²³, y ciertos cultivos, entre ellos el arroz²⁴. Aún con todo, su abundancia es mucho menor que las variantes inorgánicas.

La mayor incidencia y relevancia de estas especies se encuentra en las matrices biológicas, especialmente en sangre²⁵ y orina²⁶, como metabolitos, dónde la trivalente aparece de manera prácticamente residual, en detrimento del derivado pentavalente mucho más estable.

➤ *Especies dimetiladas*

Son sintetizados a partir de los derivados monometilados, nuevamente por sustitución de otro grupo OH por un segundo grupo CH₃, en una segunda etapa metabólica. Estas especies se conocen como ácido dimetilarsínico (V) o ácido cacodílico, y ácido dimetilarsínico (III) (Figura 4).

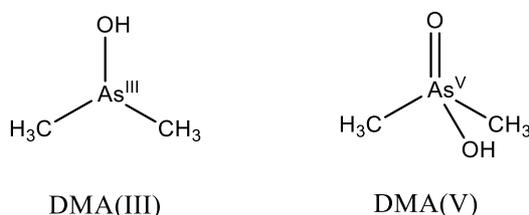


Figura 4. Especies dimetiladas de arsénico más relevantes

Los medios en los que aparecen son los mismos que para las moléculas monometiladas^{25,26}, no así la abundancia, que es mayor para éstas que para las monometiladas, en aquellas matrices en las que aparezcan conjuntamente.

Adicionalmente, es un metabolito común tras la ingesta de los arsenicales orgánicos más complejos como los arsenoazúcares o los arsenolípidos, como se comentará más adelante.

➤ *Especies trimetiladas*

La última etapa del proceso de metabolización del arsénico orgánico culmina con la completa metilación de la estructura inorgánica precursora dando lugar a una especie trimetilada, conocida como óxido de trimetilarsénico o TMAO (Figura 5).

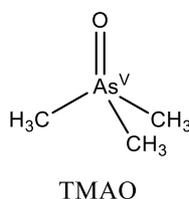


Figura 5. Estructura química del TMAO

Este compuesto no suele aparecer en el medioambiente de manera natural puesto que no todos los organismos vivos son capaces de alcanzar esta etapa del proceso metabólico, siendo especialmente destacable su presencia en seres humanos²⁷, y ratones²⁸, si bien la proporción en estos últimos es bastante alta en comparación con los primeros²⁹, dónde se detectan en concentraciones muy bajas en comparación con los dimetilados en muestras de orina. Sin embargo, su concentración puede aumentar si los seres humanos ingieren alimentos ricos en arsenoazúcares, ya que, como parte de su metabolismo, se generan una serie de compuestos de diversa índole y naturaleza, entre ellos, el TMAO³⁰.

➤ *Arsenoazúcares*

Estos arsenicales complejos son sintetizados por acción del metabolismo. Mientras que la mayor parte de los seres vivos son capaces de transformar el arsénico inorgánico (ⁱAs) en MMA^V, DMA^V, y ocasionalmente, TMAO, otros organismos como las algas³¹ o musgos³², y ciertos animales marinos^{33,34} combinan las especies tóxicas con una unidad de ribosa, modificando el OH del carbono anómero de la misma, dando como resultado una amplia familia de moléculas conocidas como arsenoazúcares, de ahora en adelante AsSug (Figura 6).

De esta manera, podemos encontrar cuatro set de compuestos en función de si su cadena lateral contiene un átomo de oxígeno (glicerol), fósforo (fosfato) y azufre (sulfonato y sulfato). Así mismo, la coordinación del arsénico es un factor primordial a la hora de clasificarlos, lo que permite dividir nuevamente esta familia en ramas en función de la valencia que adopta el átomo central, esto es, 3, 4 y/o 5³⁵.

A pesar de ser una familia muy extensa, no siempre se encuentran presentes todos los compuestos, cumpliendo que, generalmente, la especie más estable es el AsSug glicerol, seguida del fosfato, en menor medida.

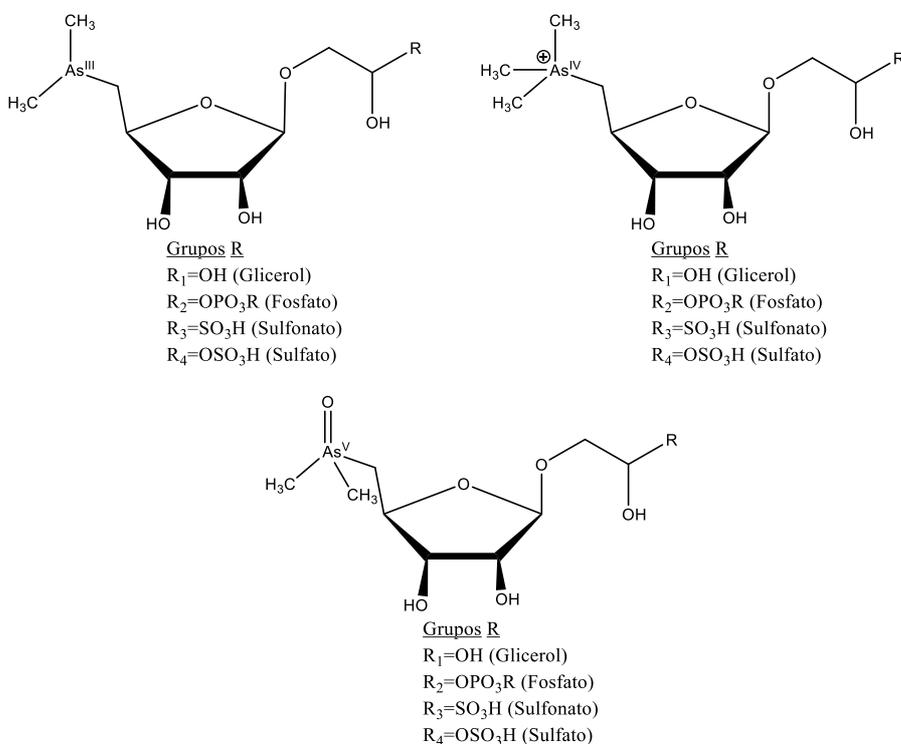


Figura 6. Clasificación de las principales familias de arsenozúcares

Los derivados azufrados suelen ser poco estables, y pueden interconvertirse fácilmente en sus homólogos de fósforo, por lo que rara vez aparecen son detectables, y de hacerlo, el más probable es el sulfónico.

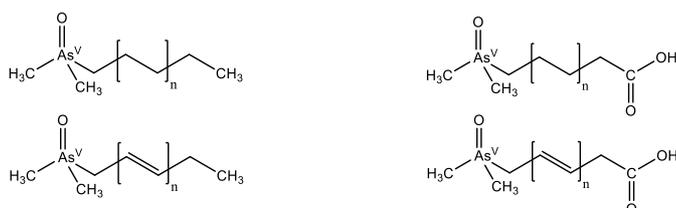
En muestras biológicas, particularmente la orina, pueden ser aislados y cuantificados sólo si ha habido una ingesta previa de dichos alimentos³⁶. El inconveniente principal reside en su estabilidad, previamente descrita. Así, de manera general éstos suelen encontrarse metabolizados en forma de otros compuestos orgánicos más sencillos entre los que cabe destacar TMAO, DMA^V, MMA^V, arsenobetaina y arsenocolina, entre otros, formando parte de la compleja mezcla junto a los arsenozúcares originales^{37,38}.

➤ *Arsenolípidos*

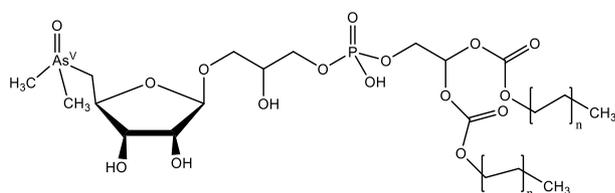
Productos complejos de detoxificación, se encuentran principalmente en ciertas algas y peces, así como en los residuos aceitosos de estos últimos.

De manera alternativa a la metilación exhaustiva o a la unión con estructuras derivadas de los azúcares, en este caso el arsénico queda anclado a fragmentos lipídicos entre los que destacan hidrocarburos (AsHCs), ácidos grasos (AsFAs), fosfolípidos (AsPLs) y fosfatidilcolinas (AsPCs), dando como resultado la familia más extensa de organoarsenicales^{36,39} (Figura 7). Su nombre abreviado es AsLip.

Hidrocarburos que contienen arsénico (AsHCs) **Ácidos grasos que contienen arsénico (AsFAs)**



Fosfolípidos que contienen arsénico (AsPLs)



Fosfatidilcolinas que contienen arsénico (AsPCs)

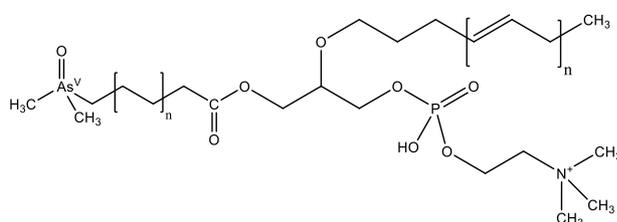


Figura 7. Clasificación de las principales familias de arsenolípidos(AsLip)

Aún no se conocen bien las propiedades de todos los integrantes de cada grupo, incluso hoy en día se siguen descubriendo nuevos compuestos⁴⁰. Sin embargo, lo que sí se conoce hasta la fecha es que son altamente liposolubles y que pueden transportarse fácilmente por los tejidos del cuerpo⁴¹.

➤ *Arsenobetaina y arsenocolina*

Denominadas comúnmente como “el arsénico del pescado”, estas dos estructuras químicas se encuentran en una gran variedad de animales marinos (Figura 8), entre los que destacan del pescado y el marisco.

Su formación se produce como consecuencia de la absorción de iAs de las aguas de las que beben estos seres vivos, seguida de un proceso de metabolización alternativo a las tres vías presentadas previamente⁴². En este sentido, algunos autores han propuesto la metabolización de los arsenozúcares y arsenolípidos como una posible ruta sintética⁴³.

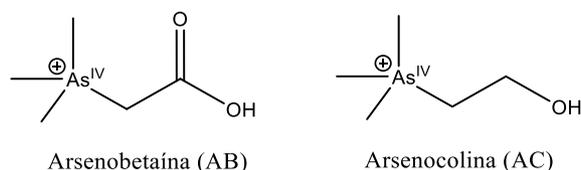


Figura 8. Estructura química de la arsenobetaina y la arsenocolina

En matrices biológicas se encuentran principalmente en sangre⁴⁴ y orina⁴⁵, si bien la abundancia de la arsenobetaina es significativamente mayor. Generalmente son excretadas sin alterar.

➤ *Otras especies orgánicas*

En este bloque se engloban una serie de compuestos que por su composición y estructura no se enmarcan dentro de las familias previas, principalmente por ser intermediarios independientes de éstas, por su falta de especificidad como para conformar una familia propia o bien por otras causas.

En este sentido, los intermediarios conocidos como dimetilarsenoacetato⁴⁶ (DMAA) o el dimetilarsenoetanol⁴⁷ (DMAE), son metabolitos compartidos entre los arsenozúcares y los arsenolípidos, y por tanto comparten un mismo origen. Desgraciadamente, bajo ciertas condiciones, pueden ser oxidados o reducidos a DMA^V. Por otro lado, tenemos a los tioarsenicales, que surgen de manera natural en entornos ricos en azufre. Existen derivados azufrados del DMA^V (DMTA^V)⁴⁸ y del MMA^V (MMTA^V)⁴⁸, y de arsenozúcares (o simplemente oxo-arsenozúcares)⁴⁹, y todos comparten el hecho diferenciador sustituir el doble enlace As=O por un doble enlace As=S. Sin embargo, al compartir miembros con varias familias más relevantes, unido al hecho de que son fácilmente convertibles nuevamente en sus oxo-derivados, para esta tesis carecen de una relevancia práctica, por lo que se encuentran agrupados en esta categoría miscelánea.

Un lugar aparte merecen los derivados del ácido arsánico⁵⁰, utilizados en la industria animal (aves de corral) como componente de piensos y medicamentos, que actualmente están en desuso por su potencial tóxico⁵¹, debido a que estos compuestos estaban dotados con una alta persistencia y se incorporaban a otros organismos que se alimentaban de estos animales inoculados con dichas especies. A continuación unos ejemplos representativos de estos grupos (Figura 9):

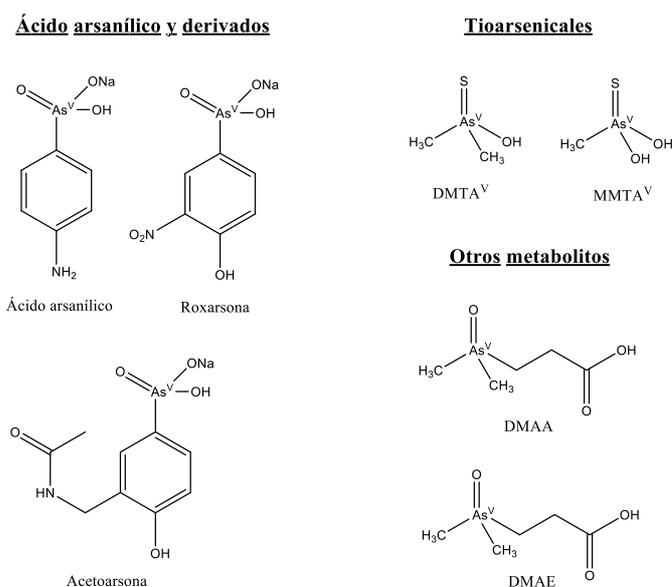


Figura 9. Estructuras químicas del ácido arsánico y sus derivados, tioarsenicales y otros metabolitos secundarios.

A pesar de la existencia de todas estas diferentes familias y/o especies de arsénico presentes tanto en el medioambiente como en el interior de los seres vivos, es importante recalcar que en un análisis rutinario en muestras biológicas de naturaleza clínica como el que se ha abordado en esta tesis, las especies más comunes, y por tanto aquellas en las que se ha puesto el foco en la misma son: la AC, AB, DMA^V, MMA^V, As^{III} y As^V. Esto se debe principalmente a los siguientes motivos:

- 1) La dieta. Es un factor sumamente relevante ya que muchas especies orgánicas se ingieren a través de ella. En el caso concreto de nuestro país, aunque se están incluyendo cada vez más en ésta alimentos de origen asiático y/o marino que puedan contener arsenozúcares y arsenolípidos, el impacto actual de dichos compuestos no es significativo con respecto a las especies presentes en el pescado, marisco o arroz, por nombrar algunos de los platos típicos de nuestra cocina que contiene arsénico en forma de las especies mayoritarias ya descritas en el anterior párrafo. No obstante, esto puede cambiar sustancialmente en un futuro.

- 2) Los derivados del ácido arsánico están prohibidos por lo que la probabilidad de ingerir alimentos tratados con estos agentes es residual.
- 3) Los tioarsenicales no se encuentran de manera abundante en muestras de orina por su baja estabilidad en medios aerobios, y aquellos que lo hacen, suelen estar ligados al consumo de arsenoazúcares, por lo que nuevamente su presencia no es mayoritaria y sí condicionada a la ingesta de alimentos que contengan estas especies, al menos en lo que a España se refiere.

La información recogida en el último apartado es específica de este país y aquellos con condiciones similares. A pesar de ello, es necesario conocer las familias principales en las que se agrupa el arsénico, qué impacto pueden tener y a través de que fuentes puede tener lugar una exposición a este elemento, aun cuando la relevancia de cada una de ellas esté sujeta a condiciones específicas geográficas, alimenticias o laborales, entre otras.

En definitiva, la etiología condiciona el perfil analítico de la especiación y esto a su vez permite conocer la toxicidad asociada a la muestra analizada, por lo que se han de conocer todas las variables implicadas responsables del perfil de especiación obtenido.

1.2.- Fuentes naturales y antropogénicas principales de exposición al arsénico

Tras sentar las bases de qué especies de arsénico existen y pueden influir en un análisis típico de especiación, es necesario entrar en detalle sobre que procesos existen en nuestro planeta que facilitan la difusión y/o transformación de este elemento a lo largo y ancho de la biosfera de este planeta, así como el papel que juega la actividad humana en dicho ciclo. Si bien en el primer bloque se ha dado una pequeña pincelada sobre qué tipo de arsenicales existen y dónde se encuentran, aquí se expandirá dicha información, dividiendo esta sección en dos partes. La primera parte se centra en el ciclo biogeoquímico que ocurre en el medioambiente sin intervención humana, mientras que en la segunda se analizará el rol que ejercen las actividades humanas en la modificación y alteración del mismo.

a) El arsénico en el medioambiente: el ciclo biogeoquímico

Desde un punto de vista químico, el arsénico es un elemento químico ampliamente conocido tanto por su abundancia en el medioambiente como por sus propiedades contaminantes, tóxicas y carcinogénicas, entre otras. En la Tabla Periódica se localiza dentro del bloque p, concretamente en el grupo de los denominados semimetales o metaloides. Entre sus principales propiedades químicas, destaca su elevada reactividad. Por ello, se encuentra combinado con una gran variedad de elementos químicos, principalmente H, O, S, y halógenos, dando lugar a más de un centenar de compuestos, acuñados por la IUPAC con el nombre de especies químicas o simplemente especies⁵². Las más relevantes la constituyen los sulfuros (As_mS_n), integrantes de la litosfera y la pedosfera de nuestro planeta, las arsinas (AsR_3), contaminantes ambientales presentes principalmente en la atmósfera y los oxoácidos de arsénico (H_3AsO_3 , y H_3AsO_4), las formas predominantes presentes en entornos hídricos⁵³.

El arsénico, pues, es capaz de difundir por el medioambiente hacia una gran variedad de medios. Este proceso se conoce con el nombre de movilización, dado que la forma primordial de este elemento se encuentra en la corteza terrestre, en forma de sólidos de diversa naturaleza.

Aunque la movilización de este elemento es un proceso complejo, existen una serie de generalidades o principios que pueden arrojar algo de luz en todo este intrincado proceso.

Primeramente y desde un punto de vista químico, la gran mayoría de las especies existentes en el medioambiente son de carácter inorgánico. La reactividad y comportamiento químico de las mismas depende, pues, de la estructura cristalina, o dicho de otro modo, de su estado de oxidación. Por lo que respecta a lo último, las especies se pueden clasificar en función de si son trivalentes (As^{3+}) o pentavalentes (As^{5+}), a excepción de los sulfuros, que se pueden encontrar en otros estados de oxidación. Así, los principales compuestos inorgánicos en la atmósfera y en el agua, se pueden catalogar en base a esta clasificación si bien bajo el marco de la toxicología todos los compuestos se engloban bajo un único término, arsénico inorgánico (iAs). Además, las especies trivalentes son consideradas menos reactivas que las pentavalentes.

Segundo, existen compuestos de naturaleza orgánica en el medioambiente, pero su abundancia es mucho menor que aquellos de naturaleza inorgánica. Así, la interacción del arsénico inorgánico con la vida de nuestro planeta (microorganismos, hongos, plantas, peces, algas, seres humanos, etc.) genera nuevas especies de carácter orgánico. La naturaleza de dichas moléculas depende del metabolismo de los seres vivos, del tipo de organismo y de la forma química con la que interacciona. Como ya se ha comentado en el primer bloque, la fauna y flora marina generan AB, AC, AsSug y As-Lip, principalmente, mientras que la fauna y flora terrestre sintetizan $\text{MMA}^{\text{III}+\text{V}}$, $\text{DMA}^{\text{III}+\text{V}}$, TMAO y AsSug. De entre todos ellos, en el medioambiente se encuentran preferentemente, aunque en cantidades pequeñas, MMA^{V} y DMA^{V} , en entornos ricos en microorganismos.

Tercero, la presencia de azufre en ciertos medios, típicamente aguas fecales, o entornos subterráneos ricos en sulfuros, humedad y microorganismos, contribuye a la formación de una serie de estructuras conocidas como tioarsenicales siendo los más representativos MMTA^{V} , DMTA^{V} o tio-DMAE, tio-arsenoazúcares (tio-AsSug) y tio-DMAA. Son mucho más estables y tóxicos que los compuestos con oxígeno, si bien su presencia en las matrices biológicas humanas se restringe al consumo de ciertas algas, mientras que en animales herbívoros aparece con mayor frecuencia.

Cuarto, el papel del mundo vegetal. La absorción del arsénico en plantas y vegetales se realiza a través de las raíces, en forma de un movimiento sistémico que llega hasta las semillas donde se almacena. Como ejemplo en el arroz es especialmente relevante dado que además de poder nutrirse del arsénico existente en el suelo, en el desarrollo vegetativo de la planta que requiere de varias etapas de anegación, siendo la calidad del agua un parámetro crítico directamente relacionado con las especies presentes en el grano. Por ello, es frecuente encontrar $^{\text{I}}\text{As}$, absorbido a través del agua, y DMA^{V} , fruto de su metabolización.

Quinto, la combinación de ciertos fenómenos meteorológicos con procesos químicos, entre los que cabe destacar la evaporación, las precipitaciones, las olas de calor y los incendios, contribuyen de una manera importante a la difusión del arsénico desde la corteza terrestre a otros medios. Esto permite explicar la presencia de las mencionadas arsinas en la atmósfera, o los oxoácidos en las masas de agua, si bien la actividad humana también contribuye a la liberación de arsénico en ambos medios.

En definitiva, la forma predominante del arsénico en el medioambiente, en ausencia de la acción de los seres vivos, es de naturaleza inorgánica, mientras que la interacción de éstos con este elemento, a través de un metabolismo propio y específico, facilita su biotransformación en formas orgánicas que facilitan su excreción y sucesiva liberación a la cadena trófica.

Si bien la movilización del arsénico por el medioambiente es cíclica, su origen primigenio en los albores de nuestro planeta comenzó en el medio terrestre, con los sulfuros. De entre todos ellos, su máximo exponente y la fuente principal vía de explotación minera de este elemento es la arsenopirita (FeAsS) y/o la pirita de arsénico ($\text{FeS}_x\text{As}_{1-x}$)⁵⁴. No obstante, también podemos destacar el oropimente (As_2S_3) o la enargita (Cu_3AsS_4). Además de estos derivados de azufre, existen, aunque en menor proporción, arseniuros como la löllingita (FeAs_2)⁵⁵ o la nicolita/niquelina (NiAs). En menor cantidad, se localiza el arsénico elemental, visible casi exclusivamente en ciertos yacimientos como consecuencia de procesos hidrotermales⁵⁶.

Posteriores procesos de oxidación, disolución y/o sustitución por ciertos átomos de la red original de estos minerales primarios permiten la formación de una serie de minerales secundarios como la arsenolita (As_2O_3)⁵⁷, farmacosiderita ($\text{Fe}_3(\text{AsO}_4)_2(\text{OH})_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)⁵⁸ y la hoernesita ($\text{M}_3(\text{AsO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, siendo $\text{M}=\text{Mn}^{2+}$, Mg^{2+} o Cu^{2+} , entre otros)⁵⁹.

Geogénicamente, los procesos que permiten la liberación y posterior difusión de los metales pesados hasta medios hídricos, incluyen la erosión de minerales arsenicales⁶⁰, la actividad magmática y/o geotérmica⁶¹, y los manantiales⁶². Así, como consecuencia de las altas temperaturas y presiones existentes en las capas más internas de nuestro planeta, se generaron y se siguen generando varias familias de minerales estables en esas condiciones, siendo la principal de ellas la de los sulfuros.

Las corrientes hidrotermales y los vapores de agua asociados a ellas junto a la presión y las altas temperaturas, las erupciones volcánicas o los movimientos de las placas tectónicas terminan empujando progresivamente estos sulfuros desde el manto hasta capas superficiales de la corteza terrestre, o como en el caso de las erupciones, depositando restos de éstos en la misma superficie⁶³. A veces por acción de estos procesos los metales implicados se liberan y al disminuir la temperatura se vuelven de nuevo a unir con otros elementos en diferentes estructuras.

Esta es una de las razones por las que podemos encontrar al arsénico formando parte de las redes cristalinas de otros metales como el Cu, Fe, Au, Al, Si, Ni, Mn, etc⁶⁴.

Esta contribución ayuda a explicar no sólo como se depositan los minerales primarios de arsénico en la pedosfera y litosfera, sino también como mediante las corrientes hidrotermales van viajando a lo largo de las zonas internas de nuestro planeta, hasta que se dan las circunstancias adecuadas y van gradualmente depositándose en zonas más extensas. Además de los factores geoquímicos, existen otras características fisicoquímicas relevantes y relacionadas con los primeros, como la composición del suelo⁶⁵⁻⁶⁷, la acidez^{68,69}, el potencial redox^{70,71} y/o la existencia de microorganismos^{72,73}, que afectan significativamente a la liberación de este elemento en el entorno. Dos de los factores más relevantes son el pH y el carácter reductor/oxidante (Eh)^{74,75}. Así, en entornos oxidantes el arsénico de los sulfuros, normalmente As^{+3} o As^{+1} , se oxida a As^{5+} , el estado de oxidación termodinámicamente más estable, hasta la forma de H_3AsO_4 y/o sus aniones, los arseniatos. Por el contrario, en entorno reductores el As^{3+} se encuentra como ácido arsenioso, H_3AsO_3 , y/o arsenitos. Por lo que respecta al pH, el As^{5+} es ácido y, por tanto, en suelos se encuentra mayoritariamente en forma de anión ($1.2 \leq \text{pH} \leq 14$). Por el contrario, el As^{3+} se encuentra principalmente como ácido arsenioso, esto es, en forma neutra ($0 \leq \text{pH} \leq 8.2$). Generalmente, la forma predominante en función del pH y el Eh se determina mediante el diagrama de Pourbaix (Figura 10).

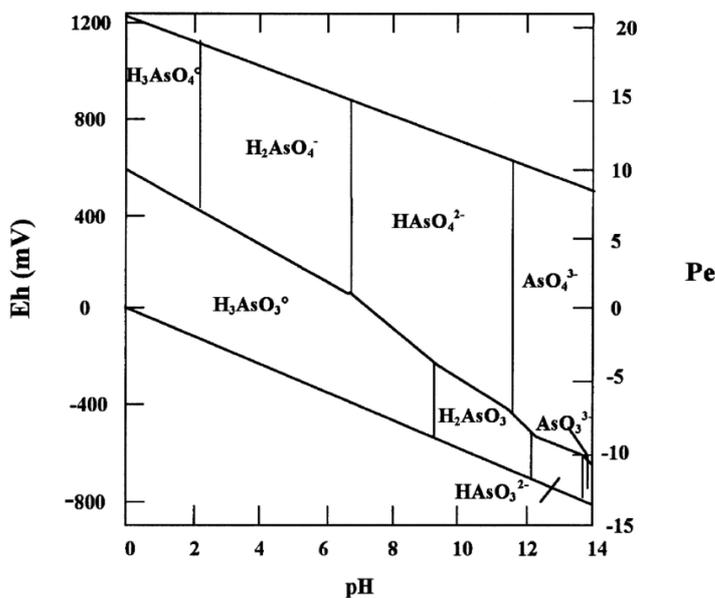


Figura 10. Diagrama de Pourbaix del arsénico.⁷⁶

En definitiva, estos dos factores intervienen directamente en la forma final de ambos estados de oxidación, lo que condiciona su incorporación en redes cristalinas, encontrándose estrechamente ligados al siguiente parámetro importante, la composición del suelo.

De manera general, los suelos arcillosos o arenosos tienden a retener más arsénico que los calcáreos debido precisamente a la fuerte adsorción sobre las redes de aluminosilicatos^{77,78}. Por el contrario, en suelos calcáreos, suele ser necesaria la presencia de entornos ricos en oxígeno y agua para favorecer esta adsorción⁷⁹. Además de los aluminosilicatos y los carbonatos, el arsénico puede interactuar con óxidos y/o hidróxidos de Fe, Cu, Ni o Mn⁸⁰, entre otros, así como en estructuras poco cristalinas o amorfas entre las que destacan cierto tipo de arcillas o la goethita (α -FeOOH)⁸¹. Esta adsorción puede ocurrir en la superficie de estructuras de estos compuestos, de manera intersticial, o sustituyendo a algunos iones de la red como ocurre con ciertos aniones PO_4^{3-} , SO_4^{2-} o CO_3^{2-} y cationes, principalmente el Fe^{3+} ⁸².

En referencia a los aluminosilicatos y las arcillas, desde pH ácidos hasta ligeramente básicos, el arseniato se adsorbe de manera preferente en los sitios activos disponibles en estos sólidos, debido a la interacción electrostática que se establece entre los sitios ácidos de la red (normalmente oxígenos protonados o metales con deficiencia de densidad electrónica). El arsenito, sin embargo, se encuentra en forma neutra estableciendo interacciones más débiles que su homólogo pentavalente. A pH básico este orden se invierte, el arseniato tiene una carga negativa muy alta, mientras que los sitios ácidos de los oxígenos protonados desaparecen conforme aumenta el pH limitando o repeliendo la interacción de los arseniatos con la red. El arsenito presenta una carga menor pudiendo adecuarse mejor a la densidad electrónica de la red.

En definitiva, desde pH ácidos hasta ligeramente básicos (pH=8-9), la adsorción de arseniato está favorecida sobre el arsenito, siendo el arsenito preferiblemente adsorbido a pH básicos. Típicamente, el As^{5+} suele ocupar los huecos tetraédricos superficiales en la red de los aluminosilicatos, mientras que el As^{3+} tiende a adsorberse en los huecos octaédricos internos de dichas estructuras.

Sin embargo, los conocidos como oxihidróxidos de hierro, o HFO (Hydrous Ferric Oxides), son en gran medida, los responsables más directos de los procesos de adsorción-desorción encontrándose de manera muy abundante en la litosfera, estableciendo interacciones de relativa afinidad entre Fe-As^{83,84}. Ésta se ve afectada por la cristalinidad de éstos. Esto es debido a la que la gran mayoría de los sitios activos se encuentran en su superficie. Así, la superficie específica está fuertemente relacionada con la cristalinidad, generalmente encontrando que los oxihidróxidos de hierro tiene menos superficie específica a mayor cristalinidad. Por otra parte, y al contrario de lo que ocurre con las arcillas y/o aluminosilicatos, la especie trivalente establece enlaces más lábiles que la pentavalente.

Por último, la proliferación de cierto tipo de microorganismos conforma otro de los mecanismos del transporte arsenical por el ecosistema. Así, ciertas bacterias pueden catalizar reacciones de óxido-reducción directas como es el caso de las bacterias DARB (*Dissimilatory Arsenate-Respiring Bacteria*) que rompen los sulfuros y liberan arseniato en medios anaerobios⁸⁵. Otras, las catalogadas como DIRB (*Dissimilatory Iron-Respiring Bacteria*), reducen el ión férrico a ferroso⁸⁶. Esta reacción puede afectar de manera indirecta a la liberación o captación de arsénico, ya bien sea porque se encuentre acoplada esta reacción a la oxidación del arsénico, o bien porque éste se encuentre absorbido dentro de estructuras como las arcillas o los oxihidróxidos de hierro (III), provocando su liberación al reducirse el hierro para estabilizar la nueva carga de la estructura. Además, ciertas bacterias lo asimilan y llevan a cabo procesos de biometilación de éste arsénico inorgánico, transformándolo en ácido monometilarsónico (MMA^V) y ácido dimetilarsínico (DMA^V)⁸⁷. Las especies trivalentes no suelen ser estables en entornos geológicos debido a su alta reactividad y fácil oxidabilidad.

En resumen, la química del arsénico en el suelo se ve afectada por las características geotérmicas, hidrotermales, geoquímicas y físicoquímicas de los suelos, así como por la presencia de microorganismos que asimilan y transforman este elemento en formas potencialmente menos tóxicas. Los diversos mecanismos de movilización del arsénico en combinación con ciertos fenómenos meteorológicos como los volcanes, los incendios naturales y los tornados, entre otros, tienen como consecuencia el paso de dicho elemento desde el suelo a la atmósfera, dónde se transforman en las ya mencionadas arsinas (AsR₃ dónde R=H, X o cadenas carbonadas), compuestos volátiles que se adsorben a material particulado de pequeño tamaño⁸⁸.

La concentración de este elemento varía mucho en función de la zona y las condiciones climáticas, estando más presente en zonas industrializadas y cuencas mineras⁸⁹, puesto que, la actividad humana contribuye en mayor medida a su liberación a la atmósfera que los propios procesos naturales y siendo apenas residual en zonas no afectadas por la actividad de los seres humanos⁹⁰.

Otros fenómenos atmosféricos como las precipitaciones o los procesos de evaporación, permiten no sólo la deposición de estas arsinas en masas de agua, sino también el movimiento del arsénico desde ciertas masas pequeñas de agua hacia otras zonas, contribuyendo una vez más a la movilización del mismo⁹¹. A los procesos terrestres comentados y que lo depositan en el agua, se le suman procesos de transporte mediante fenómenos meteorológicos asociados. Lo mismo ocurre con depósitos terrestres afectados por corrientes acuáticas como las escorrentías o los deshielos, que facilitan su paso a fase acuosa. Además de todo esto, las corrientes subterráneas, en contacto con masas de tierra que contengan arsénico movilizado por alguno o la combinación de varios de los procesos descritos, facilitan la disolución del mismo, contaminando dichos acuíferos y poniendo en riesgo la calidad del agua de consumo. Se constata su presencia en pozos o suministros de agua en zonas de países en vías de desarrollo, del tercer mundo o incluso en países desarrollados. Ejemplos concretos de esto se pueden encontrar en naciones como China⁹², India⁹³, Bangladesh⁹⁴, México⁹⁵ o Argentina⁹⁶, países con zonas ricas en este elemento que, además, poseen unas características biogeoquímicas que favorecen la liberación del mismo hacia aguas subterráneas y/o de consumo, en forma de arsenitos y arseniatos.

Tomando como base los procesos descritos previamente, generalmente se cumple que zonas ligadas directamente a las escorrentías, golfos, y en general en las zonas costeras, la concentración de este elemento es mayor que en altamar⁹⁷. Sin embargo, las precipitaciones también favorecen su deposición en mares y océanos, y dependiendo de la profundidad y la actividad sísmica de éstos, ambos factores pueden contribuir a introducir el arsénico en estos entornos⁹⁸. El factor más relevante de su presencia en medios acuosos es que entra a formar parte de la cadena trófica debido a que numerosos seres vivos se alimentan del agua de estos medios, generando diferentes especies de arsénico orgánico en función del organismo que incorpore estos arseniatos y arsenitos.

Típicamente, según vamos ascendiendo en la cadena alimenticia (agua= AsO_3^{3-} y AsO_4^{3-} ; peces=AB, AC, moluscos y algas=AsSug y AsLip), la concentración de arsénico en valor neto aumenta además de tener un perfil de especies asociado más complejo^{99,100}. De manera alternativa, esto también ocurre con plantas¹⁰¹, hongos¹⁰² y semillas¹⁰³, suponiendo una vía más de entrada a la cadena trófica. Los procesos de nutrición de éstos representan la principal vía de inclusión desde niveles terrestres, siendo especialmente relevantes en los cultivos de hortalizas y legumbres¹⁰⁴. Este tipo de organismos suelen precisar de varios nutrientes para su crecimiento, desarrollo y proliferación, siendo uno de éstos el fósforo, en forma de PO_4^{3-} , que accede al interior de estos organismos a través de proteínas transportadoras ubicadas en la membrana plasmática de las células de las raíces, el rizoma. El tamaño del AsO_4^{3-} es muy similar al del PO_4^{3-} , lo que permite que dichas proteínas transportadoras permeen arseniato de la misma manera que fosfato, aunque la afinidad es mayor por este último anión. Por último, mencionar que procesos como el cambio climático y la contaminación incontrolada de ciertos agentes tóxicos, como es el caso del arsénico, provocan y pueden provocar un impacto importante en el medioambiente. Tal es el caso de la investigación llevada a cabo por Yu¹⁰⁵. Su equipo encontró que en el permafrost de nuestro planeta existen trazas de arsénico que puede terminar liberándose debido al deshielo ocasionado por el efecto invernadero, suponiendo un riesgo para todo el planeta debido a los procesos biogeoquímicos descritos, así como para las especies animales que lo compartimos¹⁰⁶.

El ciclo biogeoquímico del arsénico (Figura 11) es, pues, un sistema complejo que depende de muchas variables interconectadas entre sí, y que con la introducción del ser humano, se va a entremezclar aún más, si cabe, favoreciendo especialmente ciertos caminos y creando nuevos, magnificando las fuentes de exposición a este elemento.

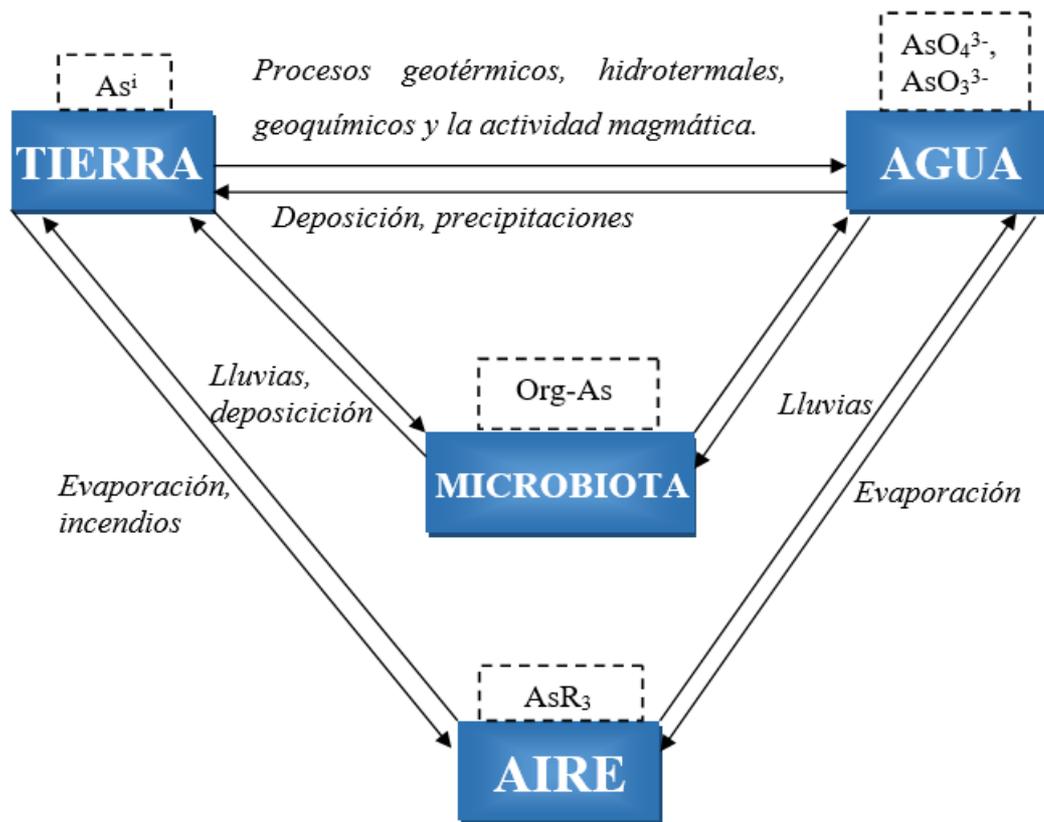


Figura 11. Esquema básico del ciclo biogeoquímico

b) El ser humano y el arsénico: una historia compartida

La evolución y el auge de la industrialización y el subsiguiente desarrollo tecnológico han modificado sensiblemente el ciclo biogeoquímico natural del arsénico, principalmente mediante el vertido y la acumulación incontrolada de residuos de naturaleza contaminante a la tierra¹⁰⁷, a ríos¹⁰⁸ y lagos¹⁰⁹, así como la expulsión de algunos de éstos a la atmósfera mediante chimeneas industriales¹¹⁰.

En este sentido, actualmente en España existen zonas abundantes en metales pesados, entre ellos el arsénico, como consecuencia del abandono de instalaciones mineras e industriales, entre otras. Alternativamente, las exposiciones laborales crónicas a este elemento constituyen una fuente de riesgo importante para trabajadores del sector secundario como la industria y la minería¹¹¹. No obstante, el conocido como rey de los tóxicos sirve como intermediario en la fabricación de productos de alto valor añadido en el campo de la industria o en medicina¹¹².

En el campo de la medicina, actualmente se utilizan muy pocos medicamentos a base de este elemento, principalmente como agentes quimioterapéuticos, si bien en el pasado su uso fue más extendido.

Históricamente, este agente tóxico por antonomasia, se engloba dentro de los elementos más antiguos y conocidos por el ser humano, remontándose hasta la Antigüedad de nuestra civilización. En las denominadas culturas clásicas, el uso de minerales que contienen arsénico como el realgar ($\alpha\text{-As}_4\text{S}_4$) o el oropimente (As_2S_3) se utilizaban con fines estéticos, específicamente como cosméticos para la alta sociedad u ornamentales, al menos en el caso de éste último, ya que se empleaba para dorar metales por su característico color amarillo. Su primer uso, sin embargo, se remonta a la Edad del Bronce, a las primeras fundiciones llevadas a cabo en los albores de la historia. Los antiguos habitantes de este planeta descubrieron que mezclar el bronce con minerales ricos en este elemento dotaba de mayor dureza a dichas aleaciones.

Irónicamente, si bien estas culturas conocían sus propiedades, no fue hasta 1200 cuándo fue descubierto oficialmente, concretamente en el 1200 por San Alberto Magno. Su nombre deriva de la palabra griega *arsenikon*, que significa amarillo, aunque algunos estudios sugieren que dicho origen está relacionado con la palabra *arrhenikon*, pigmento amarillo. Al otro lado del mundo, concretamente en Asia, la cultura china tenía pleno conocimiento de sus propiedades tóxicas y lo empleaba principalmente como pesticida; así lo refleja el “Compendio de Materia Médica” (*Bencao Gangmu*) redactado alrededor del año 1500 por Li Shizhen, médico destacado de la dinastía Ming.

Durante la época victoriana, el denominado “arsénico blanco”, se mezclaba con vinagre y caliza para obtener un preparado, que podía ser administrado tanto por vía oral como cutánea, y que poseía propiedades supuestamente tonificantes para el cutis. Esto ocasionó el denominado “envenenamiento dulce de Bradford”, acaecido en 1858, en el que desgraciadamente perdieron la vida 20 mujeres¹¹³. Una conducta similar se encontró en Austria, concretamente en la comarca de Estiria, dónde se tenía por costumbre ingerir diariamente el mismo compuesto¹¹⁴, que no es otro que As_2O_3 . Su reutilización como cosmético se cree fue debida a la creencia popular de que su consumo mejoraba el aspecto de la piel, volviéndola más tersa, además de ofrecer importantes beneficios para con el pelo, al conseguir darle más brillo. En realidad, desde como mínimo el s. XVIII, en Europa, el arsénico se usaba en el campo de la medicina como una especie de panacea frente a enfermedades¹¹⁵.

El desarrollo político y territorial de la Europa del s.XX acabó por desencadenar la Primera y Segunda Guerra Mundial, que propició el desarrollo entre otras cosas, de las primeras armas químicas como la adamsita ($C_{12}H_9AsClN$) o la lewisita ($C_2H_2AsCl_3$)¹¹⁶. Esta no sería la primera vez que el arsénico sería usado como arma, pues encontramos ejemplos del uso de minerales ricos en este elemento en ciertas guerras clásicas, como la del Peloponeso.

Desde la segunda mitad del s. XX hasta nuestros días, las principales aplicaciones del arsénico han estado focalizadas en la minería, la industria, la medicina y el sector alimentario¹¹⁷.

Comenzando con la minería, la mena principal de este elemento es la arsenopirita. Mediante el empleo de diferentes técnicas de extracción puede liberarse en forma de pequeñas partículas que en contacto con el aire acaban transformándose en arsinas, pudiendo ser inhaladas por los trabajadores de las minas. En ciertas ocasiones, esto ocurre a pesar de que se busca extraer otro tipo de materia prima, puesto que como se mencionó con anterioridad, el arsénico se encuentra en forma de impureza en varios minerales, destacando la cuprita (Cu_2O) o la cooperita (PtS).

Otros procesos, como el drenado ácido de minas (AMD o acid mine draining), consisten en la aplicación de un agente ácido en medio acuoso para romper las redes cristalinas de los elementos de interés¹¹⁸. Generalmente, el medio acuoso y ácido tienden a oxidar dichos elementos y obtenerlos en forma de óxidos. En el caso concreto del arsénico, estos procesos generan los conocidos como minerales secundarios de arsénico y que pueden suponer una fuente de contaminación importante de suelos y entornos hídricos debido a vertidos incontrolados.

Concretamente, ciertos complejos mineros abandonados, ubicados cerca de escorrentías o canales acuosos creados por el deshielo paulatino de las montañas, pueden acabar generando un proceso no controlado de AMD a su paso por masas superficiales ricas en compuestos de arsénico, generalmente dejando un rastro a lo largo de la extensión de estos canales temporales, pudiendo entrar en contacto con ríos o masas hídricas en movimiento, o dejando depósitos de diferentes minerales secundarios de arsénico, que mediante reacciones similares a las ya vistas como parte del ciclo biogeoquímico de éste y, gracias a la mayor reactividad que la de los sulfuros, difunda por el medioambiente de manera más accesible y libre.

A nivel industrial, una de las principales técnicas metalúrgicas aplicadas a los minerales de azufre es el tostado que consiste en un fuerte calentamiento del mineral en presencia de oxígeno¹¹⁹. Esto provoca la oxidación de éste hasta el anión sulfato, mientras que el hierro y el arsénico pasan a formar sus óxidos correspondientes, que serán recogidos y tratados en función de la aplicación deseada. El uso industrial del arsénico engloba varias aplicaciones, siendo una de las más extendidas la de conservante de la madera en forma del óxido mixto conocido como arseniato cromado de cobre o CCA ($\text{CrO}_3 \cdot \text{As}_2\text{O}_3 \cdot \text{CuO}$)¹²⁰. Por otro lado, éste arseniato además del arseniato de plomo (PbHAsO_4) fueron empleados como pesticidas y herbicidas¹²¹, aunque actualmente su uso está prohibido debido principalmente a que este tipo de moléculas son poco volátiles y el arsénico que contienen puede permear a través de la superficie mediante los receptores específicos de fósforo ya mencionados.

Siguiendo con las aplicaciones industriales, la quema de combustibles fósiles libera arsénico a la atmósfera en forma de cenizas de pequeño tamaño¹²². La materia orgánica muestra cierta afinidad por el arsénico¹²³, por lo que es frecuente encontrar pequeñas concentraciones de este elemento en los combustibles fósiles, que debido a las altas temperaturas son expulsados por las grandes chimeneas y se unen a la materia particulada de la atmósfera transformados en compuestos volátiles¹²⁴. De mayor actualidad, y de la mano del avance tecnológico, concretamente en el campo de la informática, se encuentra el desarrollo de semiconductores¹²⁵, de los cuáles el arseniuro de galio (GaAs) y de indio (InAs) son dos de sus máximos exponentes.

Para cerrar el bloque de la industria, mencionar el desarrollo y utilización de los sulfuros y seleniuros de arsénico en la fabricación de vidrio¹²⁶, pudiendo aparecer en concentraciones de ultratrazas y trazas en el vidrio pyrex y otros vidrios más termolábiles¹²⁷, así como su regulación en la industria cosmética¹²⁸, específicamente en ciertos productos de belleza como los lápices de ojos, colorete, pintalabios y sombra de ojos, que contienen una gran gama de metales pesados, entre ellos el arsénico; y en la industria tabacalera, pues puede estar presente como componente en los cigarrillos tradicionales¹²⁹ y en los electrónicos¹³⁰.

Saltando al sector alimentario, ciertos compuestos de naturaleza orgánica derivados del ácido fenilarsónico, ya mencionados previamente, fueron utilizados ampliamente durante todo el s.XX en aves de corral para combatir diferentes enfermedades presentes en éstos, además de como componentes de los piensos para engordarlos.

Posteriores investigaciones sugirieron que estos organoarsenicales suponían un riesgo para la salud, al generar arsénico inorgánico durante su metabolización por el ser humano. Aunque posteriormente comentaremos extensamente el rol del metabolismo en la toxicidad del arsénico, en líneas generales las especies orgánicas se consideran menos tóxicas que las inorgánicas. Es por ello que con esta información, las agencias reguladoras europeas decidieron prohibir la utilización de este tipo de aditivos a finales del siglo pasado, mientras que en Estados Unidos tan sólo hace seis años.

En resumen, a las ya conocidas fuentes naturales de exposición a través de las aguas y la dieta, se le añade el riesgo de contacto en actividades laborales, nada desdeñables por el número de horas que los seres humanos invertimos en ellas, además de estar en contacto con este elemento de manera crónica.

Por lo que concierne a la medicina, posee importantes beneficios cuándo se usa en concentraciones muy pequeñas para ciertas enfermedades como la leucemia promielocítica aguda¹³¹ (APL) en forma de As_2O_3 , o como el recién implementado arsenoplatin¹³² (Figura 12), un potente agente quimioterapéutico más estable que el cisplatino en condiciones biológicas.

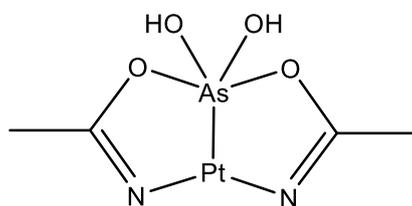


Figura 12. Estructura química del arsenoplatin deducida a partir de difracción de rayos X

1.3.- El metabolismo del arsénico y sus implicaciones tóxicas

Una vez enumerados los focos de exposición, su origen y las especies de arsénico más relevantes, en este apartado se procede a describir su influencia en los seres vivos, y más concretamente en los seres humanos, y los procesos derivados que desencadenan una respuesta tóxica a nivel celular, genética, sistémica o cualquier combinación de las tres.

El objetivo de este bloque, por tanto, es entender que sintomatología puede desencadenar la ingesta de este elemento, y cómo el metabolismo así como la naturaleza de las especies que participan en él están directamente relacionadas con dicho cuadro clínico, siendo éste proporcional a la especie implicada.

a) El metabolismo del arsénico

Como ya se ha demostrado, el arsénico inorgánico se encuentra de manera predominante formando parte de la materia inerte, y constituye la principal forma de exposición del ser humano independientemente del tipo de arsénico del que se trate, por lo que estas moléculas serán consideradas como el punto de partida para explicar el metabolismo de este elemento, y se resumirán como ^iAs .

En primer lugar, el mecanismo de entrada de este ^iAs al organismo de los seres vivos depende del organismo en sí. Así, en el caso de los microorganismos, la cercanía a la pared celular del tóxico permite su paso gracias a proteínas transportadoras ubicadas en su superficie mediante un mecanismo de transporte activo¹³³. Una vez dentro, su propio metabolismo genera especies orgánicas para favorecer su excreción y, a grandes rasgos, reducir su toxicidad, siendo en este caso concreto $\text{DMA}^{\text{III+V}}$, $\text{MMA}^{\text{III+V}}$ y posibles trazas de tioarsenicales¹³⁴.

Para las plantas y semillas, el proceso de captación ocurre en la rizosfera, una zona ubicada en las raíces que sirve de interfase entre el suelo y la planta, y que suele ser rica en microorganismos, que pueden acoplar sus procesos al de absorción de nutrientes de éstas¹³⁵. De manera similar a los microorganismos, las proteínas transportadoras permiten el paso desde la rizosfera al interior del organismo vegetal. Sin embargo, los canales de entrada para el As^{III} y As^{V} son diferentes.

Por un lado, el arsenito suele acceder al interior celular por medio de acuaporinas¹³⁶ y permeasas, mientras que el arseniato utiliza transportadores de fosfato, debido a la gran similitud en el tamaño molecular de ambos aniones, concretamente los $\text{NaP}_i\text{-IIb}$ ¹³⁷. Este mecanismo no es único sino que a lo largo de la cadena trófica se observan mecanismos similares de absorción del iAs encontrando pequeñas diferencias fenotípicas en estos transportadores, si bien para animales grandes y en la parte superior de la cadena alimenticia, la entrada en contacto con este elemento suele ocurrir a través de la ingesta de un ser vivo inmediatamente anterior a él, o bien en el agua.

En el ser humano, el arsénico puede entrar en contacto con el organismo por tres vías principales: por la piel (exposición cutánea), mediante el sistema respiratorio (exposición mediante inhalación) y a través del tracto gastrointestinal (exposición mediante ingesta). De estas tres, la vía cutánea comporta un menor riesgo a corto y medio plazo a dosis pequeñas, no así a largo plazo, ya que, por un lado, el arseniato tiende a sustituir al grupo fosfato en sus funciones celulares, así como inhibir aquellas rutas en las que tanto éste como el ATP sean moduladores alostéricos^{138,139}. Por otro, el arsenito presenta una elevada reactividad frente a grupos -SH, pudiendo unirse a aminoácidos de proteínas y enzimas¹⁴⁰. A largo plazo, estas interacciones pueden terminar causando una serie de enfermedades cuya gravedad y tipo dependerá del grado de exposición y el tiempo, como ya se comentará más adelante.

Las otras dos vías presentan una respuestas y sintomatología más diversa y problemática a dosis más bajas, por lo que la inhalación y la ingesta constituyen dos vías críticas para la toxicidad de este elemento. Así, la inhalación debido a partículas contaminantes en la atmósfera suele acarrear la acumulación del arsénico en los pulmones y vías respiratorias¹⁴¹, desde donde acaba accediendo al interior celular mediante los canales disponibles (acuaporinas, permeasas y proteínas transportadoras de fosfato), muy similares a los descritos para otros organismos menores. Tras la ingesta, el arsénico acaba en el estómago desde dónde es transportado hasta los hepatocitos para su metabolización, cuyo mecanismos explicaremos más adelante, pero que tiene como base la transformación de las especies iniciales en derivados orgánicos para hacerlos más liposolubles y por ello, más fácilmente excretables. Una vez metabolizado, éste se excreta a la sangre y a la bilis mediante proteínas multirresistentes a drogas, las conocidas como MDR. De entre ellas, las MRP-1 se emplean en la interfase hígado-sangre, y las MRP-2, a la bilis¹⁴².

Finalmente, el riñón supone la última etapa antes de la excreción, desde dónde acaba viajando y acaba excretado por la orina, de manera mayoritaria en un intervalo de entre 24 y 72h aproximadamente, en función de la dosis y el tipo de especies ingeridas.

El mecanismo que rige las reacciones bioquímicas que conforman el metabolismo del iAs ha sido debatido largamente, pero actualmente ninguna de las dos propuestas con mayor peso ha sido capaz de explicar en su totalidad los datos experimentales recabados. Históricamente, el primer científico en postular un posible mecanismo fue Challenger, quién estudiando el metabolismo de ciertos microorganismos sugirió un posible curso para las reacciones metabólicas del arsénico¹⁴³. Así, el primer paso implica una reducción previa del As^V al As^{III} . Posteriormente se descubriría que existen enzimas reductasas capaces de catalizar esta reacción. Un camino no enzimático alternativo a este paso consiste en acoplarlo a la oxidación del glutati6n (GSH)¹⁴⁴.

Seguidamente, el arsenito sufre una serie de metilaciones oxidativas, sustituyendo escalonadamente cada hidroxilo de su estructura por un metilo y oxidándose a la especie pentavalente correspondiente en cada paso. Para que la reacción progrese, cada intermedio sufre un nuevo proceso de reducci6n al estado de oxidaci6n +3 previo a cada metilaci6n oxidativa (Figura 13). Esta reacci6n est1 controlada por dos enzimas: la $As3MT$ y la SAM ¹⁴⁵. La enzima conocida como $As3MT$ o arsénico3-metiltransferasa (Cyt19 en el caso de algunas especies, entre ellas los seres humanos) es la responsable de catalizar la migraci6n de un grupo metilo aportado por la enzima SAM o S-adenosyl-meteonina¹⁴⁶. Aparentemente, esta oxidaci6n puede ocurrir en ausencia de catalizador a expensas de ciertas sustancias como la metilcobalamina, que sufre una reacci6n de sustituci6n al intercambiar el grupo metil por una molécula de glutati6n. La reacci6n de reducci6n de cada especie orgánica pentavalente a la trivalente ocurre enzimáticamente por la acci6n de las reductasas, como ya vimos en el primer paso de reducci6n del arseniato a arsenito. La enzima encargada de llevar a cabo este proceso es la glutati6n-S-transferasa- ω (GSTO)¹⁴⁷.

MECANISMO DE CHALLENGER

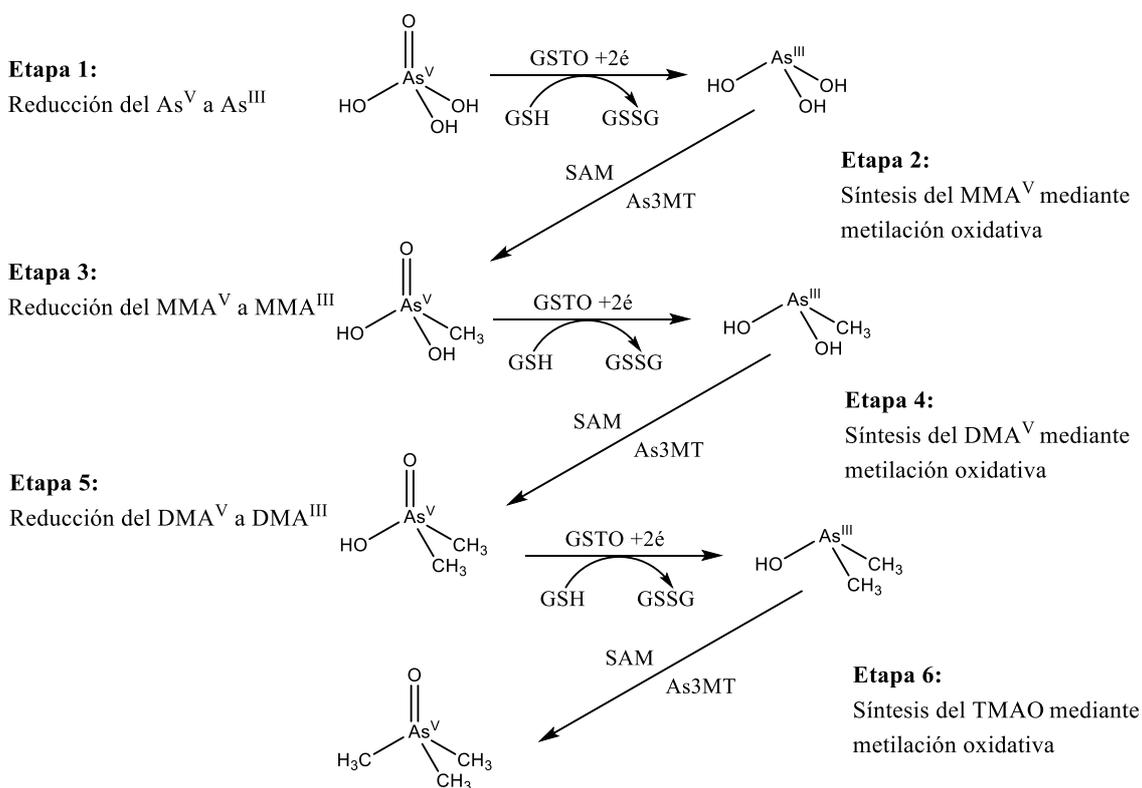


Figura 13. Ruta metabólica del arsénico explicado mediante el mecanismo de Challenger^{143,144,147}.

Como puede verse, los intermedios de esta reacción son el MMA^{III} y el DMA^{III} , obteniendo como productos finales DMA^{V} , el MMA^{V} y trimetilarsenóxido o TMAO. No todos los seres vivos presentan estos tres metabolitos, sino que en función del ser vivo, aparecen unos u otros, en proporción variable. Concretamente para seres humanos, las especies mayoritarias son el DMA^{V} y el MMA^{V} , mientras que el TMAO es muy poco frecuente, apareciendo exclusivamente cuándo la persona se ha expuesto a grandes dosis de arsénico¹⁴⁸.

Si bien este mecanismo permitió explicar la presencia de los dos metabolitos más importantes, el DMA^{V} y el MMA^{V} , no permitía explicar la proporción entre ambos que se encuentra generalmente en la orina. Según Vahter, el arsénico inorgánico se metaboliza en un 60-80% de DMA^{V} y un 10-20% de MMA^{V} ¹⁴⁹. Observando las presuntas reacciones implicadas, se observa que el DMA^{V} se forma a raíz del MMA^{V} de manera irreversible, por lo que para que se cumpla el ratio $\text{DMA}^{\text{V}}/\text{MMA}^{\text{V}}$, las enzimas implicadas no deben de tener un rendimiento del 100%.

En procesos biológicos la reacción hacia el TMAO en humanos no está favorecida¹⁴¹. En cualquier caso, hacen falta más estudios para descartar o apoyar finalmente esta vía de metabolización.

Otro dato en contra del mecanismo de Challenger es que los intermedios MMA^{III} y DMA^{III} apenas son tenidos en cuenta por éste cuando ciertos estudios posteriores han demostrado la existencia y excreción de estas especies por la orina, aunque en casos muy concretos debido a la baja estabilidad de los mismos^{150,151}.

Hayawaka, unas cinco décadas después, sugirió un mecanismo alternativo para intentar explicar los puntos débiles del modelo de Challenger, estudiando para ello los complejos de GSH con As^{III}. De acuerdo a esta teoría, el arseniato se reduce a arsenito gracias a las enzimas arseniato-reductasas o por acción del GSH¹⁵². Después, y es aquí donde radica la gran diferencia, el arsenito genera el complejo As^{III}(GS)₃, formado a partir de As^{III} y tres moléculas de GSH, uniéndose a cada una de ellas a través de un enlace entre el arsenito y el grupo SH de la cisteína (Cys) de cada molécula de glutatión. La reacción progresa sustituyendo cada enlace As-S por As-Me pero sin cambio en el estado de oxidación. Como antes, las metilaciones sucesivas ocurren en presencia de SAM, el dador de grupos metilo catalizada por la Cyt19 (ver Figura 14). Como resultado se forman los complejos MeAs^{III}(GS)₂ y (Me)₂As^{III}(GS).

A diferencia del esquema de reacciones de Challenger, cada complejo está en equilibrio con las formas libres As^{III}, MMA^{III} y DMA^{III} libre¹⁵³, si bien las reacciones de metilación son irreversibles. Posteriormente, los derivados orgánicos trivalentes se oxidan a las especies pentavalentes. En otras palabras, la existencia de un equilibrio entre el complejo y la forma libre de cada especie permite explicar, por tanto, la formación del MMA^V y DMA^V en proporciones distintas, siendo el primero el de menor concentración debido a que las reacciones en equilibrio requieren tiempos más largos que las irreversibles.

Además, las especies trivalentes tienen más repercusión en el balance global. Sin embargo, Hayawaka no termina de explicar cómo se forma el TMAO a tenor de estas reacciones.

MECANISMO DE HAYAWAKA

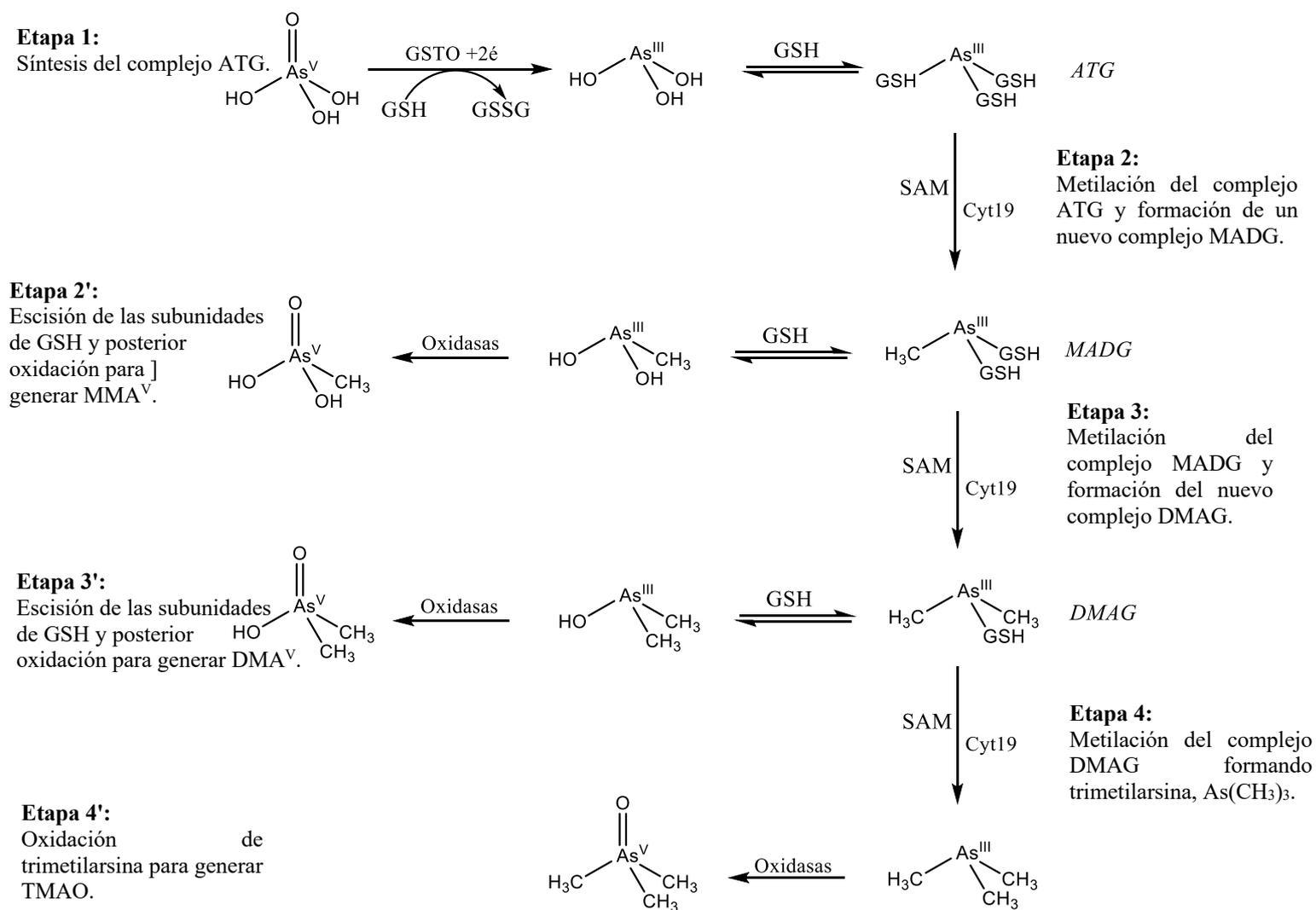


Figura 14. Ruta metabólica del arsénico explicado mediante el mecanismo de Hayawaka^{152,153}

Actualmente, estos dos mecanismos son los más aceptados para justificar los perfiles de arsénico en matrices biológicas. Si bien, ninguna de las dos posibilidades termina por explicar todos los puntos, permite entender a grandes rasgos el destino del arsénico en el organismo. Así, el metabolismo permite excretar aproximadamente el 75-80% del arsénico ingerido en forma de especies orgánicas entre las que encontramos el MMA^V, DMA^V y TMAO, almacenando el resto en diferentes órganos.

La exposición al arsénico inorgánico es muy variada y frecuente. No obstante, en ciertas ocasiones son otros arsenicales más complejos, como la arsenobetaina, los arsenoazúcares o arsenolípidos, entre otros, los que exclusivamente entran en contacto con los seres vivos a través de la ingesta de alimentos que los contiene. En estos casos, el metabolismo difiere de los procesos anteriormente descritos y toma otras vías para poder degradar, asimilar y excretar estas especies, formando DMA^V como principal intermediario común.

Por lo que respecta a los arsenolípidos, actualmente se conocen cuatro grandes familias clasificadas en función de si el arsénico está unido a una cadena de hidrocarburo (AsHCs), un ácido graso (AsFAs), un fosfolípido (AsPLs) o una fosfatidilcolina (AsPCs). Los principales estudios realizados sobre ellos han sido en algas o residuos marinos, principalmente aceites, aunque su metabolismo ha sido muy poco estudiado. Schmeisser realizó un microestudio con dos voluntarios a los que hizo ingerir separadamente hígado de bacalao en dos fracciones y aceite de hígado de bacalao, para ir midiendo secuencialmente la orina con el objetivo de analizar los principales metabolitos obtenidos. Encontró que los metabolitos principales fueron DMA^V, AB y el arsenoazúcar glicerol. En mucha menor proporción se encontraron MMA^V, As^{III} y otros compuestos entre los que destacan tioarsenicales y AsFAs de cadena pequeña¹⁵⁴. Algunos estudios más en matrices animales revelaron que los AsHCs se metabolizan perdiendo carbonos en el esqueleto central como si sufrieran una β -oxidación¹⁵⁵. No obstante, esta familia guarda aún muchas incógnitas y son necesarios más estudios para poder conocer mejor los pormenores metabólicos de sus constituyentes.

Los arsenoazúcares representan otra de las grandes familias de moléculas complejas, cuyos representantes más importantes contienen un radical hidroxilo (GLY, glicerol o 328), sulfito (SO₃, sulfonato o 392), sulfato (SO₄, sulfato o 408) y fosfato (PO₄, fosfato o 482). Se suelen metabolizar principalmente en DMA^V y otros compuestos como AC, TMAO y DMAA, y algunos tioarsenicales^{156,157}. El proceso de metabolización completo es desconocido, razón por la cual su toxicidad es difícil de evaluar. Aunque generalmente se acepta que no son tóxicos.

Otros arsenicales complejos son la AB y la AC. La AB se excreta prácticamente sin metabolizar, aunque es posible encontrar una pequeña cantidad de DMA^V asociada como subproducto¹⁵⁸.

Por otro lado, aunque la AC tampoco se metaboliza¹⁵⁹, se ha sugerido que su aparición está relacionada con la metabolización de los arsenolípidos¹⁶⁰.

En resumen, el metabolismo supone un entramado complejo de reacciones y procesos que permiten explicar la bioquímica del arsénico en el organismo de los seres vivos. Durante todo este apartado, se ha hecho hincapié en la relación de la bioquímica con la excreción de este tóxico por la orina, a través de la transformación del arsénico inorgánico en formas orgánicas más fáciles de excretar, o la transformación de derivados orgánicos complejos en otros más simples. Se debe tener en cuenta que existe una relación entre ese metabolismo y la toxicidad de cada especie, específica de cada una de ellas, cuyos fundamentos se van a abordar a continuación.

b) Toxicidad del arsénico

La toxicidad del arsénico está directa y estrechamente relacionada con la naturaleza de la especie química, el estado de oxidación y, evidentemente, la dosis de exposición. Por lo que respecta al estado de oxidación, y de manera general, las especies con estado de oxidación +3 son más tóxicas que las de valencia +5. Desde un punto de vista químico, las especies trivalentes presentan menor estabilidad, reaccionando fácilmente pudiendo alojar los nuevos electrones en los orbitales de la capa d. Biológicamente, el As^{III} es captado con mayor eficiencia por las células que el As^{V} .

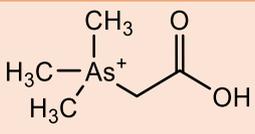
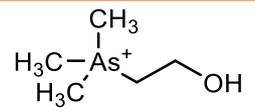
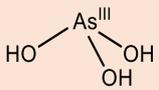
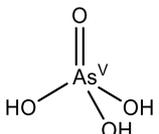
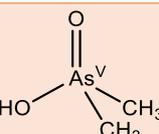
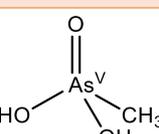
Evolutivamente esto tiene su origen en los albores de nuestro planeta cuando el arsénico presente en los mares y océanos primigenios suponía un riesgo para las primeras células que darían germen a la vida. Como consecuencia de esto, estas células desarrollaron una defensa contra el mismo, la creación de proteínas transportadoras que permiten el paso de As^{III} a la célula, para poder metabolizarlo en formas orgánicas. En cuanto a la naturaleza de las especies, las especies inorgánicas son más tóxicas que las orgánicas¹⁶¹. Mención especial merecen los intermedios MMA^{III} y DMA^{III} , que según ciertos estudios, presentan una toxicidad alta, llegando a superar a las del arsenito y arseniato. Sin embargo, el papel de estos intermedios no ha sido estudiado extensamente y su estabilidad no está demostrada por lo que su rol como posible agente tóxico no está del todo aceptado¹⁶².

Las especies orgánicas presentan un rango de toxicidad amplio, dependiendo de la familia a la que pertenezca.

Así, pueden ser consideradas no tóxicas, como es el caso de la arsenobetaina, arsenocolina y los arsenozúcares, o de toxicidad moderada, como es el caso del MMA^V y DMA^V. La excepción serían los ya mencionados MMA^{III} y DMA^{III}, y los arsenolípidos¹⁶³, pues ciertos estudios mencionan cierto grado de neurotoxicidad, además de que se ha demostrado que pueden pasar de madre a hijo a través de la leche materna, si bien la toxicidad de sendas especies no se ha estudiado en profundidad.

Con todo, en líneas generales se considera que el arsénico inorgánico es más tóxico que el orgánico, y las especies trivalentes son más tóxicas que las pentavalentes. Por lo que respecta a las especies orgánicas se suele considerar que DMA^V>MMA^V>TMAO≈AB≈AC¹⁶¹(Tabla 2).

Tabla 2. Valores de LD₅₀ de algunos compuestos arsenicales⁴⁵. N/D significa no detectada.

ID	Estructura química	LD₅₀
Arsenobetaina		N/D
Arsenocolina		N/D
Ácido arsenioso		20 mg/kg
Ácido arsénico		13 mg/kg
Ácido cacodílico		700-2600 mg/kg
Ácido metilarsónico		700-1800 mg/kg

El arsénico afecta a diferentes escalas dentro del organismo de los seres vivos. En primer lugar, influye en los procesos celulares actuando como un potente agente citotóxico. El impacto de su toxicidad depende del estado de oxidación.

La clave para entender el mecanismo de toxicidad de las especies trivalentes estriba en la extrema afinidad del As^{III} , MMA^{III} y DMA^{III} por los grupos sulfhidrilos presentes en los restos cisteína (Cys) de numerosas enzimas y proteínas, lo que provoca su inhibición, siendo mayor en el caso del monometil y dimetilarsénico (III) que en el caso del arsenito¹⁴⁴. Destacan especialmente la piruvato deshidrogenasa (PDH)^{141,164} y la aldehído deshidrogenasa (ALDH)¹⁶⁵. La primera está implicada en los procesos de respiración celular, pero sobre todo en el ciclo de Krebs, punto común a todas las reacciones anabólicas y catabólicas.

Por otro lado, la segunda protege nuestro organismo de otras sustancias tóxicas, en este caso, ciertos aldehídos¹⁶⁶. Otras enzimas clave en la estabilidad celular son la glutatión reductasa (GSH) y la tiorredoxina reductasas, encargadas de proteger la célula frente al estrés oxidativo¹⁶⁷. Su desactivación provoca un desequilibrio en las reacciones redox de las células, lo que se postula como la auténtica raíz de su poder tóxico. Así, este desequilibrio electroquímico acaba aumentando el estrés celular y fomenta la síntesis de especies reactivas de oxígeno (ROS)¹⁶⁸. Esto desencadena una serie de procesos que afectan sensiblemente a los mecanismos de comunicación o señalización celular, mecanismos directamente relacionados con la integridad de la célula, sus procesos y el material genético asociado, pudiendo provocar problemas como proliferación, diferenciación y muerte celular^{144,169}. En cuanto al arsénico pentavalente, a dosis elevadas actúa principalmente inhibiendo procesos metabólicos regulados por fosfatos (P_i , ADP o ATP) debido su similar radio iónico con el grupo fosfato del ATP^{141,170} (ciclo de Krebs, respiración celular, β -oxidación, etc.). En concentraciones pequeñas suele unirse a la queratina, quedando almacenado en el pelo, la piel y las uñas, principalmente.

Por todo lo anterior, el arsénico inhibe procesos celulares clave para la supervivencia de las células, aumentando el estrés celular sobre éstas lo que acarrea una alteración de los caminos de señalización celular. Entre las consecuencias estudiadas se encuentra la liberación de ciertas proteínas diseñadas para combatir el estrés oxidativo^{171,172}, las conocidas como HSP (Heat-Shock Proteins), cuya misión reside en reorganizar la actividad inicial alterada en las células. Estas proteínas acaban causando cierta inflamación celular, que a largo plazo puede acarrear comportamientos celulares anómalos como el crecimiento descontrolado de éstas (proliferación), desembocando en diversos tipos de cánceres¹⁷³.

Por otro lado, los factores de crecimiento celulares son los encargados de la comunicación celular y generalmente son sustancias de naturaleza proteica que se unen a un receptor activando entre otras cosas la transcripción de un gen o la regulación de procesos por secreción de otra proteína o enzima asociada¹⁷⁴.

Nuevamente, el arsénico interfiere en este tipo de procesos¹⁷⁵, por lo que, además de todo lo anteriormente comentado, puede influir sobre los receptores endocrinos actuando sobre los conocidos como receptores estrogénicos, altamente relacionados con la aparición y desarrollo de cánceres¹⁷⁶. En efecto, este elemento también presenta propiedades carcinogénicas por mediación directa, como el caso de los receptores endocrinos, o mejor dicho, de un oncogen conocido como c-Src, conectado estrechamente a estos receptores endocrinos y cuyo rol alterado ha sido descrito en diversos tipos de cánceres^{147,177}. Otro ejemplo de genes objetivo es el P53, cuya alteración incrementa el riesgo de padecer cáncer de vejiga^{178,179}. Indirectamente, el desarrollo de cánceres está asociado con errores de replicación, transcripción y traducción del ADN celular¹⁸⁰. Así, el arsénico puede inducir genotoxicidad de tres maneras distintas: alterando la cromatina y/o los cromosomas^{181,182}, provocando modificaciones en los componentes del ADN^{183,184} e inhibiendo la actividad de las enzimas responsables de los procesos genéticos¹⁸⁵⁻¹⁸⁷. Más concretamente, se ha demostrado que, *in vitro*, el arsénico inorgánico provoca aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas, lo que conlleva, en primera instancia, un mayor riesgo de daño a la estructura del ADN^{188,189}.

Referente al arsénico orgánico, el DMA^{III+V} puede causar mutaciones cromosómicas, y la unión de ciertas proteínas a las bases nitrogenadas del ADN¹⁸⁵. Alternativamente a esto, la ruptura de su hebra también es uno de sus efectos dañinos¹⁸⁹. Contrariamente a lo que pueda parecer, el MMA^V no parece generar toxicidad mediante este tipo de mecanismos. Con respecto a los componentes del ADN, el DMA^{III+V}, como consecuencia del estrés oxidativo, los radicales hidroxilos generados pueden reaccionar con ciertas bases nitrogenadas formando compuestos derivados, como por ejemplo, la 8-hidroxil-desoxyguanosina, utilizado extensamente como marcador del grado de estrés oxidativo al que está sometido el ADN^{190,191}.

Además, la hipo e hipermetilación de ciertas bases nitrogenadas ocurren de manera aleatoria, lo que puede provocar la inhibición de ciertos genes y la expresión de otros tantos, aumento el riesgo de carcinogénesis¹⁹².

La capacidad de inhibición del arsénico facilita la desactivación de ciertas DNA-ligasas, así como aquellas responsables de los mecanismos de reparación del ADN en los diferentes complejos NER (Nucleotide Excision Repair)^{193,194} y BER (Base Excision Repair)^{193,195}, lo que nuevamente daña la estructura del ADN. Otros efectos descritos incluyen la alteración de los macrófagos, lo que desencadena una respuesta inflamatoria exacerbada, constituyendo otro de los mecanismos de generación de cánceres¹⁹⁶.

Por todo lo expuesto, se puede concluir que el arsénico es citotóxico, genotóxico y carcinogénico llegando a generar una gran variedad de síntomas en diferentes órganos diana (Tabla 3). La toxicidad es, por lo tanto, más alta si se trata de especies trivalentes y/o de naturaleza inorgánica.

Tabla 3. Principal sintomatología derivada de la exposición al arsénico en diversas zonas del organismo.

<u>EFFECTOS TÓXICOS DEL ARSÉNICO EN LOS ORGANISMOS VIVOS</u>	
<u>VÍAS RESPIRATORIAS</u>	
<i>Síntomas</i>	<i>Referencias</i>
Tos crónica	197,198
Esfuerzo respiratorio	198
Bronquitis crónica	199
Asma	200
Neumonía	200
Cáncer de pulmón	200
<u>SISTEMA CARDIOVASCULARES</u>	
<i>Síntomas</i>	<i>Referencias</i>
Trombosis	201
Isquemia miocárdica	202,203
Embolias	204
Aterosclerosis	205,206
Apoplejía	202,207
Enfermedades coronarias	202,207
Hipertensión	202,207
Ensanchamiento de carótida	202,207
<u>SISTEMA ENDOCRINO</u>	
<i>Síntomas</i>	<i>Referencias</i>
Diabetes	208,209
Síndrome metabólico	210
<u>TRACTO GASTROINTESTINAL</u>	
<i>Síntomas</i>	<i>Referencias</i>
Lesiones en la cavidad oral	211
Diarrea	212
Cáncer de hígado	213
<u>ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS</u>	
<i>Síntomas</i>	<i>Referencias</i>
Trastornos sensoriales	214
Neuropatía periférica	215

<u>TRASTORNOS OCULARES</u>	
<i>Síntomas</i>	<i>Referencias</i>
Conjuntivitis	216
Cataratas	217
Pterigión	218
<u>ENFERMEDADES DÉRMICAS</u>	
<i>Síntomas</i>	<i>Referencias</i>
Líneas de Mees	219
Hiperpigmentación	220
Hiperqueratosis	219,220
Cáncer de piel	221,222
<u>SISTEMA EXCRETOR</u>	
<i>Síntomas</i>	<i>Referencias</i>
Proteinuria	
Necrosis tubular	223
Cáncer de riñón	
Cáncer de vejiga	
<u>CRECIMIENTO, REPRODUCCIÓN Y OBSTETRICIA</u>	
<i>Síntomas</i>	<i>Referencias</i>
Endometriosis	224
Disfunción del sistema reproductor femenino	225,226
Disfunción del sistema reproductor masculino	227,228
Malformaciones fetales	229
Problemas neurológicos asociados al crecimiento	230
Muerte del feto	231

En resumidas cuentas, el arsénico es capaz de movilizarse a lo largo y ancho de este planeta con o sin ayuda del ser humano, si bien éste indudablemente contribuye a su liberación y transformación, principalmente a medios terrestres y aéreos, desde dónde difunde a otros medios como el acuoso. En función de los procesos que tengan lugar durante su movilización, así como los seres vivos con los que entre en contacto, se generan una serie de especies cuya naturaleza marca su toxicidad, a nivel celular, sistémica o genética, como se ha descrito previamente.

Es por ello, que a nivel legislativo existen una serie de regulaciones centradas principalmente en el riesgo que supone este tóxico a través de los medios acuosos²³² y alimenticios²³³⁻²³⁵, los medios más críticos y de mayor incidencia.

Esto unido a la profunda conciencia del potencial cancerígeno del arsénico y sus compuesto⁵³, así como a la necesidad de recopilar más información sobre la incidencia real de este tóxico en la población ha permitido la puesta en marcha de proyectos de biomonitorización a nivel europeo²³⁶.

No obstante, para poder contribuir a recabar más información referente al impacto real del arsénico en la población, se precisan herramientas analíticas potentes, en términos de sensibilidad, selectividad y aplicabilidad, para obtener datos concluyentes y válidos y garantizar una legislación situada en un marco realista para paliar y/o eliminar los efectos adversos, a largo plazo, y muchas veces enmascarados de la exposición a este elemento.

1.4.- Metodologías analíticas de especiación de arsénico

a) Antecedentes

La implantación de una instrumentación adecuada para determinar el contenido total de arsénico y el de sus especies principales supuso un cambio en el paradigma para la química analítica instrumental de mediados del s. XX. Por un lado, cada especie de arsénico presentaba unas características físicoquímicas específicas y diferentes entre sí, lo que a la postre tenía una especial incidencia en su determinación analítica. Por otro lado, los límites máximos de residuos legislados en las directivas europeas y nacionales demandaban el desarrollo de nuevas técnicas analíticas instrumentales con objeto de obtener una mejor sensibilidad y selectividad que a su vez permitieran una preparación de muestra más sencilla para el análisis rutinario de muestras medioambientales, biológicas y clínicas de interés.

Durante los primeros compases del pasado siglo, las primeras metodologías de especiación se centraron casi exclusivamente en la separación y cuantificación de As^{III} y As^{V} , siendo aplicadas principalmente a muestras de aguas. Entre estos enfoques tradicionales podemos encontrar la espectroscopía de UV-Visible, especialmente mediante reacción con complejos coloreados que permiten distinguir una especie de otra^{237,238}(colorimetría).

Entre los principales inconvenientes de este enfoque estaban los largos tiempos de preparación de muestra y análisis, así como la dificultad de trabajar con reacciones en equilibrio, pudiendo dar lugar a reacciones secundarias de oxidoreducción, complejación, etc. Por otra parte, la electroquímica, particularmente a través de la polarografía clásica^{239,240} o la de pulso diferencial^{241,242}, permitía discriminar fácilmente entre la especie trivalente y la pentavalente, ya que únicamente la primera se considera electroactiva.

A la hora de manejar este tipo de técnicas, inicialmente se determinaba el contenido de As^{III} , y se deducía el contenido de As^{V} por diferencia con respecto al contenido de arsénico total. Posteriores avances en este sector culminaron con el alumbramiento de la voltamperometría de redisolución anódica^{243,244} y/o catódica^{245,246}. Esto derivó en el uso de ciertos reductores previos como la hidrazina o ciertos metales, para poder convertir el estado pentavalente en trivalente, y posteriormente oxidarlo. Lamentablemente ninguna de las dos variantes supuso un avance lo suficientemente potente ya que este tipo de metodologías presentaban un alto grado de interferencias, en forma de metales o reductores. Alternativamente, la espectrometría de rayos X²⁴⁷ para suelos o el análisis de activación de neutrones (NAA)²⁴⁸, encontraron su hueco y se utilizaron para análisis de la cristalinidad, entornos atómicos, caracterización, etc.

No fue hasta la llegada de la técnica conocida como generación de hidruros (HG), que se comenzaron a desarrollar metodologías de especiación con aplicación real. Concretamente, en 1973, Braman and Foreback ampliaron el alcance de la especiación a dos especies orgánicas, el DMA^{V} y el MMA^{V} , además de arsénico inorgánico. Así, mediante el empleo de un reductor (MCl_n , siendo M un metal; NaBH_4 o NaCNBH_3), cada especie analizada se transforma en su arsina correspondiente, estos compuestos, como ya hemos visto, son volátiles y pueden ser transportados hasta un detector de forma sencilla. De esta manera, partiendo de As^{III} , As^{V} , MMA^{V} y DMA^{V} , se obtiene la arsina (AsH_3 ; $T_{\text{eb}}=-55^\circ\text{C}$), la metilarsina (MeAsH_2 ; $T_{\text{eb}}=2^\circ\text{C}$) y la dimetilarsina (Me_2AsH ; $T_{\text{eb}}=55^\circ\text{C}$), respectivamente. Tanto el arsénico trivalente como el pentavalente forman hidruro de arsénico(III), pero el último requiere de un paso previo de reducción por lo que controlando el proceso se puede distinguir la formación de una arsina de la otra. Esta reducción del arseniato ocurre a un pH extremadamente ácido (≤ 1), y ocurre lo mismo para las especies orgánicas²⁴⁹. Por tanto, variando el pH se controla la formación de los hidruros correspondientes. Esta metodología suele incorporar una trampa criogénica (CT) para poder mejorar la sensibilidad de la técnica, ya que primero se atrapan los hidruros volátiles a temperaturas bajas, para después aplicar secuencialmente temperatura y volatilizar los hidruros en función de su temperatura de ebullición/vaporización²⁵⁰. La limitación principal de este enfoque es su exclusiva aplicabilidad a especies capaces de formar el hidruro ($^{\text{I}}\text{As}$, MMA^{V} y DMA^{V}), útil para análisis de aguas, pero no para estudios de biodisponibilidad en organismos vivos o de especiación de matrices con una ingesta de algas o crustáceos.

Esto se debe a que la AB, los AsSug o As-Lip no pueden ser analizados mediante esta metodología y, por tanto, la información generada es, en el mejor de los casos, incompleta. No obstante, ciertos estudios incorporaron un paso de descomposición térmica previa a la propia generación de hidruros para poder oxidar secuencialmente las especies orgánicas a arsénico pentavalente²⁵¹. Lamentablemente, la falta de selectividad y control de este paso, unido a las desventajas intrínsecas de ésta, como es la formación de hidruros interferentes, así como las condiciones de reacción que no favorecen la cinética y en ciertos casos permiten la formación de complejos acuosos, limitaron el avance de esta técnica. Todas estas técnicas, y algunas más, representaron los primeros avances en el campo de la especiación (Tabla 4). No obstante, con el tiempo todas ellas fueron relegadas, en el mejor de los casos, a aplicaciones concretas pero sin mucha progresión analítica, y gradualmente sustituidas por la cromatografía acoplada a la espectrometría de masas.

Tabla 4. Antecedentes de la especiación de arsénico en el s.XX

TÉCNICAS ANALÍTICAS TRADICIONALES DE ESPECIACIÓN DE ARSÉNICO			
<u>Generación de hidruros</u>			
Técnica	Matriz	Especies	Referencias
HG-AAS	Aguas	As ^{III} , As ^V , DMA ^V , MMA ^V	249
	Orina	As ^{III} , As ^V , DMA ^V , MMA ^V	
HG-AAS	Aguas	As ^{III} , As ^V	250
HG-GC-AAS	Aguas	As ^{III} , As ^V , DMA ^V , MMA ^V	251
HG-GC-AAS	Aguas	As ^{III} , As ^V , DMA ^V , MMA ^V	252
<u>Técnicas electroquímicas</u>			
Técnica	Matriz	Especies	Referencias
Polarografía	Aguas	As ^{III} , As ^V	253
DPP	Aguas	As ^{III} , As ^V	254
DPP	Aguas	As ^{III} , As ^V	255
ASV	Aguas	As ^{III} , As ^V	256
ASV	Aguas	As ^{III} , As ^V	257
CSV	Aguas	As ^{III} , As ^V	258
CSV	Aguas	As ^{III} , As ^V	259
<u>Electroforesis capilar</u>			
Técnica	Matriz	Especies	Referencias
CE	Aguas	As ^{III} , As ^V , DMA ^V , MMA ^V	260
CE	Aguas	As ^{III} , As ^V , DMA ^V , ácido arsánico y derivados	261
<u>Otras técnicas</u>			
Técnica	Matriz	Especies	Referencias
Colorimetría	Aguas	As ^{III} , As ^V	262
NAA	Aceites biológicos	Organoarsenicales	263
IEC-NAA	Aguas	As ^{III} , As ^V , DMA ^V , MMA ^V , AB	264
IEC-AAS	Aguas	As ^{III} , As ^V , DMA ^V , MMA ^V	265

En la década de los 80 se produciría un importante avance en el campo de la química analítica con la llegada de los espectrómetros de masas. Concretamente, el entonces reciente ICP/MS mostraba unos niveles de sensibilidad superiores que las alternativas de la época, desbancando rápidamente a las técnicas espectroscópicas anteriores²⁶⁶⁻²⁶⁸, especialmente con la posterior creación de los ICP con triple cuadrupolo (ICP/MS/MS^{269,270}) y los equipos de alta resolución (HR-ICP/MS) con el uso de un sector magnético o SF-Sector Field(SF-ICP/MS)^{271,272}. Así, a partir de la primera década del s.XXI, la técnica combinada de LC-ICP/MS constituye la metodología de especiación de arsénico por antonomasia, inicialmente aplicada a muestras biológicas y acuosas, pero que gradualmente ha ido ampliando su campo de acción hacia matrices más complejas como matrices animales, vegetales o alimenticias (Tabla 5).

Esto es debido a que es una técnica analítica instrumental con un detector (ICP/MS) que tiene una alta especificidad y sensibilidad y que está acoplado a una técnica de separación (Cromatografía iónica) que permite eliminar interferentes en función de la selectividad de los compuestos por una fase estacionaria de intercambio iónico. Esta técnica permite determinar incluso los compuestos arsenicales como arsenoazúcares, arsenolípidos o tioarsenicales metabolizados o sin metabolizar, en matrices complejas (champiñones, hongos, algas, etc.).

Tabla 5. Aplicaciones principales de HPLC-ICP/MS a lo largo del s.XXI.

METODOLOGÍAS DE ESPECIACIÓN DE ARSÉNICO POR LC-ICP/MS					
1ª DÉCADA DEL s.XXI					
Matriz biológica					
Cromatografía	Fase móvil	Columna	Matriz	Especies	Referencia
IPC-ICP/MS	C ₆ H ₁₃ -SO ₃ H	Altima C18	Orina	AB, As ^{III} , As ^V , DMA ^V , MMA ^V	273
AEC-ICP/MS	(NH ₄) ₂ CO ₃	Hamilton PRP X-100	Orina	As ^{Sug} y DMAE	274
AEC-ICP/MS	(NH ₄) ₂ CO ₃	ICSep ION-120	Orina	AB, As ^{III} , As ^V , DMA ^V , MMA ^V , TMAO, DMAA, TMAP, DMAE	275
CEC-ICP/MS	Py	Ionospher 5C			
AEC-ICP/MS	(NH ₄) ₂ CO ₃	Hamilton PRP X-100	Orina	AB, As ^{III} , As ^V , DMA ^V , MMA ^V	276
AEC-ICP/MS	Na ₂ HPO ₄	Agilent G3154-65001	Orina		277
AEC-ICP/MS	NH ₄ HCO ₃	Dionex Ion Pack AS22	Orina		
CEC-ICP/MS	Py	Shodex RSPak NN-614	Orina	AB, As ^{III} , As ^V , DMA ^V , MMA ^V	278
Matriz agua					
AEC-ICP/MS	NaH ₂ PO ₄	Spherisorb ODS/NH ₂	Agua	AB, AC, As ^{III} , As ^V , DMA ^V , MMA ^V	279
AEC-ICP/MS	Na ₂ CO ₃	Hamilton PRP X-100	Agua	As ^{III} , As ^V	280
AEC-ICP/MS	NH ₄ H ₂ PO ₄	Hamilton PRP X-100	Agua	AB, As ^{III} , As ^V , DMA ^V , MMA ^V	281
Matriz animal y vegetal					
IPC-ICP/MS	C ₆ H ₁₃ -SO ₃ H	Altima C18	Pescado	AB, As ^{III} , As ^V , DMA ^V , MMA ^V	273
AEC-ICP/MS	NH ₄ H ₂ PO ₄	Hamilton PRP X-100	Arroz	As ^{III} , As ^V , DMA ^V , MMA ^V	282
AEC-ICP/MS	(NH ₄) ₂ CO ₃	Hamilton PRP X-100	Algas	AB, AC, As ^{III} , As ^V , DMA ^V , MMA ^V	283
Otras matrices					
IPC-ICP/MS	C ₆ H ₁₃ -SO ₃ H	Altima C18	CRMs	AB, As ^{III} , As ^V , DMA ^V , MMA ^V	273

2ª DÉCADA DEL s.XXI

Matriz biológica

AEC-ICP/MS	(NH ₄) ₂ CO ₃	Thermo HyperREZ XP	Orina	AB, As ^{III} , As ^V , DMA ^V , MMA ^V	284
AEC-ICP/MS	(NH ₄) ₂ CO ₃	AG7 microcolumn	Orina		285
AEC-ICP/MS	HNO ₃ +H ₂ O	Dionex Ion Pack AS7	Orina	AB, AC, As ^{III} ,	286
AEC-ICP/MS	(NH ₄) ₂ CO ₃	AG7 microcolumn	Orina	As ^V , DMA ^V , MMA ^V	287
AEC-ICP/MS	NH ₄ HCO ₃	Dionex Ion Pack AS22	Orina	AB, As ^{III} , As ^V , DMA ^V , MMA ^V , TMAO	288
AEC- ICP/MS	(NH ₄) ₂ CO ₃	Hamilton PRP X-100	Orina	AB, As ^{III} , As ^V , DMA ^V , MMA ^V	289
AEC- ICP/MS	NH ₄ H ₂ PO ₄	ESI AEX Integrado	Orina	AB, As ^{III} , As ^V , DMA ^V , MMA ^V	290
AEC-ICP/MS	NH ₄ HCO ₃	Dionex Ion Pack AS22	Saliva	AB, As ^{III} , As ^V , DMA ^V , MMA ^V , TMAO	288
AEC -ICP/MS	(NH ₄) ₂ CO ₃	Hamilton PRP X-100	Suero	AB, As ^{III} , As ^V , DMA ^V , MMA ^V	289

Matriz animal y vegetal

AEC-ICP/MS	NH ₄ H ₂ PO ₄	Hamilton PRP X-100	Algas	AB, AC, As ^{III} , As ^V , DMA ^V , MMA ^V , TMAO, AsSug	291
CEC-ICP/MS	Py	Zorbax SCX-300			
AEC-ICP/MS	(NH ₄) ₂ HPO ₄	Hamilton PRP X-100	Marisco	AB, AC, As ^{III} , As ^V ,	292
CEC-ICP/MS	Py	Zorbax SCX-300		DMA ^V , MMA ^V , TMAO	
AEC-ICP/MS	NH ₄ H ₂ PO ₄	Hamilton PRP X-100	Plantas	AB, As ^{III} , As ^V , DMA ^V , MMA ^V	293
AEC-ICP/MS	NH ₄ H ₂ PO ₄	Hamilton PRP X-100	Musgo	As ^{III} , As ^V	294
AEC-ICP/MS ²	(NH ₄) ₂ HPO ₄	Hamilton PRP X-100	Marisco	AB, As ^{III} , As ^V , DMA ^V , MMA ^V	295
IPC-ICP/MS	C ₄ H ₉ -SO ₃ H	Capcell PAK C18	Algas	AB, AC, As ^{III} , As ^V , DMA ^V , MMA ^V , TMAO	296
AEC-ICP/MS	NH ₄ H ₂ PO ₄	Hamilton PRP X-100	Champiñones	AB, As ^{III} , As ^V , DMA ^V , MMA ^V	297
AEC-ICP/MS	HCOOH	Thermo AS14			
RP-ICP/MS	AcOH	ACE Phenyl-C18	Algas	AsSug	298

Matriz alimentos

AEC-ICP/MS	NH ₄ H ₂ PO ₄	Hamilton PRP X-100	Algas	Tioarsenicales y AsSug	299
AEC-ICP/MS	(NH ₄) ₂ HPO ₄	Hamilton PRP X-100	Vino blanco	As ^{III} , As ^V , DMA ^V , MMA ^V	300
AEC-ICP/MS	NH ₄ H ₂ PO ₄	Hamilton PRP X-100	Trigo	As ^{III} , As ^V , DMA ^V , MMA ^V	301
AEC-ICP/MS	NH ₄ H ₂ PO ₄	Hamilton PRP X-100	Carne/pescado	AB, As ^{III} , As ^V , DMA ^V , MMA ^V	302
RP-ICP/MS	AcONH ₄ /EtOH	Waters Atlantis C18	Aceites marinos	AsLip	303
RP-ICP/MS	HCOOH/H ₂ O	Waters Acquity C18	Aceites marinos	AsLip	304
RP-ICP/MS	HCOOH/MeOH	Poroshell EC18	Aceites marinos	AsLip	305
AEC-ICP/MS	(NH ₄) ₂ HPO ₄	Hamilton PRP X-100	Bebida de arroz	As ^{III} , As ^V , DMA ^V , MMA ^V	306
AEC-ICP/MS	NH ₄ H ₂ PO ₄	Hamilton PRP X-100	Arroz	As ^{III} , As ^V , DMA ^V , MMA ^V	307
IPC-ICP/MS	C ₄ H ₉ -SO ₃ H	Capcell PAK C18	Aceites marinos	ⁱ As	308
AEC-ICP/MS	(NH ₄) ₂ HPO ₄	Hamilton PRP X-100	Arroz	As ^{III} , As ^V , DMA ^V , MMA ^V	309

Históricamente, existen dos maneras de abordar la especiación y depende, como no puede ser de otra manera, del tipo de analito. Las especies más comunes (AB, AC, As^{III}, As^V, DMA^V, MMA^V), que se corresponden con las analizadas en esta investigación, son ácidos y bases de Brönsted. Por este motivo, las cromatografías más comunes nuevamente son dos: la cromatografía iónica (IC)^{292,310} y la cromatografía de par iónico (IPC)^{308,311}. En definitiva, para la separación de especies cargadas o polares el enfoque más común consiste en abordar la separación desde el punto de vista de las diferencias de acidez o basicidad, o lo que es lo mismo, la carga neta molecular a un determinado valor de pH. Por otro lado, para especies más complejas y con una parte hidrofóbica importante, mayormente los As-Lip, se han desarrollado aplicaciones a través de la cromatografía de fase reversa (RP), debido a su carácter menos polar^{305,312}.

Su uso ha ido aumentando con el paso de los años debido al creciente conocimiento de la naturaleza de estos compuestos.

Recientemente, gracias al empleo de fases móviles que no requieren demasiado tiempo de equilibrado (≈ 30 min), se han vuelto a desarrollar metodologías con columnas de fase reversa empleando fases móviles iónicas, explotando el mecanismo típico de una Cromatografía de Par Iónico (IPC), interacciones polares y apolares al mismo tiempo³¹³.

Centrándonos en la cromatografía de intercambio aniónico, la más común de las técnicas de separación, sus principales ventajas son su gran versatilidad, los tiempos cortos de análisis, y el aumento de la productividad de cara a un análisis de rutina con un gran número de muestras. Para este tipo de cromatografía, el pH y el tipo de fase móvil son parámetros clave para mejorar el rendimiento de dicho modo de separación, y cómo se puede ver claramente en la Tabla 5, el uso de tampones a base de fosfato amónico ha sido y continúa siendo generalizado, debido principalmente a su elevada fuerza iónica que disminuye la retención de los analitos en la columna, garantizando además una selectividad y resolución aceptables con tiempos cortos de análisis, lo que juega a favor de analizar un gran número de muestras en poco tiempo. Sin embargo, fases móviles como fosfatos o sulfatos se catalogan como fases no compatibles con el equipo de ICP. Esto se pone de relieve mediante su dificultad para descomponerlos en el plasma del ICP, consecuencia de su alta estabilidad, ligado a su vez a su polaridad o fuerza iónica. Esto presenta un inconveniente fundamental, y es la deposición gradual de partículas salinas^{314,315}, afectando a la vida útil del instrumento, además de paradas no deseadas para la limpieza del material, que no siempre es efectiva y corta en el tiempo, y cuya concentración depende del número de muestras analizadas.

Asimismo, si bien la retención de los analitos es más baja que otras fases empleadas, en ciertas ocasiones este hecho puede acarrear problemas de resolución cromatográfica en un análisis convencional, normalmente entre AB, DMA^V y As^{III}. La naturaleza catiónica de la AB y la AC, la neutralidad del arsenito pH<9 y el TMAO y la poca polaridad del dimetilarsénico (V) con respecto al MMA^V y al arseniato, pueden resultar en una coelución o solapamiento parcial de sus picos al emplear fases móvil que limiten la retención de los analitos en la columna, como es el caso de los fosfatos^{299,316}. Esto supone un problema fundamental ya que, obviando la presencia de tioarsenicales.

En respuesta a estos problemas, ciertos autores optaron por utilizar oxidantes en cantidades controladas para transformar todo el arsenito en arseniato^{317,318}, requiriendo de comparación con el arsénico total, que si bien puede ser para paliar el problema de resolución, suele requerir de una segunda técnica, generalmente cromatografía de intercambio catiónico, para determinar el contenido de arsénico trivalente, lo que globalmente incrementa el tiempo de análisis por muestra.

El uso de otro tipo de cromatografías, como la cromatografía de par iónico o una fase reversa utilizando un tampón ácido/base con carga opuesta a la de los analitos a determinar, puede mejorar sustancialmente la resolución de los analitos. No obstante, los ácidos sulfónicos o carboxílicos empleados, así como las bases, principalmente, aminas o sales de amonio cuaternario, requieren largos tiempos de equilibrado de la columna que juegan en detrimento del tiempo de análisis y de la productividad, además de no solucionar el problema de la volatilidad de la fase móvil³¹⁹.

Otros grupos de investigación, sin embargo, han empleado fases compatibles con equipo de ICP-masas como son los carbonatos. Estos presentan una fuerza iónica aceptable pero menor que la de los fosfatos, aumentando los tiempos de análisis, su principal desventaja, pero mejorando sustancialmente la resolución de los picos cromatográficos debido al mayor tiempo de residencia de los analitos en la columna. Lamentablemente, ciertas publicaciones han encontrado problemas de deriva en la línea base de la señal del detector al emplear como tampones estos compuestos disminuyendo la calidad de la integración y cuantificación, además de disminuir la sensibilidad instrumental^{320,321}.

En la presente tesis se ha abordado la especiación de arsénico a través de un mecanismo de intercambio iónico acoplado a un ICP/MS de simple cuadrupolo (Q-ICP/MS), empleando una fase móvil compatible con ICP/MS. La fase móvil empleada ha sido acetato amónico, con propiedades similares a los carbonatos pero que reduce los tiempos de limpieza, no ofrece problemas de resolución para las especies relevantes analizadas y permite determinar éstas en un tiempo razonable para su uso previsto.

b) Fundamentos básicos de cromatografía

La cromatografía es una técnica de separación que depende intrínsecamente de las características fisicoquímicas y/o estructurales de los analitos y de su interacción con una fase estacionaria, a unas condiciones específicas de presión, temperatura y pH.

Este proceso tiene lugar a través de una sucesión de equilibrios de adsorción-desorción de los analitos con la fase estacionaria en función del gradiente de la fase móvil³²². La naturaleza y las características de la triada analito-fase móvil-fase estacionaria constituyen el eje fundamental del proceso de separación cromatográfica y cuyo rendimiento se determina a través de una serie de magnitudes cromatográficas (Tabla 6). Los tiempos de retención y las anchuras de los picos cromatográficos son, por tanto, función del tipo de fase estacionaria y de la fase móvil³²².

Existen varios tipos de fases estacionarias comerciales. La fase estacionaria es la parte que más tiempo está en contacto con los analitos, y que es directamente responsable de los equilibrios de adsorción-desorción de los mismos. Estos equilibrios vienen marcados por una serie de interacciones, que pueden ser muy intensas y polares (Fuerzas electrostáticas y/o enlace de hidrógeno), o interacciones mucho menos intensas y de naturaleza apolar o poco polar (Fuerzas London y/o dipolo-dipolo inducido). Cuánto más selectiva sea la fase estacionaria, más tiempo pasarán los analitos dentro de la columna, aumentando sus tiempos de retención.

La fase móvil puede estar constituida con uno o varios eluyentes. Si se utiliza un solo eluyente la separación cromatográfica es en modo isocrático. Si se utiliza dos o más eluyentes y a lo largo del cromatograma se va variando la proporción de entre ellos se dice que el modo de trabajo es en gradiente, es decir que se está modificando la fuerza elutropica de la fase móvil y los compuestos saldrán de la columna en función de su afinidad para con la fase estacionara y la fase móvil.

Tabla 6. Parámetros cromatográficos más relevantes

Parámetro	Abreviatura	Definición	Fórmula química
Tiempo básico	t_0	Tiempo que tarda en atravesar el sistema un compuesto no retenido	-
Tiempo de retención	t_R	Tiempo entre la inyección y la elución del analito del sistema	-
Factor de retención	k	Parámetro que indica la extensión de la retención de un compuesto. Relación entre el número de moles de soluto de las fases estacionaria y móvil	$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$
Factor de separación	α	También denominado selectividad. Refleja la retención selectiva de dos solutos, de tal forma que $\alpha > 1$	$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R,2} - t_0}{t_{R,1} - t_0}$
Resolución	R_s	Medida cuantitativa de la capacidad de una columna de separar dos compuestos	$R_s = 1.18 * \frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{w_{1/2,1} + w_{1/2,2}}$
Eficacia	N	Número de equilibrios o platos teóricos de una columna	$N = 5.56 \frac{t_R}{w_{1/2}}$

El esquema básico de un cromatógrafo de líquidos se muestra a continuación (Figura 15):

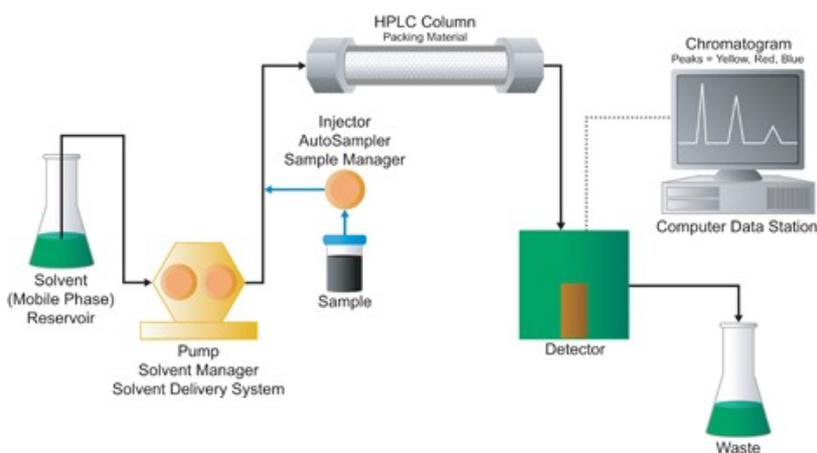


Figura 15. Esquema básico de un HPLC.

En definitiva, la combinación de todos los factores mencionados determina la separación de los analitos, y facilita la labor del detector, que en el caso concreto de esta tesis es un ICP/MS, cuyo fundamento se comenta a continuación.

c) Fundamentos básicos de ICP

Englobada dentro de la rama de la espectroscopía, la tecnología de Plasma de Acoplamiento Inductivo o ICP revolucionó el campo de los metales tanto por su sensibilidad, como por su versatilidad al poder ser aplicada para el análisis multielemental de muestras de todo tipo, especialmente medioambientales, biológicas, clínicas o forenses. El esquema básico de un ICP se muestra a continuación (Figura 16).

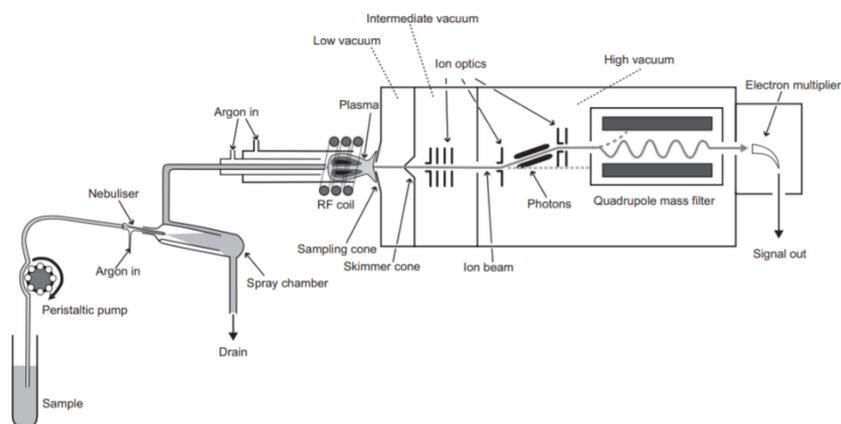


Figura 16. Esquema básico de un ICP/MS³²³

El sistema de introducción de muestra varía en función de si la matriz es líquida (simple aspiración) o sólida (ablación láser, atomización electrotérmica, arco voltaico, y montaje tipo Single-Cell o Single-Particle, entre otros). El resto del sistema es común, y consta de un nebulizador que introduce un flujo, constante de un gas inerte (argón) a alta velocidad, que junto con el flujo de muestra impulsado por una bomba peristáltica, parte éste en gotas muy finas (nebulización).

En función del contacto gas-muestra existen varios tipos de nebulizadores, los más comunes son los nebulizadores neumáticos, y dentro de este grupo, a su vez, se encuentran los concéntricos, los de flujo cruzado y los sólidos. El fundamento físico es el de transformar el flujo que viene de la bomba peristáltica en un aerosol³²³. Aunque menos comunes, los nebulizadores ultrasónicos utilizan el sonido en lugar de la presión para poder formar el aerosol.

El aerosol está formado en su mayoría por gotas de pequeño tamaño, pero dicha formación no es uniforme. Por ello, desde el nebulizador el flujo de gotas recorre un fino tubo hasta llegar a la cámara ciclónica, y por gravedad, se separan las gotas más pequeñas de las de mayor tamaño. Las primeras ascienden hasta la antorcha, en cuyo final se ubica el plasma, un gas en equilibrio con su forma ionizada, o como se conoce comúnmente, parcialmente ionizado, cuya reacción genera una energía tal que permite vaporizar, atomizar e ionizar los elementos químicos presentes en la muestra, debido a que las temperaturas alcanzadas en la misma rondan los 7000-8000 K. Este plasma, además, actúa como barrera energética al permitir la formación prácticamente en su totalidad de iones monovalentes³²³.

Con procesos de preparación de muestra generalmente sencillos y cortos, la utilización de esta técnica, permite el análisis rápido y eficaz de los elementos presentes en la muestra mediante dos variantes bien diferenciadas como consecuencia del proceso de ionización que tiene lugar en el plasma: el ICP-OES y el ICP/MS.

El primero, también conocido como ICP óptico, se sirve de la longitud de onda emitida como consecuencia de la ionización de los elementos químicos en el plasma. Esta longitud de onda es única y característica para cada elemento químico, y pasa por un sistema típico de detección espectroscópico que consta de una prisma o red de difracción y un detector a base de tubos fotomultiplicadores o un dispositivo CCD. Por otro lado, el ICP/MS utiliza una serie de lentes, conocidas como óptica o guías de iones, para dirigir los iones generados en el plasma hacia un analizador de masas. Así, una vez generado el plasma, los iones formados son focalizados hacia un espacio conocido como interfase, y pasan a través de unos filtros conocidos como conos.

Estos conos son unas piezas metálicas cuya forma geométrica la marca el nombre, ideados para enfocar un porcentaje representativo del conjunto de iones. Existen dos tipos, el “sampler”, que está en contacto directamente con el plasma, y el “skimmer”, que se encuentra a continuación. Algunas casas comerciales han comenzado a añadir un tercer cono de menor tamaño detrás del “skimmer”, denominado “hiperskimmer”.

Tras el paso de los conos, el flujo de iones es dirigido por la óptica o guía de iones. Esta zona consta de un juego de lentes que, mediante la aplicación de un potencial eléctrico, transmite la mayor cantidad posible de iones al analizador de masas. Existen varios tipos de analizadores de masas en función de la resolución.

El de menor resolución y el más sencillo es el cuadrupolo (Q-ICP/MS), cuatro varillas cargadas con potenciales opuestos dos a dos, y ubicadas en una posición determinada para generar un campo electromagnético con estructura hiperbólica. El análisis de los iones ocurre mediante la aplicación de diferentes voltajes que estabilizan la órbita de ciertos iones y desestabilizan otros, de acuerdo a la ecuación de Mathieu (Figura 17), cuyos parámetros principales son a y q ³²⁴.

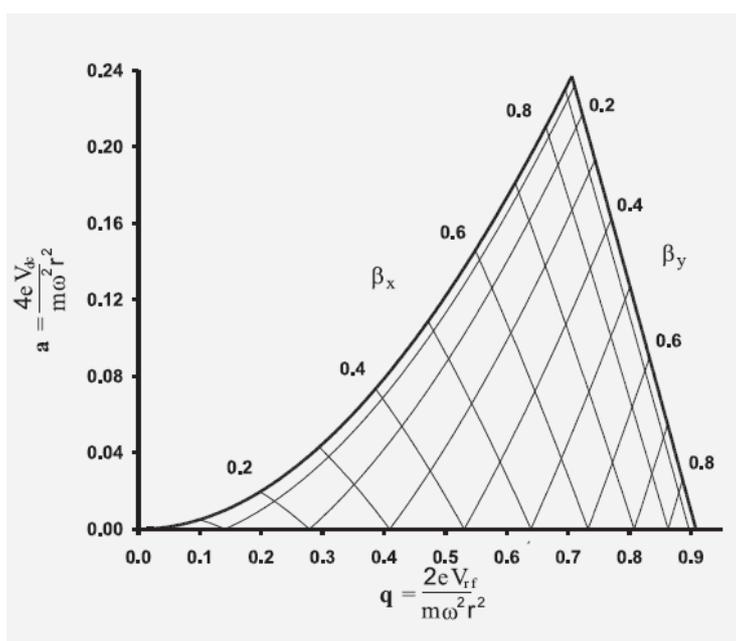


Figura 17. Órbita de estabilidad de un ion en un cuadrupolo³²⁴

Mediante la optimización de los parámetros a y q , se puede predecir las condiciones de estabilidad de los iones en el cuadrupolo. Pero de manera general, las masas pequeñas requieren menor voltaje que las masas de mayor tamaño. Todo esto lo realiza el equipo gracias a un calibrado de masas que se realiza rutinariamente.

Una mejora en el rendimiento y resolución de lo anterior se puede conseguir utilizando un triple cuadrupolo (ICP/MS/MS). El triple cuadrupolo consta de tres cuadrupolos en serie, aunque realmente actúan como tal el primero y el tercero, mientras que el segundo hace las veces de una celda de colisión o de reacción. De esta manera, el primer cuadrupolo filtra las masas deseadas, el segundo cuadrupolo introduce una corriente de gas de colisión (H_2 o He) o reacción (NH_3 , CH_4 u O_2) empleados como filtro de interferencias, y el tercer cuadrupolo filtra el ion característico de cada elemento.

Para alta resolución (HR-ICP/MS) se suele emplear un sector magnético (SF-ICP/MS). Estos instrumentos se sirven de un campo magnético focalizado para acelerar los iones generados a través de un sector de circular de 180° compuesto por una serie de rendijas ajustables a lo largo del mismo³²⁵. Así, en presencia de un campo magnético, el radio de giro de los iones es directamente proporcional a la masa isotópica de los analitos, o dicho de otro modo, los átomos más pesados realizarán órbitas más largas que los ligeros. Las rendijas ajustables en función de la resolución deseada permite el paso de los elementos pero no de sus interferencias³²⁵.

La resolución es un factor importante a la hora de elegir utilizar una u otra variante de la tecnología de ICP/MS. Ésta se ve gravemente mermada por la existencia de las interferencias propias de esta técnica, las interferencias isobáricas. Se denomina así al solapamiento espectral entre un analito y uno o varios interferentes con los que comparte la misma masa isotópica, como por ejemplo el $^{75}\text{As}^+$ y el $^{75}\text{ArCl}^+$ o el $^{64}\text{Zn}^+$ y el $^{64}\text{S}_2^+$, siendo la primera de ellas una interferencia poliatómica, y la segunda isotópica, los dos grandes grupos en los que se circunscriben las interferencias isobáricas. Este solapamiento puede corregirse, por un lado, con equipos que filtran las masas (QQQ-ICP/MS) o que discriminan por tamaño (SF-ICP/MS) y que trabajan, por tanto, con masa exacta³²⁵.

Sin embargo, en equipos con un solo cuadrupolo (Q-ICP/MS) es necesario un sistema de corrección de estas interferencias. Con esta intención nacieron los dos modos de trabajo típicos existentes hoy en día: uno por discriminación de energía cinética (KED) y otro por reacción química (DRC), desarrollados por Agilent y Perkin Elmer, respectivamente³²⁶.

El modo KED consiste en el suministro constante de un gas inerte, típicamente He, expulsado perpendicularmente a la corriente de iones de la muestra que proviene de la óptica de iones, creando un flujo de gas que choca con dicha corriente justo antes de llegar al cuadrupolo. Este modo está indicado para la corrección de interferencias poliatómicas y se basa en el hecho experimental que de las éstas presentan mayor tamaño que un ion monoatómico, y por tanto, las primeras sufren más choques por segundo que los segundos, lo que provoca que las interferencias salgan despedidas y no entren al cuadrupolo³²⁶.

El modo DRC también está ideado para corregir interferencias isotópicas y el gas utilizado en DRC, que suele ser NH_3 , CH_4 u O_2 , se mueve perpendicularmente al flujo de muestra reaccionando químicamente y formando un aducto, permitiendo la diferenciación de masa entre el analito y la interferencia (“mass shift”)³²⁶.

Si bien ambos modos de trabajo son efectivos para la eliminación de interferencias isobáricas y se aplican en rutina para el análisis de matrices biológicas especialmente difíciles por interferencias de matriz como orina y sangre total, presentan como principal desventaja la pérdida de sensibilidad por parte de los analitos.

Otro aspecto importante es la matriz. El arsénico puede encontrarse fácilmente en muestras medioambientales, especialmente en aguas³²⁷ y filtros PM_{10} ³²⁸, y en muestras biológicas. En estas últimas, y de acuerdo al camino que recorre este tóxico en nuestro organismo, se puede encontrar en pelos y uñas³²⁹, sangre³³⁰ y orina³³¹. Las uñas y los pelos están considerados biomarcadores de la exposición al arsénico a nivel crónico porque la acumulación constante de dicho tóxico favorece la deposición del arsénico inorgánico en la queratina presente en sendos medios.

Aunque en menor medida, existen estudios que demuestran la acumulación de arsénico orgánico en la forma de $\text{DMA}^{\text{III+V}}$, y $\text{MMA}^{\text{III+V}}$. Como principal desventaja, se tiene que no puede determinarse AB, AC ni ningún otro arsenical como los AsSug o As-Lip. Por todo ello, la matriz pelo suele ser elegida como biomarcador subrogado para la química clínica, comparado generalmente con el resultado de los análisis por sangre u orina, en aquellos casos en los que se pretenda discriminar entre una exposición crónica o puntual.

La sangre y la orina representan las dos matrices habituales en lo que a especiación de arsénico a nivel clínico y/o forense se refiere. La gran ventaja para ambos medios reside en que en ellas se puede determinar una gran gama de especies, en comparación a las uñas y el pelo. Además, es aplicable al análisis de intoxicaciones esporádicas y de pequeña incidencia. Sin embargo, la vida media de las especies en la sangre es mucho menor frente a aquella de la orina³³², siendo entre 24-72h en el caso de ingestión habitual de arsenicales (AB, AC, ^iAs , DMA^{V} y MMA^{V}) y hasta de 90h en el caso de AsSug y As-Lip.

Otro inconveniente de la sangre es que, si bien se ha observado un mayor número de metabolitos que en pelo y en uñas, no presenta la amplia gama de compuestos que si se excretan por la orina, pudiendo actuar como un biomarcador más adecuado³³³. El inconveniente principal de la orina reside en su elevada concentración de cloruros, lo que supone la fuente principal de interferencias a la hora de abordar la especiación de arsénico. Esto es debido a la formación del aducto poliatómico entre el ion cloruro y el gas del plasma conocido como $^{75}\text{ArCl}^+$ por acción de las altas temperaturas que se originan como consecuencia de aquél.

La separación cromatográfica previa de este aducto es crucial para todos aquellos equipos con simple cuadrupolo, puesto que la resolución obtenida no es suficiente como para poder discernir entre la señal del analito, $^{75}\text{As}^+$ y la propia del interferente $^{75}\text{ArCl}^+$. Adicionalmente, existe la opción de utilizar la tecnología de colisión y/o reacción descrita previamente, y sólo en el caso de que dicha interferencia se presente de manera sistemática y a concentración constante, se pueden emplear ecuaciones de corrección específicas para eliminarla.

En resumen, tras describir las principales fuentes de exposición al arsénico, su sintomatología descrita y las metodologías analíticas principales empleadas para su cuantificación, ha quedado puesto de relieve la existencia de numerosos compuestos de arsénico potencialmente tóxicos, lo que hace imprescindible el desarrollo de un método novedoso para la determinación de estos compuestos, o especies, debido al potencial efecto tóxico que comportan para la salud humana. En este sentido, la especiación de arsénico permite no sólo lo anterior al separar cromatográficamente, primero, y medir separadamente, las diferentes especies presentes en las muestras analizadas, sino que además es capaz de asignar adecuadamente el perfil toxicológico presente en éstas, al haber discriminado previamente las especies tóxicas de aquellas que no lo son.

Por todo ello, en esta investigación se ha elegido una metodología de especiación de arsénico por IC-ICP/MS utilizando un ICP/MS de simple cuadrupolo aplicada al análisis de muestras de orina y una ecuación de corrección para la interferencia de $^{75}\text{ArCl}^+$.

2.-Objetivos/Objectives

The main objectives of this study, derived from and firmly based on the bibliography described, are presented as follows:

- 1) To carry out two selective, sensitive, precise, accurate and cutting-edge methodologies, i.e, one based on a Total Arsenic Determination approach and the other one on Arsenic Speciation, both using ICP/MS as a detection technique in order to analyse arsenic levels in clinic samples.

- 2) To identify and quantify the main arsenic species found in a human population study and subsequently assess their toxicity taking into the account the concentration of the toxic and non-toxic species present in the samples analysed using the Arsenic Speciation Methodology developed.

- 3) To use the selected biomarkers to extract all the available and reliable information in order to determine the basal level of this element within the population studied as well as the most relevant toxicological and clinical implications based on the data assessment.

3.-Parte Experimental

3.1.-Reactivos

a) *Reactivos empleados en la metodología de arsénico total:*

- Arsenic standard solution As(V) = 1.000 g/l for ICP (Panreac Applichem, Darmstadt, Hesse, Germany)
- Germanio patrón ICP/MS 1000 ppm (Merck, Barcelona, España)
- Rhodio patrón ICP/MS 1000 ppm (Merck, Barcelona, España)
- Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EEUU)
- Ytrio patrón ICP/MS 1000 ppm (Merck, Barcelona, España)

b) *Reactivos empleados en la metodología de especiación de arsénico:*

- Acetato amónico HPLC grade (Scharlau, Barcelona, España)
- Ácido acético glacial, min. 99.8%, reagent grade (Scharlau, Barcelona, España)
- Ácido monometilarsénico (V) sal monosódica (MMA^V), min. 83.3% (LGC Standards/Dr. Ehrenstorfer, Barcelona, España)
- Ácido dimetilarsénico (V) (ácido cacodílico o DMA^V), min. 98% (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EEUU)
- Amoníaco 20-22% ultratrace[®] ppb-trace análisis grade (Scharlau, Barcelona, España)
- Arsenic (III) standard solution for ICP (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EEUU)
- Arsenic standard solution AsV = 1.000 g/l for ICP (Panreac Applichem, Darmstadt, Hesse, Germany)
- Arsenobetaína, min. 95% (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EEUU)
- Arsenocolina (bromuro de arsenocolina), min. 99.8% (TRC, North York, Ontario, Canadá)
- Fosfato amónico dibásico HPLC grade (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EEUU)
- Nitrato amónico (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EEUU)

c) Reactivos exclusivos para fines instrumentales (calibración, chequeo diario, etc)

- ELAN 6100 Setup/Masscal Solution (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA)
- ELAN Detection Limit Solution (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA)
- ELAN Dual Detector Solution (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA)

3.2.-Disolventes

- Ácido nítrico suprapur (Merck, Barcelona, España)
- Agua MilliQ (Merck Millipore, Merck, Barcelona, España)
- Metanol LC/MS (Panreac Applichem, Darmstadt, Hesse, Germany)

3.3.-Instrumentación

a) Cromatografía

- HPLC Series 1100 (Agilent, Santa Clara, California, EEUU) que consta de los siguientes módulos:
 - Desgasificador (Agilent, Santa Clara, California, EEUU)
 - Bomba cuaternaria (Agilent, Santa Clara, California, EEUU)
 - Columna de intercambio aniónico PRP X-100 (4,6 x 250 mm x 5 µm) de Hamilton (Reno, Nevada, EEUU)
 - Detector de Fluorescencia (Agilent, Santa Clara, California, EEUU)
 - Detector de Diodo Array (Agilent, Santa Clara, California, EEUU)
 - Dos válvulas Rheodyne de seis puertos con dos posiciones. Una de las válvulas tenía como función ser la línea de transferencia HPLC-ICP/MS y la otra se utilizó para inyectar el patrón interno al sistema (Waltham, Massachusetts, EEUU)

b) Espectroscopía

- ICP/MS ELAN 6100 DRC (Waltham, Massachusetts, EEUU) con los siguientes accesorios:
 - Automuestreador S-10 (Waltham, Massachusetts, EEUU)
 - Nebulizador concéntrico tipo Meinhard® (Golden, Colorado, EEUU)
 - Cámara ciclónica de vidrio (Waltham, Massachusetts, EEUU)
 - Antorcha de cuarzo (Waltham, Massachusetts, EEUU)
 - Conos sampler y skimmer de Níquel (Waltham, Massachusetts, EEUU)
 - Celda DRC® con un cuadrupolo para corrección de interferencias poliatómicas por gas de reacción (Waltham, Massachusetts, EEUU)
 - Analizador de masas de simple cuadrupolo (Waltham, Massachusetts, EEUU)

c) Otros

- Equipo de valoración automática Titrande 809® (Methrom AG, Herisau, Suiza)
- Equipo MilliQ Elements (Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, EEUU)
- Autoanalizador de Inmunoensayos Siemens Xpand Plus™ (Siemens, Munich, Alemania)

3.4.-Material volumétrico

a) Pipetas y micropipetas

- Micropipeta calibrada variable 2-20 µl (Brand, Wertheim, Alemania)
- Micropipeta calibrada fija 25 µl (Eppendorf, San Sebastián de los Reyes, Madrid, España)
- Micropipeta calibrada fija 50 µl (Brand, Wertheim, Alemania)
- Micropipeta calibrada fija 100 µl (Eppendorf, San Sebastián de los Reyes, Madrid, España)
- Micropipeta calibrada fija 250 µl (Brand, Wertheim, Alemania)

- Micropipeta calibrada fija 500 μl (Eppendorf, San Sebastián de los Reyes, Madrid, España)
- Micropipeta calibrada fija 1000 μl (Eppendorf, San Sebastián de los Reyes, Madrid, España)
- Micropipeta calibrada variable 100-1000 μl (Eppendorf, San Sebastián de los Reyes, Madrid, España)
- Pipeta calibrada variable 5 ml (Eppendorf, San Sebastián de los Reyes, Madrid, España)
- Pipeta calibrada variable 10 ml (Eppendorf, San Sebastián de los Reyes, Madrid, España)

b) Otros

- Frasco lavador de plástico estéril 2 l (VWR, Llinars del Vallès, Barcelona, España)
- Bote de recogida de muestra de plástico estéril 2 l (Nalgene)
- Vaso de precipitados 250 ml Pyrex (VWR, Llinars del Vallès, Barcelona, España),
- Pipeta Pasteur 1 ml (VWR, Llinars del Vallès, Barcelona, España)

3.5.-Preparación de disoluciones

a) Acetato amónico 20 mM pH=9 (Fase móvil A)

Colocar un vaso de precipitados de 250 ml en una balanza analítica, tarar y pesar 3.083 ± 0.001 g de AcONH_4 HPLC grade de Scharlau. A continuación, y con una probeta de 500 ± 5 ml, se recogen 200 ml de agua Milli Q dispensada por el dosificador MilliQ Elements.

Tras la disolución del acetato amónico, el vaso de precipitados se lleva al pHmetro automático del Titrande 809[®] y se ajusta el pH hasta 9.00 ± 0.05 con NH_3 ultratrace[®] de Scharlau, pipeteado gota a gota con una pipeta Pasteur de plástico.

Una vez que el pH está ajustado, se vierte el contenido del vaso de precipitados en un recipiente de plástico de 2 litros de capacidad. Alternativamente, con una probeta de 100.0 ± 0.5 ml se recogen 80 ml de MeOH LC/MS de Panreac y se añaden a dicho recipiente. Éste se enrasa hasta un volumen de 2 litros con agua MilliQ. Se conserva en nevera ($4 \pm 1^\circ\text{C}$).

b) *Acetato amónico 20 mM pH=5 (Fase móvil B)*

Colocar un vaso de precipitados de 250 ml en una balanza analítica, tarar y pesar 3.083 ± 0.001 g de AcONH_4 HPLC grade de Scharlau. A continuación, y con una probeta de 500 ± 5 ml, se recogen 200 ml de agua Milli Q dispensada por el dosificador MilliQ Elements. Tras la disolución del acetato amónico, el vaso de precipitados se lleva al pHmetro automático del Titrande 809® y se ajusta el pH hasta 5.00 ± 0.05 con AcOH glacial de Scharlau, pipeteado gota a gota con una pipeta Pasteur de plástico.

Una vez que el pH está ajustado, se vierte el contenido del vaso de precipitados en un recipiente de plástico de 2 litros de capacidad. Alternativamente, con una probeta de 100.0 ± 0.5 ml se recogen 80 ml de MeOH (4%) y se añaden a dicho recipiente. Éste se enrasa hasta un volumen final de 2 litros con agua MilliQ. Se conserva en nevera ($4 \pm 1^\circ\text{C}$).

c) *Preparación de la calibración de arsénico total*

El esquema de la calibración de arsénico total se encuentra a continuación (Figura 18):

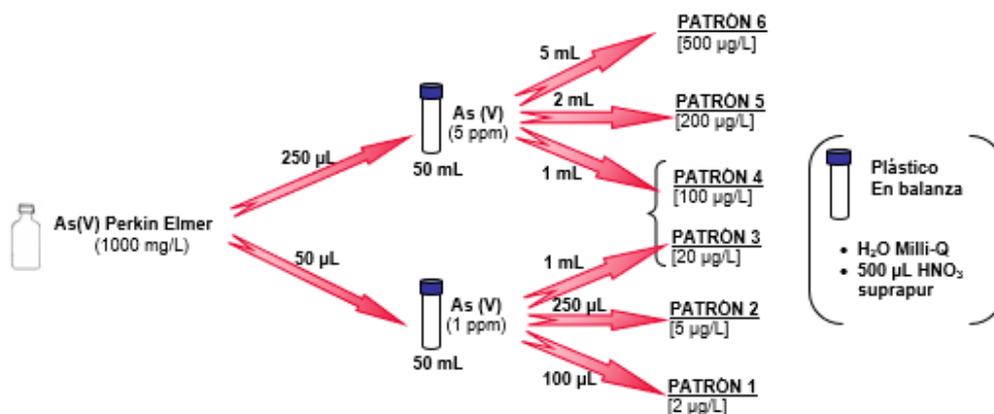


Figura 18. Esquema de calibración del método de arsénico total por ICP/MS

Las disoluciones intermedias de 5 y 1 mg/l se almacenan en nevera ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) durante 3 meses. Los patrones del calibrado se preparan diariamente a partir de sendas disoluciones intermedias. Todas las disoluciones son acuosas y contienen un 1% HNO_3 para su conservación. El volumen final es de 50 ml y los patrones se preparan en balanza analítica, utilizando micropipetas y pipetas calibradas anualmente para adicionar el volumen requerido en cada paso.

Una vez que los patrones están preparados se pipetan 500 µl con micropipeta fija de 500 µl de cada uno de ellos sobre un tubo Falcon de 15 ml. Posteriormente se adicionan 9.5 ml de la disolución contenedora del patrón interno (ver Preparación del Patrón Interno para arsénico total). La mezcla se agita en un vortex durante 30 segundos.

d) Preparación de la calibración de arsénico especiado

Primeramente, a partir de los reactivos madre, se preparan una serie de disoluciones intermedias que se van a etiquetar con los números 1, 2, 3 y 4, y cuyo esquema de elaboración se encuentra a continuación (Figura 19):

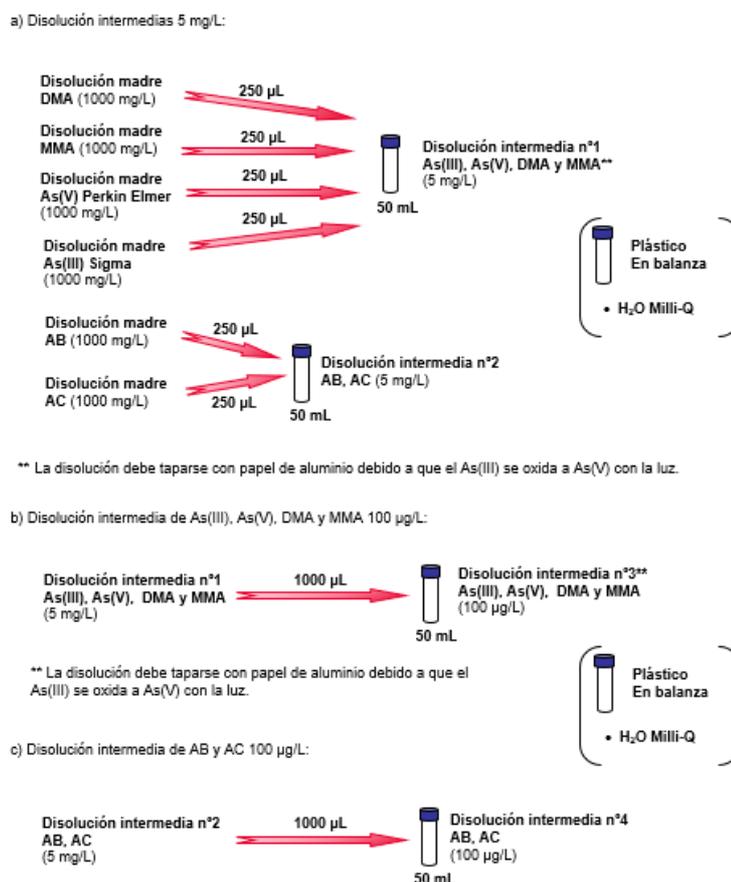


Figura 19. Esquema de preparación de las disoluciones intermedias para el método de especiación de arsénico

Todas las disoluciones intermedias se almacenan en nevera (4±1°C), las de 5 mg/L durante 3 meses y las de 100 µg/l durante 1 mes. Aquellas que contienen As(III) se recubren con papel de aluminio.

Los patrones del calibrado se preparan diariamente a partir de sendas disoluciones intermedias (Tabla 7). Todas las disoluciones son acuosas pero contienen un 4% MeOH para su conservación.

El volumen final es de 50 ml y los patrones se preparan en balanza analítica, utilizando micropipetas y pipetas calibradas anualmente para adicionar el volumen requerido en cada paso.

Tras la preparación, se pipetan 500 μ l con micropipeta fija de 500 μ L sobre sendos viales de plástico de 800 μ l de volumen y se cierran. Los viales se agitan en el vortex durante 30 segundos.

Tabla 7. Esquema de preparación de la calibración de especiación de arsénico

Punto	$V_{dis\ int\ n^{\circ}2}$ (μ l)	$V_{dis\ int\ n^{\circ}3}$ (μ l)	$V_{dis\ int\ n^{\circ}4}$ (μ l)	V_{MeOH} (ml)	V_F (ml)	Concentración final (μ g/l)
Blanco calibración	-	-	-	2	50	-
Patrón 1	-	250	500	2	50	1 AC, AB; 0.5 el resto
Patrón 2	-	500	5000	2	50	10 AC, AB; 1 el resto
Patrón 3	200	1000	-	2	50	20 AC, AB; 2 el resto
Patrón 4	500	2500	-	2	50	50 AC, AB; 5 el resto
Patrón 5	1000	5000	-	2	50	100 AC, AB; 10 el resto

e) Preparación de muestra para arsénico total

Se recogen 500 μ L de la muestra de orina y se adicionan 9,5 ml de la disolución contenedora de patrón interno sobre un tubo Falcon de 15 ml (dilución 1:20). La mezcla de agita en un vortex durante 30 segundos. Las muestras de orina se almacenan en un congelador ($-85\pm 1^{\circ}C$) para facilitar al conservación a largo plazo.

f) Preparación de muestra para arsénico especiado

Se recogen 50 μ l de la muestra de orina y se adicionan a un vial de plástico. Se pipetea 20 μ l de MeOH (4%) y se añaden 430 μ l enrasando la mezcla a 500 μ l (dilución 1:10). La mezcla de agita en un vortex durante 30 segundos. Las muestras de orina se almacenan en un congelador ($-85\pm 1^{\circ}C$) para facilitar al conservación a largo plazo.

g) Patrón interno para arsénico total

El esquema de preparación del patrón interno se incluye a continuación (ver Figura 20):

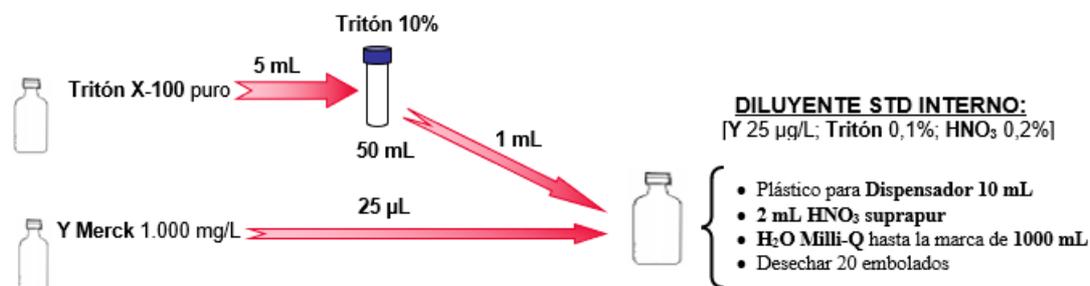


Figura 20. Preparación del patrón interno para arsénico total

La disolución del patrón interno se prepara diariamente sobre un frasco lavador de plástico de 1L añadiendo las cantidades requeridas con micropipeta y pipeta calibradas anualmente.

h) Patrón interno para arsénico especiada

El esquema de preparación del patrón interno se especifica a continuación (ver Figura 21)



Figura 21. Preparación del patrón interno para arsénico especiada

La disolución del patrón interno se prepara diariamente sobre un frasco lavador de plástico de 2 litros de capacidad añadiendo las cantidades requeridas con micropipeta y pipeta calibradas anualmente.

3.6.-Optimización de la señal instrumental

En primer lugar, y antes de abordar la optimización del sistema cromatográfico, se procedió a la correcta configuración del analizador de masas cuadrupolar del ICP/MS para garantizar la máxima respuesta posible para el canal m/z 75.

Esta técnica constituye una herramienta muy potente para el análisis elemental de matrices medioambientales, biológicas o alimenticias, entre otras, debido a su amplio rango dinámico lineal, la rapidez de sus analíticas y la simplicidad del proceso de preparación de muestra, convirtiéndose en la opción ideal para la determinación de elementos químicos a nivel de trazas y/o ultratrazas. Sin embargo, los dos inconvenientes principales de estos equipos residen en la elevada variabilidad de la señal instrumental, o deriva, y en la naturaleza de las interferencias.

Por ello es fundamental mantener una rutina constante de calibración y mantenimiento del instrumento para poder garantizar una sensibilidad adecuada, especialmente para trazas o ultratrazas. Por lo que respecta a la limpieza, cada día de trabajo se hizo pasar por todo el instrumental (desde el automuestreador hasta el analizador de masas) una disolución acuosa con un 2% HNO₃ durante un periodo aproximado de treinta minutos. En caso de acumulación de restos de matriz en el instrumental, se diseñó una serie de sistemáticas aplicadas según el tipo de componente.

En el caso de los conos, se realiza un lavado secuencial y en tres etapas mediante ultrasonidos, primero con un 1% HNO₃, luego con agua destilada para eliminar los restos de ácido y finalmente con MeOH para eliminar el agua, siendo cada uno de ellos de 10 minutos de duración. La antorcha y la cámara ciclónica se sumerge en una disolución acuosa de HNO₃ al 1%, y se lleva al ultrasonidos durante 10 minutos. El nebulizador usado es de tipo neumático, un Meinhard[®], y al ser de cuarzo, no se puede limpiar usando ultrasonidos, por lo que se mantiene sumergido durante al menos 20 minutos en una disolución 1% HNO₃.

Referente a la calibración, se evaluó el rendimiento del equipo cada día de trabajo con una disolución “tune” denominada Daily Performance Check, específicamente diseñada para hacer un barrido de masas en el rango bajo, medio y alto de masas, además de regular el porcentaje de óxidos y las dobles cargas, y controlar el ruido del equipo medido a partir de dos masas ficticias cuyos valores de corte se mencionan a continuación (ver Tabla 8):

Tabla 8. Criterios de aceptación del Daily Performance Check.

	Parámetro	Valor de corte
Rango bajo m/z	^{24}Mg	>40000 cps
Rango medio m/z	^{115}In	>300000 cps
Rango alto m/z	^{235}U	>200000 cps
Óxidos	$\%^{156}\text{CeO}/^{140}\text{Ce}$	$\leq 3\%$
Dobles cargas	$\%^{140}\text{Ce}^{++}/^{140}\text{Ce}$	$\leq 2,5\%$
Ruido	m/z 220	≤ 2 cps
Ruido	m/z 8,5	≤ 2 cps

Además, este equipo pasa anualmente los mantenimientos preventivos llevados a cabo por los técnicos de la casa comercial, en los que se ajustan tanto la calibración de masas como los parámetros relativos a la resolución de las masas.

La presencia de óxidos y dobles cargas afecta notablemente a la sensibilidad y ambos tienen su origen en el plasma. De acuerdo a la termodinámica, la reacción de generación de éste, establece una barrera de potencial que permite la formación casi exclusiva de iones monopositivos. No obstante, ciertos elementos pueden ionizarse hasta perder dos electrones, formando lo que se conoce como dobles cargas. Por otro lado, los óxidos son extremadamente reactivos y tienden a formar “clusters” al combinarse éstos con otros iones de la muestra. La explicación para ambos fenómenos parece residir en la diferencia de temperatura entre las zonas centrales y laterales del plasma, además de en las condiciones de operación.

Así, la formación de óxidos se cree que está ligada a la presencia de agua o disolventes oxigenados que al no evaporarse debidamente en el plasma, forma iones óxido^{334,335}, mientras que la de las dobles cargas se ha asociado a altos flujos de nebulización³³⁶. Sea como fuere, en ambos casos se produce un desplazamiento de la relación masa/carga, la consiguiente pérdida de sensibilidad para los elementos afectados, además de actuar como interferentes poliatómicos o isotópicos para otros analitos. En el caso del arsénico, éste presenta una alta afinidad por el oxígeno, por lo que se vigiló con especial precaución los niveles de óxidos generados.

Una vez establecidas las condiciones iniciales que permiten garantizar el buen rendimiento del equipo, se decidió optimizar paso por paso una serie de parámetros, para asegurar que el instrumento tenga una sensibilidad adecuada en la m/z 75. Estos fueron:

- Voltajes de los detectores analógico y de pulsos
- Alineamiento de la antorcha
- Voltajes de la óptica de iones
- Flujo de nebulización

Los voltajes de los dos detectores con los que cuenta el ICP/MS, el analógico (para intensidades menores de 2 millones de cps) y el de pulsos (para intensidades superiores a 2 millones de cps) se ajustaron estableciendo una relación directa entre la masa isotópica y el voltaje aplicado. Esto es importante porque a partir de 2 millones de cuentas entra en juego el detector de pulsos, y la respuesta intensidad-concentración puede verse afectada sino están correctamente alineados. Este ajuste se debe realizar al cambiar el detector y cuándo se observa una pérdida generalizada de cuentas.

Una vez ajustados los parámetros del detector, se llevó a cabo el alineamiento de la antorcha para obtener la máxima señal en el canal del arsénico. Tras lograr esto, este proceso se repitió exclusivamente en caso de retirada de la antorcha por motivos de mantenimiento o por sustitución, ya que en estos se puede perder el alineamiento logrado con la subsiguiente pérdida de sensibilidad.

El siguiente paso consistió en ajustar los voltajes de la guía u óptica de iones. Constan de una lentes que se encuentran en la zona de la óptica de iones y su importancia radica en que sirven de asistencia a la trayectoria de los iones desde la interfase hasta el analizador de masas.

Como último paso de la optimización de la señal instrumental, se ajustó el flujo de nebulización, cuya variación presenta una tendencia parabólica. En un inicio, el aumento del flujo del gas de nebulización aumenta la capacidad de ionización de los iones de la muestra, debido a que en el nebulizador el flujo de muestra se parte en gotas cada vez más pequeñas que son capaces de ascender por la cámara ciclónica hasta la antorcha. Por el contrario, para valores elevados, la ionización empieza a disminuir gradualmente como consecuencia del exceso de gas de nebulización.

Una vez optimizada la respuesta del ICP/MS para obtener la máxima señal posible arsénico se procedió a registrar la intensidad de la misma. Para ello, se preparó una disolución de 1 µg/l de arsénico, concretamente, As³⁺. Dicha disolución se preparó en un tubo falcon de 50 ml adicionando 49 ml de la disolución comercial de ajuste del ICP/MS (Daily Performance Check) y 1 ml de una disolución de As³⁺ preparada de 50 µg/l de concentración. De esta manera, las especificaciones del equipo se mantuvieron a la vez que se ajustaban los parámetros deseados con la señal m/z 75.

En base a lo todo lo anterior se establecieron una serie de protocolos de limpieza, mantenimiento y corrección de la señal instrumental (Figura 22) en caso de que disolución de control del equipo o la de arsénico constataran una pérdida de sensibilidad.

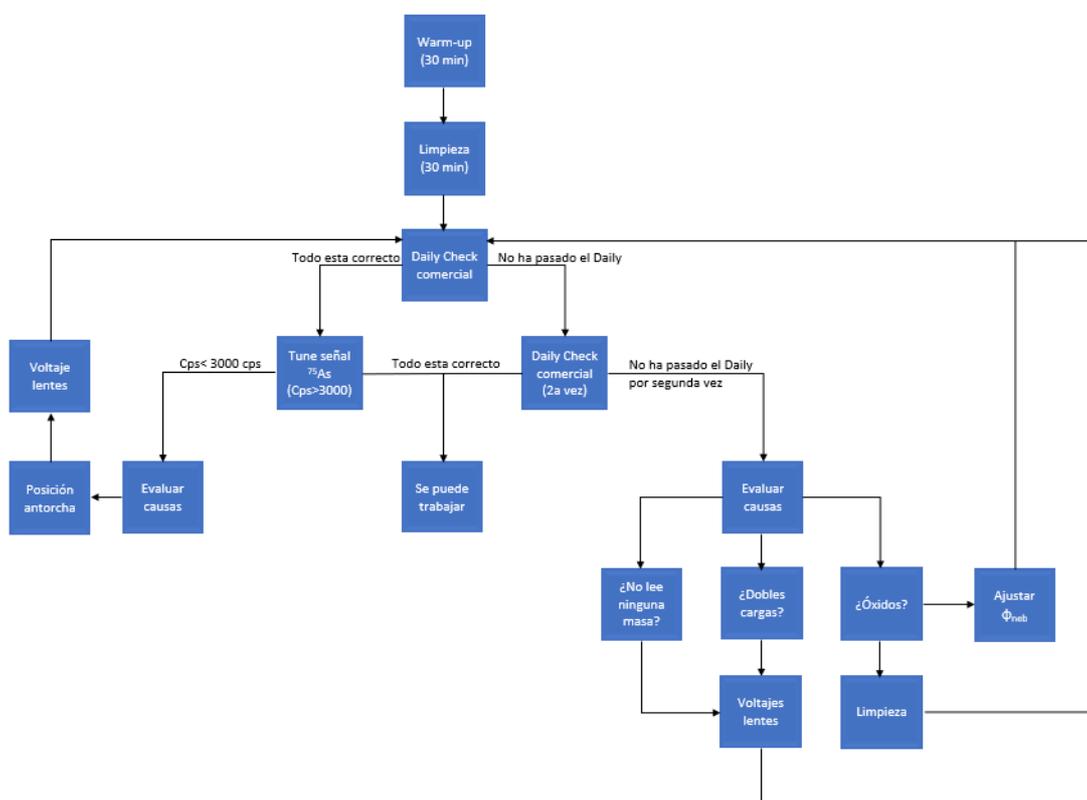


Figura 22. Flujo de trabajo para el mantenimiento preventivo del equipo. ϕ_{neb} =flujo de nebulización

Otro punto importante lo suponen las interferencias. Los filtros de interferencias actuales para los Q-ICP/MS son tres: utilizar un gas de reacción, un gas de colisión o una ecuación de corrección. El uso del gas de colisión se descartó debido a la configuración del equipo.

Como posibles opciones para gas de reacción, existen NH₃, CH₄, H₂ y O₂. De acuerdo a la bibliografía, los mejores resultados para el arsénico se consiguen con H₂³³⁷ y O₂³³⁸.

El principal problema del NH₃ es que reacciona tanto con la interferencia como con el analito³³⁹, por lo que puede presentar problemas para análisis de trazas, que es lo que se pretende en esta tesis, por lo que se descartó su uso. El CH₄, por el contrario, forma aductos que pueden incrementar el ruido de fondo por lo que presenta problemas de sensibilidad para con el arsénico³⁴⁰.

A pesar de todo, se optó por utilizar una ecuación matemática de corrección (ver Tabla 8) ya que según la bibliografía, demostró ser eficaz en determinaciones biológicas^{324,341} para eliminar la interferencia de ⁷⁵ArCl⁺.

Teniendo en cuenta lo anterior, las condiciones operacionales (Tabla 9) para la medición de la señal de arsénico en el ICP/MS ELAN DRC 6100 empleado fueron las siguientes:

Tabla 9. Parámetros operacionales del ICP/MS ELAN DRC 6100 para la señal de ⁷⁵As

Parámetro (unidad)	Valor
RF Power (W)	1250
Flujo de nebulización (ml/min)	1
Voltaje de las lentes (V)	4,5
Tiempo de integración (ms)	2500
Modo del detector	Estándar
Ecuación de corrección	-3,127[⁷⁷ ArCl-0,815(⁸² Se)]
%Óxidos (cómo ¹⁵⁶CeO/¹⁴⁰Ce)	≤3
%Dobles cargas (cómo ¹⁴⁰Ce⁺⁺/¹⁴⁰Ce)	≤2,5
Cutoff ⁷⁵As (cps)	3000*

*Medido con una disolución de 1 µg/l de As(III).

En resumen, una vez determinados los parámetros instrumentales y elegida la ecuación de corrección como posible filtro de interferencias, se decidió, pues, proceder con el diseño experimental del método de arsénico total en base a esas condiciones instrumentales.

3.7.-Optimización de la metodología de arsénico total

El método de arsénico total se diseñó para que, por un lado, éste fuera rápido y sensible para poder analizar el contenido de arsénico total y, por otro, que sirviera como valor de referencia para analizar el contenido de las especies y poder compararlo con éste.

La analítica de arsénico total en orina, permite analizar su contenido en apenas un minuto (sumándole los tiempos de demora estándar típicos de la limpieza de los canales, Wash Delay, y al tiempo que tarda desde que se inyecta la muestra hasta que llega al detector, Read Delay), muestra de la sobrada rapidez de la que hacen gala los análisis elementales por ICP/MS. En estos equipos, el patrón interno se emplea para normalizar las derivas de la señal provocadas por el efecto matriz. Si en el anterior apartado se hacía hincapié en la relación entre la respuesta instrumental y la sensibilidad, en este es importante tener en cuenta que el efecto matriz puede ocasionar un aumento o disminución de la señal, que termina afectando a los parámetros analíticos del método de medida, entre los que se encuentran la precisión, exactitud e incertidumbre^{342,343}. Tradicionalmente, las características que debe cumplir un buen patrón interno son tener una similar masa y potencial de ionización, para que los fenómenos de ionización y transporte a lo largo de la óptica de iones y en el cuadrupolo guarden similitud, haciendo que los ratios entre la señal del analito y la del patrón interno sean proporcionales, y por tanto compensando el posible efecto de deriva. Además, el patrón interno no debe estar presente en la muestra^{341,344}. En base a esto, se seleccionaron cinco candidatos a patrón interno: el germanio, el ytrio, el renio, el rodio y el bismuto (ver Tabla 10).

Tabla 10. Potencial de ionización y masa isotópica del arsénico y los patrones internos

Isótopo	Masa isotópica (uma)	Potencial de ionización (eV)*
⁷⁵ As	74,9216	9,7885
⁷³ Ge	72,6300	7,8994
⁸⁹ Y	88,9058	6,2172
¹⁰³ Rh	102,905	7,4589
¹⁸⁶ Re	186,207	7,8335
²⁰⁹ Bi	208,980	7,2855

*Valores de los potenciales de ionización de acuerdo a la base de datos NIST.

Para seleccionar el mejor candidato a patrón interno se prepararon una serie de calibraciones para cada uno de ellos y se evaluaron los siguientes tres parámetros: los residuales estandarizados, la pendiente y el coeficiente de correlación.

El esquema de preparación de la calibración se encuentra recogido en la sección correspondiente (ver 3.5.-Preparación de disoluciones). Para asegurar la buena calidad de los resultados, los patrones se prepararon diariamente teniendo en cuenta que a las disoluciones intermedias de 1 y 5 mg/l se les otorgó una caducidad de 1 y 2 meses, respectivamente.

En cualquier caso, si alguna de las dos disoluciones se agota antes de cumplirse el periodo de validez (generalmente la de 5 mg/l), se preparan todas desde cero. Para el caso del ytrio, se llevó a cabo adicionalmente un test F de linealidad. Además, se estudiaron los estadísticos de precisión y exactitud, expresada como veracidad para cada patrón interno a través del empleo de dos materiales certificados de referencia (CRM) y un QC. Los pormenores relativos a los resultados de estas pruebas así como los concernientes a la selectividad y el cálculo del límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) se encuentran descritos más adelante (*ver sección 4.1.-Validación de la metodología de arsénico total en orina*). En resumen, las condiciones instrumentales del método de arsénico optimizado son (Tabla 11):

Tabla 11. Condiciones instrumentales de la metodología de arsénico total por ICP/MS

Parámetro (unidad)	Valor
Isótopo	⁷⁵ As
Tiempo de integración (ms)	2500
Modo del detector	Estándar
Ecuación de corrección	-3,127[⁷⁷ ArCl-0,815(⁸² Se)]
V_{muestra}	500 µl
Rango de la calibración	2-500 µg/l
Patrón interno	⁸⁹ Y
Precisión	<4%
Veracidad (exactitud)	<3%
Límite de Detección	0,16 µg/l

3.8.-Optimización de la metodología de arsénico especiada

a) Elección del tipo de cromatografía

Como ya se comentó en la introducción (*ver sección 1.4.-Metodologías analíticas de especiación de arsénico*) los tres tipos de cromatografías principales más extendidas para la especiación de arsénico han sido: cromatografía de fase reversa (RP), cromatografía iónica (IC) y cromatografía de par iónico (IP). En un primer paso, se decidió analizar la separación cromatográfica de una disolución multiespecies de 100 µg/l de AB, AC, As^{III}, As^V, DMA^V y MMA^V en una columna de fase reversa (Ascentis® C18; 100 x 2,1 mm x 3 µm) y una columna de intercambio iónico con una resina de poliestireno y divinilbenceno unida a un resto de tetraalquilamonio actuando como resina de intercambio aniónico (Hamilton PRP X-100; 4,6 x 250 mm x 5 µm).

Se descartó el uso de cromatografía de par iónico debido fundamentalmente a los largos tiempos de equilibrado de las fases móviles típicas de este tipo de separación. Teniendo en cuenta los problemas de resolución entre las especies del frente (AC y AB), As^{3+} y el DMA^{V} reportados en la bibliografía se empleó como fase móvil para ambos experimentos un tampón de 5 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4/(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ pH=9,2.

Teniendo en cuenta las constantes de acidez de los analitos elegidos (Figura 23), a este pH existe una diferencia en la carga neta suficientemente diferente como para teóricamente poder separar el arsenito de las especies no retenidas AC y AB, y a su vez del DMA^{V} . En base a los resultados cromatográficos, esto sí se consiguió para la cromatografía de intercambio iónico pero no para la fase reversa, resultando en tres picos pegados unos a otros, producto de la coelución y mala resolución, o dicho de otro modo, la inadecuada retención de las especies como consecuencia de la elevada polaridad y propiedades ácido-base de las especies estudiadas, eligiendo finalmente la cromatografía de intercambio iónico.

En este sentido, y teniendo en cuenta las dos variantes principales, esto es, la cromatografía de intercambio aniónico (AEC) y la cromatografía de intercambio catiónico (CEC) y atendiendo a las constantes de acidez de las mismas, se optó por una cromatografía de intercambio aniónico, dado que de las seis especies que se pretenden analizar eran mayoritariamente ácidas.

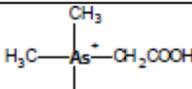
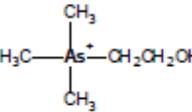
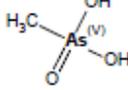
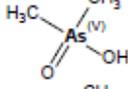
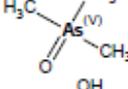
Name	Abbreviation	Structural Formula	pK _a
Arsenobetaine	AB		-
Arsenocholine	AC		-
Monomethyl arsenate	MMA		4.1, 8.7
Dimethylarsinic acid	DMA		6.2
Trimethylarsine oxide	TMAO		-
Arsenic (V) acid (arsenate)	As(V)		2.2, 7.0, 11.5
Arsenous (III) acid (arsenite)	As(III)		9.2, 12.1, 13.4

Figura 23. Nomenclatura, abreviatura, estructura química y constantes de acidez (pKa) de las principales especies de arsénico

En resumen, la cromatografía de intercambio aniónico (AEC) fue elegida como método de separación para la especiación de arsénico.

b) Estudio de la fase móvil

Durante el desarrollo de la metodología de especiación se emplearon dos fases móviles. En primer lugar, el tampón fosfato amónico, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4/(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, de uso común en la bibliografía debido a su estabilidad, elevada polaridad, alta densidad y fuerza iónica, se empleó para estudiar el efecto del pH y la concentración sobre los seis analitos seleccionados.

Posteriormente, se llevó a cabo un diseño experimental similar aunque más amplio con la segunda y definitiva fase móvil, el acetato amónico, $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ o AcONH_4 .

Comparando los valores de densidad entre las fases tradicionales (fosfato y carbonato amónico) en este tipo de aplicaciones con las del acetato amónico se encontró que la densidad del fosfato amónico (1,62 g/ml) es ligeramente superior a aquella del carbonato amónico (1,50 g/ml), otro tampón bastante común para este tipo de cromatografía, y mucho mayor que la del acetato amónico (1,17 g/ml).

Su mayor densidad explica el motivo de su extenso uso, ya que una elevada densidad le otorga, a su vez, una mayor viscosidad, acortando los tiempos de retención y reduciendo los tiempos de análisis. Por otro lado, el fosfato tiene dos equilibrios de disociación adicionales, lo que hace que pueda presentar una carga neta más alta en función del pH, lo que también puede influir a la hora de disminuir la retención de las especies estudiadas, al interactuar en mayor medida con el relleno de la columna.

Sin embargo, en forma aniónica, el acetato es más estable que el fosfato al presentar un mejor solapamiento orbitalico entre el oxígeno y el carbono, que entre el primero y el fósforo, a pesar de que ambos logran deslocalizar la carga negativa mediante la compartición de un par de electrones con el átomo contiguo (Figura 24). Además, la interacción entre este anión y el amonio es más fuerte, debido al grupo metilo del acetato, y a su efecto inductivo dador, típico de los radicales carbonados, por lo que su interacción con la fase estacionaria presumiblemente es menor, facilitando la retención de los analitos, al ocupar éstos los sitios activos de la misma, al competir menos con la fase móvil. La principal ventaja del acetato amónico radica en que se volatiliza en el plasma en forma de CO₂, cosa que no ocurre con el fosfato, que se deposita en forma de restos salinos en los conos y la interfase, principalmente, pudiendo causar fenómenos de desactivación del plasma, así como paradas indeseadas y largas para llevar a cabo labores de limpieza y/o mantenimiento.

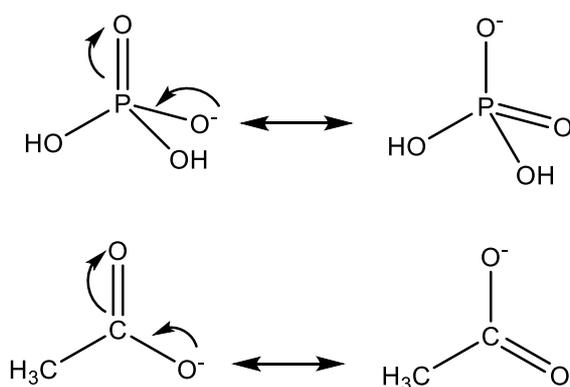


Figura 24. Formas resonantes del fosfato y acetato como medio de estimar la estabilidad de ambos aniones.

En base a todo lo anterior, se procede a describir la optimización de metodología con fosfatos y acetatos, respectivamente, para poder corroborar el papel y el grado de influencia de las propiedades físicoquímicas descritas (densidad, viscosidad, estabilidad, etc).

c) *Diseño experimental de la metodología con fosfatos*

Por lo que respecta a la fase móvil de fosfato amónico, se estudió la influencia del pH y la concentración de la fase móvil en la retención y resolución de los seis arsenicales analizados, para poder obtener una condiciones finales favorables con esta fase móvil, y poder así contrastar la efectividad así como los principales inconvenientes de ésta a la hora de realizar un análisis de especiación.

El diseño experimental incluyó tres valores de pH: 7,2, 9,2 y 11,2. Con respecto al pH, y utilizando como base una publicación previa llevada a cabo en los laboratorios del ITOXDEF³⁴⁵, se buscó pivotar alrededor del pH 9,2, valor de pK_{a1} de la primera constante de disociación del ácido arsenioso, para poder mejorar la separación en la región cercana al frente, concretamente, dos unidades de pH arriba y abajo, ya que AB, DMA^V y As^{III} presentan valores R_s<1.5, algo común con la utilización de este tipo de eluyentes. En cuanto a los valores de concentración, o fuerza iónica, éstos fueron 5, 10 y 20 mM.

Los valores de concentración se eligieron de tal manera que no implicasen una acumulación excesiva de sales, además, este tipo de fases no requiere de elevadas concentraciones para obtener una separación decente, más bien al contrario, debido a su elevada fuerza iónica.

Los tiempos de retención de los analitos de los experimentos realizados se muestran a continuación (Tablas 12-14):

Tabla 12. Tiempos de retención para las seis especies empleadas en función del pH con la fase móvil de 5 mM

TIEMPOS DE RETENCIÓN PARA NH₄HPO₄ 5 mM EN FUNCIÓN DEL pH						
pH	AC	AB	As^{III}	DMA^V	MMA^V	As^V
7,2	2,94	2,94	3,00	8,03	10,2	22,9
9,2	2,91	2,91	3,70	4,72	10,2	19,8
11,2	2,91	2,91	3,38	3,36	4,79	24,4

Tabla 13. Tiempos de retención para las seis especies empleadas en función del pH con la fase móvil de 10 mM

TIEMPOS DE RETENCIÓN PARA NH₄HPO₄ 10 mM EN FUNCIÓN DEL pH						
pH	AC	AB	As^{III}	DMA^V	MMA^V	As^V
7,2	2,85	3,01	3,01	5,00	12,9	19,7
9,2	2,81	2,81	3,30	3,86	5,93	9,31
11,2	2,78	2,78	3,92	3,73	7,17	10,8

Tabla 14. Tiempos de retención para las seis especies empleadas en función del pH con la fase móvil de 20 mM

TIEMPOS DE RETENCIÓN PARA NH_4HPO_4 20 mM EN FUNCIÓN DEL pH

pH	AC	AB	As^{III}	DMA^V	MMA^V	As^V
7,2	2,96	2,96	2,96	2,96	3,62	6,07
9,2	2,96	3,01	3,15	3,42	4,45	5,76
11,2	2,95	3,43	3,43	3,43	4,81	6,43

Para poder justificar estos valores hay que entender que la cromatografía es un juego compuesto por tres participantes: la fase móvil, la fase estacionaria y los analitos. Por lo que respecta al pH, y en las condiciones cromatográficas utilizadas, la fase móvil y los analitos modifican su carga en función del pH, y es necesario tener este efecto en cuenta.

La fase estacionaria, sin embargo, presenta una carga constante como consecuencia de su composición. Ésta contiene un polímero de poliestireno-divinilbenceno (PSDVB) ligado a amonios cuaternarios como grupos terminales, concretamente, $^+\text{NMe}_3$. Esto hace que la carga se mantenga constante y positiva

En cuanto a las especies y a la fase móvil (NH_4^+ , $\text{pKa}=9,25$; H_3PO_4 , $\text{pKa}_1=2,14$, $\text{pKa}_2=7,20$, $\text{pKa}_3=12,32$), utilizando como base las constantes de acidez correspondientes se han establecido las cargas netas de todos los componentes presentes en la columna cromatográfica a los tres valores de pH medidos (tabla 15).

Tabla 15. Distribución de cargas en función del pH

pH	AC	AB	As^{III}	DMA^V	MMA^V	As^V	NH_4^+	H_3PO_4
7,20	+1,0	0	0	-1,0	-1,0	-1,4	+1,0	-1,5
9,20	+1,0	0	-0,50	-1,0	-1,7	-2,0	+0,55	-2,0
11,2	+1,0	0	-1,0	-1,0	-2,0	-2,6	0	-2,0

Las estructuras de la AC y la AB contiene un átomo de arsénico en estado de oxidación es 4, y por tanto, cargado positivamente. Sin embargo, si bien la AC es catiónica en todo el rango de pH, la AB, forma oxidada de la AC, posee un grupo carboxilo, que a $\text{pH}>2.9$ se encuentra desprotonado, convirtiéndose en un zwitterion, y bajo ciertas condiciones puede separarse cromatográficamente de la otra especie catiónica. Aún con todo, ambas especies aparecen siempre en el frente cromatográfico como consecuencia de su carga positiva.

El ácido arsenioso, que a juzgar por sus constantes de acidez debería ser considerado una base, tiene un átomo central de arsénico cuya valencia es +3. Presenta carácter neutro en una gran parte del intervalo, sufriendo la primera desprotonación a un pH moderadamente básico (9,2), aumento progresivamente su carga neta según se incrementa la basicidad del medio.

El resto de especies poseen un átomo de arsénico con un estado de oxidación +5, además de un carácter ácido mucho más acentuado que el ácido arsenioso. No obstante, éste decrece a medida que se incrementa el número de metilos de la estructura. En otras palabras, el orden de acidez para las tres especies es: $\text{DMA}^{\text{V}} < \text{MMA}^{\text{V}} < \text{As}^{\text{V}}$.

Este hecho se encuentra directamente relacionado con los grupos unidos al átomo central de arsénico y el efecto inductivo que presentan. Así, los grupos metilo ceden densidad electrónica por hiperconjugación, que ocurre entre un orbital sp^3 del carbono y un orbital d del arsénico. A la vez, por diferencia de electronegatividad entre el oxígeno de los OH y el átomo central, el enlace As-O, y por consiguiente, O-H, se fortalece cuanto mayor sea el efecto inductivo asociado.

De hecho, esta disminución del carácter ácido como consecuencia del fortalecimiento del enlace O-H se traduce en un aumento de 2 unidades de pKa por cada nuevo metilo, aproximadamente (Figura 23). Este hecho constituye una de las principales dificultades a la hora de establecer unas buenas condiciones para una buena separación cromatográfica en este campo. Teniendo en cuenta el sistema de funcionamiento de la cromatografía de intercambio aniónico, fuertemente influenciada por la carga de los analitos, dado que, a mayor carga, mayor retención, y teniendo en cuenta estas diferencias de pKa de ± 2 , esto complica la separación pues es difícil alcanzar unas condiciones de compromiso útiles para todos los arsenicales de estado de oxidación +3 y +5, dado que los otros dos, al tener una carga positiva, tienden a eluir en el frente cromatográfico. En definitiva, y por lo que respecta al pH, el orden de elución a los tres valores estudiados está directamente relacionado con la carga de las especies en los nueve experimentos realizados.

El otro factor de estudio fue la concentración de la fase móvil. Como era previsible, su incremento incidió sustancialmente en los tiempos de retención de las especies, pudiendo explicar el orden concreto de las mismas en función de su carga neta en función del pH.

Así, a 5 y 10 mM el orden de elución se encontró fuertemente influenciado por ambos factores, función de la carga neta a los diferentes pH y con un tiempo total de análisis menor acorde con el incremento de la concentración.

En este sentido, y centrándonos en el caso de pH 7,2 y 5 mM de concentración, se observó que, a mayor carga negativa, mayor retención, consecuencia de la interacción entre las especies aniónicas arsenicales y la fase estacionaria sobre los aniones arsenicales.

En el caso concreto del DMA^V y MMA^V, ambos con la misma carga, la retención del primero fue menor. Analizando su estructura química se puede concluir que el efecto inductivo de los grupos metilo puede explicar esta cuestión. Así, el derivado dimetilado presenta una carga negativa más acentuada como consecuencia de la cesión de densidad electrónica por hiperconjugación de los dos radicales CH₃ frente a sólo uno del monometilado (Figura 25).

Al estar más acentuada la carga para el arsenical dimetilado, es más nucleófilo y por tanto, la interacción con los iones amonio de la fase móvil es más fuerte, viajando más rápidamente y disminuyendo su tiempo de retención. Por otro lado, y teniendo en cuenta el tamaño molecular, el MMA^V es más pequeño que el DMA^V por lo que puede acceder más fácilmente a los sitios activos de la fase estacionaria, con los que establece interacciones electrostáticas debido a la carga opuesta de ambas partes, además de posibles interacciones apolares entre los metilos y la parte aromática y olefínica del relleno. Ambos factores permiten justificar la mayor movilidad del DMA^V a lo largo de la columna y su mayor elución con respecto al MMA^V. El comportamiento del resto de especies se explica en función de su carga neta.

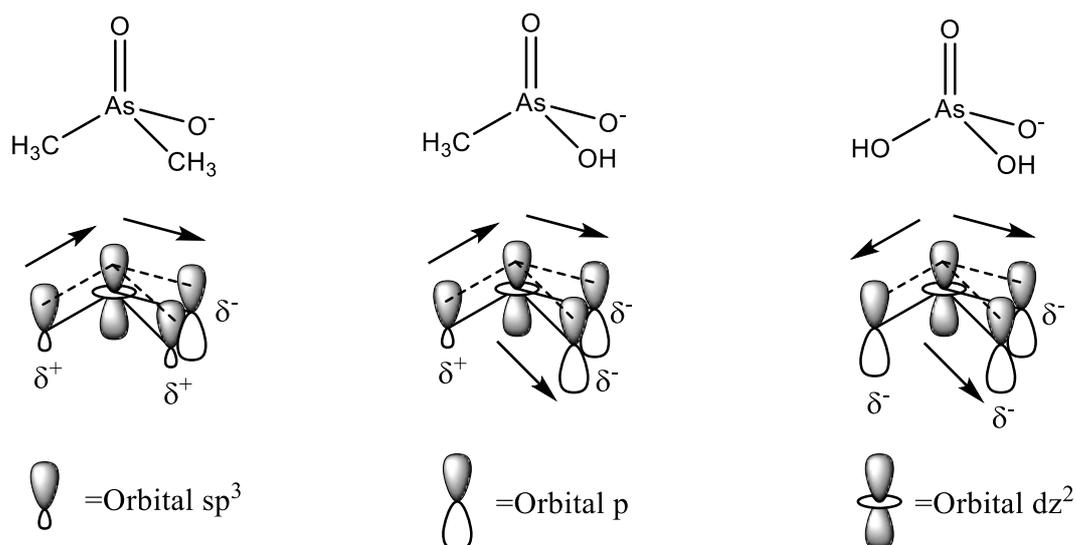


Figura 25. El efecto inductivo aumenta la basicidad de los aniones arsenicales

En el caso de 5 mM y pH 9,2, ocurre un cambio también en la estructura de la fase móvil. Concretamente, más de la mitad del amonio se ha transformado en amoníaco y el equilibrio ácido-base del fosfato está completamente desplazado hacia la forma de monohidrógenofosfato. En definitiva, la fase móvil a pH 9,2 posee menos carga positiva y más carga negativa.

Por lo que respecta a los analitos, las especies As^{III} , MMA^{V} y As^{V} han perdido un protón más con respecto al caso anterior y, por tanto, poseen una carga neta negativa mayor. Sin embargo, y para el caso del As^{III} , DMA^{V} , MMA^{V} y As^{V} el comportamiento no fue el esperado. Así, se observó que el tiempo de retención (t_{R}) del arsenito aumentó mientras aquellos del DMA^{V} y As^{V} disminuyeron, especialmente en el primer caso. Por último, la retención del MMA^{V} permaneció sin cambios.

Una posible explicación puede residir en que la desprotonación del arsenito y su mayor inestabilidad con respecto a los otros oxoaniones tanto de arsénico como de fósforo, fruto de la imposibilidad de deslocalizar la carga negativa, permite explicar su fuerte interacción con la fase estacionaria, retrasando su elución.

Con respecto a las especies pentavalentes, la estabilidad vendría definida por la carga, la posibilidad de deslocalizar la misma, y la afectividad del solapamiento (Figura 26). Teniendo en cuenta esto, el orden de estabilidad creciente propuesto es $\text{MMA}^{\text{V}} < \text{As}^{\text{V}} < \text{DMA}^{\text{V}}$.

En base a esto, a mayor carga negativa, y por tanto mayor reactividad que el dimetilarsénico. Ahora bien, el efecto inductivo del grupo metilo del MMA^V permite que el oxígeno con carga negativa posea mayor densidad electrónica que el arseniato, siendo éste más reactivo que el arseniato. Este orden por sí sólo, sin embargo, no permite justificar el efecto observado en los tiempos de retención. Por tanto, nuestra propuesta es que se genera una situación de competencia entre los aniones de los analitos y el monohidrogenofosfato de la fase móvil por los grupos -NMe₃⁺ del relleno de la columna afectando mayoritariamente a las especies pentavalentes doblemente cargadas, por ser más reactivas, provocada por la menor concentración de NH₄⁺.

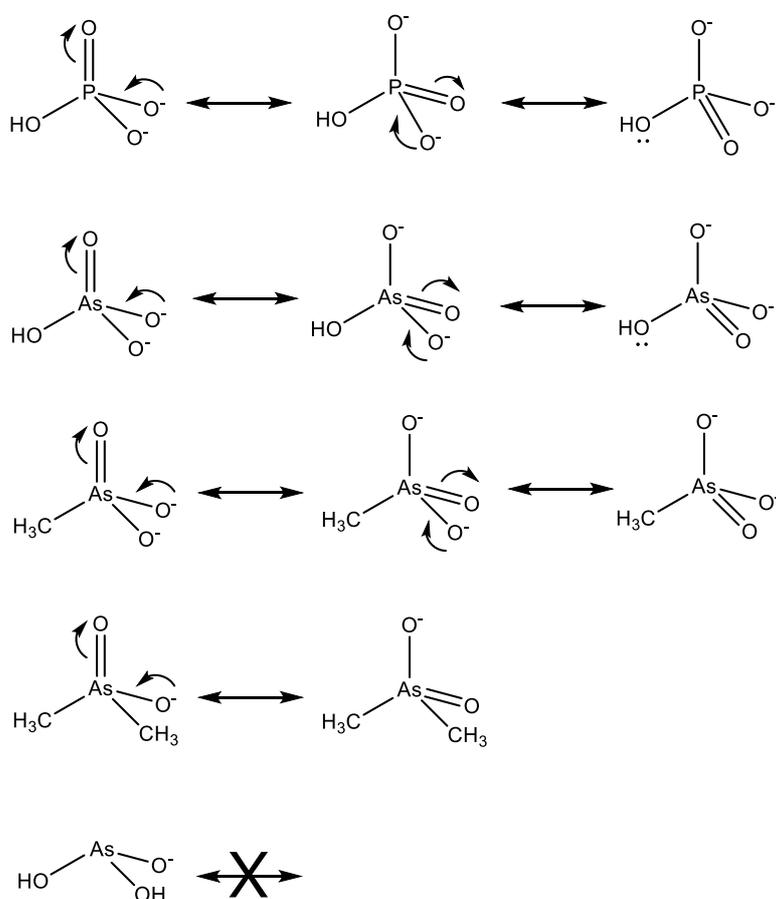


Figura 26. Estabilidad por resonancia de los aniones existentes en el sistema cromatográfico

En contraposición a lo que ocurría a pH 7,2, al aumentar la basicidad el amonio se encuentra ahora en mayor proporción como amoniaco que como amonio, y la interacción entre éste y el HPO₄²⁻ es menor, quedando libre para interaccionar con el relleno de la columna. Lo mismo ocurre con los analitos, que no son arrastrados con tanta fuerza por el amonio como antes y esto origina la competición por ocupar los sitios activos de la fase estacionaria según se van desplazando por la columna.

Por tamaño, el átomo de P es más pequeño que el de As por lo que las interacciones iniciales favorecerían la ocupación de estos sitios activos con grupos monohidrógenofosfato, siendo desplazados en función de la reactividad de los analitos que se encuentren cerca.

Como se ha justificado antes, el arsenito, MMA^{V} y As^{V} son los más reactivos, por lo que el efecto sobre la retención debería observarse más para el primero, menos para el segundo y mucho menos para el tercero, cosa que justifica porque el arsenito se retiene más, el monometil se mantiene igual, y el arseniato un pelín menos. En cuanto al DMA^{V} , al no ser tan reactivo como el resto migra por la columna interaccionando con el amonio de la fase móvil, o bien por repulsión con los demás aniones, especialmente con los del fosfato, que ahora están en mayor proporción, ya que los sitios activos están siendo gradualmente ocupados por los otros aniones.

Por último, a pH 11,2, se observa una menor retención generalizada de los analitos, excepto para el arseniato. Esto se explica porque en estas condiciones todo el amonio de la fase móvil se encuentra en forma de amoníaco, quedando el fosfato completamente libre para interaccionar con la fase estacionaria, en mayor medida que en los casos anteriores, lo que impide la retención de los analitos, que ahora poseen una carga neta mayor, excepto el dimetilarsénico. Concretamente, el arseniato ha adquirido una carga superior a la del fosfato, por lo que es el único que puede desplazar al fosfato de manera generalizada, y provocando que su tiempo de retención aumente, mientras que el resto de especies no son tan afines por poseer menos carga que el arseniato.

El efecto de competición entre el fosfato y los aniones formados en las condiciones de pH estudiadas va desapareciendo según aumenta la concentración de la fase móvil, prueba de que, al aumentar la proporción de la misma, el ratio entre éste y los diferentes aniones es más favorable hacia el primero, desapareciendo dicha competición.

En conclusión, el pH fue el más factor más relevante, debido fundamentalmente a las propiedades ácido-base de las seis especies de arsénico, sólo siendo opacado cuándo la concentración de la fase móvil es lo suficientemente alta como para que, por un lado, desaparezcan los efectos de competición entre los contraiones de la fase móvil y los analitos, y por otro, se produzca pérdida de resolución cromatográfica.

Por lo que respecta al orden de elución, a rasgos generales la AC y la AB aparecen el frente, y coeluyendo en la mayor parte de los casos, a excepción de los casos de 10 mM y pH 7,2 así como 20 mM y pH 11,2.

En este último caso, lamentablemente, la AB coeluyó con arsenito y dimetilarsénico. La elución del resto de especies guarda una situación de compromiso entre las cargas de las mismas influenciadas por el pH, el efecto de la fuerza iónica de la fase móvil y su competición con los analitos, llegando a su punto álgido para la concentración máxima de fosfato, encontrando tiempos de retención más bajos que para el resto de condiciones. Esto es lógico dado que, a mayor concentración, mayor es la densidad local de la fase móvil y mayores las interacciones con la fase estacionaria, disminuyendo los sitios activos disponibles, y por tanto, las interacciones con los analitos, afectando sensiblemente a la resolución, prueba de la pobre cromatografía que tuvo lugar a las citadas condiciones.

En base a todo lo estudiado, las condiciones finales de trabajo con el tampón fosfato fueron: 6 mM y pH 9,2 (Tabla 16, Figura 27). En estas condiciones, los tiempos de retención son ligeramente parecidos a aquellos de obtenidos para 5 mM y pH 9,2, aunque existen diferencias, como la resolución a línea base entre AC y AB ($R_s=1,50$). En general, los valores del parámetro de retención son aceptables, exceptuando aquellos de AC y AB, ya que salen en el frente.

Tabla 16. Parámetros cromatográficos del método de especiación de arsénico con fosfato amónico

<u>PARÁMETRO</u>	<u>AC</u>	<u>AB</u>	<u>As^{III}</u>	<u>DMA^V</u>	<u>MMA^V</u>	<u>As^V</u>
<i>t_R/min</i>	2,44	2,96	4,09	5,50	13,0	21,9
<i>k</i>	0,165	0,326	1,51	3,87	8,16	11,6
<i>α</i>		1,97	4,63	2,56	2,11	1,42
<i>R_s</i>		1,50	4,40	9,34	18,6	9,28

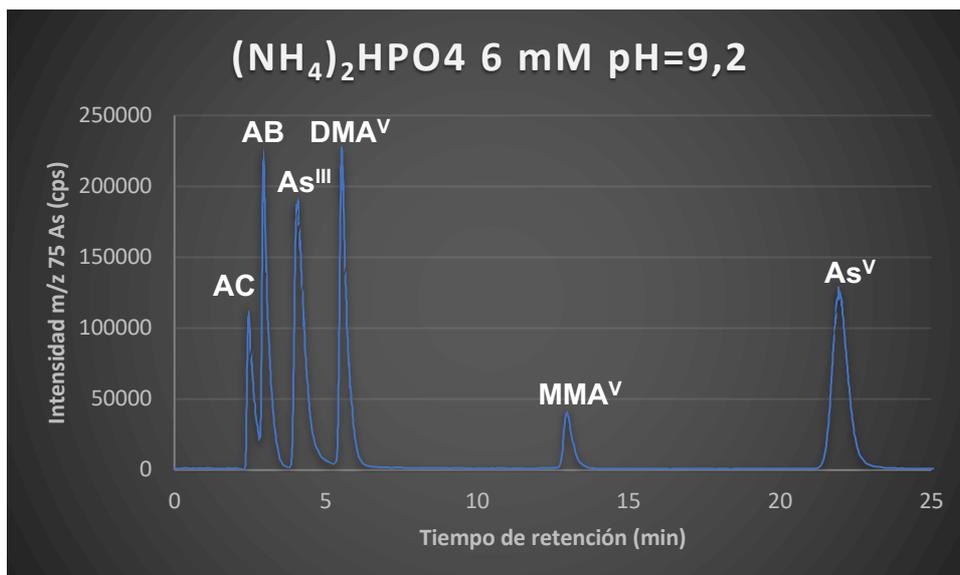


Figura 27. Cromatograma típico de 100 $\mu\text{g/l}$ para cada especie con la fase móvil de fosfato amónico

Lamentablemente, y a pesar de que las condiciones obtenidas mediante el diseño experimental son aceptables, debido al uso continuado del tampón fosfato, se observaron depósitos graduales de sales en la zona de los conos y la interfase, a pesar de emplear concentraciones tan bajas, por lo que finalmente se optó por buscar una alternativa a esta fase móvil, el acetato amónico.

d) Diseño experimental de la metodología de acetatos

Para esta fase se optó por un diseño que incluyera cuatro valores de pH (5, 7, 9 y 11) y cuatro de concentración (5, 10, 20 y 40 mM), tomando como base aquellos del estudio previo con fosfatos. Teniendo en cuenta la diferencia en las propiedades fisicoquímicas del acetato amónico con respecto al fosfato amónico, se incluyó un cuarto de valor de concentración, 40 mM, para compensar el posible aumento en los tiempos de retención. Por otro lado, la elección del pH=5 se planteó para poder disminuir la carga neta sobre las especies más ácidas, y poder así acelerar su elución.

En base a lo anterior, se llevaron a cabo dieciséis experimentos, cada uno con un valor específico de concentración y pH. Cada uno de éstos se codificó con un número y se realizaron aleatoriamente las preparaciones y mediciones para cada uno de los dieciséis puntos (Tabla 17).

Tabla 17. Diseño experimental con pH y concentración de fase móvil (mM) realizado

#Experimento	pH	Conc. (mM)	#Experimento	pH	Conc. (mM)
1	9	20	9	11	20
2	7	10	10	9	5
3	5	20	11	11	40
4	11	5	12	7	5
5	9	40	13	5	10
6	5	5	14	7	40
7	7	20	15	9	10
8	5	40	16	11	10

Las cargas calculadas (Tabla 18) y los tiempos de retención obtenidos para los dieciséis experimentos se muestran a continuación (Tablas 19-22):

Tabla 18. Distribución de cargas en función del pH

pH	AC	AB	As^{III}	DMA^V	MMA^V	As^V	NH₄⁺	AcOH
5,0	+1,0	0,0	0,0	0,0	-0,95	-1,0	+1,0	-0,60
7,0	+1,0	0,0	0,0	-0,80	-1,0	-1,5	+1,0	-1,0
9,0	+1,0	0,0	-0,40	-1,0	-1,7	-2,3	+0,75	-1,0
11,0	+1,0	0,0	-1,0	-1,0	-2,0	-2,6	0	-1,0

Tabla 19. Tiempos de retención obtenidos para AcONH₄ 5 mM en función del pH. ND=no detectado

TIEMPOS DE RETENCIÓN PARA AcONH₄ 5 mM EN FUNCIÓN DEL pH							
pH	AC	AB	As^{III}	DMA^V	MMA^V	As^V	
5	1,89	2,90	3,03	5,59	37,1	135	
7	2,19	2,90	3,16	11,7	18,1	280	
9	2,43	2,91	5,62	30,9	180	≥360	
11	2,90	2,90	ND	68,3	108	340	

Tabla 20. Tiempos de retención obtenidos para AcONH₄ 10 mM en función del pH. ND=no detectado

TIEMPOS DE RETENCIÓN PARA AcONH₄ 10 mM EN FUNCIÓN DEL pH							
pH	AC	AB	As^{III}	DMA^V	MMA^V	As^V	
5	1,94	2,90	3,03	4,32	20,2	22,9	
7	2,15	2,95	2,95	12,0	18,9	≈300	
9	2,31	2,90	4,80	20,7	119	≥360	
11	2,82	2,82	ND	42,4	68,6	300	

Tabla 21. Tiempos de retención obtenidos para AcONH_4 20 mM en función del pH. ND=no detectado

TIEMPOS DE RETENCIÓN PARA AcONH_4 20 mM EN FUNCIÓN DEL pH						
pH	AC	AB	As^{III}	DMA^V	MMA^V	As^V
5	2,10	2,92	2,92	3,75	11,3	21,0
7	2,25	2,92	3,03	8,85	12,3	123
9	2,24	2,84	4,47	11,8	62,0	≥360
11	2,91	2,86	ND	21,2	37,3	195

Tabla 22. Tiempos de retención obtenidos para AcONH_4 40 mM en función del pH. ND=no detectado

TIEMPOS DE RETENCIÓN PARA AcONH_4 40 mM EN FUNCIÓN DEL pH						
pH	AC	AB	As^{III}	DMA^V	MMA^V	As^V
5	2,29	2,91	3,02	3,56	6,83	11,1
7	2,35	2,92	3,03	5,88	7,25	37,2
9	2,58	2,92	3,80	6,30	17,6	58,7
11	2,77	2,86	ND	5,57	30,4	84,0

En vista de los resultados obtenidos, se confirma que el efecto del pH sobre las especies de arsénico influye de manera similar sobre el orden de elución, como ya se discutió en el estudio de los fosfatos. De manera similar, un aumento de la concentración de la fase móvil disminuye la retención de los analitos, con mayor ratio incluso que en el caso de los fosfatos. Sin embargo, para aquellas condiciones de baja fuerza iónica o elevada carga la retención de las especies es excesivamente elevada.

Esto tiene su explicación en la propia naturaleza de la fase móvil, que posee menos fuerza iónica que el fosfato amónico, debido a su menor densidad y menor polaridad, además de una menor carga neta a los pH testados. Esto se demuestra comparando los resultados obtenidos, por ejemplo, para una concentración de 20 mM de ambas fases, y a un pH similar (7,0 vs 7,2).

El acetato amónico tarda seis veces más en eluir todos los compuestos que el fosfato amónico, demostrando el acierto a la hora de añadir un pH más ácido para que las especies estuvieran menos cargadas, o una mayor concentración para compensar la excesiva retención. Por otro lado, la naturaleza de los enlaces de esta fase le permite establecer interacciones más fuertes con la fase estacionaria dado que el solapamiento entre C-O y NR_3^+ es superior al que se genera por el P-O y As-O.

No obstante, el acetato presenta menor carga neta que las especies de arsénico analizadas, por lo que, a menos que la fase móvil posea valores altos de concentración que compensen este hecho, la mayor nucleofilia o carga neta de los analitos va a tender a interactuar más fuertemente que la propia fase móvil, lo que a su vez también contribuye al aumento de la capacidad de retención de las especies de arsénico.

De entre todas las condiciones testeadas, la más próxima a una situación óptima se encontró al usar acetato amónico 20 mM, ya que en los ensayos a pH 5 el tiempo total de análisis fue aceptable. Lamentablemente, la AB y el As^{III} se encuentran coeluidas a estos valores, por lo que se desestimó su aplicabilidad. Por otro lado, para esa misma fuerza iónica pero a pH 9, la retención y resolución de esos mismos compuestos además de aquellas del DMA^{V} fueron considerablemente menores, como consecuencia de la mayor retención al poseer mayor carga neta por el aumento del pH. Sin embargo, esto mismo también supone que las especies más ácidas se retengan más.

En definitiva, ninguna de las condiciones del estudio cumplió con los requisitos de retención y resolución, por lo que se descartó el uso de esta fase móvil en modo isocrático. No obstante, se valoró el empleo de un modo gradiente para poder combinar la escasa retención de las especies menos ácidas a un pH débilmente básico (9,0), y así evitar la coelución o la mala resolución de las especies menos retenidas (AC, AB, As^{III} y DMA^{V}), con la utilización de un pH ácido (5,0) para que así las especies más ácidas tengan menos carga negativa y eluyan más rápidamente. Para ello, se decidió utilizar un pH automático con agitador magnético para calcular el tiempo de equilibrio y el pH resultante al mezclar la fase ácida con la básica, para poder predecir el comportamiento de las especies de arsénico durante el equilibrado entre la fase 1 y la fase 2.

Así, se midió el pH de la fase inicial, que idealmente se pretendía que fuera 9, dando como resultado 9,005, depositado sobre un vaso de precipitados de 25 ml lleno con un volumen de 4,15 ml, equivalente al volumen de la columna cromatográfica (4,6 x 250 mm x 5 μm). Tras esto, se adicionó una cantidad equivalente de fase móvil de pH 5, B, (pH=5,003), observando que el pH cayó hasta 7,12, hasta que pasados unos 2 minutos, y habiendo adicionado el 100% de la fase de pH ácido, empezó a estabilizarse en 5.

Con esta información se ideó una serie de gradientes de prueba con tiempos de mezclado de 2 min, hasta que finalmente se obtuvieron las condiciones finales (Tabla 23), con un tiempo total de análisis de 30 min seguido de un periodo de estabilización del sistema de 10 min.

Tabla 23. Esquema del gradiente cromatográfico utilizado para la especiación de arsénico

PROGRAMA DEL GRADIENTE DE ESPECIACIÓN DE ARSÉNICO		
Tiempo (min)	%Fase móvil A	%Fase móvil B
0-4	100	0
4-6	0	100
6-28	0	100
28-30	100	0
30-40	100	0

La fase móvil A por tanto, fue AcONH₄ 20 mM pH 9 y la fase móvil B AcONH₄ 20 mM pH 5.

Una vez obtenido el gradiente, se determinó el frente cromatográfico (Figura 28). Para ello, se configuró el instrumento para detectar el canal de la m/z 23 y se inyectó el patrón de Na⁺, de 100 µg/l de concentración, preparado a partir de una disolución comercial de 1000 mg/l de Perkin Elmer por simple dilución. Al minuto 2,02 se observó un pico ancho e intenso correspondiente al frente, ya que al tratarse de una columna con un relleno cargado positivamente, un catión como el sodio no se quedaría retenido bajo ningún concepto en la misma.

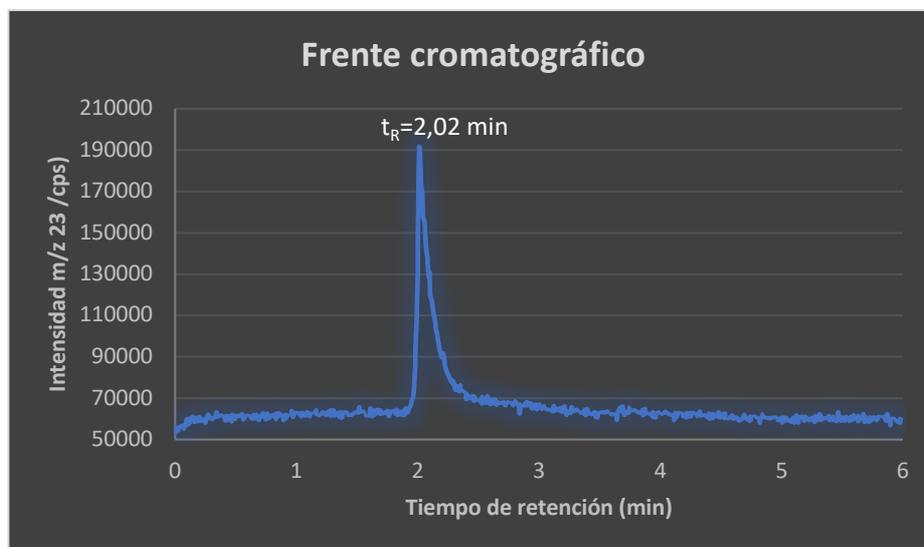


Figura 28. Cromatograma de una disolución de 100 µg/l de Na para medir el frente cromatográfico

Por último, y una vez conocido el frente, se calcularon los parámetros cromatográficos del modo gradiente establecido en las condiciones descritas (Tabla 24, Figura 29):

Tabla 24. Parámetros cromatográficos del método de especiación de arsénico con acetato amónico

<u>PARÁMETRO</u>	<u>AC</u>	<u>AB</u>	<u>As^{III}</u>	<u>DMA^V</u>	<u>MMA^V</u>	<u>As^V</u>
<i>t_R</i>/min	2,42	3,09	5,09	9,84	18,5	25,5
<i>k</i>	0,198	0,530	1,52	3,87	8,16	11,6
α	2,68	2,87	2,55	2,11	1,42	
<i>R_s</i>	0,988	2,31	5,29	10,9	3,25	

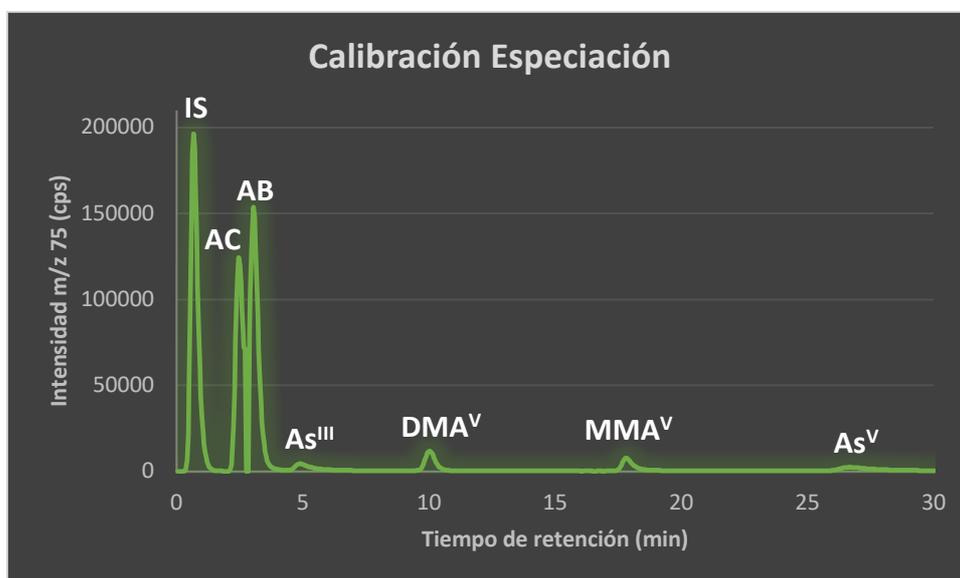


Figura 29. Tiempo de retención de las seis especies analizadas

En vista de los parámetros cromatográficos calculados, el problema de resolución observado en modo isocrático se solucionó al aplicar este modo gradiente. En este sentido, los picos cercanos al frente como tradicionalmente son el As^{III} y el DMA^V, se encuentran bien separados y resueltos, no necesitando de estrategias de oxidación o fases móviles no compatibles con ICP/MS para la correcta separación y determinación de estas especies inorgánicas y orgánicas por antonomasia.

Adicionalmente, el empleo de acetato amónico como fase móvil implicó otras ventajas adicionales como que tras el uso continuado de esta fase no se detectó residuo salino alguno de la misma ni en la interfase ni en los conos, probablemente debido a que esta fase se descompone en forma de CO₂, una ventaja con respecto al empleo de fosfatos.

Tampoco se observó ningún tipo de deriva instrumental, como si ocurre al utilizar fases móviles de carbonato. Sin embargo, el principal problema de esta fase radica en la mayor retención cromatográfica que con respecto a otras más comunes, ya que el tiempo total del cromatograma fue de 30 minutos, con 10 minutos más de equilibrado entre pinchazo y pinchazo.

En definitiva, el modo gradiente desarrollando empleando como fase móvil acetato amónico presenta ventajas con respecto a los métodos tradicionales en términos de resolución cromatográfica y inexistencia de derivas de la línea base, por lo que se procedió a validar la presente metodología cuyos pormenores se describen más adelante. Los principales parámetros de esta metodología son (Tabla 25):

Tabla 25. Condiciones instrumentales de la metodología de especiación de arsénico

Parámetro	Valor		
Volumen inyección muestra (μ l)	20		
Temperatura de la columna ($^{\circ}$ C)	25		
Flujo de la columna (ml/min)	1		
Fase móvil A (μ mol/ml)	Acetato amónico 20 mM pH 9		
Fase móvil B (μ mol/ml)	Acetato amónico 20 mM pH 5		
<i>Esquema del gradiente:</i>			
<i>Tiempo (min)</i>	<i>Flujo (ml/min)</i>	<i>%Fase A</i>	<i>%Fase B</i>
0-4	1	100	0
4-6	1	100→0	0→100
6-28	1	0	100
28-30	1	0→100	100→0
30-40 (Equilibrado)	1	100	0

4.-Resultados

4.1.-Validación metodológica del arsénico total en orina

a) Calibración: rango y linealidad

Se utilizó una calibración interna con patrones preparados en medio acuoso (ver sección 3.4.-Preparación de disoluciones), con un rango lineal desde 2 hasta 500 $\mu\text{g/l}$ (Figura 30), divididos en seis puntos (2, 5, 20, 100, 200 y 500 $\mu\text{g/l}$), y un blanco de calibración. Los cinco patrones internos fueron: Y, Bi, Ge, Rh y Re. Esta calibración se repitió a lo largo de seis días no consecutivos ($n=6$).

La bondad de la calibración se determinó utilizando el valor medio del coeficiente de variación, CV(%), en condiciones de reproducibilidad, de los residuales estandarizados del coeficiente de correlación (r^2) medio y de la pendiente para las seis curvas y para cada uno de los patrones internos (Tablas 26-30). Además, se representaron gráficamente la media de los residuales estandarizados para cada patrón interno (Figura 31a-e).

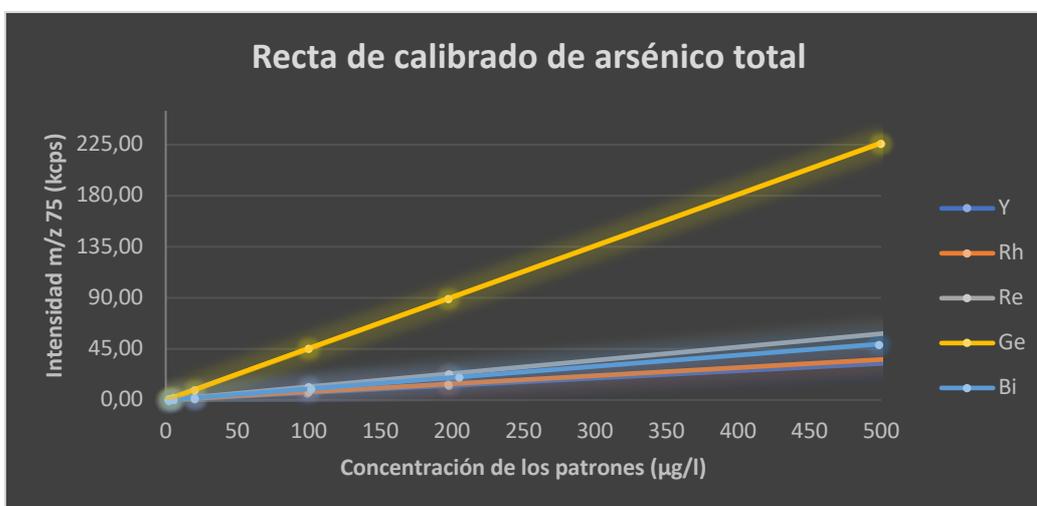


Figura 30. Curva de calibración de arsénico total para los patrones internos estudiados

Tabla 26. Valor medio del coeficiente de correlación (r^2), pendiente del calibrado (m), la concentración media para cada nivel y el residual estandarizado asociado para las curvas de calibración ($n=6$) con Y como patrón interno

PATRÓN INTERNO: ⁸⁹Y

Conc. teórica del patrón ($\mu\text{g/l}$)	$\bar{x}_{n=6}$ ($\mu\text{g/l}$)	$CV_{n=6}$ (% , $\mu\text{g/l}$)	Residual (%)	r^2	m
2	1,99	0,532	0,477	0,9998	1,05E-04
5	5,04	1,34	0,537		
20	20,1	1,86	0,208		
100	99,3	1,34	0,504		
200	199	1,29	0,513		
500	498	1,30	0,267		

Tabla 27. Valor medio del coeficiente de correlación (r^2), pendiente del calibrado (m), la concentración media para cada nivel y el residual estandarizado asociado para las curvas de calibración ($n=6$) con Rh como patrón interno.

PATRÓN INTERNO: ^{103}Rh					
Conc. teórica del patrón ($\mu\text{g/l}$)	$\bar{x}_{n=6}$ ($\mu\text{g/l}$)	$\text{CV}_{n=6}$ ($\%$, $\mu\text{g/l}$)	Residual (%)	r^2	m
2	1,99	0,573	0,468	0,9998	1,07E-04
5	5,04	1,46	0,526		
20	20,1	1,82	0,169		
100	99,2	0,958	0,864		
200	199	1,07	0,565		
500	497	1,27	0,426		

Tabla 28. Valor medio del coeficiente de correlación (r^2), pendiente del calibrado (m), la concentración media para cada nivel y el residual estandarizado asociado para las curvas de calibración ($n=6$) con Re como patrón interno

PATRÓN INTERNO: ^{186}Re					
Conc. teórica del patrón ($\mu\text{g/l}$)	$\bar{x}_{n=6}$ ($\mu\text{g/l}$)	$\text{CV}_{n=6}$ ($\%$, $\mu\text{g/l}$)	Residual (%)	r^2	m
2	2,00	0,457	0,538	0,9998	1,41E-04
5	5,04	1,23	0,589		
20	20,1	1,77	0,183		
100	99,1	1,010	0,940		
200	199	0,91	0,417		
500	498	1,17	0,372		

Tabla 29. Valor medio del coeficiente de correlación (r^2), pendiente del calibrado (m), la concentración media para cada nivel y el residual estandarizado asociado para las curvas de calibración ($n=6$) con Ge como patrón interno

PATRÓN INTERNO: ^{73}Ge					
Conc. teórica del patrón ($\mu\text{g/l}$)	$\bar{x}_{n=6}$ ($\mu\text{g/l}$)	$\text{CV}_{n=6}$ ($\%$, $\mu\text{g/l}$)	Residual (%)	r^2	m
2	2,00	0,329	0,563	0,9997	4,61E-04
5	5,03	1,01	0,617		
20	20,0	2,03	0,103		
100	99,2	0,91	0,929		
200	199	1,714	0,235		
500	499	1,44	0,174		

Tabla 30. Valor medio del coeficiente de correlación (r^2), pendiente del calibrado (m), la concentración media para cada nivel y el residual estandarizado asociado para las curvas de calibración ($n=6$) con Bi como patrón interno

PATRÓN INTERNO: ^{209}Bi					
Conc. teórica del patrón ($\mu\text{g/l}$)	$\bar{x}_{n=6}$ ($\mu\text{g/l}$)	$\text{CV}_{n=6}$ ($\%$, $\mu\text{g/l}$)	Residual (%)	r^2	m
2	1,99	0,450	0,581	0,9960	1,57E-04
5	5,04	1,21	0,609		
20	20,1	1,55	0,267		
100	99,3	1,58	0,424		
200	199	3,420	0,128		
500	495	1,78	0,542		

Como puede observarse, el CV(%) para cada nivel y patrón interno fue $\leq 2\%$, exceptuando el punto de 20 $\mu\text{g}/\text{l}$ en el caso del Ge y aquel de 200 $\mu\text{g}/\text{l}$ para el Bi. Sin embargo, en general, los valores encontrados fueron similares no pudiendo elegir a un único candidato que sobresaliera sobre el resto.

Por lo que respecta a los residuales estandarizados, todos aquellos valores $\leq 1,5$ se consideran aceptables, siendo mejor cuánto más pequeño sea dicho valor. En vista de los datos obtenidos, los residuales estandarizados para los cinco patrones internos estuvieron dentro de los límites establecidos ($\pm 1,5$).

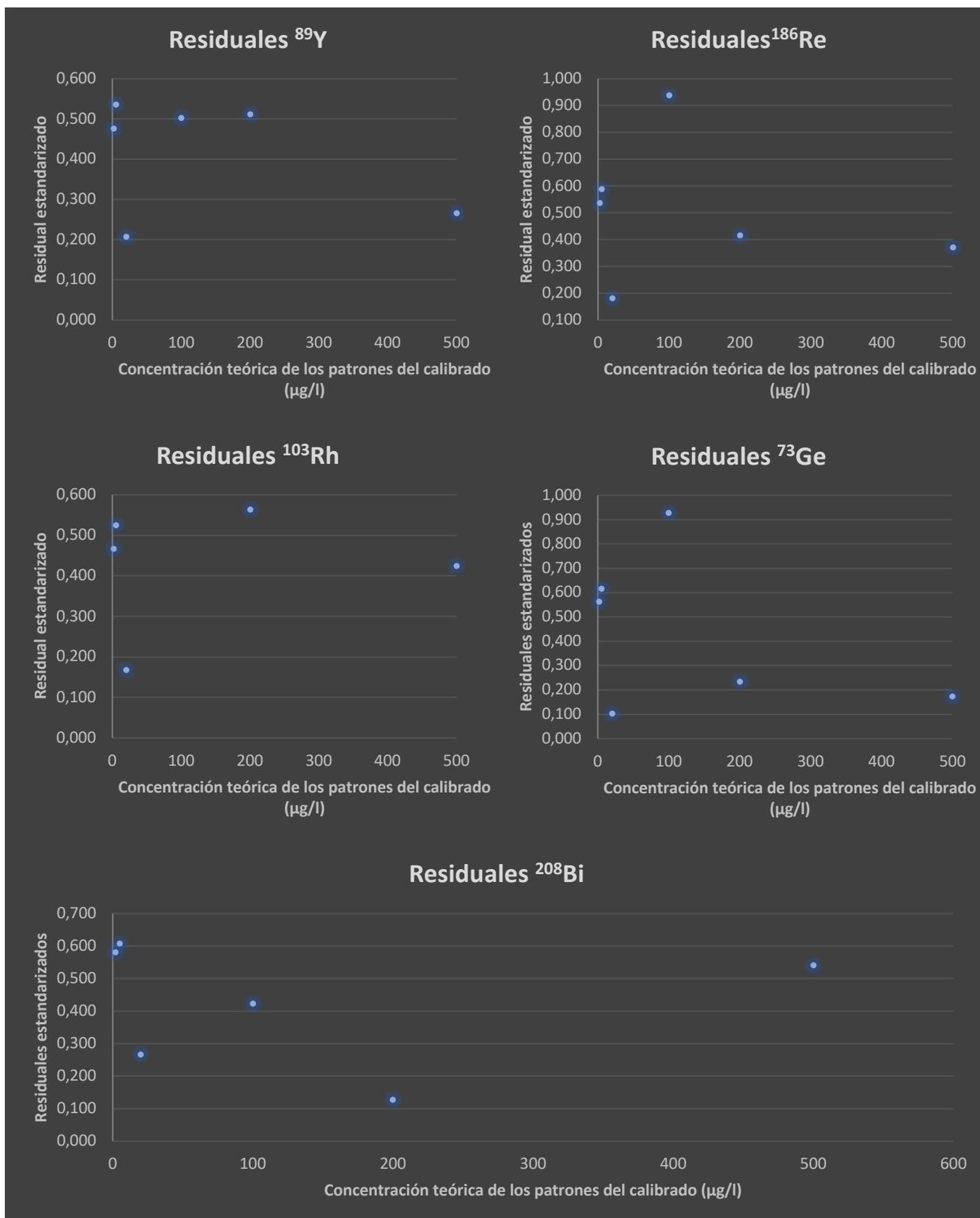


Figura 31. Residuales estandarizados para cada calibración interna con los cinco candidatos a patrón interno. A) ^{89}Y ; B) ^{186}Re ; C) ^{103}Rh ; D) ^{73}Ge ; E) ^{208}Bi

Por último, la linealidad de la calibración se determinó mediante un test F (Tabla 31), utilizando los datos correspondientes a la calibración con Y como patrón interno, y demostrando la linealidad entre dichos puntos.

Tabla 31. Evaluación de la linealidad desde 0 hasta 500 µg/l mediante un test F de comparación entre el valor medio (\bar{x}) de la concentración obtenida para cada nivel, y la teórica

Resultados del Test F		
	$\bar{X}_{obtenida}$ (µg/l)	$\bar{X}_{teórica}$ (µg/l)
Media	138	137
Varianza	37288	36979
Observaciones	6	6
Grados de libertad	5	5
F_{exp}		1,01
F_{crit} (una cola)		5,05

En base a los datos recabados, la calibración establecida es lineal en el rango de concentraciones establecido.

b) Precisión y exactitud

Para poder discriminar entre los cinco posibles candidatos, se analizaron seis réplicas de tres controles internos diferentes, durante seis días (n=6) no consecutivos. Dos de estos controles son materiales certificados de referencia (CRM): Seronorm Trace Elements in Urine Level 1 Lot. #877 y Seronorm Trace Elements in Urine Level 2 Lot. #878. El tercer control, denominado Límite de Decisión, se preparó por dilución a partir de Seronorm Trace Elements in Urine Level 1 Lot. #877 hasta una concentración final de 35 µg/l, límite de decisión establecido y propuesto por el Biological Exposure Index (BEI)³⁴⁶, una prestigiosa organización encargada de revisar toda la información disponible sobre un agente tóxico y en base a esto, emite recomendaciones de valores máximos de exposición. En su directriz del arsénico, 35 µg/l se establece como valor límite de arsénico en orina, o lo que es lo mismo, el límite a partir del cual es necesario llevar a cabo una especiación de arsénico para determinar la toxicidad o no que pueda acarrear su contenido. Así, se determinó el CV(%) en condiciones de repetibilidad (por día) y reproducibilidad (n=6), como parámetros de la precisión del método. Se procedió de igual manera con la exactitud, calculada y expresada como veracidad. Todo esto se realizó para cada uno de los cinco patrones internos.

A continuación se muestran los valores del CV(%) en condiciones de reproducibilidad, la concentración media (n=6) y la veracidad para cada patrón interno (Tablas 32-36):

Tabla 32. Precisión y exactitud para los controles internos medidos con Y como patrón interno

PATRÓN INTERNO: ⁸⁹Y				
	CV_{n=6} (% , µg/l)	$\bar{x}_{n=6}$ (µg/l)	Valor aceptado (µg/l)	Veracidad (%)
Seronorm Trace Elements in				
Urine Level 1 Lote #877	3,95	96,0	97,0	1,03
Seronorm Trace Elements in				
Urine Level 2 Lote #878	3,07	196	198	0,92
Límite de Decisión	2,95	34,1	35,5	2,65

Tabla 33. Precisión y exactitud para los controles internos medidos con Rh como patrón interno

PATRÓN INTERNO: ¹⁰³Rh				
	CV_{n=6} (% , µg/l)	$\bar{x}_{n=6}$ (µg/l)	Valor aceptado (µg/l)	Veracidad (%)
Seronorm Trace Elements in				
Urine Level 1 Lote #877	2,96	102	97,0	-5,47
Seronorm Trace Elements in				
Urine Level 2 Lote #878	3,17	210	198	-6,20
Límite de Decisión	1,32	36,1	35,5	-3,12

Tabla 34. Precisión y exactitud para los controles internos medidos con Re como patrón interno

PATRÓN INTERNO: ¹⁸⁶Re				
	CV_{n=6} (% , µg/l)	$\bar{x}_{n=6}$ (µg/l)	Valor aceptado (µg/l)	Veracidad (%)
Seronorm Trace Elements in				
Urine Level 1 Lote #877	3,67	94,9	97,0	2,15
Seronorm Trace Elements in				
Urine Level 2 Lote #878	4,04	191	198	3,77
QC "Límite de Decisión"	2,75	33,7	35,5	3,66

Tabla 35. Precisión y exactitud para los controles internos medidos con Ge como patrón interno

PATRÓN INTERNO: ⁷³Ge				
	CV_{n=6} (% , µg/l)	$\bar{x}_{n=6}$ (µg/l)	Valor aceptado (µg/l)	Veracidad (%)
Seronorm Trace Elements in				
Urine Level 1 Lote #877	2,56	100	97,0	-3,55
Seronorm Trace Elements in				
Urine Level 2 Lote #878	1,64	207	198	-4,54
QC "Límite de Decisión"	1,59	35,6	35,5	-1,84

Tabla 36. Precisión y exactitud para los controles internos medidos con Bi como patrón interno

PATRÓN INTERNO: ²⁰⁹Bi				
	CV_{n=6} (% , µg/l)	$\bar{x}_{n=6}$ (µg/l)	Valor aceptado (µg/l)	Veracidad (%)
Seronorm Trace Elements in				
Urine Level 1 Lote #877	5,48	105	97,0	-8,20
Seronorm Trace Elements in				
Urine Level 2 Lote #878	6,10	212	198	-7,26
QC "Límite de Decisión"	6,98	36,6	35,5	-4,61

Por lo que respecta a los resultados de precisión, expresados en condiciones de reproducibilidad, los valores calculados de los CV(%) para los tres controles internos se encontraron en el rango 2-4% para ytrio, rodio, renio y germanio, y en el caso de este último, menores del 3%. Sin embargo, el bismuto se desmarcó ligeramente de esta tendencia, mostrando valores entre el 5-7%. El límite fijado para este estadístico se encuentra dentro el 10%, por lo que a grandes rasgos, ningún patrón interno estuvo fuera del rango aceptable. No obstante, se descartó el uso del Bi al presentar mayores valores de para este estadístico.

Los valores de veracidad, sin embargo, demostraron que el mejor candidato fue el ⁸⁹Y. Esto se refleja en los valores calculados de veracidad, siendo ≈1,00% para Seronorm Trace Elements in Urine Level 1 #877 y Seronorm Trace Elements in Urine Level 2 #878, y 2,65% para el QC "Límite de Decisión". El resto de patrones internos mostraron, a grandes rasgos, valores del estadístico de veracidad superiores al 3%. Tras estos experimentos, se asignó al Ytrio como patrón interno del método de arsénico total.

c) Selectividad

La selectividad se evaluó dopando una orina de concentración conocida con una concentración de 100 mg/l de cloruros. Teniendo en cuenta que la concentración media de cloruros en orina es de 1000 mg/l y que para medir el arsénico total la matriz se diluye sistemáticamente 1:20, o 1:10 en el caso de la especiación, esto resulta en 50 y 100 mg/l, respectivamente, de concentración real de cloruros analizada por el equipo. Seleccionando el caso más restrictivo, coincide con la concentración que se adicionó a la orina, medida sin y con el dopado de ³⁵Cl.

Teniendo todo esto en cuenta, se midieron varias réplicas (n=21) de la orina sin dopar y dopada, en dos días no consecutivos (n=2).

A partir de estos datos, se calculó la concentración media de la orina con y sin dopar, y se analizaron estas medias mediante un test F de varianzas, y un test t de Student para medias. (Tabla 37). De esta manera, mediante la comparación de dos distribuciones de datos, la predicha por el modelo correspondiente ($F_{\text{crítico}}$ y $t_{\text{crítico}}$, respectivamente) con la obtenida en nuestros experimentos (F_{exp} y t_{exp}) y siempre se cumpla que los valores de la primera sean superiores a los de la segunda, se puede concluir que los datos son estadísticamente comparables y por tanto, concluyentes.

Tabla 37. Estadísticos de media, desviación estándar, test T y test F para la concentración de arsénico obtenida para un blanco de orina y una orina dopada con 100 mg/l de cloruros

Estudio de selectividad				
	Día 1		Día 2	
Parámetro	Blk orina (µg/l)	Orina + 100 mg/l Cl (µg/l)	Blk orina (µg/l)	Orina + 100 mg/l Cl (µg/l)
Conc. Media (µg/l)	3,62	3,61	3,21	3,02
Desv. Estándar	0,306	0,252	0,445	0,518
F_{exp}		1,48		1,36
F_{crítico}		2,12		2,12
t_{exp} (95%, 2 colas, N=21)		0,152		-1,28
t_{crítico} (95%, 2 colas, N=21)		2,02		2,02

En vista de los resultados, las medias obtenidas para el blanco de orina y la orina son estadísticamente similares y comparables, pudiendo concluir que en las condiciones instrumentales utilizadas, la interferencia $^{75}\text{ArCl}^+$ no influye de manera significativa en la señal de ^{75}As .

d) Sensibilidad

Por último, el límite de detección (LOD) y el de cuantificación (LOQ) se calcularon utilizando el método IUPAC^{347,348}, aplicando el factor $k=3$ para el LOD y $k=10$ para el LOQ. De acuerdo a esto³⁴⁹, se midieron 20 de blancos de calibración durante 5 días no consecutivos. En base a esto, y utilizando el valor medio ($n=5$) se calcularon dichos sendos parámetros obteniéndose un LOD de 0,16 µg/l y un LOQ de 0,53 µg/l.

A la luz de los resultados obtenidos, la metodología de arsénico total en orina cuenta con una sensibilidad adecuada y acorde al rango de calibración medido (2-500 µg/l), con buenos valores de precisión (<2%) y exactitud, (<3%), expresada como veracidad, al usar ^{89}Y como patrón interno, además de no presentar interferencias del $^{75}\text{ArCl}^+$.

4.2.-Validación metodológica de la especiación de arsénico en orina

Primeramente se procedió a establecer un rango de calibración adecuado para medir muestras de orina. Inicialmente se diseñó una calibración en 5 puntos, y un blanco de calibración (0, 1, 5, 50 y 100 $\mu\text{g/l}$) para cada una de las especies, respectivamente. Esta calibración contaba con un patrón interno, inyectado fuera de la columna y directamente hacia el nebulizador del ICP/MS. El patrón interno elegido fue DMA^{V} .

La precisión y la exactitud, medidas respectivamente como recuperación y veracidad, se calculó utilizando cuatro controles del programa de intercomparativos PCI del Institut National de Santé Publique de QUEBEC (INSPQ) denominados como PCI-U-1901, PCI-U-1902, PCI-U-1908 y PCI-U-1913, medidos como cuatro réplicas ($n=4$) cada día de trabajo durante cuatro días ($n=4$) no consecutivos. Así, la precisión para todas las especies fue del rango del 5-10%, mientras que la exactitud encontrada fue $\leq 6\%$. Las z-score de cada control intercomparativo, por su parte, fueron $\leq 0,4\%$ en valor absoluto. La determinación del límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) se realizó utilizando como base la ISO 11843, obteniendo un LOQ $\approx 0,3 \mu\text{g/l}$ para cada especie analizada.

Los procedimientos específicos para cada estadístico, así como todos los datos referente a ellos aquí descritos, se encuentran publicados en la prestigiosa revista *Talanta*³⁵⁰.

a) Calibración: rango y linealidad

Sin embargo, y utilizando la metodología publicada para el análisis y posterior evaluación de muestras de orina susceptibles de contener arsénico, se llegó a la conclusión de, manera general, el arsénico del pescado, representado conjuntamente por las especies AB y AC, aparece normalmente en una concentración al menos 10 veces superior al resto. Así, se decidió revalidar la metodología de especiación con un nuevo set de patrones tal y como se describe en la sección correspondiente de esta tesis (*ver sección 3.4.-Preparación de disoluciones*).

En cuanto al patrón interno, se decidió cambiar el DMA^{V} por As^{V} en esta nueva metodología ya que éste último presenta una estabilidad más alta que el primero.

El patrón interno utilizado (IS) fue conectado a una válvula Rheodyne que permitió aspirar la cantidad ajustada en función del tiempo de apertura y cierre de la misma, por fuera de la columna y previo al nebulizador. Por otro lado, el objetivo del IS fue el de corregir la deriva del detector, por eso se programó el tiempo de apertura y cierre de dicha válvula para obtener una señal suficientemente intensa en área para poder normalizar la señal de los patrones. De este modo, y en forma de 5 patrones acuosos y un blanco, el rango de la AB y AC abarcó desde 0 hasta 100 $\mu\text{g/l}$ de cada una, mientras que para As^{III} , As^{V} , DMA^{V} y MMA^{V} éste comenzó en 0 y llegó hasta 10 $\mu\text{g/l}$ para cada forma de arsénico (Figuras 32-33). Para evaluar la calibración, se midió el CV(%) de todos los patrones de seis calibraciones en seis días no consecutivos (Tablas 38-43).

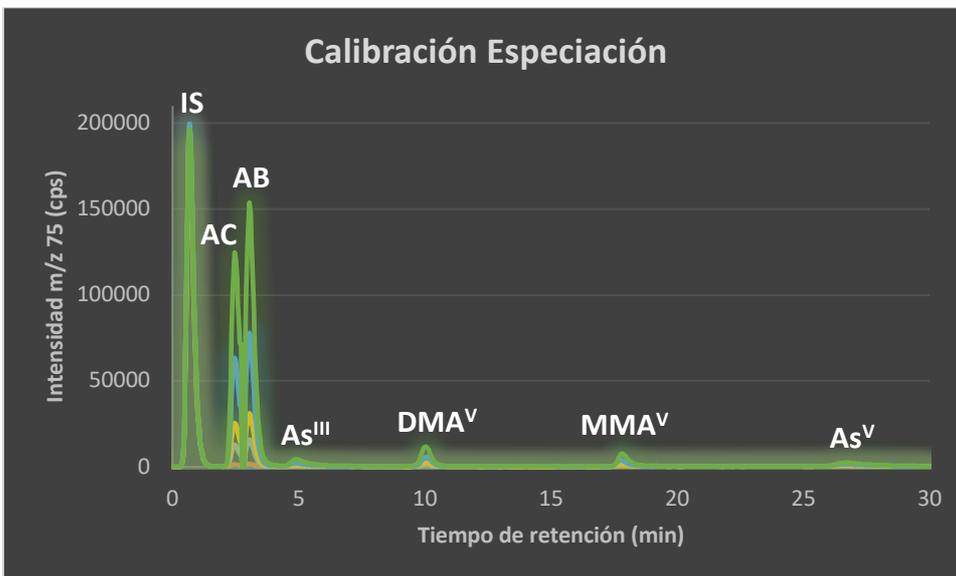


Figura 32. Esquema superpuesto de los puntos del calibrado

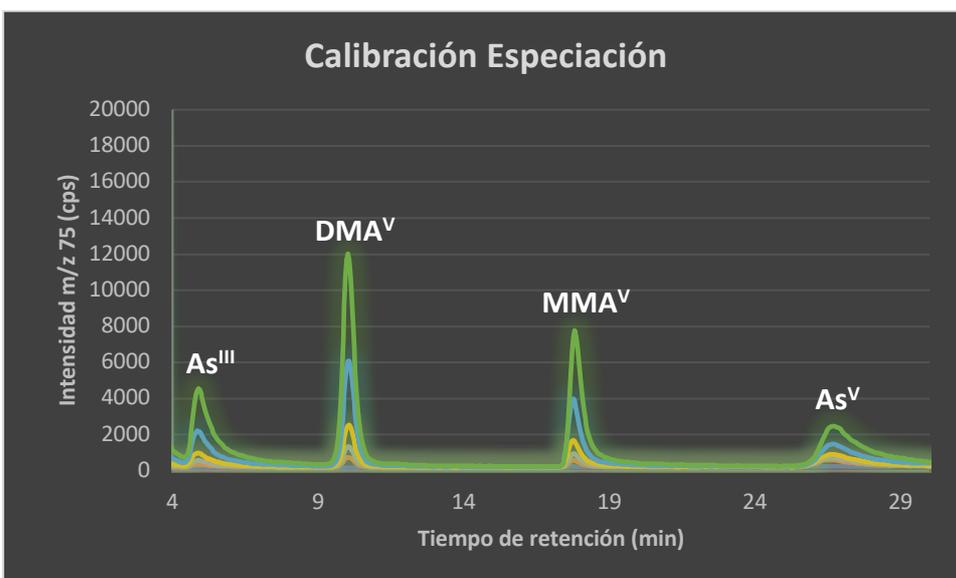


Figura 33. Extracto del esquema superpuesto de la calibración aplicado sobre las cuatro especies de menor rango de calibración

Tabla 38. Valor medio del coeficiente de correlación (r^2), pendiente del calibrado (m), la concentración media para cada nivel y el residual estandarizado asociado para las curvas de calibración ($n=6$)

ARSENOCOLINA (AC)					
Conc. teórica del patrón ($\mu\text{g/l}$)	$\bar{x}_{n=6}$ ($\mu\text{g/l}$)	$CV_{n=6}$ ($\%$, $\mu\text{g/l}$)	Residual (%)	r^2	m
1	0,998	7,73	0,267	1,000	0,0105
10	9,99	1,43	0,144		
20	20,1	0,902	-0,504		
50	50,0	0,519	-0,076		
100	100	0,355	-0,028		

Tabla 39. Valor medio del coeficiente de correlación (r^2), pendiente del calibrado (m), la concentración media para cada nivel y el residual estandarizado asociado para las curvas de calibración ($n=6$)

ARSENOBETAÍNA (AB)					
Conc. teórica del patrón ($\mu\text{g/l}$)	$\bar{x}_{n=6}$ ($\mu\text{g/l}$)	$CV_{n=6}$ ($\%$, $\mu\text{g/l}$)	Residual (%)	r^2	m
1	1,01	5,39	-1,25	0,9999	0,0168
10	10,0	1,30	-0,403		
20	19,8	0,850	0,773		
50	49,9	0,710	0,044		
100	100	0,836	-0,251		

Tabla 40. Valor medio del coeficiente de correlación (r^2), pendiente del calibrado (m), la concentración media para cada nivel y el residual estandarizado asociado para las curvas de calibración ($n=6$)

ARSENITO (As^{III})					
Conc. teórica del patrón ($\mu\text{g/l}$)	$\bar{x}_{n=6}$ ($\mu\text{g/l}$)	$CV_{n=6}$ ($\%$, $\mu\text{g/l}$)	Residual (%)	r^2	m
0,5	0,501	2,12	-0,133	0,9997	0,0101
1	0,990	2,99	1,02		
2	1,99	2,59	0,135		
5	5,00	0,986	-0,074		
10	10,0	0,613	-0,183		

Tabla 41. Valor medio del coeficiente de correlación (r^2), pendiente del calibrado (m), la concentración media para cada nivel y el residual estandarizado asociado para las curvas de calibración ($n=6$)

ARSENIATO (As^V)					
Conc. teórica del patrón ($\mu\text{g/l}$)	$\bar{x}_{n=6}$ ($\mu\text{g/l}$)	$CV_{n=6}$ ($\%$, $\mu\text{g/l}$)	Residual (%)	r^2	m
0,5	0,497	2,14	0,508	0,9998	0,0079
1	0,994	4,49	0,573		
2	2,00	2,84	0,018		
5	5,02	1,13	-0,438		
10	9,98	0,826	0,168		

Tabla 42. Valor medio del coeficiente de correlación (r^2), pendiente del calibrado (m), la concentración media para cada nivel y el residual estandarizado asociado para las curvas de calibración ($n=6$)

Ácido dimetilarsínico (DMA^V)					
Conc. teórica del patrón ($\mu\text{g/l}$)	$\bar{x}_{n=6}$ ($\mu\text{g/l}$)	$CV_{n=6}$ ($\%$, $\mu\text{g/l}$)	Residual (%)	r^2	m
0,5	0,497	1,96	0,677	0,9999	0,0152
1	0,991	3,34	0,924		
2	1,97	2,66	1,30		
5	5,00	0,886	-0,029		
10	10,0	0,491	-0,081		

Tabla 43. Valor medio del coeficiente de correlación (r^2), pendiente del calibrado (m), la concentración media para cada nivel y el residual estandarizado asociado para las curvas de calibración ($n=6$)

Ácido monometilarsónico (MMA ^V)					
Conc. teórica del patrón (µg/l)	$\bar{x}_{n=6}$ (µg/l)	CV _{n=6} (% µg/l)	Residual (%)	r^2	m
0,5	0,500	1,56	0,073	0,9998	0,0123
1	1,01	1,71	-1,32		
2	2,00	2,87	-0,207		
5	4,99	1,15	0,129		
10	10,0	0,557	-0,029		

Los residuales estandarizados obtenidos (Figuras 34 a-f) así como su valores números, demostraron que ninguno de ellos se fue de los límites permitidos para estas magnitudes ($\pm 1,5$).

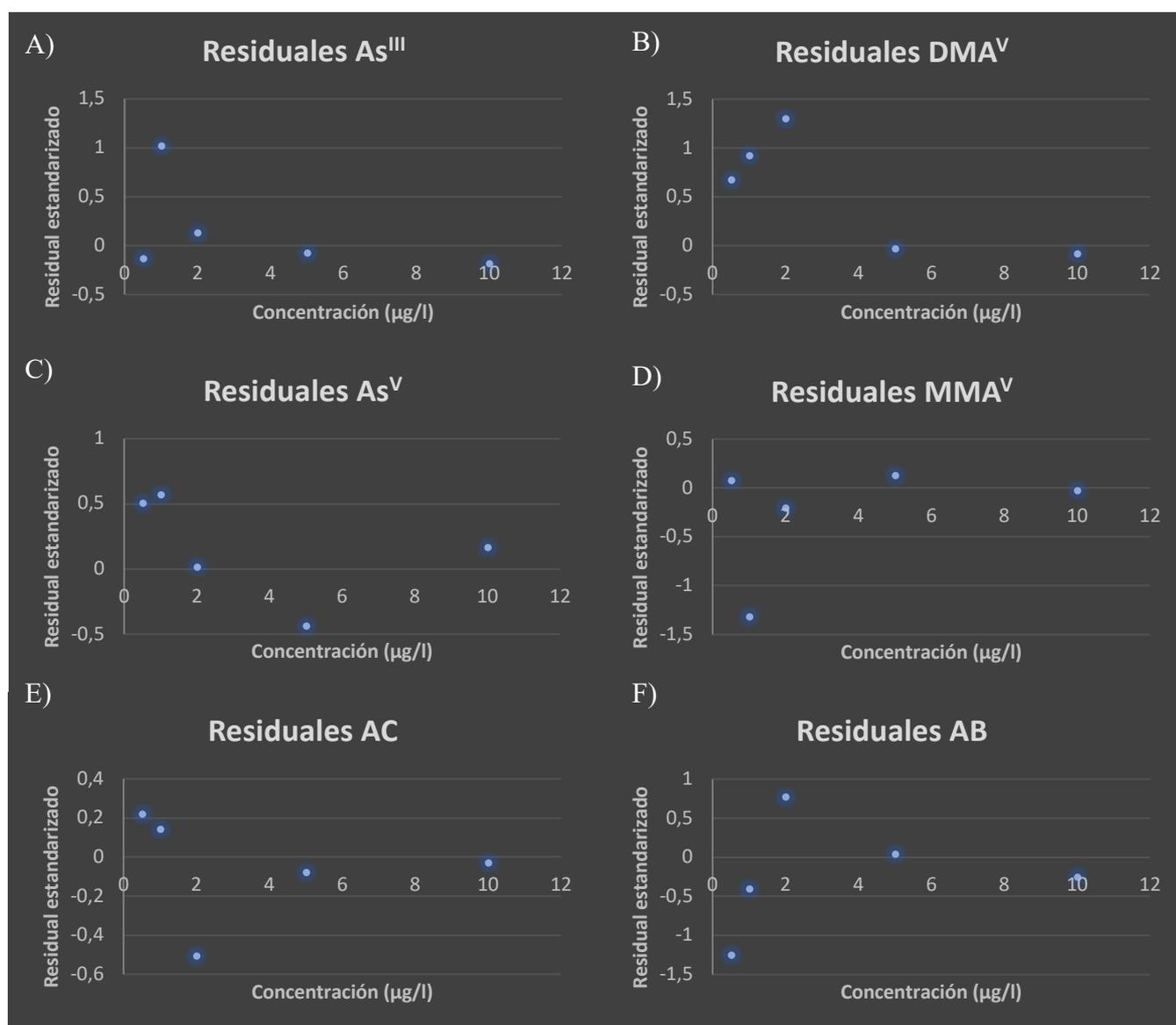


Figura 34. Residuales obtenidos para: a)As^{III}, b)DMA^V, c)MMA^V, d)As^V, e)AC, f)AB

Adicionalmente a lo anterior, a partir de los datos obtenidos de seis calibraciones obtenidos en seis días no consecutivos, se obtuvieron las áreas de pico normalizadas ($\text{Peak Area}_{\text{analito}}/\text{Peak Area}_{\text{IS}}$) para las especies y el patrón interno y se calcularon los coeficientes de variación para el patrón interno y cada especie en cada nivel en términos de concentración y de área de pico normalizada (tabla 44), y a partir de éstas su coeficiente de variación (tabla 45).

Tabla 44. Áreas de pico para el patrón interno (IS) y las seis especies

ÁREAS DE PICO_{n=6} (UA)							
Patrón	IS	AC	AB	As^{III}	DMA^V	MMA^V	As^V
Blanco	2307390	0	0	0	0	0	0
1	2335658	0,0066272	0,0064342	0,0024895	0,0036938	0,0034106	0,0024217
2	2325951	0,0613315	0,0611104	0,0050937	0,0058191	0,0069197	0,0044649
3	2355431	0,1209504	0,1200195	0,0106798	0,0103446	0,0136442	0,0091018
4	2339270	0,2979765	0,3004202	0,0269135	0,0243205	0,0340349	0,0220151
5	2248175	0,5935724	0,608213	0,0540916	0,0464261	0,0680631	0,0436690

Con respecto a la ionización en el plasma, las especies inorgánicas mostraron una menor eficiencia. Prueba de ello es su menor área de pico normalizada con respecto a aquellas del DMA^V y MMA^V, con quienes comparte la misma concentración. Este efecto también fue observado tomando en consideración las áreas de AC y AB, el doble en concentración que el resto para el primer patrón. Teniendo esto en cuenta, las áreas de pico para el DMA^V como para el MMA^V guardaron mejor relación con aquellas de la arsenocolina y arsenobetaína que el arsenito y el arseniato, prueba adicional de su peor ionización. No obstante, en general la relación área-concentración fue proporcional.

Tabla 45. Coeficientes de variación de las áreas de pico patrón interno (IS) y los seis analitos

CV_{n=6} (%)							
Patrón	IS	AC	AB	As^{III}	DMA^V	MMA^V	As^V
1	0,258	8,11	9,61	6,86	11,0	4,13	5,56
2	1,81	3,51	2,86	5,58	10,8	4,43	5,69
3	1,21	5,01	3,63	0,667	7,33	0,212	5,18
4	1,67	6,25	0,630	2,96	1,65	1,37	8,27
5	2,54	5,57	1,92	4,47	3,24	1,32	7,08

Los coeficientes de variación relativos a las áreas normalizadas para cada patrón del calibrado fueron menores del 10% excepto para el primer y segundo patrón del DMA^V, observando una tendencia general decreciente con la concentración. Por lo que respecta a la reproducibilidad del patrón interno, ésta se mantuvo por debajo del 3%.

Estos valores fueron considerados aceptables y dentro del rango normal en este tipo de analíticas (CV $\leq 15\%$).

La linealidad para los dos rangos de calibración utilizados (As^{III} , As^V , DMA^V , MMA^V =0,5-10 $\mu\text{g/l}$; AC, AB=1-100 $\mu\text{g/l}$) se demostró mediante sendos test F (Tablas 46-48).

Tabla 46. Evaluación de la linealidad para las especies AC y AB

Resultados del Test F para AC y AB				
	$\bar{X}_{obtenida\ AC} (\mu\text{g/l})$	$\bar{X}_{teórica\ AC} (\mu\text{g/l})$	$\bar{X}_{obtenida\ AB} (\mu\text{g/l})$	$\bar{X}_{teórica\ AB} (\mu\text{g/l})$
Media	36,2176	36,2	36,142	36,2
Varianza	1611,558339	1612,2	1612,96232	1612,2
Observaciones	5	5	5	5
Grados de libertad	4	4	4	4
F	1,00039		1,00047	
Valor crítico para F (una cola)	6,3882			

Tabla 47. Evaluación de la linealidad para las especies As^{III} y As^V

Resultados del Test F para As^{III} y As^V				
	$\bar{X}_{obtenida\ As^{III}} (\mu\text{g/l})$	$\bar{X}_{teórica\ As^{III}} (\mu\text{g/l})$	$\bar{X}_{obtenida\ As^V} (\mu\text{g/l})$	$\bar{X}_{teórica\ As^V} (\mu\text{g/l})$
Media	3,6962	3,7	3,6982	3,7
Varianza	15,4704322	15,45	15,4131072	15,45
Observaciones	5	5	5	5
Grados de libertad	4	4	4	4
F	1,00132247		1,0023936	
Valor crítico para F (una cola)	6,3882			

Tabla 48. Evaluación de la linealidad para las especies DMA^V y MMA^V

Resultados del Test F para DMA^V y MMA^V				
	$\bar{X}_{obtenida\ DMA^V} (\mu\text{g/l})$	$\bar{X}_{teórica\ DMA^V} (\mu\text{g/l})$	$\bar{X}_{obtenida\ MMA^V} (\mu\text{g/l})$	$\bar{X}_{teórica\ MMA^V} (\mu\text{g/l})$
Media	3,6916	3,7	3,7	3,7
Varianza	15,4926093	15,45	15,43005	15,45
Observaciones	5	5	5	5
Grados de libertad	4	4	4	4
F	1,00275788		1,00129293	
Valor crítico para F (una cola)	6,3882			

b) Precisión y exactitud

La precisión y exactitud se determinó mediante la medición por duplicado en seis días (n=6) no consecutivos de un control intercomparativo del INSPQ, denominado PCI-U-1914, considerado como Proficiency Testing Sample (PTS). Adicionalmente, se utilizó un blanco de orina fortificado con una concentración igual al primer punto del calibrado (1,0 $\mu\text{g/l}$ para AC, AB y 0,5 $\mu\text{g/l}$ para el resto), denominado control inferior.

De esta manera, la precisión se expresó como el CV en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, mientras que para la exactitud se usó la veracidad y la z-score, ésta última sólo para el control PCI-U-1914 (Tablas 49,50).

Tabla 49. Estadísticos de precisión y exactitud medidos como CV(%), veracidad(%) y z-score

PCI-U-1914					
	CV(%)	$\bar{x}_{n=6}(\mu\text{g/l})$	Valor aceptado ($\mu\text{g/l}$)	Veracidad (%)	z-score
AB	5,02	54,1	54,8	1,19	-0,085
As^{III}	4,27	2,94	2,79	-5,48	0,358
DMA	5,65	40,2	40,2	0,020	0
MMA	3,22	4,36	4,21	-3,48	0,237

Tabla 50. Estadísticos de precisión y exactitud medidos como CV(%) y veracidad(%)

Control LQ				
	CV(%)	$\bar{x}_{n=6}(\mu\text{g/l})$	Valor aceptado ($\mu\text{g/l}$)	Veracidad (%)
AC	4,35	1,01	1,00	-1,48
AB	2,29	1,01	1,00	-1,11
As^{III}	2,28	0,501	0,500	-0,250
As^V	3,17	0,485	0,500	3,06
DMA	4,71	0,510	0,500	-2,05
MMA	3,56	0,501	0,500	-2,53

c) Selectividad

La selectividad se evaluó dopando una blanco de orina con una concentración de 100 mg/l de cloruros, y comparando las señales obtenidas con dicho blanco de orina sin dopar (Figura 35). En el caso de la orina dopada, el ICP/MS fue sintonizado para medir dos canales: la m/z 75 (As) y la m/z 35 (Cl).

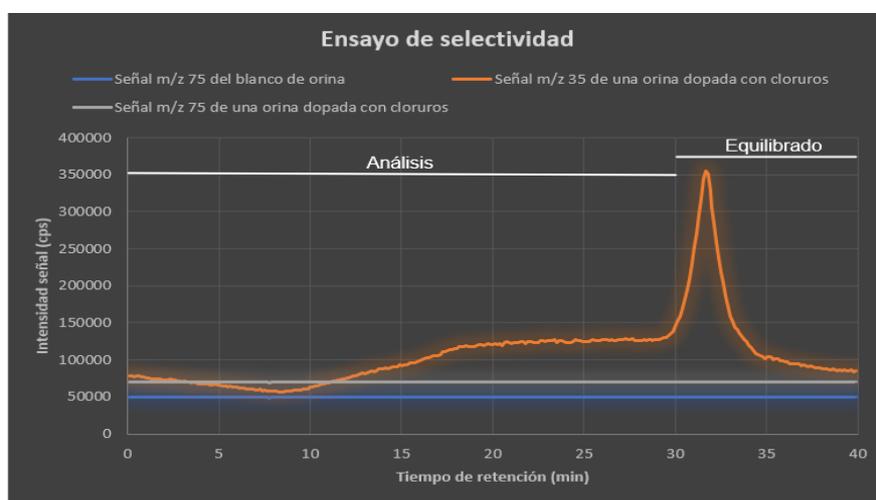


Figura 35. Comparación de un blanco de orina y una orina dopada con 100 $\mu\text{g/l}$ de cloruro

Como puede observarse, aparece una fuerte señal en el canal del cloro ≈ 35 min para la orina dopada, que se atribuyó al pico de los cloruros, ya que en la m/z 75 no se detecta señal al mismo tiempo. Así pues, el hecho de que dicha señal sólo fuera detectable en el canal del cloro indica que no existe interferencia $^{75}\text{ArCl}^+$ y que por tanto, la ecuación de corrección utilizada funciona satisfactoriamente. Se puede concluir, por tanto, que la interferencia de los cloruros no afectó ni afecta en ningún modo a la metodología de especiación desarrollada.

d) Sensibilidad

Por último, el LOD y LOQ se calculó de la misma manera que para el arsénico total, es decir, por el método IUPAC (tabla 51).

Tabla 51. Límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) para cada especie de arsénico medida

Estudio de la sensibilidad del método de arsénico total		
Especie de arsénico	LOD_{n=5} ($\mu\text{g/l}$)	LOQ_{n=5} ($\mu\text{g/l}$)
AC	0,102	0,305
AB	0,102	0,305
As ^{III}	0,099	0,297
As ^V	0,100	0,300
DMA ^V	0,087	0,261
MMA ^V	0,100	0,301

4.3.-Estudio de los niveles de arsénico en una población

Una vez optimizado y validado el método de trabajo concluyendo que es apto para el uso previsto se diseñó un estudio para evaluar los niveles de arsénico en orina utilizando orinas recepcionadas por el servicio del Instituto de Toxicología de la Defensa (ITOXDEF) con el consiguiente apoyo del Comité Ético del Hospital Central de la Defensa Gómez Ulla, Centro de Vida y Esperanza, organismo sanitario dentro del que se engloba logísticamente el ITOXDEF. De manera regular el laboratorio analiza muestras de naturaleza clínica para organismos y entidades sanitarias públicas que no cuentan con la instrumentación analítica necesaria para la determinación de especies de arsénico.

De esta manera, y con el consiguiente acceso autorizado a los demográficos disponibles de dichas muestras se seleccionaron un número adecuado de ellas (N=706), pertenecientes a dos localidades costeras del Mar Mediterráneo, y vinculadas históricamente a la explotación minera. La existencia de estas dos ciertas circunstancias especialmente relevantes fueron clave para la elección de dichas muestras ya que de esta manera se pudo analizar de mejor manera la exposición al arsénico, que puede ocurrir por varios frentes, siendo el ocupacional y sus influencias sobre el medioambiente, además del alimenticio los dos más relevantes a priori.

Todas las muestras fueron almacenadas en un congelador a -85°C hasta su posterior análisis, para su análisis se descongelan las muestras a temperatura ambiente.

Las variables estudiadas y los biomarcadores elegidos se muestran a continuación (Tabla 52). Se estudió primeramente una serie de variables demográficas, como fueron el país de nacimiento u origen, el género de los sujetos y su edad. Adicionalmente, se utilizó el peso y la altura para calcular el índice de masa corporal (IMC). Si bien los dos primeros pueden considerarse variables demográficas, el enfoque seleccionado tuvo como objetivo utilizar los IMC calculados para poder analizar en base a ellos el grado de obesidad, o ausencia de ella, de los participantes, lo que en sí mismo supone un factor de riesgo en el caso de aquél.

Tabla 52. Variables y biomarcadores empleadas en el estudio

<u>Variables analizadas</u>			
<u>Demográficos</u>			
País de nacimiento	España	Marruecos	Otros
Género	Mujeres		Hombres
Edad	Menores		Adultos
<u>Factores de riesgo</u>			
Peso	IMC		
Altura			
Consumo de tabaco			
Información dietética	Consumo de pescado	Consumo de arroz	
<u>Parámetros clínicos</u>			
Cotina en suero			
Cadmio en suero			
Cadmio en orina			
Arsénico total en orina			
Suma de especies de arsénico en orina			
AB en orina			
DMA ^V en orina			
MMA ^V en orina			
As ^{III} en orina			
As ^V en orina			
As ^I en orina (As ^{III} + As ^V)			
<u>Biomarcadores utilizados</u>			
Arsénico total en orina (TAs)			
Suma de especies de arsénico en orina (TSAs)			
AB en orina			
DMA ^V en orina			
MMA ^V en orina			
As ^I en orina			
Índice primario de metilación (PMI)			
Índice secundario de metilación (SMI)			

El consumo de tabaco se evaluó a través de una serie de biomarcadores específicos de acuerdo a la bibliografía: niveles de cotinina y cadmio en suero, cadmio en orina y creatinina sérica. Además se registró el estatus tabáquico (no fumador, exfumador y fumador).

Estos biomarcadores se utilizaron para poder corroborar y validar los datos obtenidos en relación con el tabaco, debido a la gran diferencia de sus valores entre una población con un hábito elevado de consumo de tabaco y otra que no es consumidora.

Por último, se estudió el efecto del consumo de pescado y de arroz, dos alimentos ricos en especies de arsénico que potencialmente contribuyen a aumentar el nivel basal de este elemento en el organismo de los seres humanos.

El nivel de arsénico total, la concentración total y de cada especie de arsénico en las muestras de orina se determinó mediante las metodologías de arsénico total y especiación de arsénico, respectivamente, y se utilizaron como biomarcadores, además de para calcular los dos últimos biomarcadores utilizados: el índice primario de metilación (PMI) y el índice secundario de metilación (SMI), cuyos valores se calcularon mediante las siguientes ecuaciones (ec. [1] y [2]):

$$PMI = \frac{\text{Concentración de MMA}^V (\mu\text{g/g creatinina})}{\text{Concentración de As}^i (\mu\text{g/g creatinina})} \quad [1]$$

$$SMI = \frac{\text{Concentración de DMA}^V (\mu\text{g/g creatinina})}{\text{Concentración de MMA}^V (\mu\text{g/g creatinina})} \quad [2]$$

Por lo que respecta al resto de ensayos clínicos, éstos se llevaron a cabo utilizando procedimientos validados de rutina. En este sentido, los niveles de cadmio en orina y suero se determinaron respectivamente por ICP/MS y ETAAS, instrumentos pertenecientes al Departamento de Espectroscopía Atómica, mientras que el ensayo de cotinina en orina se realizó mediante HPLC-MS/MS (tecnología Orbitrap®), a cargo del Departamento de Drogas. Por otro lado, los valores de creatinina en orina y sérica se realizaron mediante inmunocromatografía utilizando un Siemens Xpand Plus™, del Departamento de Ensayos Físicoquímicos. El análisis de creatinina en orina se utilizó como criterio para analizar la calidad de las orinas. Así, toda orina con un valor de creatinina inferior a 30 mg/dl y superior a 300 mg/dl fue descartada, y por tanto, de las 706 muestras de orina iniciales recolectadas, 20 de ellas fueron descartadas, quedando un número total de muestras de orina resultó ser finalmente 686. Por último, los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software SPSS versión 15.0.

Para acreditar la significancia estadística se usaron dos parámetros: el coeficiente de correlación de Pearson (R) y el P-value o Sig. (bilateral). El primer parámetro muestra la correlación de los datos estadísticos del biomarcador y la variable elegida, si bien este dato no es concluyente hasta corroborar dicha tendencia mediante el análisis del P-value, un estadístico que permite validar que la ordenación o tendencia de los datos no es fruto del azar. Así, cuándo este valor es menor de 0,05 y 0,01 decimos que la tendencia es estadísticamente significativa al 95% y 99%, respectivamente, aceptando dicha tendencia.

a) Estudio del contenido de arsénico: generalidades

El contenido de arsénico total (TAs), el arsénico total especiado (TSAs) y el contenido de AB, DMA^V, MMA^V, As^{III} y As^V fue registrado, expresándose cada una de estas magnitudes como media geométrica (Tabla 53). En ningún caso se detectaron As^{III} ni As^V en las muestras. Aunque a la hora de los análisis la AC se calibró y se midió como el resto de las especies, para los cálculos estadísticos no se ha incluido dado que no se detectó en ninguna muestra y guarda un significado similar al de la AB. Por otro lado, para todas las especies no detectadas, a efectos prácticos de los cálculos, se utilizó como resultado el valor de LOD/ $\sqrt{2}$. Además, los valores de As^{III} y As^V se sumaron para contabilizar ambas como una única contribución, ⁱAs o arsénico inorgánico total. Por último, cabe aclarar que las unidades escogidas para expresar la de concentración de las especies en los estadísticos fueron $\mu\text{g/g}$ creatinina.

Tabla 53. Media geométrica (GM), media aritmética (AM), mediana, percentil 95% y valores por debajo del LOD del arsénico total especiado (TSAs), el contenido de arsénico total (TAs) y de cada una de las especies

Estadístico	TAs	TSAs	AB	DMA^V	MMA^V	As^{III}	As^V
GM \pm IC ($\mu\text{g/g}$ creatinina)	31,5 \pm 6,8	28,3 \pm 5,3	22,7 \pm 5,1	0,815 \pm 0,016	0,107 \pm 0,005	<LOD	<LOD
AM \pm IC ($\mu\text{g/g}$ creatinina)	52,5 \pm 6,8	47,6 \pm 5,3	42,4 \pm 5,1	4,40 \pm 0,50	0,494 \pm 0,163	<LOD	<LOD
Mediana ($\mu\text{g/g}$ creatinina)	32,0	28,2	24,4	0,678	0,089	<LOD	<LOD
Valores < LD (%)	3 (0.4%)	3 (0.4%)	7 (1.0%)	16 (2.3%)	651 (95%)	686 (100%)	686 (100%)
Percen. 95% ($\mu\text{g/g}$ creatinina)	159	151	139,5	17,6	0,313	<LOD	<LOD

Los resultados globales del estudio muestran una diferencia entre el contenido de arsénico total (TAs), medido por ICP/MS y especiado (TSAs), determinado por HPLC-ICP/MS, del 10.1% (medido como %Diferencia).

Esto demuestra una buena precisión entre ambas técnicas. En cuanto a la proporción de las especies en las muestras analizadas, aquellas englobadas bajo la categoría de arsénico orgánico demostraron tener mayor impacto que aquellas de arsénico inorgánico. Así, la arsenobetaina es la que presenta un mayor valor en unidades de concentración, seguida del dimetilarsínico y muy lejanamente por el monometilarsínico. Por el contrario, no se detectaron ni arsénico trivalente ni pentavalente en ninguna de las muestras analizadas.

Estadísticamente, la contribución más relevante para el contenido total de arsénico la constituye la AB ($r=0,995$, $P\text{-value}=0,000$), en menor medida el DMA^V ($r=0,360$; $P\text{-value}=0,000$) y en mucha menor escala el MMA^V ($r=0,110$; $P\text{-value}=0,004$), siguiendo un comportamiento análogo al de la distribución por especies y corroborando su relevancia (Figura 36).

		Correlaciones						
		TSAs	AB	DMA	MMA	iAs	PMI	SMI
TSAs	Correlación de Pearson	1	,995**	,360**	,110**	,076*	,122**	,267**
	Sig. (bilateral)		,000	,000	,004	,046	,001	,000
	N	686	686	686	686	686	686	686
AB	Correlación de Pearson	,995**	1	,268**	,065	,083*	,077*	,201**
	Sig. (bilateral)	,000		,000	,088	,030	,045	,000
	N	686	686	686	686	686	686	686
DMA	Correlación de Pearson	,360**	,268**	1	,172**	-,067	,207**	,808**
	Sig. (bilateral)	,000	,000		,000	,079	,000	,000
	N	686	686	686	686	686	686	686
MMA	Correlación de Pearson	,110**	,065	,172**	1	,032	,915**	-,108**
	Sig. (bilateral)	,004	,088	,000		,397	,000	,005
	N	686	686	686	686	686	686	686
iAs	Correlación de Pearson	,076*	,083*	-,067	,032	1	-,056	-,234**
	Sig. (bilateral)	,046	,030	,079	,397		,146	,000
	N	686	686	686	686	686	686	686
PMI	Correlación de Pearson	,122**	,077*	,207**	,915**	-,056	1	-,110**
	Sig. (bilateral)	,001	,045	,000	,000	,146		,004
	N	686	686	686	686	686	686	686
SMI	Correlación de Pearson	,267**	,201**	,808**	-,108**	-,234**	-,110**	1
	Sig. (bilateral)	,000	,000	,000	,005	,000	,004	
	N	686	686	686	686	686	686	686

** . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

* . La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

Figura 36. Coeficientes de correlación de Pearson y P-value (Sig.[bilateral]) para cada biomarcador

Estas contribuciones vienen reflejadas por la elevada relación entre la AB y la suma total del arsénico especiado sigue una tendencia completamente lineal ($r=0,995$), mientras que para el DMA^V ésta es notablemente menor ($r=0,360$), aunque se puede notar cierta tendencia (Figura 37 a-d). Por el contrario, para el MMA^V ($r=0,110$) y el Asⁱ dicho comportamiento es débil o prácticamente inexistente.

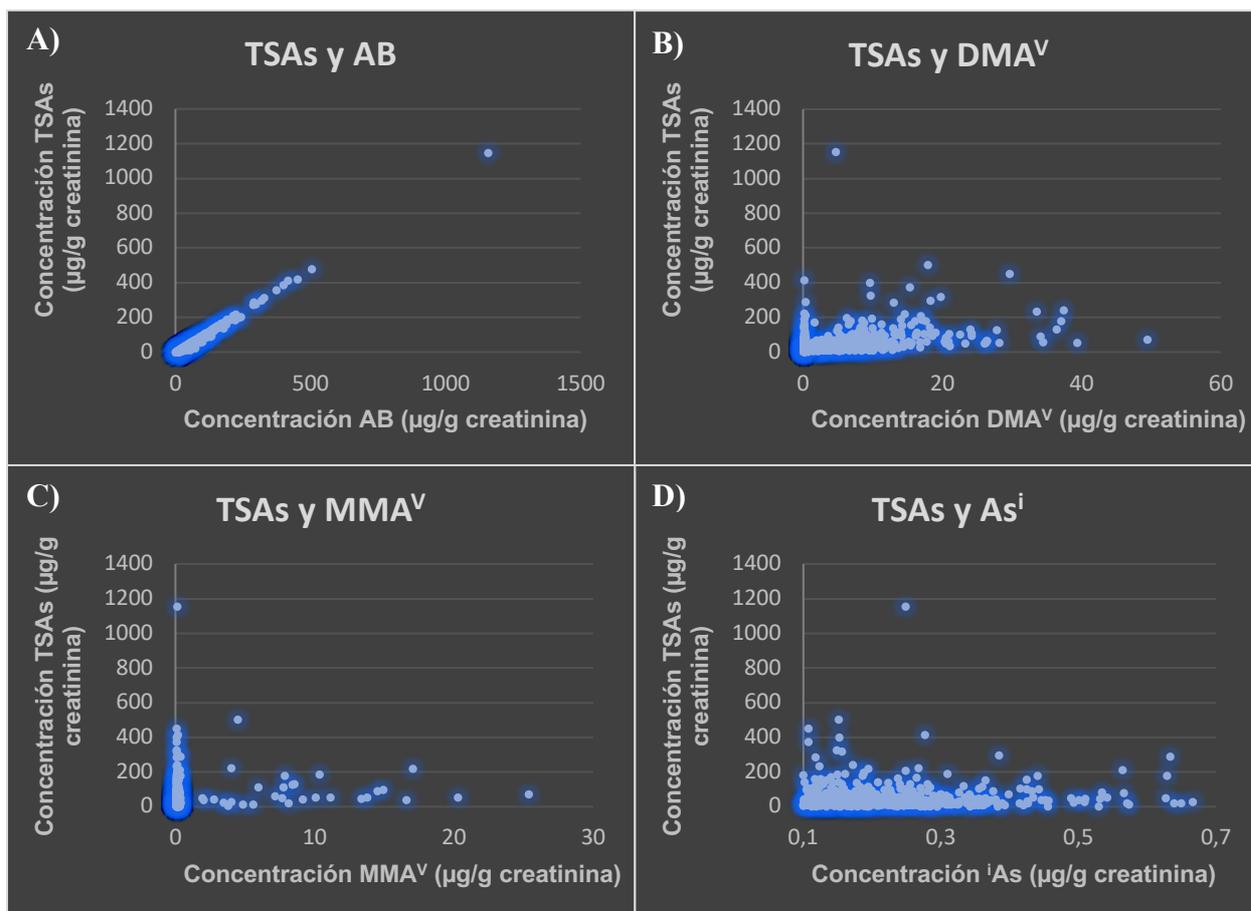


Figura 37. Gráficos de correlación entre el arsénico total especiado (TSAs) y cada especie por separado. A) Arsenobetaina; B) Ácido dimetilarsínico (V); C) Ácido monometilarsónico (V); D) Arsénico inorgánico

En base a lo anterior, las dos especies más relevantes parecen ser la AB y DMA^V. De hecho, se puede deducir la existencia de una relación baja-moderada de carácter lineal ($r=0,268$; P-value=0,000) entre ambas, sugiriendo un posible origen común (Figura 38). Esta posible interacción y se discutirá en la siguiente sección (ver 5.-*Discusión de resultados*)

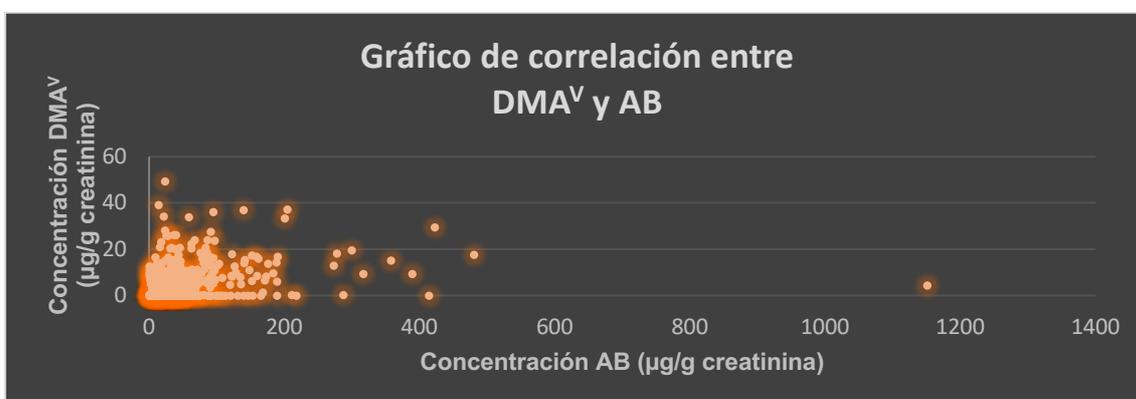


Figura 38. Gráficos de correlación entre DMA^V y AB.

Por último, se examinó la proporcionalidad entre los índices de metilación primario y secundario y las especies ácido monometilarsónico y dimetilarsónico. La correlación fuerte entre éstos fue consecuencia directa de la relación existente entre el PMI ($r=0,915$) y SMI ($r=0,808$) con el MMA^V y DMA^V, respectivamente, mediante las ecuaciones [1] y [2] descritas al comienzo de este apartado.

b) Niveles de arsénico según el país de origen

La primera variable que se analizó fue el país de nacimiento de los participantes (Tabla 54). El 94,9% de los participantes tenían la nacionalidad española (N=651), un 3,06% de Marruecos (N=21), mientras que el 2,04% restante nacieron en un país o países desconocidos en el momento del estudio.

Los resultados clasificados por país de nacimiento mostraron unos mayores valores en general para el caso de la población española que para la marroquí, siendo prácticamente el doble la concentración de las especies AB y DMA^V para la primera que para la segunda, si bien el tamaño muestral es muchísimo más pequeño para éste último. Como consecuencia de esto, el SMI es mayor mientras que el PMI tiene el mismo valor. Con respecto a los participantes cuyos países de origen desconocidos, es interesante notar que los niveles de AB y DMA^V fueron superiores que aquellos de los nativos de Marruecos, para un tamaño muestral aproximadamente similar.

Tabla 54. Biomarcadores medidos en función del país de nacimiento de los participantes

<i>Biomarcador</i> <i>(µg/g creatinina)</i>	<i>País de origen de los participantes</i>		
	<i>España</i> <i>(N=651)</i>	<i>Marruecos</i> <i>(N=21)</i>	<i>Otros</i> <i>(N=14)</i>
<i>TAs</i>	32,2±7,2	17,5±9,4	26,8±10,8
<i>TSA</i>	28,9±5,5	15,2±10,1	24,4±9,8
<i>AB</i>	23,3±5,4	11,5±9,9	16,4±8,0
<i>DMA^V</i>	0,832±0,016	0,239±0,037	1,93±0,17
<i>MMA^V</i>	0,105±0,005	0,147±0,049	0,178±0,029
<i>iAs</i>	<LOD	<LOD	<LOD
<i>PMI</i>	0,604	0,627	0,973
<i>SMI</i>	7,91	1,63	10,8

Analizando las correlaciones entre los datos conjuntos del país de nacimiento (variable nominal; 1=España, 2=Marruecos, 3=Otros) y los biomarcadores seleccionados, no se encontró ninguna correlación estadísticamente significativa, ni siquiera con la AB, el DMA^V y el MMA^V.

Sin embargo, al analizar por separado el comportamiento de estas tres especies dividiendo el tamaño muestral por tipo de país se observaron ciertas diferencias en las tendencias. Así, la linealidad de la AB con los niveles totales para las especies es significativa para la población española, la marroquí y aquella perteneciente a Otros países, lo que unido al hecho de que sus valores son aproximadamente unos 100 veces mayores que el resto de especies, nos permite concluir que el biomarcador AB es el de mayor peso a la hora de justificar los valores totales de arsénico (Figura 39 a-b).

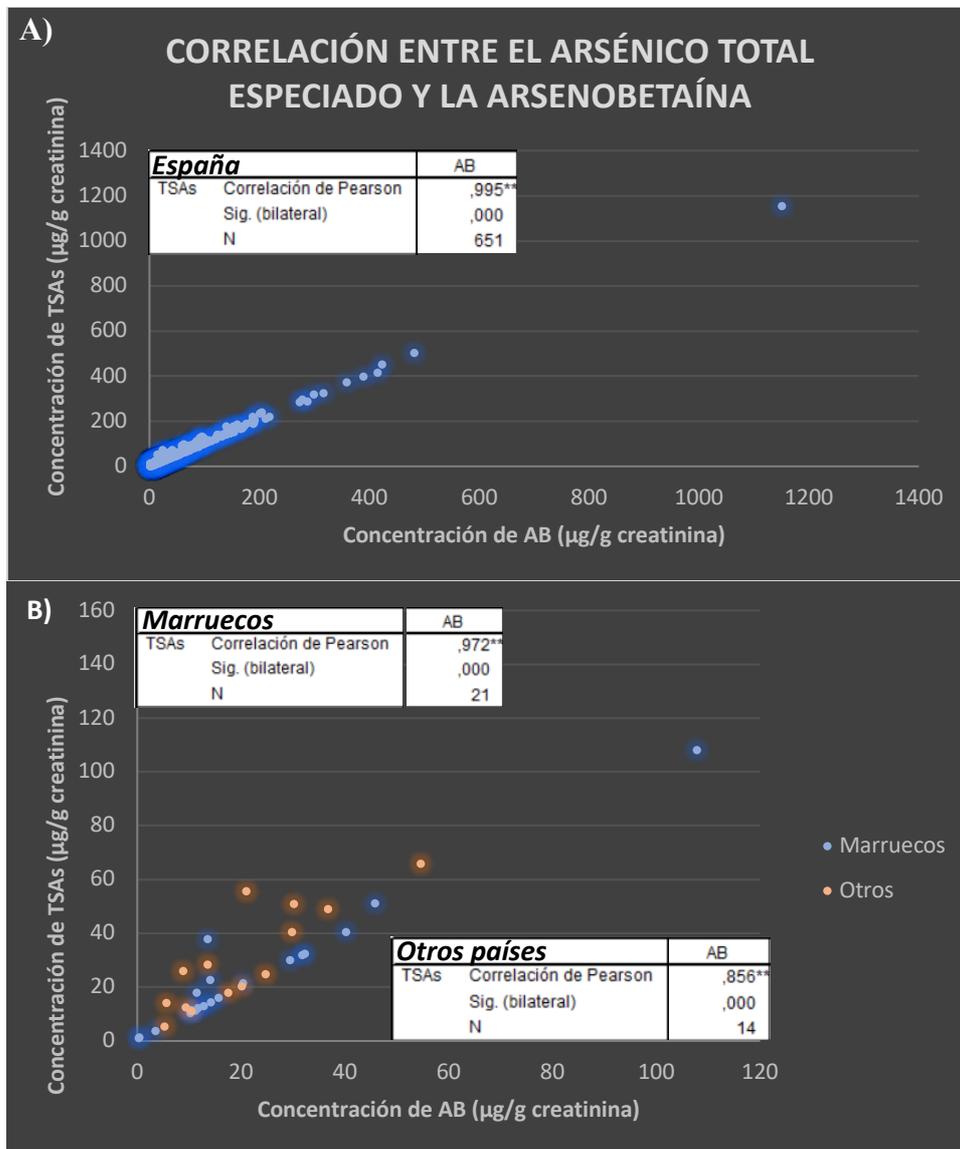


Figura 39. Comparación entre las concentraciones de AB con las de arsénico total especiado (TSAs). A) España; B) Marruecos y “Otros países”

De manera similar, se representaron las tendencias encontradas para el DMA^V para los tres países, influenciado por la relación, a priori no contrastada pero existente estadísticamente hablando, entre esta especie y la AB. Teniendo en cuenta éstas, se puede concluir que existe una interacción significativa y considerable entre el DMA^V y TSAs tanto en la población española como en la población catalogada como “Otros países”, si bien para esta última la correlación es notablemente superior (Figura 40 a-b).

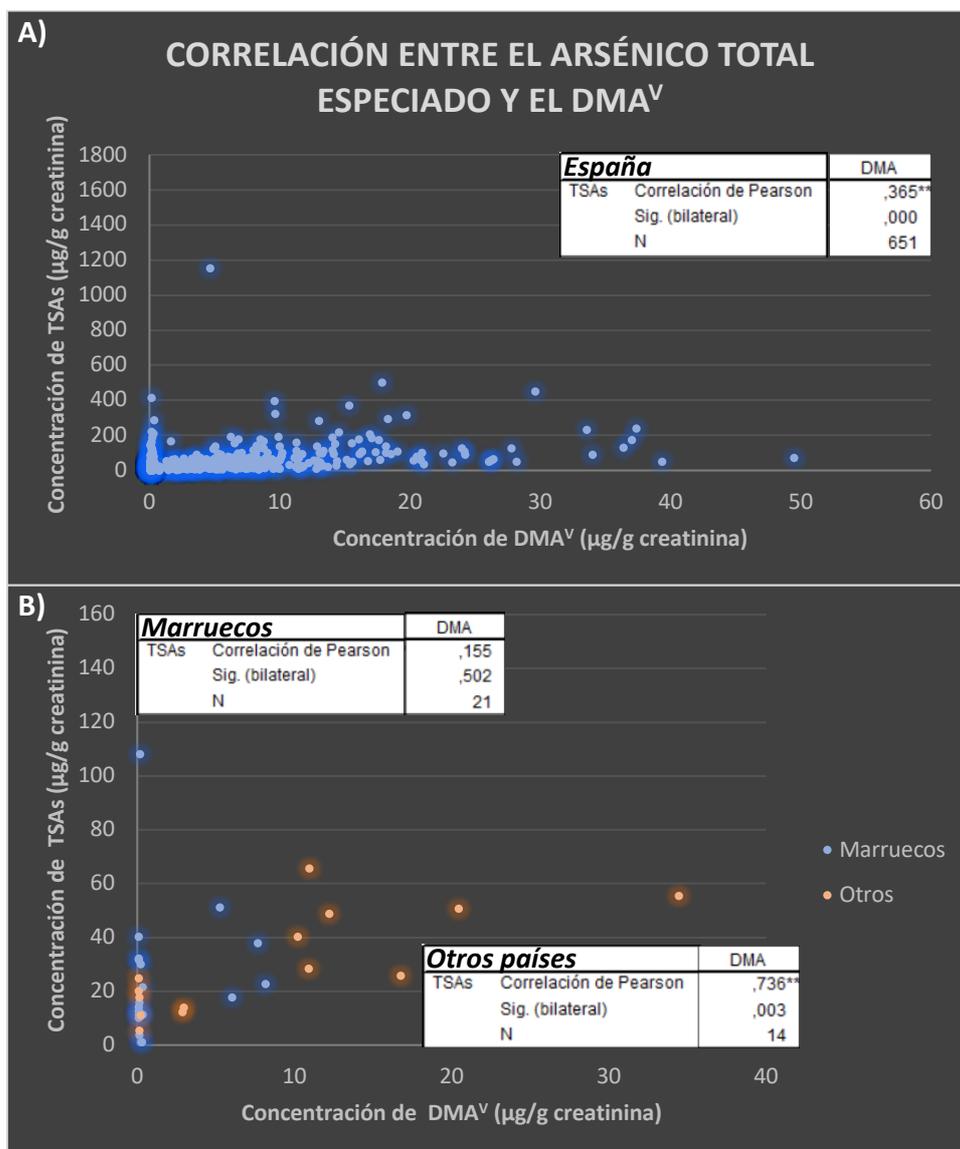


Figura 40. Comparación entre las concentraciones de DMA^V con las de arsénico total especiado (TSAs). A) España; B) Marruecos y “Otros países”

Por lo que respecta al MMA^V, y en el caso concreto de los españoles, éste muestra una correlación baja pero estadísticamente significativa con la concentración total de arsénico especiado. En Marruecos y en “Otros países” no son estadísticamente relevantes las tendencias encontradas, si bien es llamativa la tendencia inversamente proporcional para esta especie en el caso concreto de “Otros países” (Figura 41 a-b). Como dato adicional, cabe destacar que se encontró una relación débil pero estadísticamente significativa entre el dimetil y el monometil para España ($r=0,118$; P-value=0,000) y Marruecos ($r=0,533$; P-value=0,013), pero no para “Otros países”.

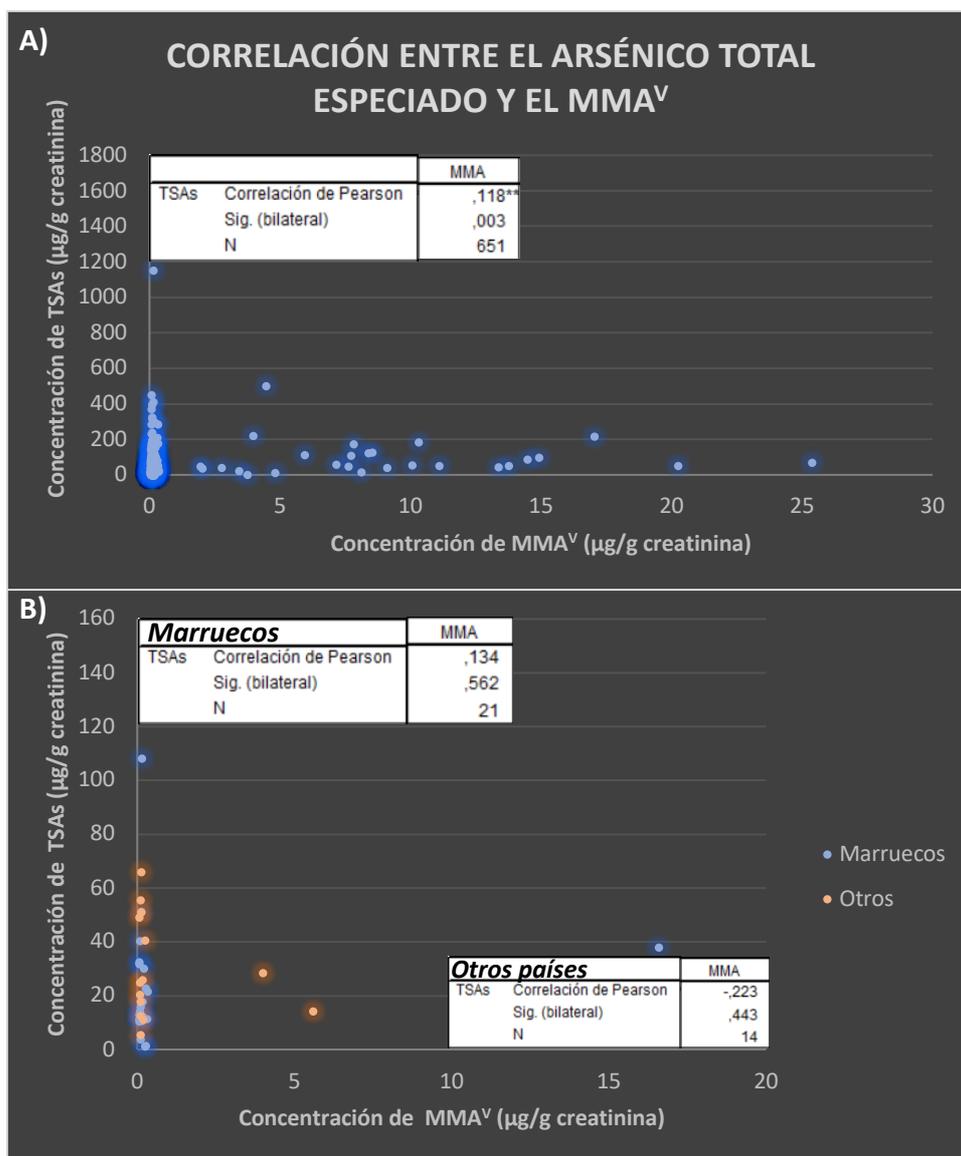


Figura 41. Comparación entre las concentraciones de MMA^V con las de arsénico total especiado (TSAs) para: A) España; B) Marruecos y Otros.

En conclusión, el denominador común de este apartado parece indicar que es la AB. Esto queda validado por su significancia estadística y alta linealidad frente a TSAs.

Esto unido al hecho de que dependiendo del país las especies mono y dimetilarsínico cobran relevancia estadísticamente hablando y que entre estas últimas parece haber también algún tipo de relación específica, apunta a que la posible causa detrás de estas discrepancias se encuentre en un componente común y a la vez específico de cada país. No obstante, es importante remarcar el efecto que puede conllevar el diferente tamaño muestral de la población española, unas ≈ 30 veces mayor que aquellos pertenecientes a los otros dos grupos, por lo que estos resultados no son 100% concluyentes.

c) Niveles de arsénico según la edad y el género

Posteriormente, se analizó el impacto de la edad y del género en la acumulación de arsénico (Tabla 55). En este sentido, el 74,3% de los participantes fueron mujeres, de las cuales el 32,2% resultaron ser menores de edad. El 25,7% restante fueron hombres, concretamente todos ellos menores de edad.

En cuanto a la distribución por edad, el 49,8% de los colaboradores poseían un rango de edad de 0-20 años, el 27,4% entre los 20-40, y el 22,8% restante 40-60 años.

Tabla 55. Biomarcadores en función del género y la edad de los participantes

Biomarcador ($\mu\text{g/g creatinina}$)	Género				Edad		
	Hombres (N=178)	Mujeres (N=508)	Niños (N=178)	Niñas (N=164)	Menores de edad [0-20 años] (N=342)	Adultos [20-40 años] (N=188)	Adultos [40-60 años] (N=156)
TAs	27,1 \pm 7,3	33,1 \pm 8,9	27,1 \pm 7,3	31,0 \pm 7,6	28,8 \pm 5,2	32,2 \pm 1,9	37,0 \pm 13,9
TSA	24,2 \pm 6,7	29,8 \pm 6,7	24,3 \pm 6,7	27,8 \pm 7,5	25,9 \pm 3,64	28,4 \pm 1,3	34,1 \pm 12,8
AB	19,1 \pm 6,4	24,1 \pm 6,5	19,0 \pm 6,4	21,5 \pm 7,0	20,1 \pm 3,4	23,5 \pm 1,2	28,3 \pm 12,2
DMA^V	0,804 \pm 0,029	0,819 \pm 0,019	0,804 \pm 0,029	0,826 \pm 0,033	0,819 \pm 0,016	0,817 \pm 0,087	0,804 \pm 0,039
MMA^V	0,105 \pm 0,007	0,108 \pm 0,007	0,105 \pm 0,007	0,124 \pm 0,016	0,113 \pm 0,190	0,097 \pm 0,029	0,108 \pm 0,008
iAs	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
PMI	0,580	0,622	0,580	0,650	0,612	0,637	0,577
SMI	7,67	7,55	7,67	6,67	7,22	8,43	7,44

Se observó un factor acumulativo exclusivamente para la AB en función de la edad (variable ordinal; 1=[0-20 años], 2=[20-40 años], 3=[40-60 años]). En este sentido, se calculó un incremento del 10% para aquellos con edad comprendida entre 20-40 años con respecto a los menores de edad, mientras que para el grupo de 40 a 60 años, este incremento fue del $\approx 20\%$ con respecto a los adultos de menor rango de edad. Sorprendentemente, la concentración media para el resto de las especies permaneció relativamente constante, lo que se demuestra por los índices PMI y SMI para los 3 rangos de edad.

Analizando posibles diferencias entre el metabolismo de hombres y mujeres, se encontró que de manera similar al efecto de la edad, las mujeres presentaban una mayor tasa de AB excretado que los hombres, siendo en este caso la diferencia de un 27%. Ahora bien, los hombres eran en realidad niños, por lo que a continuación, se procedió a comparar únicamente entre niños y niñas para determinar si ese porcentaje mostraba valores inferiores, algo que explicaría el efecto acumulativo por edad descrito anteriormente combinado con el efecto de género. Así, esta diferencia fue del 12%, igualmente mayor para las niñas. Posteriormente, cogiendo sólo la población femenina, las mujeres adultas mostraron un 14% más de AB que las niñas, lo cuál tiene sentido ya que resultó ser la diferencia esperable entre el efecto de edad y el de género. Por lo que respecta al resto de biomarcadores, todos ellos mostraron valores de concentración similares, manteniendo nuevamente constante los índices PMI y SMI.

Clasificando los datos del estudio en base a criterios de género (variable nominal; 1=Mujer, 2=Hombre) y/o edad, no se encontró ninguna correlación estadística significativa en adultos, pero sí en niños.

d) Efecto combinado del país de nacimiento y la edad

En este punto, se planteó dividir los datos de acuerdo al país de origen y ordenarlos de manera creciente con la edad, comprobando así si la variable o variables desconocidas y acumulativas eran específicas para cada país o por el contrario, este efecto acumulativo es común a sendas naciones, clarificando así algunos puntos mencionados en las secciones previas. De esta manera, se separaron en tres grupos de datos atendiendo al primer criterio, y a continuación, se ordenaron por edad (Tabla 56).

Los resultados mostraron resultados dependientes del tipo de especie. Por un lado, se observó una tendencia lineal y creciente con la edad para la excreción de arsenobetaina en orina para la población española y la perteneciente a otros países, siendo más destacable para este último. Así, el incremento en concentración de AB, y por ende TSAs y TAs, para aquellos dentro del rango de 20 a 60 años, fue del 579% para los oriundos de los países desconocidos frente al 31% calculado para los españoles. En ambos casos la correlación fue estadísticamente significativa, estando mejor correlacionados para los primeros ($r=0,532$; $P\text{-value}=0,032$) que para los segundos ($r=0,116$; $P\text{-value}=0,000$).

Tabla 56. Influencia del tipo de país en los biomarcadores seleccionados

Biomarcador ($\mu\text{g/g}$ creatinina)	España			Marruecos			Otros	
	[0-20 años] (N=340)	[20-40 años] (N=164)	[40-60 años] (N=147)	[0-20 años] (N=2)	[20-40 años] (N=12)	[40-60 años] (N=7)	[20-40 años] (N=12)	[40-60 años] (N=2)
TAs	28,9 \pm 0,2	32,8 \pm 0,7	40,3 \pm 0,5	22,5 \pm 0,6	26,1 \pm 0,5	8,28 \pm 0,77	30,4 \pm 0,4	12,1 \pm 0,4
TSAs	7,17 \pm 0,10	10,9 \pm 0,4	13,9 \pm 0,3	6,57 \pm 0,90	5,47 \pm 0,18	1,89 \pm 0,11	10,7 \pm 0,3	38,6 \pm 0,7
AB	2,69 \pm 0,09	6,69 \pm 0,45	8,76 \pm 0,31	2,90 \pm 0,91	2,92 \pm 0,08	0,705 \pm 0,118	3,80 \pm 0,20	25,8 \pm 1,1
DMA^V	0,819 \pm 0,021	0,831 \pm 0,030	0,846 \pm 0,031	0,233 \pm 0,003	0,329 \pm 0,061	0,140 \pm 0,002	1,60 \pm 0,20	5,60 \pm 0,25
MMA^V	0,113 \pm 0,008	0,092 \pm 0,009	0,104 \pm 0,012	0,233 \pm 0,003	0,140 \pm 0,086	0,140 \pm 0,002	0,144 \pm 0,029	0,636 \pm 0,122
iAs	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
PMI	0,613	0,621	0,564	0,500	0,742	0,500	0,752	4,56
SMI	7,25	9,08	8,12	1,00	2,34	1,00	11,3	8,73

Por lo que respecta a los nativos de Marruecos, se observó una fuerte depresión en los niveles de AB, para los más mayores, pero no validada por ninguna correlación significativa. Por otro lado, los metabolitos orgánicos mono y dimetilados guardaron una buena correlación con la edad, exclusivamente para los oriundos de los países desconocidos, concretamente un incremento del 342 y 250%, respectivamente para aquellos con edades comprendidas entre 20 y 60 años. Lamentablemente, los P-values para ambas contribuciones no se encontraron dentro del 95 ni 99% de significación, por lo que este aumento en los mencionados biomarcadores, así como en el PMI, son sospechosos pero no concluyentes.

En resumen, parecer existir una variable que efectivamente tiene un carácter acumulativo y que guarda algún tipo de relación con el país de origen de los participantes, no expresándose de la misma manera entre las diferentes naciones estudiadas.

e) Efecto del consumo de tabaco en los niveles de arsénico

Posteriormente, se decidió estudiar la posible influencia del tabaco en la acumulación del arsénico en el cuerpo humano. El tabaco, junto al BMI, fueron los dos factores de riesgo que se decidieron evaluar en este estudio, siendo el primero el factor más importante debido al consabido contenido de arsénico en el tabaco, si bien éste gradualmente es menor debido a la desaparición de los pesticidas a base de este elemento. Así, a partir de la concentración obtenida para cada muestra de cotinina en orina, cadmio en suero y orina, creatinina sérica, categoría de fumador (nominal; 1=no-fumador, 2=exfumador; 3=fumador activo) y los biomarcadores, éstos se categorizaron en base al estatus de fumador en el momento de la recogida de muestra (Tabla 57).

No se observó incidencia alguna ni correlación estadísticamente significativa entre el consumo de tabaco y los niveles de arsénico, como demuestra el hecho de que los valores para los biomarcadores de arsénico fueron constantes independientemente de los hábitos de fumar.

La excepción la supuso el ácido dimetilarsínico, que presentó una tendencia decreciente (disminución $\approx 38\%$ para los fumadores que para los no fumadores, y del $\approx 27\%$ para los exfumadores con respecto a los no fumadores) disminuyendo en similar medida el SMI como consecuencia de esto. El tratamiento estadístico reflejó una correlación estadísticamente significativa entre los valores de DMA^V y el tipo de hábito de consumo ($r=-0,081$; P-value=0,033), si bien de carácter débil.

Para contrastar la veracidad de estos datos, se estudiaron también los niveles de cotinina en orina, metabolito principal de la nicotina, la concentración de cadmio en suero y orina y la creatinina sérica, biomarcadores del tabaquismo de acuerdo a la bibliografía consultada. Los resultados arrojaron un notable incremento de cotinina ($\approx x20$) en la población fumadora frente a la no fumadora y exfumadora ($r=0,420$, P-value=0,000), consistente con los datos de consumo de tabaco.

Por otro lado, los niveles de Cd en suero encontrados fueron mayores (≈ 2) en población fumadora, manteniéndose constante para exfumadores y no fumadores. Estos dos biomarcadores mostraron, a su vez, una estrecha correlación ($r=0,657$; $P\text{-value}=0,000$). Por lo que respecta al Cd en orina y a la creatinina sérica, no se detectaron concentraciones superiores en fumadores, sino que los valores fueron constantes para toda la población estudiada.

Tabla 57. Biomarcadores de arsénico e indicadores específicos del consumo de tabaco

Biomarcador ($\mu\text{g/g creatinina}^*$)	Efecto del consumo de tabaco		
	No fumadores (N=261)	Exfumadores (N=81)	Fumadores activos (N=122)
TAs en orina	32,6 \pm 0,5	29,5 \pm 0,3	31,5 \pm 0,4
TSA s en orina	28,5 \pm 0,3	27,0 \pm 0,3	29,2 \pm 0,4
AB en orina	21,3 \pm 0,3	22,2 \pm 0,3	24,8 \pm 0,4
DMA^V en orina	1,06 \pm 0,03	0,766 \pm 0,036	0,655 \pm 0,038
MMA^V en orina	0,111 \pm 0,010	0,105 \pm 0,007	0,106 \pm 0,014
ⁱAs en orina	<LOD	<LOD	<LOD
PMI	0,631	0,553	0,635
SMI	9,58	7,28	6,19
Cotina en orina	11,3 \pm 0,1	12,3 \pm 4,4	237 \pm 17
Cd en suero ($\mu\text{g/l}$)	0,237 \pm 0,001	0,257 \pm 0,002	0,421 \pm 0,003
Cd en orina	0,165 \pm 0,001	0,159 \pm 0,002	0,174 \pm 0,001
Creatinina sérica ($\mu\text{g/l}$)	0,568 \pm 0,001	0,569 \pm 0,001	0,591 \pm 0,001

**Todas las unidades menos el Cadmio en suero y la creatinina sérica se midieron con corrección de creatinina.*

En conclusión, el tabaco no contribuye a modificar los niveles de arsénico del organismo, por lo que podemos descartar los hábitos de esta índole como posible variable que explicase los niveles general encontrados y descritos para la población de estudio.

f) *Influencia del índice de masa corporal (IMC)*

El otro factor de riesgo evaluado en este estudio fue el de índice de masa corporal o IMC (Tabla 58). Como puede observarse, a medida que aumenta el peso, el arsénico excretado en forma de AB disminuye (aproximadamente un 40%). Al mismo tiempo, el contenido de dimetilarsínico aumento un 22%, mientras que el del ácido monometilarsínico disminuyó un 15%.

Tabla 58. Influencia del IMC en la excreción de las distintas especies de arsénico

Biomarcador ($\mu\text{g/g creatinina}^*$)	Índice de Masa Corporal (IMC)		
	<i>Infrapeso (IMC<18.5)</i> (N=204)	<i>Normopeso (18.5<IMC<25.0)</i> (N=254)	<i>Sobrepeso (>25.0)</i> (N=228)
TAs en orina	30,4 \pm 7,7	27,6 \pm 7,6	23,7 \pm 8,4
TSA's en orina	27,1 \pm 7,5	25,5 \pm 6,6	19,1 \pm 8,4
AB en orina	21,2 \pm 7,1	20,3 \pm 6,3	12,8 \pm 7,6
DMA^V en orina	0,761 \pm 0,027	0,903 \pm 0,042	0,935 \pm 0,062
MMA^V en orina	0,125 \pm 0,011	0,101 \pm 0,014	0,106 \pm 0,001
'As en orina	<LOD	<LOD	<LOD
PMI	0,643	0,588	0,500
SMI	6,08	8,89	10,7

Este efecto aparentemente sin sentido se reflejó a su vez en los índices primarios y secundarios de metilación (Figura 42), encontrando que una mayor eficacia en la metilación al rendir en mayor proporción DMA^V sobre MMA^V.

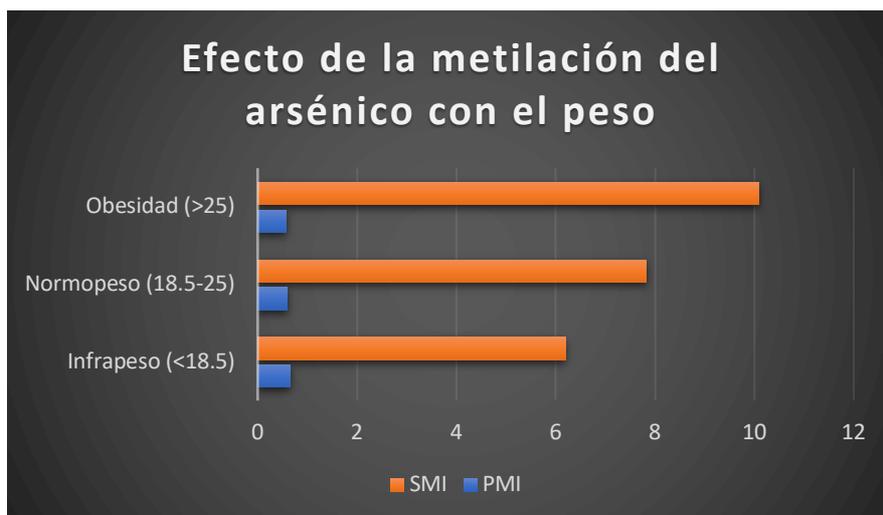


Figura 42. Variación en los índices de metilación primario (PMI) y secundario (SMI) con el peso

g) Influencia de la dieta en los niveles de arsénico

Finalmente, se clasificó a la población atendiendo a uno de los factores de exposición más comunes cuando se habla del arsénico: la dieta. Además, la región de Murcia es ampliamente conocida por ser una zona con una dieta especialmente rica y basada en alimentos de origen marino y arroz, ejemplos por antonomasia de alimentos portadores de arsénico. Así, se registró el consumo en forma de piezas o raciones por semana de pescado y arroz para todos los participantes, contando conjuntamente el consumo de pescado y marisco.

En este sentido, los resultados obtenidos al analizar la concentración obtenida en las muestras de orina con ingestas crecientes de pescado y arroz, respectivamente, se han ordenado clasificándolos en grupos de 5 piezas cada uno para el pescado, y 2 raciones en el caso del arroz (Tabla 59).

Tabla 59. Influencia del consumo de pescado y de arroz en los niveles de arsénico

Biomarcador ($\mu\text{g/g creatinina}$)	Indicadores de la dieta						
	Piezas de pescado por semana				Raciones de arroz por semana		
	0 (N=154)	1-5 (N=409)	5-10 (N=114)	10-20 (N=9)	0 (N=87)	1-2 (N=587)	2-4 (N=12)
TAs	20,9 \pm 6,9	32,2 \pm 5,3	47,0 \pm 1,4	71,8 \pm 2,4	29,3 \pm 9,7	31,9 \pm 7,8	25,2 \pm 3,4
TSAs	18,5 \pm 6,7	29,1 \pm 4,9	42,8 \pm 1,0	64,6 \pm 2,0	27,6 \pm 6,4	28,4 \pm 6,9	24,5 \pm 4,8
AB	14,9 \pm 6,6	22,9 \pm 4,6	35,9 \pm 1,0	54,6 \pm 1,9	23,2 \pm 6,1	22,8 \pm 6,6	14,4 \pm 2,6
DMA^V	0,341 \pm 0,017	0,956 \pm 0,020	1,36 \pm 0,066	2,56 \pm 0,198	0,531 \pm 0,023	0,848 \pm 0,020	2,52 \pm 0,11
MMA^V	0,102 \pm 0,009	0,111 \pm 0,066	0,099 \pm 0,018	0,159 \pm 0,071	0,108 \pm 0,010	0,106 \pm 0,006	0,196 \pm 0,038
ⁱAs	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
PMI	0,592	0,625	0,569	0,864	0,611	0,604	1,05
SMI	3,33	8,64	13,64	16,06	4,93	8,00	12,8

A la vista de los resultados, queda palpable la influencia de la ingesta de pescado y arroz en los niveles y el tipo de especie excretada. Por lo que respecta al número de piezas de pescado, existe un aumento aproximadamente del 50% en los niveles de Arsenobetaina excretada ligado al creciente consumo de porciones de este alimento.

Con el DMA^V dicho incremento no es constante, sino que se produce un primer incremento fuerte del 180% con las 5 primeras piezas de pescado y/o marisco, un 42% con las segundas 5, y un incremento final del 88% para la última categoría. Para su precursor monometilado, sólo se observa un incremento del 50% en aquellos casos en los que la ingesta fue superior a 10 piezas/semana.

Los tres factores de manera global contribuyen al incremento de los niveles excretados de TAs y TSAs en un \approx 50% para ambos biomarcadores según crece gradualmente la ingesta de este tipo de alimento, prueba de que entre los tres, el factor determinante fue el de la AB, lógico por otra parte debido a la diferencia en concentración.

El análisis estadístico de los datos demostró una correlación moderada entre las piezas de pescado ingeridas y la concentración de TAs, TSAs, AB y DMA^V, no así para el MMA^V (Figura 43).

Correlaciones

		Piezaspe scado	TAs	TSAs	AB	DMA	MMA	íAs	PMI	SMI
Piezaspe scado	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	1 686	,224** ,000 686	,243** ,000 686	,228** ,000 686	,215** ,000 686	,059 ,120 686	-,003 ,938 686	,046 ,224 686	,189** ,000 686
TAs	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	,224** ,000 686	1 686	,964** ,000 686	,966** ,000 686	,293** ,000 686	,074 ,054 686	,072 ,059 686	,081* ,034 686	,218** ,000 686
TSAs	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	,243** ,000 686	,964** ,000 686	1 686	,995** ,000 686	,360** ,000 686	,110** ,004 686	,076* ,046 686	,122** ,001 686	,267** ,000 686
AB	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	,228** ,000 686	,966** ,000 686	,995** ,000 686	1 686	,268** ,000 686	,065 ,088 686	,083* ,030 686	,077* ,045 686	,201** ,000 686
DMA	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	,215** ,000 686	,293** ,000 686	,360** ,000 686	,268** ,000 686	1 686	,172** ,000 686	-,067 ,079 686	,207** ,000 686	,808** ,000 686
MMA	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	,059 ,120 686	,074 ,054 686	,110** ,004 686	,065 ,088 686	,172** ,000 686	1 686	,032 ,397 686	,915** ,000 686	-,108** ,005 686
íAs	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	-,003 ,938 686	,072 ,059 686	,076* ,046 686	,083* ,030 686	-,067 ,079 686	,032 ,397 686	1 686	-,056 ,146 686	-,234** ,000 686
PMI	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	,046 ,224 686	,081* ,034 686	,122** ,001 686	,077* ,045 686	,207** ,000 686	,915** ,000 686	-,056 ,146 686	1 686	-,110** ,004 686
SMI	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	,189** ,000 686	,218** ,000 686	,267** ,000 686	,201** ,000 686	,808** ,000 686	-,108** ,005 686	-,234** ,000 686	-,110** ,004 686	1 686

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

* La correlación es significante al nivel 0,05 (bilateral).

Figura 43. Correlaciones encontradas para el consumo de pescado

Por lo que respecta al arroz, las especies más relevantes vuelven a ser el DMA^V, el MMA^V y la AB. El primero aumenta de manera global un 370% (primero 60% y luego 197%) al pasar de no consumir arroz a consumir 4 raciones por semana. El segundo, de manera similar a lo que ocurrió con el pescado, se mantiene constante hasta un valor máximo de consumo, en este caso, 3-4 platos de arroz, momento en el cual su concentración sufre un incremento del 83%. Y en cuanto a la AB, se observó una tendencia decreciente con la ingesta de arroz (-58%) a partir de la 3ª ración de este alimento.

A la luz de la variación global en los niveles de arsénico total y la suma de especies, decrecientes cuánto mayor resultó ser la ingesta semanal de arroz, se comprobó nuevamente que el factor limitante fue aquel de la AB, ya que de las tres contribuciones, la suya fue la única con tendencia similar.

En cuanto a los estadísticos del arroz, se detectó una correlación débil-moderada entre el DMA^V y las raciones de arroz, no así para la AB, MMA^V, TAs y TSAs (Figura 44).

Correlaciones

		Raciones Arroz	DMA	MMA	PMI	SMI	AB	TAs	TSAs	iAs
RacionesArroz	Correlación de Pearson	1	,101**	,030	,025	,065	,001	,025	,011	-,043
	Sig. (bilateral)		,008	,434	,508	,091	,977	,516	,764	,257
	N	686	686	686	686	686	686	686	686	686
DMA	Correlación de Pearson	,101**	1	,172**	,207**	,808**	,268**	,293**	,360**	-,067
	Sig. (bilateral)	,008		,000	,000	,000	,000	,000	,000	,079
	N	686	686	686	686	686	686	686	686	686
MMA	Correlación de Pearson	,030	,172**	1	,915**	-,108**	,065	,074	,110**	,032
	Sig. (bilateral)	,434	,000		,000	,005	,088	,054	,004	,397
	N	686	686	686	686	686	686	686	686	686
PMI	Correlación de Pearson	,025	,207**	,915**	1	-,110**	,077*	,081*	,122**	-,056
	Sig. (bilateral)	,508	,000	,000		,004	,045	,034	,001	,146
	N	686	686	686	686	686	686	686	686	686
SMI	Correlación de Pearson	,065	,808**	-,108**	-,110**	1	,201**	,218**	,267**	-,234**
	Sig. (bilateral)	,091	,000	,005	,004		,000	,000	,000	,000
	N	686	686	686	686	686	686	686	686	686
AB	Correlación de Pearson	,001	,268**	,065	,077*	,201**	1	,966**	,995**	,083*
	Sig. (bilateral)	,977	,000	,088	,045	,000		,000	,000	,030
	N	686	686	686	686	686	686	686	686	686
TAs	Correlación de Pearson	,025	,293**	,074	,081*	,218**	,966**	1	,964**	,072
	Sig. (bilateral)	,516	,000	,054	,034	,000	,000		,000	,059
	N	686	686	686	686	686	686	686	686	686
TSAs	Correlación de Pearson	,011	,360**	,110**	,122**	,267**	,995**	,964**	1	,076*
	Sig. (bilateral)	,764	,000	,004	,001	,000	,000	,000		,046
	N	686	686	686	686	686	686	686	686	686
iAs	Correlación de Pearson	-,043	-,067	,032	-,056	-,234**	,083*	,072	,076*	1
	Sig. (bilateral)	,257	,079	,397	,146	,000	,030	,059	,046	
	N	686	686	686	686	686	686	686	686	686

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

* La correlación es significante al nivel 0,05 (bilateral).

Figura 44. Correlaciones encontradas para el consumo de arroz

En vista de esto, se procedió a dividir los datos por países, puesto que las dietas de cada país pueden tener elementos en común, pero poseen la suficiente especificidad como para presentar perfiles característicos en elementos presentes en la dieta, como el arsénico. Para poder entender mejor las contribuciones de la dieta de cada país, se eligieron únicamente tres especies: AB, DMA^V y MMA^V. Se representaron gráficamente los niveles divididos por los tipos de ración (Figuras 45-47). Se puede observar, pues, que existen diferencias sustanciales entre los diferentes países.

Por un lado, y centrándonos exclusivamente en la arsenobetaina, España y Otros muestran una tendencia creciente con el consumo de pescado, mientras que en el caso de Marruecos, la concentración de esta especie es relativamente similar para un ingesta creciente.



Figura 45. Concentración de AB frente al consumo de pescado para cada país

Examinando el impacto del monometilarsónico, se observa una clara tendencia creciente con el consumo para Otros. Sin embargo, en el caso de España, la variación es relativamente constante, y para Marruecos, la diferencia a partir de las 5 piezas es del 50%, mostrando un crecimiento en declive. Estas diferencias ponen de relieve que la relación pescado/marisco debe ser significativamente diferente entre sendos países, ya que los países desconocidos la ingesta tiene mucho mayor efecto que en los demás.

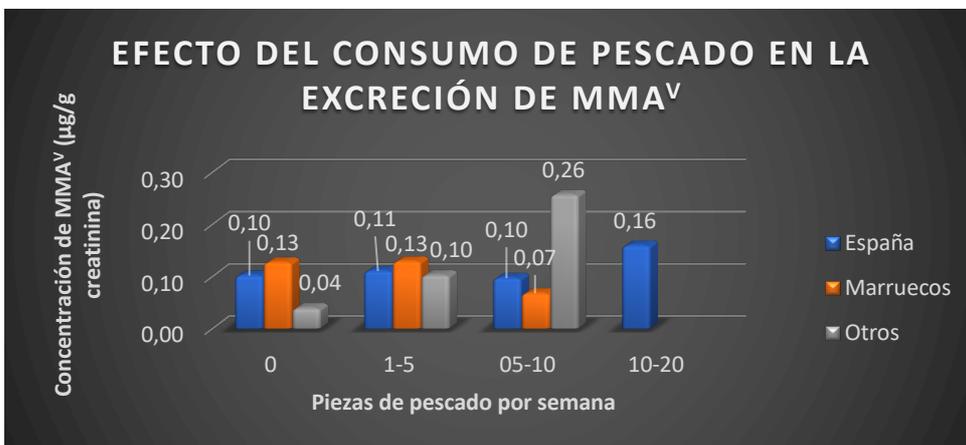


Figura 46. Concentración de MMAV frente al consumo de pescado para cada país

Por último, para la especie dimetilada se encontró un crecimiento en función del consumo de alimentos de origen marino para España y Otros, siendo más pronunciado para éste último. Por lo que respecta a Marruecos, ese crecimiento fue diferente ya que para un número comprendido entre 1 y 5 piezas, la concentración se mantuvo constante.

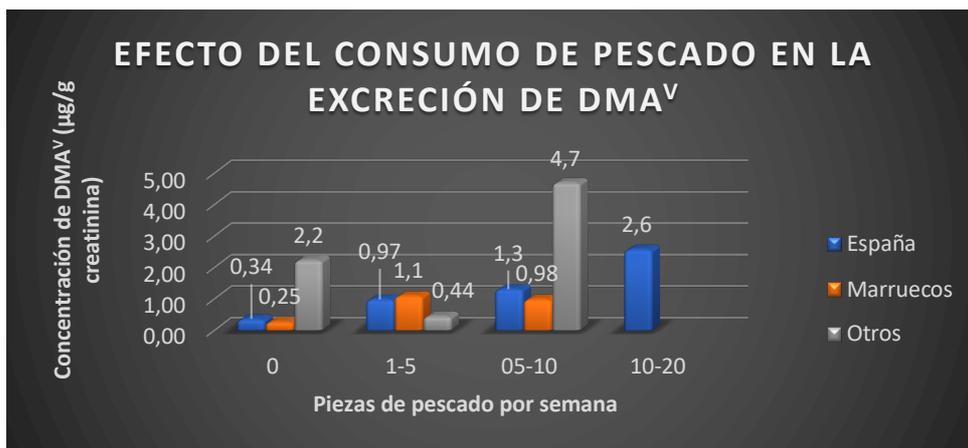


Figura 47. Concentración de DMA^V frente al consumo de pescado para cada país

Por lo que respecta al arroz, se observó una disminución en los niveles de AB con la creciente ingesta de arroz para todos los países estudiados (Figura 48), si bien para España y Marruecos este decrecimiento representó un 40% aproximadamente, mientras que para Otros fue casi del 70%.

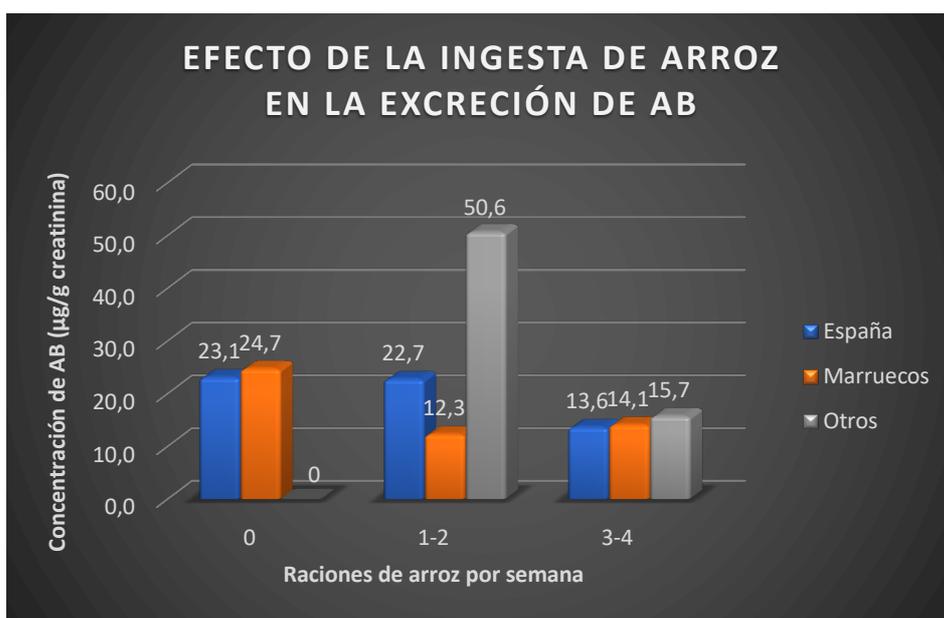


Figura 48. Concentración de AB frente al consumo de arroz para cada país

En cuanto al DMA^V, se detectó un fuerte aumento en su concentración (x7) en la población española para ingestas superiores a 3 platos de arroz a la semana (Figura 49). Similar para Marruecos, sin embargo este crecimiento fue menos pronunciado (x4) ya que hasta ingestas elevadas (3-4 platos por semana), sus niveles no se vieron afectados.

Por lo que respecta a Otros, toda la población del estudio fue consumidora de arroz, por lo que no pudimos establecer el nivel basal del derivado dimetilado, encontrando que sus niveles permanecieron constantes a pesar de la creciente ingesta.

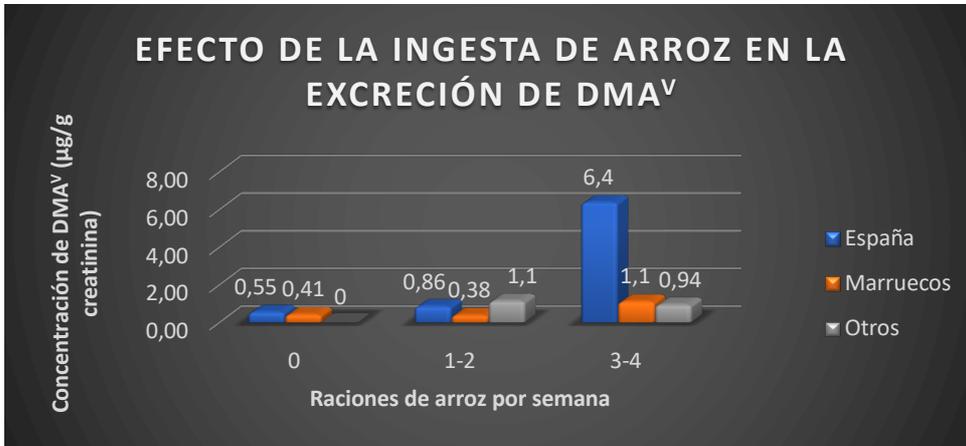


Figura 49. Concentración de DMA^V frente al consumo de pescado para cada país

El estudio de la variabilidad del MMA^V con la ingesta de arroz fue aún más interesante (Figura 50). En este caso, la población marroquí vio incrementados sus niveles basales por 16, mientras que para las otras dos zonas los niveles fueron constantes. Mención aparte merece la variable Otros que, al desconocerse los niveles sin ingesta de arroz, no se puede concluir que los niveles basales permanecieran constante, como si ocurre para la población española.



Figura 50. Concentración de MMA^V frente al consumo de pescado para cada país

Para resumir todo lo anteriormente descrito y usando como apoyo las correlaciones encontradas para cada especie con los consumos de pescado y arroz y el parámetro de significancia estadística (p-value) calculado estadísticamente (Tabla 60), a continuación se describen las implicaciones más relevantes de este apartado.

El consumo de pescado implicó un aumento significativo en los niveles de AB excretada para la nacidos en España y Otros. En el caso de Marruecos, dichos niveles permanecieron constantes. Esto coincide con las correlaciones encontradas, ya que sólo para España y Otros fueron estadísticamente significativas. Aunque menos relevante, para el DMA^V la tendencia fue similar, en este caso para los tres países, si bien para España y Marruecos fue más escalonada y menos pronunciada que para Otros.

Sólo España mostró una correlación estadística significativa. Por último, para el MMA^V el comportamiento fue diferente según el país. Así, para Marruecos se observó una disminución en sus valores a ingestas grandes, mientras que, para el resto, la tendencia fue la contraria, si bien menos pronunciada para España.

No obstante, con el arroz la tendencia es la contraria, al menos con respecto a la AB. Así, cuánto mayor fue el consumo de arroz, menor fue la concentración de AB, como se demuestra por la correlación negativa encontrada, si bien es muy débil.

A medida que la proporción de la especie del pescado disminuye en la orina, aquellas del dimetil y monometil aumentaron, siendo más relevante el incremento de la primera para los españoles y los pertenecientes a otros países, y la segunda para los oriundos de Marruecos. De estas relaciones, sólo la del MMA^V y el arroz para Marruecos y la del DMA^V y España fueron estadísticamente significativas.

Tabla 60. Correlaciones encontradas para las tres especies implicadas para el consumo de pescado y arroz

Biomarcadores ($\mu\text{g}/\text{g}$ creatinina)	Consumo de pescado por países					
	España		Marruecos		Otros	
	<i>r</i>	<i>P-value</i>	<i>r</i>	<i>P-value</i>	<i>r</i>	<i>P-value</i>
AB	0,231	0,000	-0,090	0,699	0,605	0,022
DMA^V	0,199	0,000	0,428	0,053	0,423	0,132
MMA^V	0,078	0,054	-0,100	0,665	0,159	0,588
	Consumo de arroz por países					
	España		Marruecos		Otros	
	<i>r</i>	<i>P-value</i>	<i>r</i>	<i>P-value</i>	<i>r</i>	<i>P-value</i>
AB	-0,019	0,621	-0,257	0,260	-0,135	0,645
DMA^V	0,101	0,010	0,190	0,410	-0,011	0,970
MMA^V	-0,015	0,701	0,607	0,004	0,306	0,287

4.4.-Análisis de las muestras

En esta sección se pretende mostrar el perfil de las muestras obtenidas en el estudio epidemiológico. En este punto ya se han discutido los pormenores de la metodología de especiación, los parámetros cromatográficos, el aspecto de los cromatogramas de los patrones y los resultados y conclusiones del estudio llevado a cabo con las 686 orinas. De hecho, y como se ya se indicaba previamente, en ninguna de ellas se detectó ¹As. Por otro lado, el MMA^V sólo se detectó en el 5% de las muestras. Esto significa que a grandes rasgos, en el 95% de las muestras el perfil de especiación constó única y exclusivamente de AB y DMA^V, mientras que para el 5% de las muestras, este perfil se encontró dominado por AB, DMA^V y MMA^V. Además, por supuesto, de la señal del patrón interno, en ambos casos. En este sentido, a continuación se han incluido dos muestras que resumen los dos tipos de perfiles encontrados (Figuras 51-52).

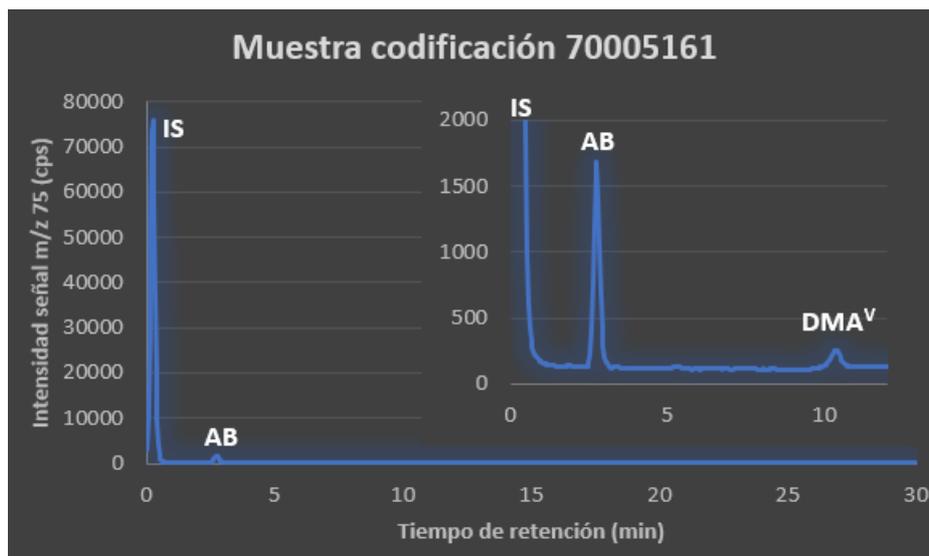


Figura 51. Cromatograma de la muestra 70005161

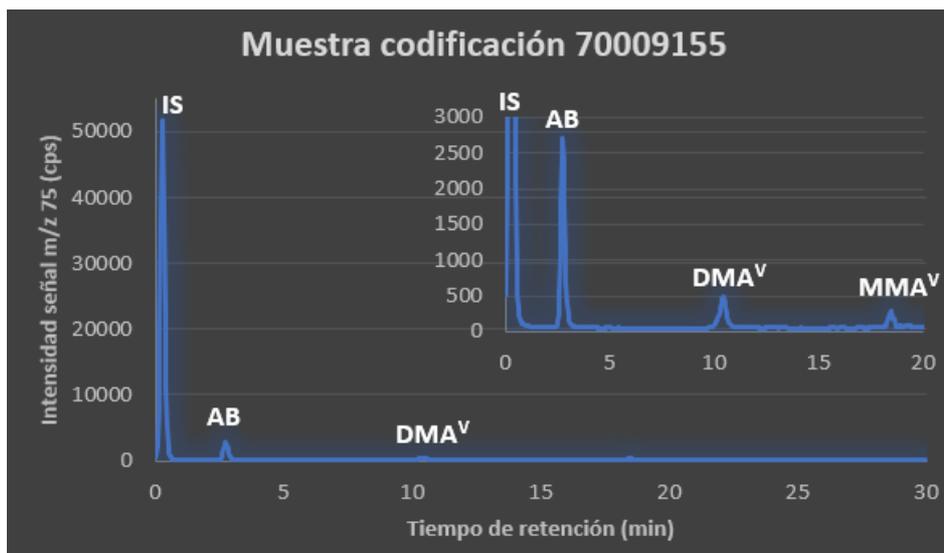


Figura 52. Cromatograma de la muestra 70009155

La muestra 70005161 contuvo 70,3 $\mu\text{g/l}$ de AB, 18,5 $\mu\text{g/l}$ de DMA^V mientras que la muestra 70009155 estuvo compuesta por 75,1 $\mu\text{g/l}$ de AB, 27,7 $\mu\text{g/l}$ de DMA^V y 8,4 $\mu\text{g/l}$ de MMA^V.

5.-Discusión

5.1.-Desarrollo y validación del método de arsénico total

Comparando nuestros estadísticos con la bibliografía (tabla 61), se observó que en general eran comparables a los valores reportados y en el caso concreto de la exactitud, nuestros datos demostraron ser mejores que otros estudios. Para mayor comodidad, las referencias se han ordenado cronológicamente, ya que el avance de los años ha repercutido en instrumentos más sensibles, por lo que se espera unos mejores valores de los estadísticos a lo largo de los años.

Tabla 61. Comparación de los estadísticos de precisión y exactitud con la bibliografía

COMPARACIÓN DE NUESTROS ESTADÍSTICOS DE PRECISIÓN Y EXACTITUD CON LA BIBLIOGRAFÍA				
Referencia	Control Interno utilizado	Réplicas (n)	Precisión^a	Exactitud^b
Valores experimentales	CRM 1 ^c	36	3,95	1,03
	CRM 2 ^d	36	3,07	0,923
	QC "Límite de Decisión"	36	2,95	2,65
Valores bibliográficos	CRM NIES n° 18 ³⁵¹	74	3,70	17,5
	QC pool de orina (nivel bajo) ³⁵²	>50	3,97	-
	QC pool de orina (nivel medio) ³⁵²	>50	3,16	-
	QC pool de orina (nivel alto) ³⁵²	>50	3,69	-
	NIST SRM 2668L1 (nivel bajo) ³⁵²	34	-	2,95
	NIST SRM 2668L2 (nivel alto) ³⁵²	33	-	0,920
	ClinChek 1 (nivel bajo) Lot. #1227 ³⁵³	10	1,90	0,920
ClinChek 2 (nivel alto) Lot. #1227 ³⁵³	10	1,60	2,19	

^aLa precisión se expresa como CV(%).

^bLa exactitud se expresa como veracidad.

^cSeronorm Trace Elements in Urine Level 1 Lot. #877

^dSeronorm Trace Elements in Urine Level 1 Lot. #878

En primer lugar, Scheer y sus colaboradores utilizaron NIES n°18 para medir el arsénico total en orina, obteniendo unos valores de precisión muy similares a los obtenidos por nuestro grupo, pero notablemente inferiores en exactitud, a pesar de usar un modo de colisión a base de He como filtro de interferencias frente al ⁷⁵ArCl⁺ y/o ⁷⁵CaCl⁺.

Nueve años más tarde, Jones desarrolló un método para determinar ^{75}As , ^{52}Cr y ^{60}Ni utilizando también un gas de colisión para eliminar las interferencias poliatómicas. Su grupo utilizó tres pools de orinas, uno para concentraciones bajas (10,8 $\mu\text{g/l}$), otro para intermedias (48,1 $\mu\text{g/l}$) y un último para concentraciones altas (1240 $\mu\text{g/l}$), usados como QCs para medir la precisión, expresada como CV(%), y dos SRMs para calcular la exactitud, expresada como sesgo, aunque en la tabla anexa, y utilizando los datos suministrados por el autor, se reconvirtió a veracidad. En base a los datos suministrados, la precisión y la exactitud fueron similares, siendo ligeramente superior en nuestro caso para el QC “Límite de Decisión” que el SRM 2668L1. Sin embargo, Schmied y su grupo obtuvieron unos estadísticos muy superiores a los reflejados en nuestra investigación para la precisión y ligeramente superiores en cuanto a exactitud, utilizando el modo DRC con O_2 para desplazar la señal de ^{75}As a ^{91}AsO , debido a la alta afinidad del oxígeno con el metaloide, eliminando las posibles interferencias lo que puede provocar una mejoría en la detección del mismo, mejorando los estadísticos comparados.

En nuestra investigación, la detección se realizó utilizando una ecuación de corrección para la señal de ^{75}As ya que no se disponía de modo colisión. Con respecto al modo reacción, sólo existía un única línea con NH_3 , que a raíz de las primeras pruebas, demostraron disminuir notablemente la señal del arsénico. Como se observa, la concentración de la orina antes y después de adicionar los cloruros es similar, lo que permite demostrar que la señal del $^{75}\text{ArCl}^+$ no altera ni afecta significativamente los resultados de arsénico en orina, o dicho de otro modo, que la ecuación de corrección del arsénico supone una herramienta eficaz de eliminación de interferencias. De acuerdo a la bibliografía (tabla 62), se puede observar diferentes maneras de detectar la señal de ^{75}As . En base a la información recogida en estas investigaciones, se puede concluir que nuestro límite de detección logró ser más bajo que el de otros estudios como los de Cadwell o Jones.

El caso contrario ocurrió con las metodologías de Heitland y Goullé. Concretamente para esta última, el motivo es muy sencillo: Goullé y sus colaboradores contaron con un ICP/MS de alta resolución, el Thermo Elemental X7CCT, para llevar a cabo una determinación multielemental en orina, plasma, sangre total y pelo.

Tabla 62. Comparación de LOD y LOQ con la bibliografía. NR significa no reportados

COMPARACIÓN DE LOD y LOQ CON LA BIBLIOGRAFÍA				
Referencia	ICP/MS	Modo de detección	LOD ($\mu\text{g/l}$)	LOQ ($\mu\text{g/l}$)
Valores experimentales	Perkin Elmer ELAN® DRC 6100	Q-ICP/MS (Ec. Corrección)	0,16	0,53
	Thermo Elemental X7CCT ³⁵⁴	HR-ICP/MS	0,03	0,10
Valores bibliográficos	Perkin Elmer ELAN® DRC II ³⁵⁵	Q-ICP/MS (DRC-H ₂) $\Phi_{\text{H}_2}=0,2-0,6$ ml/min; 10% H ₂	0,74	NR
	Agilent 7700x ³⁵⁶	Q-ICP/MS (KED-He) $\Phi_{\text{He}}=4,0$ ml/min	0,05	NR
	Perkin Elmer NexION® 300D ³⁵²	Q-ICP/MS (KED-He) $\Phi_{\text{He}}=2,5$ ml/min	0,23	NR

Al contar con tecnología de alta resolución, la relación señal/ruido es mucho mayor que para un ICP/MS convencional con un solo cuadrupolo, como es el caso del ICP/MS que se ha utilizado en esta tesis y el del resto de los estudios que Figuran en la tabla. No se especifica si se trata de un sector magnético o de un triple cuadrupolo, pero en cualquier caso, permite la detección de analitos a concentraciones mucho menores por la eliminación de las interferencias además de contar con una separación de los iones del resto de la muestra mucho más eficiente, permitiendo llegar mucho más abajo en la escala de sensibilidad.

El resto de estudios fueron realizados con un Q-ICP/MS, aprovechando la tecnología de reacción o DRC® de Perkin Elmer o la de colisión o CRC® de Agilent, si bien actualmente los equipos cuentan con ambas tecnologías independientemente de la casa comercial a la que pertenezcan.

Así, en el caso de la metodología desarrollada por Cadwell, éste usó hidrógeno como gas de reacción alcanzando un valor final para el LOD unas 4-5 veces superior al nuestro, lo cuál es extraño porque los gases más efectivos para la determinación de arsénico son el H₂ y el O₂.

En el caso del hidrógeno, éste reacciona con las interferencias poliatómicas (⁷⁵ArCl⁺ si se trata de ⁷⁵As) eliminándola y aumentando, por ende, la sensibilidad del arsénico, mientras que en el caso del oxígeno, es el propio arsénico el que reacciona provocando un desplazamiento de masa hasta la m/z 91, ⁹¹AsO⁺, masa a la que ya no existen interferentes poliatómicos.

Las condiciones de Cadwell (10% H₂) fueron replicadas por Quarles para determinar satisfactoriamente arsénico en muestras de sangre total³⁵⁷, ricas en cloro y con un efecto matriz importante, por lo que en orina deberían ser más que suficientes para lograr una correcta sensibilidad. La única posibilidad es que los valores del gas H₂ indicados por el autor (0,2 a 0,6 ml/min) no fueran suficientes para lograr una eliminación completa de los clusters del ión del plasma.

Por otro lado, la investigación de Jones reveló unos niveles de sensibilidad muy similares a los nuestros, aunque siendo nuestro LOD levemente inferior, a pesar de la diferencia de sensibilidad que existe entre un NexION[®] y un ELAN DRC[®] 6100, con 10 años de diferencia. En este caso, Jones optó por eliminar las interferencias por colisión, altamente recomendada para masas <100 umas, si la interferencia es poliatómica y su proporción es muy superior a la del analito, como es el caso de los iones generados a partir del plasma.

A la hora de trabajar con el modo de colisión, o KED (Kinetic Energy Discrimination) es importante tener en cuenta que la eficiencia en la eliminación de las interferencias sigue una forma parecida a la de una campana de Gauss, encontrando en el pico de dicha estructura el valor óptimo de flujo en ml/min. Así pues, desde 0 hasta ese valor óptimo, a medida que se aumenta el flujo, un mayor porcentaje de interferente es eliminado de manera creciente.

Por el contrario, cuándo se aumenta gradualmente el valor del flujo por encima del valor óptimo, la señal del analito comienza a disminuir por reacción del gas de colisión no sólo con el interferente sino también con el analito. Esto tiene su explicación en el propio funcionamiento de este modo.

El KED es una corriente de gas inerte que se suele situar entre la óptica de iones y el analizador de masas o entre el Q1 y Q2 en el caso de un ICP-QQQ. Al pasar perpendicularmente el analito y su interferente, al ser éste último de mayor tamaño por ser poliatómico, el gas de colisión choca preferentemente con las interferencias y cambiando su trayectoria e impidiendo así que entren al analizador de masas. Si este flujo, por tanto, es muy alto, el analito se vera asimismo afectado disminuyendo su sensibilidad y aumentando el LOD. Esta explicación puede tener sentido si tenemos en cuenta que otro estudio utilizó unas condiciones muy similares a las de Jones, salvo por una cosa, el gas KED.

Mientras que Heitland optó por un flujo alto para la detección, Jones empleó un flujo medio, pudiendo no eliminar completamente las interferencias poliatómicas presentes en la orina, lo que explicaría la mayor sensibilidad de la metodología del primero, 3 veces mayor que la nuestra, algo esperable para un instrumento de una generación superior al nuestro.

En resumidas cuentas, nuestra metodología de arsénico total en orina cumplió con los objetivos propuestos y constituye una herramienta rápida, sensible y selectiva, y competitiva incluso con algunos estudios con ICP/MS de generaciones superiores, por lo que es ideal para cuantificar este elemento en la matriz designada y actual así de técnica analítica de referencia y contraste para los valores de especies totales obtenidos mediante AEC-HPLC-ICP/MS.

Por último, y referente a la preparación de la muestra, se optó por un proceso sencillo de dilución 1:20 de la muestra de orina con el objetivo de no sufrir ningún tipo de efecto matriz, ya que para la preparación del calibrado se utilizaron patrones acuosos. Los estadísticos de precisión, exactitud, LOD y LOQ corroboraron las ventajas de este procedimiento.

5.2.-Desarrollo y validación del método de especiación de arsénico

Por lo que respecta a las fases móviles empleadas, y refiriéndonos a aquellas investigaciones realizadas en orina, nuestra misma matriz, Quarles²⁹⁰, Scheer³⁵¹ y Serrano³⁴⁵ utilizaron fosfato amónico a pH 8,6, 6,0 y 9,2, respectivamente. En los tres casos el tiempo de retención para las especies fue menor que en nuestro caso como consecuencia del empleo de dicha fase en combinación con el empleo de columnas más cortas. En el caso concreto de Quarles, éste empleó fosfato amónico 80 mM como parte de un modo gradiente además de una columna 5 veces más corta (4 x 50 mm) que la nuestra (4.6 x 250 mm), lo que justifica que su tiempo total de análisis sea 6 veces menor que el nuestro (5 minutos frente a 30). Sin embargo, y aunque no se encuentra reflejado en su publicación concentraciones tan elevadas de una sal no volátil puede suponer un problema a largo plazo debido a paradas indeseadas por limpieza y mantenimiento, puesto que en nuestro estudio de pH con fosfatos, empleando menos concentración, ya se observaban restos salinos en la zona de la interfase y los conos.

Por lo que respecta a los otros dos métodos, se tuvieron que emplear agentes oxidantes³⁴⁶ o medios básicos³⁴⁵ para transformar o aumentar la retención del arsenito que generalmente sale en el frente junto a la AB y el DMA^V. En nuestra investigación se ha aprovechado la utilización de un modo gradiente para modificar la retención en función del pH pudiendo separar las seis especies sin necesidad de pretratamientos de oxidación, que pueden provocar reacciones indeseadas en las muestras además de requerir del empleo de otras sistemáticas para cuantificar la concentración de las especies oxidadas.

Otras analíticas de especiación de arsénico en orina, sin embargo, han apostado por el empleo del carbonato amónico como fase móvil. Por lo que respecta a las columnas, aquellas más cortas, las de Morton²⁸⁴, Leese²⁸⁵ o Carioni²⁸⁷, presentaron como contrapartida el empleo de elevadas concentraciones (50-80 mM) para compensar la menor fuerza iónica con respecto a los fosfatos, lo que nuevamente afecta a la resolución cromatográfica, como en el caso de Carioni y sus colaboradores, que inicialmente se encontraron con que las señales del As^{III} y el DMA^V coelúan, recurriendo una vez más a la oxidación para poder cuantificar el arsénico inorgánico como una mezcla de tri y pentavalente.

En base a todo lo anterior, el empleo de acetato amónico supone una mejora sustancial con respecto a la resolución cromatográfica y a la posibilidad de separar la AC de la AB, como consecuencia de su menor fuerza iónica que permite un mayor equilibrio de las especies en la columna. Sin embargo, la principal desventaja de esto es el incremento de los tiempos de análisis. Para poder compensar esto se requieren unas condiciones específicas de acidez para compensar la acidez de unas especies y la basicidad del resto.

En el caso de nuestro modo gradiente primero se emplean condiciones básicas para eluir cómodamente AC, AB, As^{III} y el DMA^V para posteriormente cambiar a un medio más ácido que permita disminuir la retención del MMA^V y el As^V.

Además de en orina, la especiación de arsénico también se aplica actualmente al análisis de muestras acuosas³⁵⁸, diversos tipos de vegetales³⁵⁹, alimentarias como el arroz^{307,309} o la carne^{360,361} y cosméticos³⁶².

Si bien en todas ellas siguen confiando en el empleo de fosfatos o carbonatos a altas concentraciones y por tanto, todo lo que se ha comentado hasta este punto sigue en vigor, en el arroz o en el agua, principalmente, los problemas de resolución asociados son menos relevantes dado que las especies presentes son menor en número que en el caso de las orinas, por lo que no llegan a suponer realmente un inconveniente para dicha resolución, encontrando métodos cortos a tiempos de análisis de menos de 10 minutos.

Por lo que respecta a la bibliografía, y centrándonos exclusivamente en aquellas metodologías realizadas en matriz orina, nuestro método ha demostrado obtener mejor valores para los estadísticos de exactitud, expresados como veracidad, que los declarados por Piñeiro²⁸⁶, utilizando dos CRMs de la NIST, denominados NIST CRM 2669 level I y level II, y 8 repeticiones. Así, los valores de veracidad calculados para el NIST CRM 2669 level I fueron del 6% para todas las especies menos para el MMA^V que fue de 8.6%. Por el contrario, para el NIST CRM 2669 level II, dichos valores fueron menos del 5% para el DMA^V, MMA^V, As^{III} y As^V, mientras que para la AB la veracidad resultó ser del 8.8%. Estos mismos controles fueron utilizados por el grupo de Sen^[46] obteniendo unos resultados muy distintos. Con respecto al primer nivel (level I), la veracidad del MMA^V y el As^{III} fue menor del 3% mientras que para el DMA^V y el As^V fue del 38% y 10%, respectivamente. Para el segundo nivel (level II), sin embargo, la veracidad fue $\leq 3\%$. Teniendo en cuenta nuestros datos, para los dos controles internos utilizados la veracidad calculada fue $\leq 6\%$ para todas las especies, y para ambos controles.

Con respecto a la precisión, Carioni²⁸⁷ reportó un CV $<5\%$ para todas sus especies, utilizando una muestra de orina de concentración conocida medida como 10 repeticiones para determinar la precisión. De manera similar, utilizó otra muestra de orina de concentración conocida medida 9 veces para obtener un CV $<6\%$ para todas las especies.

Finalmente, Sen⁴⁵ utilizó los CRMs NIST CRM 2669 level I y level II para medir también la precisión, obteniendo valores $\leq 10\%$ para todas las especies y en ambos menos para el As^{III} del level I, que fue del 14%.

En base a estos datos, y si bien hay muy poca información disponible con la que comparar, la existente refleja que la metodología desarrollada es competitiva y presenta unos valores aceptables, ya que si se consultan las tablas correspondientes, nuestros estadísticos de exactitud y precisión fueron para todas las especies y en ambos controles internos <6%, resultados muy similares y en ciertos casos superiores a los presentados por otros autores.

Ahora bien, en cuanto al límite de detección (LOD) y el de cuantificación (LOQ), en general, los parámetros fueron similares o más elevados que los obtenidos en nuestra investigación. Tanabe³⁶³ declaró tener unos límites de cuantificación para el As^{III}, As^V, DMA^V y MMA^V de 1.2, 1.4, 1.2 y 1.3 µg/l, respectivamente, cuatro veces más elevado que los obtenidos en nuestro estudio. Por otro lado, Lindemann³⁶⁴ reportó que el LOD de las especies de arsénico estaban en el rango de 0.3-0.5 µg/l, y sus LOQ, 1.0-1.5 µg/l, tres veces superiores a los nuestros. Algo más bajos fueron los valores de Xie³⁶⁵, cuyos LOD se encontraron entre 0.11-0.18 para todas las especies menos para el As^V, que fue de 0.25. Nuevamente, nuestra metodología es comparable y ligeramente superior a lo reflejado por otros estudios, pudiendo defender una mayor sensibilidad (menor valor de LOD) para nuestro estudio, demostrando la validez para medir en un rango de concentración más bajo que otros métodos.

En definitiva, nuestra metodología es selectiva, sensible y presenta unos estadísticos de precisión y exactitud adecuados y mejores que otros métodos publicados. Esto sumado al hecho de que la resolución y retención de las especies también suponen un avance con respecto a otros estudios, se puede considerar que esta metodología es adecuada y aplicable al estudio de los niveles de arsénico en orina en muestras de interés real.

5.3.- Estudio de los niveles de arsénico en una muestra poblacional española

a) Análisis general de las especies de arsénico más relevantes

En base a los datos recogidos, se puede deducir que la especie más relevante es la arsenobetaina, contribuyendo un 90% al contenido total de las diferentes especies encontradas en este estudio (Total Speciated Arsenic o TSAs). La siguiente especie en concentración es el DMA^V, que representa el 9% del contenido de TSAs. El MMA^V apenas supuso el 1% del total.

Por lo que respecta a las especies inorgánicas, no fueron detectadas en ninguno de los 686 sujetos. Estos datos son similares a los obtenidos en otros estudios nacionales^{345,366} e internacionales³⁶⁷⁻³⁶⁹. Así, Serrano, en un estudio similar al nuestro, midió el arsénico total y las especies presentes en orina de 124 voluntarios residentes en Madrid, encontrando que la especie mayoritaria fue la AB con una proporción del 70% sobre el resto de especies seguida del DMA^V con un 18%. Las especies minoritarias, al igual que en nuestro estudio, fueron el MMA^V y el ⁱAs. Por otro lado, Grau-Pérez, a través de un estudio realizado con 1451 participantes de Valladolid, y con el objetivo de analizar las posibles relaciones entre la exposición al arsénico inorgánico y la diabetes tipo 2, también encontró unos valores de concentración superiores para el caso de la AB (70%), seguido del DMA^V, MMA^V y ⁱAs, cuyas concentraciones netas no están incluidas, pero cuyo orden de abundancia es el mencionado. Además, en este mismo estudio, la relación encontrada para las proporciones de DMA^V y el MMA^V (DMA^V/MMA^V) fue de 8 veces, un valor similar al obtenido en nuestro estudio. Teniendo en cuenta que tanto en Madrid y en Valladolid el consumo de pescado es menor que en Murcia, esto justifica los mayores valores de AB encontrados en nuestro estudio. Por lo que respecta a los niveles de DMA^V, son menores de los esperados al haber un importante consumo de arroz en dicha región, comparado con otras zonas de España como Madrid o Valladolid.

En el ámbito internacional, los estudios llevados a cabo por Hata (N=210) y Lee (N=2044) en Japón y Corea del Sur mostraron niveles más elevados de DMA^V que los de España, como consecuencia del mayor consumo de algas y otros alimentos ricos en AsSug, que se metabolizan en dicha especie.

Como consecuencia de esto, la AB demostró seguir siendo la especie mayoritaria, pero su proporción fue menor debido al aumento de aquella del DMA^V.

Similarmente, el MMA^V y el ⁱAs, fueron las dos especies menos abundantes en concentración. Por otro lado, y al otro lado del mundo, Rivera-Núñez realizó un estudio con 343 sujetos en Estados Unidos. Nuevamente, la relación de abundancia según especies fue la misma encontrada en nuestro estudio y en el resto de estudios mencionados, si bien los niveles totales de arsénico fueron mucho menores que los asiáticos, probablemente debido a que la exposición vía dieta fue menor para la población estadounidense.

En resumen, la información que se obtiene de los estudios descritos concluye que la AB es la especie mayoritaria durante un análisis de especiación, ya que, como ya se ha hecho hincapié a lo largo de esta tesis, ésta se encuentra exclusivamente en alimentos de origen marino como el pescado, las algas o ciertos moluscos como consecuencia de los procesos de alimentación naturales dentro de la cadena trófica, por lo que un contenido tan elevado de este compuesto apunta directamente a un origen dietético. Esta especie se considera inerte a efectos del metabolismo y se excreta prácticamente sin alterar, generalmente al cabo de 24-48h, a excepción de un pequeño porcentaje de DMA^V ($\leq 10\%$)

La aparición de DMA^V y el MMA^V está relacionada con dos posibles orígenes. Por un lado, la ingesta de arsénico inorgánico, que se metaboliza en estas dos especies, encontrándose generalmente en proporción más DMA^V que MMA^V. El ⁱAs puede encontrarse disuelto en el agua, especialmente en zonas especialmente ricas en este mineral, o sujetas a actividades como la minería o la industria.

La otra contribución la supone la alimentación, principalmente el arroz, rico en estas dos especies, como consecuencia de la metabolización previa del ⁱAs disuelto en el agua que se usa para cultivar esta semilla o a través del suelo por medio del rizoma. Otros alimentos como las algas, y los seres vivos que se alimentan de ellas, que contienen arsenoazúcares y arsenolípidos, al metabolizarse acaban generando, entre otras especies, MMA^V y DMA^V, siendo este último la especie de arsénico mayoritaria.

Cabe destacar que los participantes de este estudio pertenecen a una zona cuya cocina se basa en la ingesta de alimentos a base de pescado, marisco y/o arroz, por lo que una exposición a través de la dieta permitiría explicar la existencia exclusiva de esta tríada de moléculas asociadas a la alimentación.

Ahora bien, para descartar una posible exposición a arsénico inorgánico a través de los medios mencionados, y ante la imposibilidad de contar con muestras de agua del terreno, se realizó un estudio bibliográfico en busca de información sobre las características geológicas y/o antropogénicas que permitieran descartar la presencia de niveles tóxicos de arsénico inorgánico. Aunque no todos los participantes vivían en la misma población en el momento de los análisis, todos ellos tenían su residencia en poblaciones cercanas a la Sierra Minera de Cartagena-La Unión o cercanos a los ríos que nacen de ella y acaban desembocando en el Mar Menor mediante el cauce natural de éstos. Esta zona, como su propio nombre indica, ha sido una zona de explotación minera muy importante, y si bien actualmente estas instalaciones llevan clausuradas 30 años³⁷⁰, han podido contribuir a la liberación de metales pesados al ecosistema o bien facilitar la movilización de los nativos de la zona por incremento de la acidez del medio mediante el Drenado Ácido de Minas, lo que unido a las escorrentías acabarían en ríos y eventualmente en el Mar Menor, mar interior perteneciente al Mar Mediterráneo³⁷¹. Por lo que respecta a esta zona costera, es considerado un ecosistema protegido debido a que sus condiciones naturales son específicas y muy poco frecuentes.

Martínez-López³⁷² llevó a cabo un estudio de los niveles de As, Fe y Mn en suelos a lo largo de la zona costera de la Mar Menor y en diferentes puntos de los 8 ríos que desembocan en éste.

El nivel de medio de As encontrado en estas muestras fue de 108,6 mg/kg, y el rango fue 6,90-347 mg/kg. De todas ellas, aquellas muestras recogidas en los ríos que conectan directamente la Sierra Minera con la Manga mostraron los mayores valores de As, prueba de que el ecosistema moviliza este elemento con facilidad, y termina depositándose en los sedimentos costeros. Además, las zonas con mayor contenido en Fe y Mn mostraron asociaciones estadísticamente significativas con el arsénico, prueba de que, como ya se ha comentado en la introducción, el metaloide se moviliza mejor a través de los óxidos e oxihidróxidos de esos metales.

Estudios realizados en muestras de tejido animal de diferentes especies autóctonas de la Manga del Mar Menor (algunas de éstas se encuentran en peligro de extinción³⁷³), principalmente en medusas³⁷⁴, algas³⁷⁵ y anguilas³⁷⁶, revelaron un efecto de bioacumulación de arsénico en el organismo de dichos animales marinos.

Este efecto demostró ser decreciente con la distancia a la costa, lógico y en consonancia con la movilización observada por Martínez-López, y con lo descrito previamente en la introducción. No obstante, Muñoz-Vera analizó varias muestras de agua de la bahía obteniendo resultados nulos de As en agua. Teniendo en cuenta estos datos así como los controles actuales en legislación de aguas²³⁵, es bastante probable que dicha bioacumulación sea adsorbida por la fauna y flora a su paso por los ríos hasta la bahía, ya que si los niveles de arsénico inorgánico fueran tan elevados al contacto con los participantes se habrían observado, aunque sea a nivel de trazas, señal As^{III} y As^V. Otro hecho que apoya esto es que al ingerir ⁱAs, el perfil de metabolización¹⁴⁹ suele ser de un 10-30% de ⁱAs, 10-20% de MMA^V y un 60-80% de DMA^V. Teniendo en cuenta estos porcentajes y aplicándolos a las concentraciones del DMA^V y MMA^V, los niveles de ⁱAs deberían ser menores del LOD, lo que no supone un problema de toxicidad. Además, en el caso de que la población estuviera expuesta por término medio a esos niveles no generaría unas concentraciones de DMA^V y MMA^V como las observadas, por lo que la causa principal y generadora no es la exposición al arsénico inorgánico.

Como ya se ha comentado, la correlación más fuerte y estadísticamente significativa correspondió a la AB seguida del DMA^V, esperable teniendo en cuenta la relación existente entre ambas especies y la alimentación. No obstante, cabe destacar que dicho análisis estadístico reveló una correlación muy interesante entre ambas sugiriendo algún tipo de conexión entre sus orígenes. Dicha conexión se plasmó como una correlación estadísticamente significativa al 99% y de grado bajo-moderado ($r=0,268$), observada también en otros estudios^{285,345,377}. Analizando el porcentaje de DMA^V/AB a partir de las concentraciones excretadas de ambas especies, se encontraron valores que fueron desde 0.03307% hasta 12700% por lo que, si bien es posible que exista una relación entre ambas, debe existir además otro factor más relevante debido al alto porcentaje observado, posiblemente la alimentación.

Comparando nuestra información con aquella recogida del macroestudio (n=2645) NHANES durante la ronda 2013/2014 (tabla 63), se observa que del mismo modo que nuestro estudio, la AB y el DMA^V son las dos especies mayoritarias contribuyendo un 56% y 32%, respectivamente, en línea con aquellos estudios de poblaciones con predominante uso de algas, moluscos y/o marisco en su gastronomía, aunque esta variable se comparará más adelante.

De todos los datos recogidos, y por similitud a nuestro estudio, se compararán el efecto del género, la edad y el consumo de pescado, en las correspondientes secciones.

Tabla 63. Media aritmética (AM), media geométrica (GM), intervalo de confianza (IC), mediana y los datos para el percentil 95 para el arsénico total (TAs), la suma de especies (TSAs) y cada especie por separado expresados como µg/g creatinina

Estadístico	TAs	TSAs	AB	DMA^V	MMA^V	<i>i</i>As
AM (µg/g creatinina)	15,7	16,6	9,33	5,29	0,658	0,589
GM (µg/g creatinina)	7,55	9,21	2,27	3,86	0,468	0,386
IC (µg/g creatinina)	1,48	1,44	1,32	0,24	0,047	0,022
Mediana (µg/g creatinina)	6,28	7,93	34,59	3,65	0,484	0,414
Percen. 95% (µg/g creatinina)	55,7	55,7	39,4	14,4	1,65	1,69

En vista de la información obtenida, el factor más probable que permite explicar la relación de especies y sus niveles debe ser la alimentación. Para ello, se estudiaron también otras posibles contribuciones como el país de nacimiento o la edad, puesto que, de existir una acumulación a través de la dieta, estas dos variables deberían estar fuertemente influenciadas por ello. Otras variables como la edad³⁷⁸, el género³⁷⁹, el efecto del tabaco³⁸⁰ y la obesidad³⁸¹ han sido relacionadas con la capacidad de metilación de los individuos, y por ende, a los niveles de DMA^V y MMA^V.

b) Niveles de arsénico según el país de origen

Los resultados muestran claramente que la contribución más significativa fue aquella de la AB, independientemente del tipo de país, aunque cabe destacar que el tamaño muestral de la población española es unas 30 veces mayor que el de las otras dos categorías. Sorprendentemente, la concentración de DMA^V no fue tan relevante a nivel estadístico para aquellos habitantes de Marruecos con respecto a los de España. Por lo que respecta a la AB, su predominancia fue consistente con otros estudios debido principalmente a la dieta. Concretamente, Marruecos y España cuentan con una dieta mediterránea similar³⁸².

La alimentación de Marruecos está basada fundamentalmente en una mayor ingesta de cereales y la carne en comparación a otros alimentos. España, por el contrario, presenta un elevado consumo de pescado³⁸³, en comparación con Marruecos. Por lo que respecta al consumo de arroz, y a pesar del elevado consumo de cereales, el consumo de arroz en la población marroquí es menor que en la española³⁸⁴.

La menor ingesta, pues, de arroz y de pescado, podría explicar los menores niveles de AB y DMA^V detectados entre la población marroquí, consecuentemente provocando que ésta última especie no sea tan relevante a nivel estadístico como para los españoles.

Los especies de arsénico menos relevantes fueron el MMA^V y el ⁱAs, en ese orden, semejante a lo recogido en otros estudios, independientemente del tipo de país.

Referente a los parámetros PMI (Índice Primario de Metilación) y SMI (Índice Secundario de Metilación), la población marroquí contó con una capacidad de metilación inferior al resto de países.

Así, el SMI fue tres veces superior al valor del PMI para la población marroquí, mientras que para el resto de países, esta relación fue cuatro veces más alta. A tenor de las fórmulas que permiten calcular estas dos magnitudes, y teniendo en cuenta las concentraciones medias obtenidas así como la tendencia por país, el impacto del DMA^V en la dieta local constituyó la variable crucial para explicar sendos resultados. Cabe mencionar de manera especial el SMI obtenido para la población perteneciente a “Otros países”, que mostró unos valores superiores de dicha especie pero no así para la AB, lo que puede ser compatible con una dieta rica en alimentos ricos en arsenoazúcares, como algas.

En resumen, la tendencia observada al clasificar el tamaño muestral por países de origen de los sujetos mostró un perfil compatible con una exposición a través de la dieta, con variaciones entre países como resultado de las diferentes particularidades de la alimentación para cada uno de ellos.

c) Niveles de arsénico según la edad y el género

A raíz de los resultados presentados se pueden deducir dos hechos bien diferenciados. En primer lugar, existe una clara tendencia creciente de excreción de AB con la edad, con un incremento constante de 20% por cada grupo de edad.

El resto de especies no aportó información nueva y significativa ya que las concentraciones se mantuvieron constantes. Similarmente, al hacer una comparativa entre mujeres menores de edad (niñas) y el total de mujeres, se observó una mayor excreción de AB en las últimas (niñas+adultas) que en niñas, concretamente un incremento del 12% entre niñas y mujeres. De acuerdo a un informe elaborado por el Gobierno de España referente a los hábitos alimentarios en nuestro país en 2018, existe un creciente consumo de pescado con la edad³⁸⁵, permitiendo entonces explicar la variabilidad observada y relativa a la excreción de AB.

El segundo hecho es que la capacidad de metilación mostró una leve variación en función del género y la edad. Así, ésta fue un 15% superior para los de niños que para las niñas.

Sin embargo, al tener en cuenta la edad global de todos los participantes las mujeres del estudio (niñas y adultas) mostraron una capacidad de metilación similar con respecto a la de los hombres.

Al comparar nuestros datos con otros estudios^{386,387}, se observa una tendencia opuesta, puesto que las mujeres han mostrado de manera generalizada una eficiencia de metilación superior a la de los hombres, es decir, las mujeres presentan menores valores del PMI y mayores del SMI en comparación con los hombres. Así, Lindberg propuso que la explicación a la mayor eficiencia de metilación de las mujeres residía en los estrógenos, reguladores de la síntesis de las colinas, otros dadores de metilo³⁸⁸. Otra explicación a este hecho reside en la homocisteína³⁸⁹, aminoácido clave ya que actúa como intermediario en varios procesos metabólicos.

Dos de estos procesos se encuentran en competición y se conocen con el nombre de metilación y trans-sulfuración. El primero culmina con la síntesis de S-adenosil-homocisteína, a expensas de la molécula S-adenosil-metionina (SAM), intermediario en el metabolismo del arsénico y encargado de transformar el arsénico inorgánico en MMA^V y DMA^V. Por otro lado, el mecanismo de la trans-sulfuración no consume SAM y permite la síntesis de cisteína. Entre estos dos mecanismos, y en el caso de las mujeres, es el segundo el que se encuentra más favorecido³⁹⁰, por lo que existen más reservas del donador de metilos y la eficiencia es mayor. Por otro lado, los hombres, debido a su mayor masa muscular, requieren sintetizar más abundantemente creatina.

Dicha síntesis requiere de la unión de L-arginina y glicina seguida de una metilación en la que interviene SAM. Por ello, al requerir más equivalentes de SAM para dicha síntesis, la disponibilidad de éstos para el metabolismo del arsénico es menor, lo que provoca que la eficiencia de la metilación en el caso de los hombres sea más baja, resultando en un valor menor del SMI. En nuestro estudio, la comparativa por género se realizó con niños y niñas cuya edad fue menor de 12 años, por lo que es de esperar que no exista aún una diferenciación total a causa de los estrógenos, ni que los músculos de los varones estén aún del todo desarrollados, por lo que las diferencias encontradas pueden ser debidas a la edad.

Por otro lado, la enzima As3MT se encarga, como ya se ha explicado, de transferir un grupo metilo a los diferentes intermedios de arsénico utilizando un donador de metilo, como SAM. Según algunos estudios, la presencia de polimorfismos en dicha enzima modifica sustancialmente la eficiencia de metilación^{391,392}, y por tanto, el SMI y PMI. Este hecho ha podido también ser la causa de las discrepancias observadas con respecto a otras investigaciones publicadas.

En definitiva, la información relativa a la eficiencia de metilación en la población menor de edad fue concluyente y se puede explicar debido a la escasa producción hormonal y a la presencia de polimorfismos en la enzima As3MT. Por lo que respecta a los adultos, se precisan más estudios para poder aseverar el efecto del crecimiento y todo lo que ello conlleva a nivel hormonal y biológico, para poder determinar de una manera más crítica cómo influye en la capacidad de metilación en adultos.

La capacidad de metilación mostró una marcada diferencia con la edad. Por un lado, se observó que la población más joven metilaba arsénico de manera menos eficiente que la población adulta. Por otro lado, entre la población adulta, aquellos sujetos con edad comprendida entre 20 y 40 años mostraron una mayor capacidad de metilación que los aquellos de entre 40 y 60 años. Esta tendencia está en consonancia con los datos recogidos por Huang³⁹³, ya que en su estudio los sujetos cuya edad superaba los 50 años presentaron un SMI inferior a aquellos de menor edad. Por otro lado, en Italia, Bustaffa³⁹⁴ comparó la capacidad de metilación entre dos grupos de población, uno presuntamente expuesto a ¹As a través del agua, y otro no expuesto. En este último, se observó un crecimiento del SMI así como una disminución de los niveles de MMA^V según la edad creciente de los sujetos hasta una edad límite, los 40 años.

Asimismo, se ha reportado una conexión significativa entre la edad y el menor %DMA^V con ésta, disminuyendo consecuentemente el SMI³⁹⁵.

Una posible explicación para este hecho radica en la menor abundancia de enzimas de metilación con la edad. Ciertos estudios vinculan el envejecimiento con una menor expresión de los genes específicos para enzimas metiltransferasas^{396,397}.

En este sentido, el metabolismo de arsénico inorgánico depende fundamentalmente de estas enzimas para poder modificar la estructura de éste añadiendo secuencialmente grupos metilo a la misma, por lo que una disminución en los niveles de ésta implicaría una menor capacidad de metilación, y por tanto, un SMI más bajo para la población más anciana. Por otro lado, la generación de especies activas de oxígeno (ROS) cobra especial relevancia en el envejecimiento al ser de uno de los parámetros críticos relacionados con éste. Entre las funciones disruptivas de estas especies se encuentran la de alterar los mecanismos de señalización celular³⁹⁸, alteraciones en el metabolismo de los seres vivos³⁹⁹ y en su ADN⁴⁰⁰, mediante diferentes mecanismos, afectando sensiblemente a los procesos de transcripción de numerosas enzimas, entre las que se encuentran la GSH y TRX. Si bien actualmente no se ha llegado a un acuerdo sobre el mecanismo concreto de metabolización del ³As, por lo que no es concluyente que la GSH forme un complejo con el arsénico trivalente a lo largo de este proceso, sí está implicada en la reducción de las formas pentavalentes a las trivalentes, por lo que una alteración de dichos niveles podría afectar sensiblemente a este proceso de reducción, inhibiéndolo o alterándolo, reduciendo la eficiencia y disminuyendo la capacidad de metilación. Además de todo esto, existe una relación entre la metilación del ADN y el donador de metilos SAM⁴⁰¹⁻⁴⁰³, por lo que si los procesos de metilación de las hebras del ADN se ven afectados por las ROS, esto puede afectar a la formación y el rol de SAM, lo que, de nuevo, conllevaría unos menores niveles de DMA^V, y por ende, SMI.

A continuación, se muestran los datos correspondientes a la clasificación de los datos por género y edad del estudio NHANES (tabla 64).

Tabla 64. Biomarcadores en función de la edad y el género

Biomarcador ($\mu\text{g/g creatinina}$)	Género		Edad			
	<i>Hombres</i> (N=1313)	<i>Mujeres</i> (N=1332)	<i>Menores</i> [0-20 años] (N=1180)	<i>Adultos</i> [20-40 años] (N=476)	<i>Adultos</i> [40-60 años] (N=521)	<i>Ancianos</i> [>60 años] (N=468)
TAs	7,66±1,95	7,60±2,20	7,53±2,22	8,14±4,44	7,55±2,98	7,47±2,57
TSAAs	7,67±2,08	8,21±2,49	9,15±2,14	9,77±4,44	9,44±2,95	8,92±2,38
AB	2,23±1,64	2,27±1,97	2,19±1,92	2,43±4,18	2,26±2,67	2,22±2,08
DMA	3,91±0,38	3,88±0,29	3,94±0,39	3,96±0,55	3,82±0,46	3,79±0,57
MMA	0,48±0,03	0,45±0,08	0,47±0,09	0,47±0,05	0,47±0,05	0,46±0,05
iAs	1,15±0,07	1,13±0,05	1,15±0,06	1,12±0,10	1,17±0,10	1,10±0,11
PMI	0,42	0,40	0,41	0,42	0,40	0,42
SMI	8,03	8,48	8,31	8,37	8,13	8,15

La mayor diferencia con nuestro estudio radica en la mayor capacidad de metilación reflejada en mujeres en comparación con los hombres, estando, por tanto, en consonancia con lo reflejado en los estudios mencionados previamente. No obstante, y por lo que respecta a la edad, la variabilidad del índice secundario de metilación mostró una pauta similar a nuestro estudio.

En definitiva, la capacidad de metilación en nuestro estudio parece verse influenciada por factores como el género, en el caso de la población menor de edad, y por la edad. Teniendo esto en cuenta, es posible que esta tendencia esté reflejando de manera indirecta el consumo de alimentos ricos en arsénico, que como ya se ha demostrado, guardan una relación directa con la edad.

d) Efecto combinado del país de origen y la edad

En este punto se decidió dividir según el país de nacimiento y la edad creciente de los sujetos. Esto permitió observar una diferenciación de tendencias en los niveles de AB, DMA^V y MMA^V que de otro modo hubieran quedado ocultas por la tendencia general española, debido a su mayor tamaño muestral y, por tanto, su mayor peso en la media geométrica.

La AB mostró una tendencia proporcional con la edad. Sin embargo, para los nativos de Marruecos los niveles de AB decrecieron con la edad (76%) mientras que el efecto fue el contrario para los otros dos países, siendo especialmente relevante para los “Otros países”, con un incremento del 579% frente al 31% de España.

Tanto el MMA^V como el DMA^V muestran un crecimiento importante con la edad para la población de aquellos países desconocidos, 342% y 250%, respectivamente, observándose a su vez en los respectivos PMI y SMI. Esta tendencia creciente se observó también para los españoles, exclusivamente para el DMA^V, con un incremento del $\approx 15\%$ por cada grupo de edad, mientras que el MMA^V los niveles fueron constantes con la edad. En el caso de Marruecos, el MMA^V decreció un 40% a partir de los 20 años y se mantuvo constante, mientras que para el DMA^V se observó un crecimiento desde la infancia a las primeras etapas de la vida adulta (40%) para posteriormente decrecer drásticamente para la población más anciana (57%).

El hecho de que ninguna de estas contribuciones fuera estadísticamente significativas pudo ser debido a que, si bien estos valores están reflejando una tendencia existente, las variables no son exactamente ni la edad ni el país, sino otra indirectamente relacionada con ambas.

e) Consumo de tabaco y niveles de arsénico

A continuación, se decidió estudiar uno de los marcadores de riesgo relacionados con la exposición al arsénico.

Tradicionalmente se ha considerado el consumo de tabaco como un factor de exposición al arsénico, debido a que el tabaco comercial contiene trazas de arsénico, de naturaleza inorgánica. Así, los datos se dividieron en tres categorías: fumadores activos, no fumadores y exfumadores.

La hipótesis de trabajo contemplaba el hecho de encontrar valores superiores de arsénico inorgánico y/o de sus metabolitos para la población fumadora. Además de esto, se pretendía evaluar el posible efecto acumulativo de dicha exposición en exfumadores.

Sin embargo, los resultados no fueron los esperados. En primer lugar, los valores encontrados de DMA^V fueron superiores para población no fumadora que para el resto. Por otra parte, los niveles de MMA^V y el ⁱAs se mantuvieron constantes para los tres grupos. Más interesante fue el caso de la AB, que mostró un crecimiento del 4% para los exfumadores con respecto a los no fumadores. Sorprendentemente, para la población fumadora estos niveles fueron 18% superiores con respecto a los exfumadores. Estos datos fueron similares a los reportados por Marano⁴⁰⁴, ya que los valores de DMA^V en orina fueron ligeramente superiores para la población no fumadora y los niveles de AB en los fumadores fueron más elevados que aquellos de los exfumadores. Otros estudios encontraron valores más elevados de MMA^V y menores de DMA^V para fumadores que para no fumadores^{387,394}. Por lo que respecta al SMI, sus valores fueron un 54% superiores en no fumadores con respecto a los fumadores, mientras que en el caso del PMI, éste fue superior para fumadores que para el resto. Estos datos fueron congruentes con los recogidos por otros estudios^{405,406}.

En vista de lo anterior, se seleccionaron una serie de biomarcadores tradicionales del tabaco para poder decidir si los datos obtenidos podían ser considerados representativos o no. Estos biomarcadores fueron: cotinina, metabolito principal de la nicotina^{407,408}, el cadmio en suero^{409,410} y orina⁴¹¹, y la creatinina sérica⁴¹². Así, se observó un elevado incremento de la concentración de cotinina, estadísticamente significativo y con una correlación media-alta, en los fumadores con respecto a los no fumadores y exfumadores.

Los niveles similares y extremadamente bajos para los exfumadores y no fumadores comparados con los consumidores de tabaco demostraron exitosamente dicho consumo. Menos notable fue el aumento de concentración de Cd en suero para los fumadores (x2) con respecto al resto de la población, aunque la correlación encontrada fue alta.

Los niveles de Cd en orina y la creatinina sérica fueron constantes para las tres categorías, si bien estos dos marcadores presentan menor relevancia que el resto. Así, las buenas correlaciones de la cotinina y cadmio sérico fueron suficiente para demostrar la validez de los datos analizados.

Por tanto, si el arsénico fuera un factor relevante debería observarse en forma de unos mayores valores de sus metabolitos en orina, por lo que se descarta el consumo de tabaco como un factor influyente en el perfil obtenido.

f) Influencia del índice de masa corporal (IMC)

Otro de los factores de riesgo por antonomasia lo supone la obesidad, por lo que a partir de la altura (mm) y el peso (kg) se calculó el índice de masa corporal (IMC) y se dividió en tres categorías: infrapeso, normopeso y sobrepeso.

El efecto más relevante observado fue el gradual incremento del SMI en función del IMC como consecuencia de la mayor metilación del arsénico hasta la forma final, el DMA^V. Este incremento no fue constante sino que inicialmente se observó un pronunciado incremento del 19% desde la población catalogada con infrapeso para después aumentar levemente un 4% para aquellos con normopeso y sobrepeso. Por el contrario, los niveles de AB fueron similares y levemente menores en los sujetos con normopeso (4%), mientras que aquellos con sobrepeso mostraron unos niveles sustancialmente menores (37%). Por lo que respecta al MMA^V, la concentración media de la población con infrapeso fue 20% mayor que aquellos con normo y sobrepeso. En resumen, se observó una tendencia creciente de los valores de DMA^V y SMI con el IMC, mientras que ésta fue decreciente con el DMA^V y el PMI.

Estos resultados son apoyados por otros estudios^{387,389,413,414,415}, en los que independientemente del género y la población, los sujetos con un mayor porcentaje de grasa presentaron una eficiencia más elevada en cuanto a la metilación de arsénico. Esto se expresó, al igual que en nuestro estudio, en menores niveles de MMA^V en orina y mayores de DMA^V, afectando a los PMI y SMI de manera proporcional. Una posible explicación radica en que la regulación genética de la expresión de la As3MT puede estar influenciada por el peso^{391,392}. Como ya se ha comentado, esta enzima es la responsable de la metilación del arsénico inorgánico, por lo que cualquier factor que modifique su regulación, hipotéticamente alteraría la capacidad y eficiencia de metilación.

g) Influencia de la dieta en los niveles de arsénico

El factor más relevante en este estudio y responsable, por tanto, del perfil de especiación determinado fue la dieta.

Esta contribuyó significativamente a la excreción de AB y DMA^V tal y como demuestran las correlaciones y los datos estadísticos. Por otra parte, el MMA^V incrementó su concentración en un 50%. Teniendo en cuenta que en el cuestionario realizado se registró el consumo de pescado y marisco por semana, de manera conjunta y para cada participante, y cotejando esto con las variaciones de cada especie, queda patente que, de ambos alimentos el pescado fue el de mayor consumo seguido del marisco ya que, de haber sucedido al contrario, los niveles de DMA^V y MMA^V serían más elevados, por la metabolización del arsénico inorgánico. El pescado contiene como especie mayoritaria la AB^{416,417}, que no supone toxicidad alguna, y es excretada prácticamente sin alterar por el organismo humano. Por lo que respecta al marisco, éste cuenta también con ⁱAs, que se acumula en su piel y en la cabeza de dichos animales, además de DMA^V y, según qué casos, trazas de MMA^V, por lo que al ingerir este alimento no sólo excretamos AB sino también MMA^V y DMA^V ^{418,419}. Por otra parte, se descarta el consumo de AsSug y AsLip debido, principalmente, a la gran similitud entre el arsénico total determinado por ICP/MS y la suma de especies obtenida por HPLC-ICP/MS, ya que de haber sido el caso se habrían detectado picos desconocidos, correspondientes a los metabolitos de estos compuestos⁴²⁰.

Otra opción que podía haber enmascarado estos supuestos picos sería que la diferencia entre TAs y TSAs hubiera sido mayor, prueba de que podrían existir otras especies no retenidas o no detectadas durante el análisis, hecho que tampoco se cumple.

El consumo de arroz también se registró de la misma manera y de dichos datos se dedujo que de manera habitual se produjeron ingestas semanales de pescado, marisco y/o arroz. Los datos obtenidos corroboran este hecho ya que los niveles de DMA^V encontrados para aquellos participantes que reconocieron consumir cuatro raciones de arroz a la semana presentan el mismo valor que aquellos que consumen más de diez raciones de pescado a la semana.

Por lo que respecta al MMA^V, éste aumentó un 83% con el consumo gradual de arroz, casi el doble que con el pescado. Esta tendencia tiene sentido ya que las especies más relevantes presentes en el arroz son As^{III}, As^V, DMA^V y MMA^V, encontrándose estos dos últimos en proporción variable en función del tipo de suelo dónde se encuentre cultivado el cereal⁴²¹. Concretamente, en España se han llevado a cabo estudios con arroz nacional ^{422,423} que dejaron patente que las especies más relevantes son el ⁱAs y el DMA^V, encontrando de manera minoritaria MMA^V.

Teniendo esto en cuenta, nuestros datos son consistentes con este hecho, concluyendo que la contribución más relevante en nuestro estudio estuvo en línea con los resultados obtenidos por otras investigaciones.

Por otra parte, la AB mostró un decrecimiento del 58% en aquellas personas que consumieron más arroz a nivel semanal. El arroz no contiene AB, pero el pescado sí. El consumo excluyente del arroz sobre el pescado puede explicar este hecho. En otras palabras, aquellos participantes con un consumo elevado arroz, no consumieron pescado en la misma medida. Esto permite explicar el decrecimiento observado para la AB como consecuencia de que su proporción en la orina disminuye a la vez que aumenta aquella de las especies del arroz.

Esto permite plantear la hipótesis de que los niveles de DMA^V encontrados para el pescado provienen del arroz, además de la posible metabolización de la AB en DMA^V, siendo esta una contribución minoritaria a los niveles totales de DMA^V excretados.

La capacidad de metilación se vio fuertemente influenciada por el tipo de alimento. Así, ésta experimentó un aumento correspondiente a tres veces su valor con el creciente consumo de arroz, para el SMI, y de dos veces para el PMI.

Teniendo en cuenta la dieta de los sujetos, el arroz y el marisco, por contener DMA^V y MMA^V, deberían contribuir al SMI y PMI, respectivamente. Además, el pescado también debería contribuir, más levemente, debido al DMA^V generado como consecuencia de la metabolización de la AB. Por otro lado, el arroz debería contribuir más que el pescado (incluido el marisco) al incremento de los valores del PMI y SMI, máxime si se tiene en cuenta la hipótesis formulada de que el consumo del primero limita el del segundo. Ahora bien, en cuanto al pescado, la relación entre los valores del consumo máximo y mínimo fue sustancialmente mayor en el caso del SMI, unas cinco veces, mientras que el PMI supuso un incremento aproximado de 1,4 veces. En el caso del arroz, esta relación se correspondió con un incremento de 2,6 veces para el SMI, frente a 1,79 del PMI. Como puede verse, el pescado tiene mayor impacto en estos índices, lo que se puede explicar teniendo en cuenta que el consumo de pescado, en número, fue mayor que el de arroz, independientemente del hecho de que al consumir arroz, no se consumiera pescado.

El siguiente paso fue dividir el consumo de estos dos alimentos por países. Teniendo en cuenta que la población española fue la dominante de este estudio, se observó un incremento significativo de los niveles basales de MMA^V para la población marroquí frente al resto, como demuestra la correlación y el valor P-value obtenido. Para la población española y la de “Otros países”, la contribución estadísticamente más relevante fue aquella del pescado, concretamente la AB, y en el caso concreto de la española, adicionalmente el DMA^V.

Por último, y comparando nuestros datos referentes a la dieta con aquellos del NHANES (Tabla 65), se observa que los niveles generales de arsénico son sustancialmente menores.

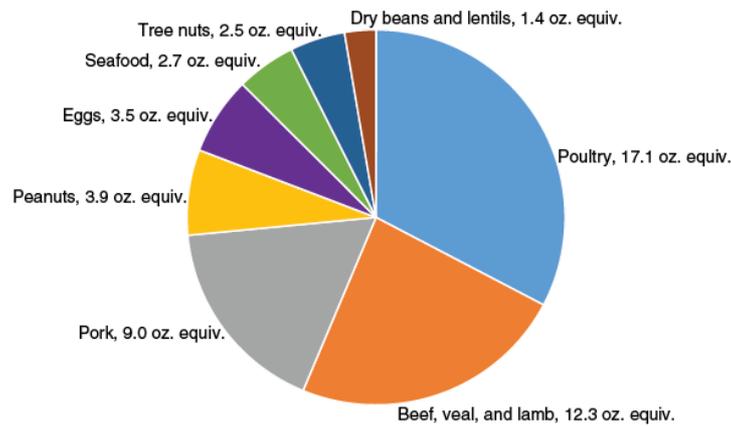
Tabla 65. Comparación de los biomarcadores de nuestro estudio y el del NHANES

Biomarcador ($\mu\text{g/g creatinina}$)	Estudio comparativo de la ingesta de pescado entre España y Estados Unidos							
	Piezas por semana en España				Piezas por semana en EEUU			
	0 (N=154)	1-5 (N=411)	5-10 (N=114)	>10 (N=9)	0 (N=383)	1-5 (N=645)	5-10 (N=16)	>10 (N=1000)
TAs	20,9±6,9	32,2±5,3	47,0±1,4	71,8±2,4	7,09±0,08	8,05±0,10	10,78±1,17	7,57±0,08
TSAs	18,5±6,7	29,1±4,9	42,8±1,0	64,6±2,0	7,29±0,09	10,75±0,11	21,70±0,91	17,75±0,09
AB	14,9±6,6	22,9±4,6	35,9±1,0	54,6±1,9	1,99±0,07	2,51±0,09	2,64±0,61	2,21±0,07
DMA^V	0,341±0,017	0,956±0,020	1,36±0,066	2,56±0,198	3,69±0,02	3,92±0,01	5,58±0,15	3,92±0,02
MMA^V	0,102±0,009	0,111±0,066	0,099±0,018	0,159±0,071	0,44±0,01	0,46±0,01	0,61±0,02	0,48±0,01
'As	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	1,07±0,01	1,15±0,01	1,20±0,02	1,15±0,01
PMI	0,592	0,625	0,569	0,864	0,41	0,40	0,51	0,42
SMI	3,33	8,64	13,6	16,1	8,38	8,41	9,12	8,16

En vista de estos datos, queda patente que la principal causa de este hecho puede ser una menor ingesta de platos de naturaleza marina o, dicho de otro modo, los niveles parecen indicar un menor consumo de pescado que en la muestra poblacional española. De hecho, según varios informes publicados por el Comité de Investigación Económica del Ministerio de Agricultura de los Estados Unidos en 2014, los alimentos de origen marino representaron el tercer tipo de comida menos consumida (Figura 53) por la población. Este hecho corrobora las conclusiones de otro estudio llevado a cabo ese mismo año sobre la población americana⁴²⁴.

Entre los factores que se analizaron se puede encontrar la edad, el género y la alimentación. Así, contando con aproximadamente unas 15.000 personas, se concluyó que la población de Estados Unidos no cumplía con los estándares mínimos de nutrición en materia de consumo de pescado, marisco, etc.

Seafood was one of the least consumed protein foods on a weekly per capita basis in 2014

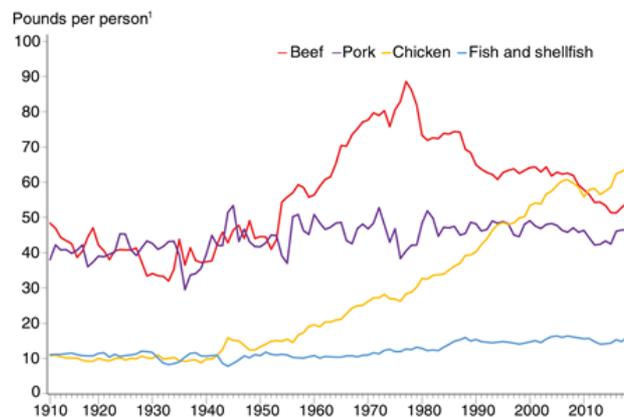


Note: oz. equiv. = ounce equivalent. One ounce of meat, poultry, or fish; ¼ cup of cooked beans; 1 egg; 1 tablespoon of peanut butter; ½ ounce of nuts or seeds is equal to 1 ounce equivalent from the Protein Foods group.
Source: USDA, Economic Research Service, Loss-Adjusted Food Availability data.

Figura 53. Hábitos alimenticios en Estados Unidos

Cuatro años después, en 2018, la misma organización llevó a cabo otro estudio dirigido a estimar la ingesta promedio per cápita de los alimentos con proteína animal (Figura 54). Entre los diferentes tipos, aquellos de origen marino demostraron consumirse en menor cantidad (un factor de cuatro veces menos) que la ternera, el cerdo o el pollo, siendo este último el de mayor crecimiento en los 20 años previos.

U.S. per capita availability of beef, pork, chicken, and fish/shellfish—1910-2018



¹Calculated on the basis of raw and edible meat in boneless, trimmed (edible) weight. Excludes edible offals, bones, viscera, and game from red meat. Include skin, neck, and giblets from chicken. Excludes use of chicken for commercially prepared pet food.
Source: USDA, Economic Research Service, Food Availability Data.

Figura 54. Comparación del consumo de alimentos ricos en proteína animal en Estados Unidos

Entre los alimentos más consumidos por la población se encontró el salmón, las gambas y el atún enlatado⁴²⁵. Todos ellos contienen AB y DMA^V pero en baja proporción con respecto a otros pescados⁴²⁶⁻⁴²⁸, principalmente debido al tamaño, ya que al igual que el mercurio, el arsénico se bioacumula^{99,429}, por lo que las especies animales pequeñas bioacumulan menos que las de mayor tamaño. En resumen, el consumo de pescado para la población es menor, y además, el tipo de pescado ingerido contiene niveles de arsénico inferiores a otros alimentos de la misma naturaleza que sí se consumen en España. En cuanto a la tendencia observada para el mayor consumo de pescado o marisco, es muy similar a la nuestra, salvo por el decrecimiento observado en para aquellos sujetos que declararon haber consumido más de 10 piezas por semana. Dividiendo por especies, la AB mantiene, a grandes rasgos, unos niveles similares que rondaron los 2-3 $\mu\text{g/g}$ creatinina, independientemente del consumo, similar a la tendencia del MMA^V, en torno a 0,50-0,60 $\mu\text{g/g}$ creatinina. Por el contrario, es el DMA^V el que sufre más esta depresión en los valores, reduciendo su valor en casi la mitad. Una posible explicación a este hecho puede ser que aquellos sujetos que consumieron más de 10 piezas estuvieran incorporando a su dieta otro tipo de pescados distintos al resto de sujetos con las demás pautas de consumo.

En resumen, este estudio ha permitido determinar que la contribución más elevada a los niveles de arsénico fue aquella de la dieta, encontrando también que otros parámetros como el género, la edad o el país de origen, y por tanto, los hábitos culinarios, influyen en el mismo.

6.-Conclusiones/Conclusions

The most relevant conclusions found in this study are summarized below:

1. Two selective, sensitive, precise, accurate and cutting-edge methodologies, based on Total Arsenic as well as Arsenic Speciation, have been developed in order to identify and quantify in urine samples AC, AB, DMA^V, MMA^V, As^V y As^{III}.
2. The benefits of using a mathematical equation compared to the use of a collision/reaction gas to eliminate the contribution of the polyatomic ⁷⁵ArCl⁺ interference has been proved. Hence, the two methodologies carried out showed a greater sensitivity compared to other published methods.
3. The Arsenic Speciation methodology developed solved the resolution and drifting problems presented in the traditional mobile phases.
4. The arsenic species distribution calculated from the samples of the population study (N=686) showed that the 90% of the total arsenic detected corresponds to arsenobetaine, a non-toxic arsenic species. The remaining 10% consists of DMA^V (9%) and MMA^V (1%). On the other hand, inorganic arsenic (iAs) was not detected in any of the samples.
5. The speciation profile found is compatible with an arsenic exposure occurring through diet, mainly rice and fish, arsenic-enriched food. As a consequence of that, no toxicological risk for the human health of the subjects of the study is expected.
6. A specific tendency was observed when the subjects were classified under their country of birth. This was successfully explained and linked to the specific diet of the different countries.
7. The methylation capacity, measured using the Primary Methylation Index (PMI) and the Secondary Methylation Index (SMI) was greater in case of male children than female children.
8. The smoking habits of the subjects did not have any influence over the arsenic speciation profile, regardless of the positive response of the main smoking biomarkers over the tobacco consumption. Hence, the smoking habits was not considered a substantial source of arsenic.
9. The methylation capacity increased subsequently with the increase of the BMI.
10. Fish intake in the Spanish population analysed was superior to that of the USA.

7.-Bibliografía

1. Cullen, W. R. & Reimer, K. J. Arsenic Speciation in the Environment. *Chem. Rev.* **89**, 713–764 (1989).
2. Smedley, P. L. & Kinniburgh, D. G. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Appl. Geochemistry* **17**, 517–568 (2002).
3. Raab, A., Meharg, A. A., Jaspars, M., Genney, D. R. & Feldmann, J. Arsenic-glutathione complexes - Their stability in solution and during separation by different HPLC modes. *J. Anal. At. Spectrom.* **19**, 183–190 (2004).
4. Singh, R., Singh, S., Parihar, P., Singh, V. P. & Prasad, S. M. Arsenic contamination, consequences and remediation techniques: A review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **112**, 247–270 (2015).
5. Mondal, D. *et al.* Arsenic exposure from food exceeds that from drinking water in endemic area of Bihar, India. *Sci. Total Environ.* **754**, 142082–142094 (2021).
6. Li, H. Clinimetallomics: Arsenic Speciation in Urine from Patients With Arsenism by HPLC-ICP-MS. *At. Spectrosc.* **42**, 278–281 (2021).
7. Tawfik, D. S. & Viola, R. E. Arsenate replacing phosphate: Alternative life chemistries and ion promiscuity. *Biochemistry* **50**, 1128–1134 (2011).
8. Weber, A. M. *et al.* Arsenic speciation in rice bran: Agronomic practices, postharvest fermentation, and human health risk assessment across the lifespan. *Environ. Pollut.* **290**, 117962–117971 (2021).
9. Gupta, S. K. & Singh, J. SPECIAL ISSUE ON ENVIRONMENTAL MANAGEMENT FOR SUSTAINABLE DEVELOPMENT EVALUATION OF MOLLUSC AS SENSITIVE INDICATOR OF HEAVY METAL POLLUTION IN AQUATIC SYSTEM: A REVIEW. **2**, 49–57 (2011).
10. Corkhill, C. L. & Vaughan, D. J. Arsenopyrite oxidation - A review. *Appl. Geochemistry* **24**, 2342–2361 (2009).
11. Nordstrom, D. K. & Archer, D. G. Arsenic thermodynamic data and environmental geochemistry. *Arsenic in Ground Water* 1–25 (2003).

12. Mestrot, A., Merle, J. K., Broglia, A., Feldmann, J. & Krupp, E. M. Atmospheric stability of arsine and methylarsines. *Environ. Sci. Technol.* **45**, 4010–4015 (2011).
13. Masuda, H. Arsenic cycling in the Earth's crust and hydrosphere: interaction between naturally occurring arsenic and human activities. *Prog. Earth Planet. Sci.* **5**, 1–11 (2018).
14. Craw, D., Falconer, D. & Youngson, J. H. Environmental arsenopyrite stability and dissolution: Theory, experiment, and field observations. *Chem. Geol.* **199**, 71–82 (2003).
15. Bonazzi, P. & Bindi, L. A crystallographic review of arsenic sulfides: Effects of chemical variations and changes induced by exposure to light. *Zeitschrift für Kristallographie* vol. 223 132–147 (2008).
16. Gaboreau, S., Beaufort, D., Vieillard, P., Patrier, P. & Bruneton, P. ALUMINUM PHOSPHATE-SULFATE MINERALS ASSOCIATED WITH PROTEROZOIC UNCONFORMITY-TYPE URANIUM DEPOSITS IN THE EAST ALLIGATOR RIVER URANIUM FIELD, NORTHERN TERRITORIES, AUSTRALIA. *Can. Mineral.* **43**, 813–827 (2005).
17. Gas'kova, O. L., Shironosova, G. P. & Bortnikova, S. B. Thermodynamic estimation of the stability field of bukovskyite, an iron sulfoarsenate. *Geochemistry Int.* **46**, 85–91 (2008).
18. Pantsar-Kallio, M. & Korpela, A. Analysis of gaseous arsenic species and stability studies of arsine and trimethylarsine by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **410**, 65–70 (2000).
19. Kösters, J., Diaz-Bone, R. A., Planer-Friedrich, B., Rothweiler, B. & Hirner, A. V. Identification of organic arsenic, tin, antimony and tellurium compounds in environmental samples by GC-MS. *J. Mol. Struct.* **661–662**, 347–356 (2003).
20. Suzuki, K. T. Metabolomics of arsenic based on speciation studies. in *Analytica Chimica Acta* vol. 540 71–76 (2005).

21. Vasken Aposhian, H., Zakharyan, R. A., Avram, M. D., Sampayo-Reyes, A. & Wollenberg, M. L. A review of the enzymology of arsenic metabolism and a new potential role of hydrogen peroxide in the detoxication of the trivalent arsenic species. *Toxicology and Applied Pharmacology* vol. 198 327–335 (2004).
22. Fang, Z., Zhang, K., Zhang, X. & Pan, B. Enhanced water decontamination from methylated arsenic by utilizing ultra-small hydrated zirconium oxides encapsulated inside gel-type anion exchanger. *Chem. Eng. J.* **430**, (2022).
23. González de las Torres, A. I. *et al.* Arsenic accumulation and speciation in strawberry plants exposed to inorganic arsenic enriched irrigation. *Food Chem.* **315**, 126215–126221 (2020).
24. Langasco, I. *et al.* Assessment and validation of ICP-MS and IC-ICP-MS methods for the determination of total, extracted and speciated arsenic. Application to samples from a soil-rice system at varying the irrigation method. *J. Environ. Manage.* **302**, 114105–114116 (2022).
25. Hall, M. *et al.* Determinants of arsenic metabolism: Blood arsenic metabolites, plasma folate, cobalamin, and homocysteine concentrations in maternal-newborn pairs. *Environ. Health Perspect.* **115**, 1503–1509 (2007).
26. Zhang, W., Li, H., Zheng, H., Lan, H. & Zhuang, Y. Arsenic speciation and concentration in the urine of infants in Xiamen, ChinaA cross-sectional survey. 1–26 (2022) doi:10.21203/rs.3.rs-1522535/v1.
27. Verdon, C. P., Caldwell, K. L., Fresquez, M. R. & Jones, R. L. Determination of seven arsenic compounds in urine by HPLC-ICP-DRC-MS: A CDC population biomonitoring method. *Anal. Bioanal. Chem.* **393**, 939–947 (2009).
28. Lu, X., Arnold, L. L., Cohen, S. M., Cullen, W. R. & Le, X. C. Speciation of Dimethylarsinous Acid and Trimethylarsine Oxide in Urine from Rats Fed with Dimethylarsinic Acid and Dimercaptopropane Sulfonate. *Anal. Chem.* **75**, 6463–6468 (2003).
29. Lewchalermvong, K., Rangkadilok, N., Nookabkaew, S., Suriyo, T. & Satayavivad, J. Arsenic Speciation and Accumulation in Selected Organs after Oral Administration of Rice Extracts in Wistar Rats. *J. Agric. Food Chem.* **66**, 3199–3209 (2018).

30. Francesconi, K. A., Tanggaard, R., McKenzie, C. J. & Goessler, W. Arsenic Metabolites in Human Urine after Ingestion of an Arsenosugar. *Clin. Chem.* **48**, 92–101 (2002).
31. Yu, Y., Navarro, A. V., Sahuquillo, À., Zhou, G. & López-Sánchez, J. F. Arsenosugar standards extracted from algae: Isolation, characterization and use for identification and quantification purposes. *J. Chromatogr. A* **1609**, (2020).
32. Nan, K., He, M., Chen, B., Chen, Y. & Hu, B. Arsenic speciation in tree moss by mass spectrometry based hyphenated techniques. *Talanta* **183**, 48–54 (2018).
33. Terol, A., Ardini, F., Grotti, M. & Todolí, J. L. High temperature liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of arsenosugars in biological samples. *J. Chromatogr. A* **1262**, 70–76 (2012).
34. Kohlmeyer, U., Kuballa, J. & Jantzen, E. Simultaneous separation of 17 inorganic and organic arsenic compounds in marine biota by means of high-performance liquid chromatography/inductively coupled plasma mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16**, 965–974 (2002).
35. Taylor, V. *et al.* Human exposure to organic arsenic species from seafood. *Sci. Total Environ.* **580**, 266–282 (2017).
36. Taylor, V. F. *et al.* Distinct arsenic metabolites following seaweed consumption in humans. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
37. Wu, Y. C. *et al.* Metabolic and residual characteristic of different arsenic species contained in laver during mouse digestion. *Sci. Total Environ.* **793**, (2021).
38. Viczek, S. A., Jensen, K. B. & Francesconi, K. A. Arsenic-Containing Phosphatidylcholines: A New Group of Arsenolipids Discovered in Herring Caviar. *Angew. Chemie* **128**, 5345–5348 (2016).
39. Bornhorst, J. *et al.* Toxicity of three types of arsenolipids: Species-specific effects in: *Caenorhabditis elegans*. *Metallomics* **12**, 794–798 (2020).
40. Glabonjat, R. A. *et al.* Origin of arsenolipids in sediments from Great Salt Lake. *Environ. Chem.* **16**, 303–311 (2019).

41. Chávez-Capilla, T. The Need to Unravel Arsenolipid Transformations in Humans. *DNA Cell Biol.* **41**, 64–70 (2022).
42. Caumette, G., Koch, I. & Reimer, K. J. Arsenobetaine formation in plankton: A review of studies at the base of the aquatic food chain. *J. Environ. Monit.* **14**, 2841–2853 (2012).
43. Popowich, A., Zhang, Q. & Chris Le, X. Arsenobetaine: The ongoing mystery. *Natl. Sci. Rev.* **3**, 451–458 (2016).
44. Nguyen, M. H. *et al.* Speciation Analysis of Arsenic Compounds by HPLC-ICP-MS: Application for Human Serum and Urine. *J. Anal. Methods Chem.* **2018**, (2018).
45. Sen, I. *et al.* Development and validation of a simple and robust method for arsenic speciation in human urine using HPLC/ICP-MS. *J. AOAC Int.* **98**, 517–523 (2015).
46. Niedzielski, P., Mleczek, M., Magdziak, Z., Siwulski, M. & Kozak, L. Selected arsenic species: As(III), As(V) and dimethylarsenic acid (DMAA) in *Xerocomus badius* fruiting bodies. *Food Chem.* **141**, 3571–3577 (2013).
47. Wolle, M. M., Conklin, S. D. & Wittenberg, J. Matrix-induced transformation of arsenic species in seafoods. *Anal. Chim. Acta* **1060**, 53–63 (2019).
48. Leese, E., Clench, M., Morton, J., Gardiner, P. H. E. & Carolan, V. A. The investigation of unexpected arsenic compounds observed in routine biological monitoring urinary speciation analysis. *Toxics* **5**, (2017).
49. Xiong, C. *et al.* Arsenolipids in salmon are partly converted to thioxo analogs during cooking. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **69**, (2022).
50. Zhu, X. D., Wang, Y. J., Liu, C., Qin, W. X. & Zhou, D. M. Kinetics, intermediates and acute toxicity of arsanilic acid photolysis. *Chemosphere* **107**, 274–281 (2014).
51. 51.-EPA 2009-Arsenic products cancellation order.

52. Nordberg, M., Duffus, J. H. & Templeton, D. M. *GLOSSARY OF TERMS USED IN TOXICOKINETICS (IUPAC Recommendations 2003)*. C. R. Ganellin (UK vol. 76 (2004).
53. Organization, W. H. *Arsenic monograph IARC*. (2012).
54. Bose, P. & Sharma, A. *Role of iron in controlling speciation and mobilization of arsenic in subsurface environment*. *Water Research* vol. 36 (2002).
55. Saintilan, N. J., Creaser, R. A., Spry, P. G. & Hnatyshin, D. Re-Os Systematics of löllingite and arsenopyrite in granulite-facies garnet rocks: Insights into the metamorphic history and thermal evolution of the broken hill block during the early mesoproterozoic (New South Wales, Australia). *Can. Mineral.* **55**, 29–44 (2017).
56. Garelick, H., Jones, H., Dybowska, A. & Valsami-Jones, E. Arsenic pollution sources. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **197**, 17–60 (2008).
57. Kumar, M., Goswami, R., Patel, A. K., Srivastava, M. & Das, N. Scenario, perspectives and mechanism of arsenic and fluoride Co-occurrence in the groundwater: A review. *Chemosphere* vol. 249 (2020).
58. Das, B. Theoretical study of formation of secondary arsenic minerals: Scorodite and pharmacosiderite. *ACS Earth Sp. Chem.* **3**, 192–201 (2019).
59. Bentz, J. L. & Peterson, R. C. Realgar and hörnesite precipitation in an iron-poor, sulfate-rich mudflat, laguna chiar khota, Bolivia. *Can. Mineral.* **55**, 1009–1025 (2017).
60. Alvarez, R., Ordóñez, A. & Loredó, J. Geochemical assessment of an arsenic mine adjacent to a water reservoir (León, Spain). *Environ. Geol.* **50**, 873–884 (2006).
61. Bowell, R. J., Alpers, C. N., Jamieson, H. E., Nordstrom, D. K. & Majzlan, J. The environmental geochemistry of arsenic: - An overview -. in *Arsenic: Environmental Geochemistry, Mineralogy, and Microbiology* vol. 79 1–16 (De Gruyter, 2014).

62. Ormachea Muñoz, M. *et al.* Arsenic and other trace elements in thermal springs and in cold waters from drinking water wells on the Bolivian Altiplano. *J. South Am. Earth Sci.* **60**, 10–20 (2015).
63. Morales-Simfors, N. *et al.* Arsenic in Latin America: A critical overview on the geochemistry of arsenic originating from geothermal features and volcanic emissions for solving its environmental consequences. *Sci. Total Environ.* **716**, (2020).
64. Zuzolo, D. *et al.* Arsenic: Geochemical distribution and age-related health risk in Italy. *Environ. Res.* **182**, (2020).
65. Dousova, B., Buzek, F., Lhotka, M., Krejcová, S. & Boubinová, R. Leaching effect on arsenic mobility in agricultural soils. *J. Hazard. Mater.* **307**, 231–239 (2016).
66. Ramos, Q., Armienta, M. A., Aguayo, A. & Cruz, O. Evaluation of the interactions of arsenic (As), boron (B), and lead (Pb) from geothermal production wells with agricultural soils. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **211**, (2021).
67. Long, J. *et al.* The leaching of antimony and arsenic by simulated acid rain in three soil types from the world's largest antimony mine area. *Environ. Geochem. Health* (2022) doi:10.1007/s10653-021-01188-3.
68. Sigfusson, B., Meharg, A. A. & Gislason, S. R. Regulation of arsenic mobility on basaltic glass surfaces by speciation and pH. *Environ. Sci. Technol.* **42**, 8816–8821 (2008).
69. Shen, B. *et al.* The optimum pH and Eh for simultaneously minimizing bioavailable cadmium and arsenic contents in soils under the organic fertilizer application. *Sci. Total Environ.* **711**, (2020).
70. Bissen, M., Frimmel, F. H. & Bissen, M. *Arsenic-a Review. Part I: Occurrence, Toxicity, Speciation, Mobility. Acta hydrochim. hydrobiol.* vol. 31 (2003).
71. Qiu, G. *et al.* Mechanisms of arsenic-containing pyrite oxidation by aqueous arsenate under anoxic conditions. *Geochim. Cosmochim. Acta* **217**, 306–319 (2017).

72. Wang, Y. F., Qiao, M., Wang, H. T. & Zhu, D. Species-specific effects of arsenic on the soil collembolan gut microbiota. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **183**, (2019).
73. Zhao, Z. *et al.* Microbial mobilization of arsenic from iron-bearing clay mineral through iron, arsenate, and simultaneous iron-arsenate reduction pathways. *Sci. Total Environ.* **763**, (2021).
74. Kocar, B. D. & Fendorf, S. Thermodynamic constraints on reductive reactions influencing the biogeochemistry of arsenic in soils and sediments. *Environ. Sci. Technol.* **43**, 4871–4877 (2009).
75. Nikolopoulos D, P. D. Arsenic Occurrence and Fate in the Environment; A Geochemical Perspective. *J. Earth Sci. Clim. Change* **06**, (2015).
76. Farzana Akter, K., Owens, G., Davey, D. E. & Naidu, R. *Arsenic Speciation and Toxicity in Biological Systems. Rev Environ Contam Toxicol* vol. 184 (2005).
77. Smith, E., Naidu, R. & Alston, A. M. (1999) *Chemistry of Arsenic in Soils: I. Sorption of Arsenate and Arsenite by Four Australian Soils.*
78. Herbel, M. & Fendorf, S. Biogeochemical processes controlling the speciation and transport of arsenic within iron coated sands. *Chem. Geol.* **228**, 16–32 (2006).
79. Morin, G. & Calas, G. Arsenic in Soils, Mine Tailings, and Former Industrial Sites. *Elements* **2**, 97–101 (2006).
80. Dousova, B., Buzek, F., Rothwell, J., Krejcova, S. & Lhotka, M. Adsorption behavior of arsenic relating to different natural solids: Soils, stream sediments and peats. *Sci. Total Environ.* **433**, 456–461 (2012).
81. Tufano, K. J., Reyes, C., Saltikov, C. W. & Fendorf, S. Reductive processes controlling arsenic retention: Revealing the relative importance of iron and arsenic reduction. *Environ. Sci. Technol.* **42**, 8283–8289 (2008).
82. Smith, E., Naidu, R., Alston, A. M., Osmond, G. & Alston, A. A. *Heavy Metals in the Environment Chemistry of Inorganic Arsenic in Soils: II. Effect of Phosphorus, Sodium, and Calcium on Arsenic Sorption.*

83. Mercer, K. L. & Tobiasson, J. E. Removal of arsenic from high ionic strength solutions: Effects of ionic strength, pH, and preformed versus in situ formed HFO. *Environ. Sci. Technol.* **42**, 3797–3802 (2008).
84. Jelenová, H., Drahotka, P., Falteisek, L. & Culka, A. Arsenic-rich stalactites from abandoned mines: Mineralogy and biogeochemistry. *Appl. Geochemistry* **129**, (2021).
85. Wu, Y. F. *et al.* Anaerobic As(III) Oxidation Coupled with Nitrate Reduction and Attenuation of Dissolved Arsenic by *Noviherbaspirillum* Species. *ACS Earth Sp. Chem.* **5**, 2115–2123 (2021).
86. Darma, A., Yang, J., Bloem, E., Mozdzen, K. & Zandi, P. Arsenic biotransformation and mobilization: the role of bacterial strains and other environmental variables. *Environmental Science and Pollution Research* vol. 29 1763–1787 (2022).
87. Seyfferth, A. L., Limmer, M. A. & Dykes, G. E. On the Use of Silicon as an Agronomic Mitigation Strategy to Decrease Arsenic Uptake by Rice. in *Advances in Agronomy* vol. 149 49–91 (Academic Press Inc., 2018).
88. Xie, J. *et al.* Distribution and chemical speciation of arsenic in different sized atmospheric particulate matters. *J. Environ. Sci. (China)* **108**, 1–7 (2021).
89. Millán-Martínez, M. *et al.* Source contribution and origin of PM10 and arsenic in a complex industrial region (Huelva, SW Spain). *Environ. Pollut.* **274**, (2021).
90. Wang, Y. Y., Chai, L. Y. & Yang, W. C. Arsenic distribution and pollution characteristics. *Arsenic Pollution Control in Nonferrous Metallurgy* 1–15 (2019) doi:10.1007/978-981-13-6721-2_1.
91. Savage, L., Carey, M., Williams, P. N. & Meharg, A. A. Maritime Deposition of Organic and Inorganic Arsenic. *Environ. Sci. Technol.* **53**, 7288–7295 (2019).
92. Tong, S. *et al.* Association of selenium, arsenic, and other trace elements in drinking water and urine in residents of the plateau region in China. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **29**, 26498–26512 (2022).

93. Shaji, E. *et al.* Arsenic contamination of groundwater: A global synopsis with focus on the Indian Peninsula. *Geosci. Front.* **12**, (2021).
94. Ahmed, F. T. *et al.* Characterization of arsenic contaminated groundwater from central Bangladesh: Irrigation feasibility and preliminary health risks assessment. *Environ. Nanotechnology, Monit. Manag.* **15**, (2021).
95. Escot-Espinoza, V. M. *et al.* Presence of arsenic in potential sources of drinking water supply located in a mineralized and mined area of the sierra madre oriental in Mexico. *Toxics* **9**, (2021).
96. Litter, M. I. *et al.* Arsenic in Argentina: Occurrence, human health, legislation and determination. *Sci. Total Environ.* **676**, 756–766 (2019).
97. Gu, X. *et al.* Occurrence, migration, and allocation of arsenic in multiple media of a typical semi-enclosed bay. *J. Hazard. Mater.* **384**, (2020).
98. Fakhreddine, S., Prommer, H., Scanlon, B. R., Ying, S. C. & Nicot, J. P. Mobilization of arsenic and other naturally occurring contaminants during managed aquifer recharge: A critical review. *Environmental Science and Technology* vol. 55 2208–2223 (2021).
99. Rehman, M. U. *et al.* Fate of arsenic in living systems: Implications for sustainable and safe food chains. *J. Hazard. Mater.* **417**, (2021).
100. Du, S., Zhou, Y. & Zhang, L. The potential of arsenic biomagnification in marine ecosystems: A systematic investigation in Daya Bay in China. *Sci. Total Environ.* **773**, (2021).
101. Dai, Z. H. *et al.* Selenate increased plant growth and arsenic uptake in As-hyperaccumulator *Pteris vittata* via glutathione-enhanced arsenic reduction and translocation. *J. Hazard. Mater.* **424**, (2022).
102. Sandhi, A., Landberg, T. & Greger, M. Phytofiltration of arsenic by aquatic moss (*Warnstorfia fluitans*). *Environ. Pollut.* **237**, 1098–1105 (2018).
103. Punshon, T. *et al.* Understanding arsenic dynamics in agronomic systems to predict and prevent uptake by crop plants. *Sci. Total Environ.* **581–582**, 209–220 (2017).

104. Majumder, S., Powell, M. A., Kumar Biswas, P. & Banik, P. The role of agronomic factors (rice cultivation practices and soil amendments) on Arsenic fractionation: A strategy to minimise Arsenic uptake by rice, with some observations related to cadmium. *Catena* **206**, (2021).
105. Yu, C. *et al.* Arsenic in permafrost-affected rivers and lakes of Tibetan Plateau, China. *Environ. Pollut. Bioavailab.* **31**, 226–232 (2019).
106. Varagiya, D., Jethva, B. & Pandya, D. Feather heavy metal contamination in various species of waterbirds from Asia: a review. *Environmental Monitoring and Assessment* vol. 194 (2022).
107. Hernández-Mendiola, E. *et al.* Arsenic and lead in the soils of San Antonio–El Triunfo mining district, B.C.S., México: a human health risk assessment. *Environ. Earth Sci.* **81**, (2022).
108. Kerr, G. & Craw, D. Arsenic residues from historic gold extraction, Snowy River, Westland, New Zealand. *New Zeal. J. Geol. Geophys.* **64**, 107–119 (2021).
109. Leclerc, É. *et al.* Quantifying arsenic post-depositional mobility in lake sediments impacted by gold ore roasting in sub-arctic Canada using inverse diagenetic modelling. *Environ. Pollut.* **288**, (2021).
110. Ye, L., Zhong, B., Huang, M., Chen, W. & Wang, X. Pollution evaluation and children’s multimedia exposure of atmospheric arsenic deposition in the Pearl River Delta, China. *Sci. Total Environ.* **787**, (2021).
111. Wurl, J., Mendez-Rodriguez, L. & Acosta-Vargas, B. Arsenic content in groundwater from the southern part of the San Antonio-El Triunfo mining district, Baja California Sur, Mexico. *J. Hydrol.* **518**, 447–459 (2014).
112. Wang, Q. Q., Jiang, Y. & Naranmandura, H. Therapeutic strategy of arsenic trioxide in the fight against cancers and other diseases. *Metallomics* vol. 12 326–336 (2020).
113. Turner, A. Viewpoint: the story so far An overview of developments in UK food regulation and associated advisory committees. *Br. Food J.* **101**, 7–070 (1999).
114. Bentley, R. & Chasteen, T. G. Arsenic Curiosa and Humanity. *Chem. Educ.* **7**, 51–60 (2002).

115. The duplicitous nature of inorganic arsenic. *Reflections* **5**, 60–64 (2005).
116. Radke, B., Jewell, L., Piketh, S. & Namieśnik, J. Arsenic-based warfare agents: Production, use, and destruction. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* vol. 44 1525–1576 (2014).
117. Mangalgi, K. P., Adak, A. & Blaney, L. Organoarsenicals in poultry litter: Detection, fate, and toxicity. *Environment International* vol. 75 68–80 (2015).
118. Byambaa, E. *et al.* Arsenic (V) removal by an adsorbent material derived from acid mine drainage sludge. *Appl. Sci.* **11**, 1–13 (2021).
119. Qin, H., Guo, X., Tian, Q., Yu, D. & Zhang, L. Recovery of gold from sulfide refractory gold ore: Oxidation roasting pretreatment and gold extraction. *Miner. Eng.* **164**, (2021).
120. Kato, T., Hatakeyama, T. & Sugawara, K. Release behavior of arsenic, chromium, and copper during heat treatments of CCA-treated wood. *J. Mater. Cycles Waste Manag.* **23**, 1636–1645 (2021).
121. Gamble, A. V., Givens, A. K. & Sparks, D. L. Arsenic Speciation and Availability in Orchard Soils Historically Contaminated with Lead Arsenate. *J. Environ. Qual.* **47**, 121–128 (2018).
122. Wierońska-Wiśniewska, F., Makowska, D. & Strugała, A. Arsenic in polish coals: Content, mode of occurrence, and distribution during coal combustion process. *Fuel* **312**, (2022).
123. Qiao, W. *et al.* Identification of processes mobilizing organic molecules and arsenic in geothermal confined groundwater from Pliocene aquifers. *Water Res.* **198**, (2021).
124. Zou, C., Wang, C., Liu, H., Wang, H. & Zhang, Y. Effect of Volatile and Ash Contents in Coal on the Volatilization of Arsenic during Isothermal Coal Combustion. *Energy and Fuels* **31**, 12831–12838 (2017).
125. Wang, C. *et al.* Arsenic K₄ crystal: A new stable direct-gap semiconductor allotrope. *Solid State Commun.* **323**, (2021).

126. Burunkova, J. A. *et al.* Arsenic trisulfide-doped silica-based porous glass. *Opt. Laser Technol.* **147**, (2022).
127. Pillai, S. A., Chobisa, D., Urimi, D. & Ravindra, N. *Pharmaceutical Glass Interactions: A Review of Possibilities*.
128. Abrar, S., Javed, S., Kiran, S. & Awan, H. Analysis of lead, cadmium, and arsenic in colored cosmetics marketed in Pakistan. *J. Public Health Policy* **43**, 54–64 (2022).
129. Huang, J. R. *et al.* Determination of arsenic species in mainstream cigarette smoke based on inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrosc. Lett.* **51**, 252–256 (2018).
130. Liu, Q., Huang, C. & Chris Le, X. Arsenic species in electronic cigarettes: Determination and potential health risk. *J. Environ. Sci. (China)* **91**, 168–176 (2020).
131. Designed Research; L, J.-M. L. C. Arsenic trioxide replacing or reducing chemotherapy in consolidation therapy for acute promyelocytic leukemia (APL2012 trial). **118**, 2020382118 (2021).
132. Miodragović, D. *et al.* Arsenoplatin-1 Is a Dual Pharmacophore Anticancer Agent. *J. Am. Chem. Soc.* **141**, 6453–6457 (2019).
133. Pommerrenig, B. *et al.* Functional evolution of nodulin 26-like intrinsic proteins: from bacterial arsenic detoxification to plant nutrient transport. *New Phytol.* **225**, 1383–1396 (2020).
134. Yang, Y. *et al.* The gut microbiome and arsenic-induced disease-iAs metabolism in mice. doi:10.1007/s40572-021-00305-9/Published.
135. Mishra, J., Singh, R. & Arora, N. K. Alleviation of heavy metal stress in plants and remediation of soil by rhizosphere microorganisms. *Front. Microbiol.* **8**, (2017).
136. Deng, F. *et al.* Aquaporins mediated arsenite transport in plants: Molecular mechanisms and applications in crop improvement. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **50**, 1613–1639 (2020).

137. Tang, Z. & Zhao, F. J. The roles of membrane transporters in arsenic uptake, translocation and detoxification in plants. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 1–36 (2020) doi:10.1080/10643389.2020.1795053.
138. Kulshrestha, A. Arsenic-induced abnormalities in glucose metabolism: Biochemical basis and potential therapeutic and nutritional interventions. *World J. Transl. Med.* **3**, 96 (2014).
139. Zhang, H. N. *et al.* Systematic identification of arsenic-binding proteins reveals that hexokinase-2 is inhibited by arsenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 15084–15089 (2015).
140. Vergara-Gerónimo, C. A., León Del Río, A., Rodríguez-Dorantes, M., Ostrosky-Wegman, P. & Salazar, A. M. Arsenic-protein interactions as a mechanism of arsenic toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* vol. 431 (2021).
141. Jomova, K. *et al.* Arsenic: Toxicity, oxidative stress and human disease. *Journal of Applied Toxicology* vol. 31 95–107 (2011).
142. Watanabe, T. & Hirano, S. Metabolism of arsenic and its toxicological relevance. *Arch. Toxicol.* **87**, 969–979 (2013).
143. Challenger, F. Biological methylation. *Chem. Rev.* **36**, 315–361 (1945).
144. Hughes, M. F. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol. Lett.* **133**, 1–16 (2002).
145. Das, A., Sanyal, T. & Bhattacharjee, P. Depletion of S-adenosylmethionine pool and promoter hypermethylation of Arsenite methyltransferase in arsenic-induced skin lesion individuals: A case-control study from West Bengal, India. *Environ. Res.* **198**, (2021).
146. Ren, Q. X. *et al.* Effects of Proanthocyanidins on Arsenic Methylation Metabolism and Efflux in Human Hepatocytes L-02. *Biomed Res. Int.* **2019**, (2019).

147. Zhou, Q. & Xi, S. A review on arsenic carcinogenesis: Epidemiology, metabolism, genotoxicity and epigenetic changes. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* vol. 99 78–88 (2018).
148. El-Ghiaty, M. A. & El-Kadi, A. O. S. ARSENIC: VARIOUS SPECIES WITH DIFFERENT EFFECTS ON CYTOCHROME P450 REGULATION IN HUMANS. *EXCLI J.* **20**, 1184–1242 (2021).
149. Vahter, M. & Concha, G. Role of Metabolism in Arsenic Toxicity. *C Pharmacol. Toxicol.* **89**, 1–5 (2001).
150. Aposhian, H. V. *et al.* Occurrence of monomethylarsonous acid in urine of humans exposed to inorganic arsenic. *Chem. Res. Toxicol.* **13**, 693–697 (2000).
151. Drobna, Z., Styblo, M. & Thomas, D. J. An Overview of Arsenic Metabolism and Toxicity. *Curr. Protoc. Toxicol.* **42**, 1–6 (2009).
152. Hayakawa, T., Kobayashi, Y., Cui, X. & Hirano, S. A new metabolic pathway of arsenite: Arsenic-glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19. *Arch. Toxicol.* **79**, 183–191 (2005).
153. Ajees, A. A. & Rosen, B. P. As(III) S-Adenosylmethionine Methyltransferases and Other Arsenic Binding Proteins. *Geomicrobiol. J.* **32**, 570–576 (2015).
154. Schmeisser, E., Goessler, W. & Francesconi, K. A. Human metabolism of arsenolipids present in cod liver. in *Analytical and Bioanalytical Chemistry* vol. 385 367–376 (2006).
155. Müller, S. M. *et al.* Effects of arsenolipids on in vitro blood-brain barrier model. *Arch. Toxicol.* **92**, 823–832 (2018).
156. Raml, R. *et al.* Individual variability in the human metabolism of an arsenic-containing carbohydrate, 2',3'-dihydroxypropyl 5-deoxy-5-dimethylarsinoyl- β -D-ribose, a naturally occurring arsenical in seafood. *Chem. Res. Toxicol.* **22**, 1534–1540 (2009).
157. Hata, A. *et al.* Metabolism of 3-[5'-deoxy-5'-(dimethylarsinoyl)- β -ribofuranosyloxy]-2-hydroxypropylene glycol in an artificial digestive system. *Heliyon* **5**, (2019).

158. Newcombe, C. *et al.* Accumulation or production of arsenobetaine in humans? *J. Environ. Monit.* **12**, 832–837 (2010).
159. Choi, B. S. *et al.* Effects of repeated seafood consumption on urinary excretion of arsenic species by volunteers. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **58**, 222–229 (2010).
160. Sele, V. *et al.* Arsenolipids in marine oils and fats: A review of occurrence, chemistry and future research needs. *Food Chemistry* vol. 133 618–630 (2012).
161. Atsdr. *ADDENDUM TO THE TOXICOLOGICAL PROFILE FOR ARSENIC.* (2016).
162. Chowdhury, U. K. Selenium (Se) as well as mercury (Hg) may influence the methylation and toxicity of inorganic arsenic, but further research is needed with combination of Inorganic arsenic, Se, and Hg. *J. Toxicol. Environ. Sci.* **1**, 1–8 (2021).
163. Xiong, C. *et al.* Transport of arsenolipids to the milk of a nursing mother after consuming salmon fish. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **61**, (2020).
164. Renu, K. *et al.* Role of arsenic exposure in adipose tissue dysfunction and its possible implication in diabetes pathophysiology. *Toxicology Letters* vol. 284 86–95 (2018).
165. Younus, H., Arsalan, A. & Alam, M. F. Arsenic inhibits human salivary aldehyde dehydrogenase: Mechanism and a population-based study. *Chemosphere* **243**, (2020).
166. Park, W. H., Han, B. R., Park, H. K. & Kim, S. Z. Arsenic trioxide induces growth inhibition and death in human pulmonary artery smooth muscle cells accompanied by mitochondrial O₂^{•-} increase and GSH depletion. *Environ. Toxicol.* **33**, 833–840 (2018).
167. Chupakhin, E. & Krasavin, M. Thioredoxin reductase inhibitors: updated patent review (2017-present). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* vol. 31 745–758 (2021).
168. Hu, Y. *et al.* The role of reactive oxygen species in arsenic toxicity. *Biomolecules* vol. 10 (2020).

169. Phull, A. R., Nasir, B., Haq, I. ul & Kim, S. J. Oxidative stress, consequences and ROS mediated cellular signaling in rheumatoid arthritis. *Chemico-Biological Interactions* vol. 281 121–136 (2018).
170. Saona, L. A. *et al.* Phosphate-Arsenic Interactions in Halophilic Microorganisms of the Microbial Mat from Laguna Tebenquiche: from the Microenvironment to the Genomes. doi:10.1007/s00248-020-01673-9/Published.
171. Wang, Y. *et al.* Copper and arsenic-induced oxidative stress and immune imbalance are associated with activation of heat shock proteins in chicken intestines. *Int. Immunopharmacol.* **60**, 64–75 (2018).
172. Mohanty, B. P., Mahanty, A., Mitra, T., Parija, S. C. & Mohanty, S. Heat Shock Proteins in Stress in Teleosts. in 71–94 (2018). doi:10.1007/978-3-319-74715-6_4.
173. Calderwood, S. K. Heat shock proteins and cancer: Intracellular chaperones or extracellular signalling ligands? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* vol. 373 (2018).
174. Hsu, P. C., Jablons, D. M., Yang, C. T. & You, L. Epidermal growth factor receptor (EGFR) pathway, yes-associated protein (YAP) and the regulation of programmed death-ligand 1 (PD-L1) in non-small cell lung cancer (NSCLC). *International Journal of Molecular Sciences* vol. 20 (2019).
175. Gurevich, V. V. & Gurevich, E. V. Arrestins and G proteins in cellular signaling: The coin has two sides. *Sci. Signal.* **11**, (2018).
176. Sung, T. I., Wang, Y. J., Chen, C. Y., Hung, T. L. & Guo, H. R. Increased serum level of epidermal growth factor receptor in liver cancer patients and its association with exposure to arsenic. *Sci. Total Environ.* **424**, 74–78 (2012).
177. Miao, Z. *et al.* Analysis of the transcriptional regulation of cancer-related genes by aberrant DNA methylation of the cis-regulation sites in the promoter region during hepatocyte carcinogenesis caused by arsenic. *Oncotarget* vol. 6 www.impactjournals.com/oncotarget/.

178. Han, N. *et al.* GADD45a mediated cell cycle inhibition is regulated by p53 in bladder cancer. *Onco. Targets. Ther.* **12**, 7591–7599 (2019).
179. Medda, N., De, S. K. & Maiti, S. Different mechanisms of arsenic related signaling in cellular proliferation, apoptosis and neo-plastic transformation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* vol. 208 (2021).
180. Katerji, M. & Duerksen-Hughes, P. J. *Original Article DNA damage in cancer development: special implications in viral oncogenesis. Am J Cancer Res* vol. 11 www.ajcr.us/ (2021).
181. Lee, C.-H. Role of mitochondria, ROS, and DNA damage in arsenic induced carcinogenesis. *Front. Biosci.* **8**, 312–320 (1996).
182. Neeratanaphan, L., Kanjanakunti, A., Intamat, S. & Tengjaroenkul, B. Analysis of chromosome abnormalities in the Asian swamp eel (*Monopterus albus*) affected by arsenic contamination near a gold mine area. *Int. J. Environ. Stud.* **77**, 815–829 (2020).
183. Lambrou, A. *et al.* Arsenic exposure and DNA methylation among elderly men. *Epidemiology* **23**, 668–676 (2012).
184. Tam, L. M., Price, N. E. & Wang, Y. Molecular Mechanisms of Arsenic-Induced Disruption of DNA Repair. *Chemical Research in Toxicology* vol. 33 709–726 (2020).
185. Stýblo, M., Venkatratnam, A., Fry, R. C. & Thomas, D. J. Origins, fate, and actions of methylated trivalent metabolites of inorganic arsenic: progress and prospects. *Archives of Toxicology* vol. 95 1547–1572 (2021).
186. Zhou, X., Speer, R. M., Volk, L., Hudson, L. G. & Liu, K. J. Arsenic co-carcinogenesis: Inhibition of DNA repair and interaction with zinc finger proteins. *Semin. Cancer Biol.* **76**, 86–98 (2021).
187. Bal, S., Yadav, A., Verma, N., Aggarwal, N. K. & Gupta, R. Protective role of eugenol on arsenic induced oxidative DNA damage and modulatory effect of GSTO2 polymorphism. *J. Food Biochem.* **42**, (2018).

188. Roy, J. S., Chatterjee, D., Das, N. & Giri, A. K. Substantial evidences indicate that inorganic arsenic is a genotoxic carcinogen: A review. *Toxicological Research* vol. 34 311–324 (2018).
189. Nava-Rivera, L. E. *et al.* Transgenerational effects in DNA methylation, genotoxicity and reproductive phenotype by chronic arsenic exposure. *Sci. Rep.* **11**, (2021).
190. Wu, L. L., Chiou, C. C., Chang, P. Y. & Wu, J. T. Urinary 8-OHdG: A marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clinica Chimica Acta* vol. 339 1–9 (2004).
191. Shin, S. K. *et al.* Exogenous 8-hydroxydeoxyguanosine ameliorates liver fibrosis through the inhibition of Rac1-NADPH oxidase signaling. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **35**, 1078–1087 (2020).
192. Pfeifer, G. P. Defining driver DNA methylation changes in human cancer. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 19 (2018).
193. Zhang, A. L. *et al.* Role of H3K18ac-regulated nucleotide excision repair-related genes in arsenic-induced DNA damage and repair of HaCaT cells. *Hum. Exp. Toxicol.* **39**, 1168–1177 (2020).
194. Banerjee, M. *et al.* Dynamic alteration in miRNA and mRNA expression profiles at different stages of chronic arsenic exposure-induced carcinogenesis in a human cell culture model of skin cancer. *Arch. Toxicol.* **95**, 2351–2365 (2021).
195. Minatel, B. C. *et al.* Environmental arsenic exposure: From genetic susceptibility to pathogenesis. *Environment International* vol. 112 183–197 (2018).
196. Srivastava, R. K. *et al.* Unfolded protein response (UPR) signaling regulates arsenic trioxide-mediated macrophage innate immune function disruption. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **272**, 879–887 (2013).
197. Parvez, F. *et al.* A prospective study of respiratory symptoms associated with chronic arsenic exposure in Bangladesh: Findings from the health effects of arsenic longitudinal study (HEALS). *Thorax* **65**, 528–533 (2010).

198. Dauphiné, D. C. *et al.* Lung function in adults following in utero and childhood exposure to arsenic in drinking water: Preliminary findings. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **84**, 591–600 (2011).
199. Smith, A. H. *et al.* Chronic respiratory symptoms in children following in utero and early life exposure to arsenic in drinking water in Bangladesh. *Int. J. Epidemiol.* **42**, 1077–1086 (2013).
200. Argos, M. *et al.* Arsenic and lung disease mortality in bangladeshi adults. *Epidemiology* **25**, 536–543 (2014).
201. Chen, Y. *et al.* Arsenic exposure from drinking water and mortality from cardiovascular disease in Bangladesh: Prospective cohort study. *BMJ* **342**, (2011).
202. Wu, M. M. *et al.* GT-repeat polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with cardiovascular mortality risk in an arsenic-exposed population in northeastern Taiwan. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **248**, 226–233 (2010).
203. Chen, Y. *et al.* Arsenic exposure from drinking water, arsenic methylation capacity, and carotid intima-media thickness in Bangladesh. *Am. J. Epidemiol.* **178**, 372–381 (2013).
204. Moon, K. A. *et al.* Association Between Exposure to Low to Moderate Arsenic Levels and Incident Cardiovascular Disease A Prospective Cohort Study. www.annals.org (2013).
205. Islam, M. R. *et al.* Association between hypertension and chronic arsenic exposure in drinking water: A cross-sectional study in Bangladesh. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **9**, 4522–4536 (2012).
206. Hawkesworth, S. *et al.* Early exposure to toxic metals has a limited effect on blood pressure or kidney function in later childhood, rural bangladesh. *Int. J. Epidemiol.* **42**, 176–185 (2013).
207. Osorio-Yáñez, C. *et al.* Carotid intima-media thickness and plasma asymmetric dimethylarginine in Mexican children exposed to inorganic arsenic. *Environ. Health Perspect.* **121**, 1090–1096 (2013).

208. Gribble, M. O. *et al.* Arsenic exposure, diabetes prevalence, and diabetes control in the strong heart study. *Am. J. Epidemiol.* **176**, 865–874 (2012).
209. James, K. A. *et al.* A case-cohort study examining lifetime exposure to inorganic arsenic in drinking water and diabetes mellitus. *Environ. Res.* **123**, 33–38 (2013).
210. Chen, J. W. *et al.* Arsenic methylation, GSTO1 polymorphisms, and metabolic syndrome in an arseniasis endemic area of southwestern Taiwan. *Chemosphere* **88**, 432–438 (2012).
211. Syed, E. H. *et al.* Arsenic exposure and oral cavity lesions in Bangladesh. *J. Occup. Environ. Med.* **55**, 59–66 (2013).
212. Majumdar, S. *et al.* Folic acid or combination of folic acid and vitamin B12 prevents short-term arsenic trioxide-induced systemic and mitochondrial dysfunction and DNA damage. *Environ. Toxicol.* **24**, 377–387 (2009).
213. Lin, H. J., Sung, T. I., Chen, C. Y. & Guo, H. R. Arsenic levels in drinking water and mortality of liver cancer in Taiwan. *J. Hazard. Mater.* **262**, 1132–1138 (2013).
214. Guo, J. X. *et al.* Chronic arsenic poisoning in drinking water in Inner Mongolia and its associated health effects. *J. Environ. Sci. Heal. - Part A Toxic/Hazardous Subst. Environ. Eng.* **42**, 1853–1858 (2007).
215. Ghosh, P. *et al.* Comparison of health effects between individuals with and without skin lesions in the population exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* **17**, 215–223 (2007).
216. Paul, S. *et al.* Arsenic-induced toxicity and carcinogenicity: A two-wave cross-sectional study in arsenicosis individuals in West Bengal, India. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* **23**, 156–162 (2013).
217. See, L. C. *et al.* Dose-response relationship between ingested arsenic and cataracts among residents in Southwestern Taiwan. *J. Environ. Sci. Heal. - Part A Toxic/Hazardous Subst. Environ. Eng.* **42**, 1843–1851 (2007).
218. Lin, W. *et al.* Associations between arsenic in drinking water and pterygium in southwestern Taiwan. *Environ. Health Perspect.* **116**, 952–955 (2008).

219. Atsdr. *TOXICOLOGICAL PROFILE FOR ARSENIC*. (2007).
220. Baker, B. A., Cassano, V. A., Murray, C. & Dreger, M. Arsenic exposure, assessment, toxicity, diagnosis, and management: Guidance for occupational and environmental physicians. *J. Occup. Environ. Med.* **60**, E634–E639 (2018).
221. Naujokas, M. F. *et al.* The broad scope of health effects from chronic arsenic exposure: Update on a worldwide public health problem. *Environmental Health Perspectives* vol. 121 295–302 (2013).
222. Mayer, J. E. & Goldman, R. H. Arsenic and skin cancer in the USA: the current evidence regarding arsenic-contaminated drinking water. *Int. J. Dermatol.* **55**, e585–e591 (2016).
223. Atsdr. *Arsenic Toxicity Cover Page*. <http://www.atsdr.cdc.gov/csem/csem.html>.
224. Pollack, A. Z. *et al.* Trace elements and endometriosis: The ENDO Study. *Reprod. Toxicol.* **42**, 41–48 (2013).
225. Akram, Z. *et al.* Adverse effects of arsenic exposure on uterine function and structure in female rat. *Exp. Toxicol. Pathol.* **62**, 451–459 (2010).
226. Reilly, M. P. *et al.* Prepubertal exposure to arsenic(III) suppresses circulating insulin-like growth factor-1 (IGF-1) delaying sexual maturation in female rats. *Reprod. Toxicol.* **44**, 41–49 (2014).
227. Chen, L. *et al.* Male sexual dysfunction: A review of literature on its pathological mechanisms, potential risk factors, and herbal drug intervention. *Biomedicine and Pharmacotherapy* vol. 112 (2019).
228. Pachnanda, R. & Singh, S. P. Histopathological alterations in testicular tissue of male rats exposed to arsenic. *J. Appl. Nat. Sci.* **4**, 247–251 (2012).
229. Rudnai, T. *et al.* Arsenic in drinking water and congenital heart anomalies in Hungary. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **217**, 813–818 (2014).
230. Hsieh, R. L. *et al.* Arsenic methylation capacity and developmental delay in preschool children in Taiwan. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **217**, 678–686 (2014).
231. Rahman, A. *et al.* Arsenic Exposure and Risk of Spontaneous Abortion, Stillbirth, and Infant Mortality. *Source Epidemiol.* **21**, 797–804 (2010).

232. Ng, J. (Jack), Gomez-Caminero, A., Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals. & International Program on Chemical Safety. *Arsenic and arsenic compounds*. (World Health Organization, 2001).
233. *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*.
234. Nutrición, A. E. de S. A. y. *Arsénico*. (2021).
235. La Presidencia, M. DE & Con Las Cortes Igualdad, R. E. *MINISTERIO DE LA PRESIDENCIA, RELACIONES CON LAS CORTES E IGUALDAD*. <http://www.boe.es> (2018).
236. Ganzleben, C. *Scoping documents for 2021 for the first and second second round HBM4EU priority substances Deliverable Report D4.9 WP4-Prioritisation and input to the Annual Work Plan Work Package Leader*.
237. Sandhu, S. S. *Colorimetric Method for the Determination of Arsenic(III) in Potable Water*. *Analyst* vol. 101 (1976).
238. Lakso, J. U., Rose, L. J., Peoples, S. A. & Shirachi, D. Y. *Arsenic Determination A Colorimetric Method for the Determination of Arsenite, Arsenate, Monomethylarsonic Acid, and Dimethylarsinic Acid in Biological and Environmental Samples*. *Food Chem* vol. 27 <https://pubs.acs.org/sharingguidelines> (1979).
239. Bambach, K. Polarographic Determination of Arsenic in Biological Material. *Ind. Eng. Chem. - Anal. Ed.* **14**, 265–267 (1942).
240. Arnold, J. P. & Johnson, R. M. *POLAROGRAPHY OF ARSENIC*. *Talanta* vol. 16 (1969).
241. Myers, D. J. & Osteryoung, J. *Determination of Arsenic(III) at the Parts-per-Billion Level by Differential Pulse Polarography*. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.

242. Sharma, P. *Sequential Trace Determination Arsenic(V) by Differential Pulse of Arsenic(III)*. *ANALYTICAL SCIENCES* vol. 11 (1995).
243. Forsberg, G., O’Laughlin, J. W., Megargle, R. G. & Koirttyohann, S. R. Determination of Arsenic by Anodic Stripping Voltammetry and Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry. *Anal. Chem.* **47**, 1586–1592 (1975).
244. Zeitschrift, F., Bodewig, F. G. & Valenta, P. *Trace Determination of As(III) and As(V) in Natural Waters by Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry**. *Fresenius Z Anal Chem* (1982).
245. Holak, W. Determination of Arsenic by Cathodic Stripping Voltammetry with a Hanging Mercury Drop Electrode. *Anal. Chem.* **52**, 2189–2192 (1980).
246. Henze, G., Wagner, W. & Sander, S. Speciation of arsenic(V) and arsenic(III) by cathodic stripping voltammetry in fresh water samples. *Fresenius J Anal Chem* **358**, 741–744 (1997).
247. Foster, A. L., Brown Jr, G. E., Tingle, T. N. & Parks, G. A. *Quantitative arsenic speciation in mine tailings using X-ray absorption spectroscopy*. *American Mineralogist* vol. 83 (1998).
248. Mok, W. M., Shah, N. K. & Wai, C. M. Extraction of Arsenic(III) and Arsenic(V) from Natural Waters for Neutron Activation Analysis. *Anal. Chem.* **58**, 110–113 (1986).
249. Braman, R. S. & Foreback, C. C. Methylated forms of arsenic in the environment. *Science (80-.)*. **182**, 1–2 (1973).
250. Braman, R. S., Justen, L. L. & Foreback, C. C. Direct Volatilization-Spectral Emission Type Detection System for Nanogram Amounts of Arsenic and Antimony. *Anal. Chem.* **44**, 2195–2199 (1972).
251. Heng-Bin, H., Yan-Bing, L., Shi-Fen, M. & Zhe-Ming, N. Speciation of arsenic by ion chromatography and off-line hydride generation electrothermal atomic absorption spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **8**, 1085–1090 (1993).
252. Andreae2, M. O. *The influence of biological-chemical interactions on the chemistry of a trace element’*. *Limnol. Oceanogr* vol. 24 (1979).

253. Meites, L. Polarographic Characteristics of +3 and +5 Arsenic in Hydrochloric Acid Solutions. *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 5927–5931 (1954).
254. Thorpe, T. M., Henry, F. T. & Kirch, T. O. Determination of Trace Level Arsenic(III), Arsenic(V), Total Inorganic Arsenic by Differential Pulse Polarography. *Anal. Chem.* **51**, 215–218 (1979).
255. Buldini, P. L. & Ferri, D. *Differential Pulse Polarographic Determination of Inorganic and Organic Arsenic in Natural Waters.*
256. Lee, S. W. & Méranger, J. C. Determination of total arsenic species by anodic stripping voltammetry. *Anal. Chem.* **53**, 130–131 (1981).
257. Sun, Y.-C., Mierzwa, J. & Yang, M.-H. *New method of gold-film electrode preparation for anodic stripping voltammetric determination of arsenic (III and V) in seawater.* *Talanta* vol. 44 (1997).
258. Sadana, R. S. Determination of Arsenic in the Presence of Copper by Differential Pulse Cathodic Stripping Voltammetry at a Hanging Mercury Drop Electrode. *Anal. Chem.* **55**, 304–307 (1983).
259. Zima, J. & van den Berg, C. M. *ANALYTICA CHIMICA ACTA ELSEVIER Determination of arsenic in sea water by cathodic stripping voltammetry in the presence of pyrrolidine dithiocarbamate.* *Analytica Chimica Acta* vol. 289 (1994).
260. Morin, P., Amran, M. B., Favier, S., Heimburger, R. & Leroy, M. *Separation of arsenic anions by capillary zone electrophoresis with UV detection.* *Fresenius J Anal Chem* vol. 342 (1992).
261. Gáspár, A., Sdgor, C. & Posta, J. *Separation of Organic and Inorganic Arsenic Species by Capillary Zone Electrophoresis.*
262. Nyamah, D. & Obodai Torgbor, J. *COLORIMETRIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF ARSENIC IN POTABLE WATER.* *War. Res* vol. 20 (1986).
263. Lunde, G. *Analysis Evidence of Arsenic in Marine Oils by Neutron of Arscno Organic Compounds Activation.*

264. Slejkovec, Z., Byrne, A. R. & Dermelj, M. *NEUTRON ACTIVATION ANALYSIS OF ARSENIC SPECIES. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, Articles* vol. 17.
265. Grabinski, A. A. Determination of Arsenic(III), Arsenic(V), Monomethylarsonate, and Dimethylarsinate by Ion-Exchange Chromatography with Flameless Atomic Absorption Spectrometric Detection. *Anal. Chem.* **53**, 966–968 (1981).
266. Jenner, G. A., Longrich, H. P., Jackson, S. E. & Fryer, B. J. *ICP-MS A powerful tool for high-precision trace-element analysis in Earth sciences: Evidence from analysis of selected U.S.G.S. reference samples. Chemical Geology* vol. 83 (1990).
267. Bouvier-Capely, C., Ritt, J., Baglan, N. & Cossonnet, C. Potentialities of mass spectrometry (ICP-MS) for actinides determination in urine. *Appl. Radiat. Isot.* **60**, 629–633 (2004).
268. Newman, K., Freedman, P. A., Williams, J., Belshaw, N. S. & Halliday, A. N. High sensitivity skimmers and non-linear mass dependent fractionation in ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* **24**, 742–751 (2009).
269. Bishop, D. P. *et al.* Determination of selenium in serum in the presence of gadolinium with ICP-QQQ-MS. *Analyst* **140**, 2842–2846 (2015).
270. Mihai, O. *et al.* Determination of chromium picolinate and trace hexavalent chromium in multivitamins and supplements by HPLC-ICP-QQQ-MS. *J. Food Compos. Anal.* **87**, (2020).
271. Mitev, D. P., Townsend, A. T., Paull, B. & Nesterenko, P. N. Direct sector field ICP-MS determination of metal impurities in detonation nanodiamond. *Carbon N. Y.* **60**, 326–334 (2013).
272. Yang, G. *et al.* Rapid analysis of ²³⁷Np and Pu isotopes in small volume urine by SF-ICP-MS and ICP-MS/MS. *Anal. Chim. Acta* **1158**, (2021).

273. Wrobel, K., Wrobel, K., Parker, B., Kannamkumarath, S. S. & Caruso, J. A. Determination of As(III), As(V), monomethylarsonic acid, dimethylarsinic acid and arsenobetaine by HPLC/ICP/MS: analysis of reference materials, fish tissues and urine. *Talanta* **58**, 899–907 (2002).
274. Hansen, H. R., Raab, A., Jaspars, M., Milne, B. F. & Feldmann, J. Sulfur-containing arsenical mistaken for dimethylarsinous acid [DMA(III)] and identified as a natural metabolite in urine: Major implications for studies on arsenic metabolism and toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* **17**, 1086–1091 (2004).
275. Sloth, J. J., Larsen, E. H. & Julshann, K. Selective arsenic speciation analysis of human urine reference materials using gradient elution ion-exchange HPLC-ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* **19**, 973–978 (2004).
276. Morton, J. & Mason, H. *Speciation of Arsenic Compounds in Urine from Occupationally Unexposed and Exposed Persons in the U.K. Using a Routine LC-ICP-MS Method.* *Journal of Analytical Toxicology* vol. 30 (2006).
277. Heitland, P. & Köster, H. D. Comparison of different medical cases in urinary arsenic speciation by fast HPLC-ICP-MS. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **212**, 432–438 (2009).
278. Suzuki, Y. *et al.* *Short Communication Rapid and Effective Speciation Analysis of Arsenic Compounds in Human Urine using Anion-Exchange Columns in HPLC-ICP-MS.* *J Occup Health* vol. 51 (2009).
279. Moldovan, M., Milagros Gómez, M., Palacios, M. A. & Cámara, C. *Arsenic Speciation in Water and Human Urine by HPLC-ICP-MS and HPLC-MO-HG-AAS.* *MICROCHEMICAL JOURNAL* vol. 59 (1998).
280. Roig-Navarro, A. F., Martinez-Bravo, Y., Lopez, F. J. & Hernandez, F. *Simultaneous determination of arsenic species and chromium(VI) by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry.* *Journal of Chromatography A* vol. 912 www.elsevier.com/locate/chroma (2001).

281. Chen, Z. L., Khan, N. I., Owens, G. & Naidu, R. Elimination of chloride interference on arsenic speciation in ion chromatography inductively coupled mass spectrometry using an octopole collision/reaction system. *Microchem. J.* **87**, 87–90 (2007).
282. Sanz, E., Muñoz-Olivas, R. & Cámara, C. A rapid and novel alternative to conventional sample treatment for arsenic speciation in rice using enzymatic ultrasonic probe. *Anal. Chim. Acta* **535**, 227–235 (2005).
283. Han, C., Cao, X., Yu, J. J., Wang, X. R. & Shen, Y. Arsenic speciation in sargassum fusiforme by microwave-assisted extraction and LC-ICP-MS. *Chromatographia* **69**, 587–591 (2009).
284. Morton, J. & Leese, E. Arsenic speciation in clinical samples: Urine analysis using fast micro-liquid chromatography ICP-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **399**, 1781–1788 (2011).
285. Leese, E., Morton, J., Tan, E., Gardiner, P. H. E. & Carolan, V. A. μ LC-ICP-MS determinations of unexposed UK urinary arsenic speciation reference values. *J. Anal. Toxicol.* **38**, 24–30 (2014).
286. Moreda-Piñeiro, J., Herbello-Hermelo, P., Moreda-Piñeiro, A. & Bermejo-Barrera, P. *Determination of arsenic species in urine samples of subjects not exposed to dietary arsenic by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. Atomic Spectroscopy* vol. 36 <https://www.researchgate.net/publication/297840181>.
287. Carioni, V. M. O., McElroy, J. A., Guthrie, J. M., Ngwenyama, R. A. & Brockman, J. D. Fast and reliable method for As speciation in urine samples containing low levels of As by LC-ICP-MS: Focus on epidemiological studies. *Talanta* **165**, 76–83 (2017).
288. Wang, D. *et al.* Total arsenic and speciation analysis of saliva and urine samples from individuals living in a chronic arsenicosis area in China. *Environ. Health Prev. Med.* **22**, (2017).
289. Lintschinger, J., Schramel, P., Hatalak-Rauscher, A., Wendler, I. & Michalke, B. A new method for the analysis of arsenic species in urine by using HPLC-ICP-MS. *Fresenius J Anal Chem* **362**, 313–318 (1998).

290. Quarles, C. D., Sullivan, P., Field, M. P., Smith, S. & Wiederin, D. R. Use of an inline dilution method to eliminate species interconversion for LC-ICP-MS based applications: Focus on arsenic in urine. *J. Anal. At. Spectrom.* **33**, 745–751 (2018).
291. Pell, A. *et al.* LC-ICP-MS analysis of arsenic compounds in dominant seaweeds from the Thermaikos Gulf (Northern Aegean Sea, Greece). *Chemosphere* **93**, 2187–2194 (2013).
292. Zmozinski, A. V., Llorente-Mirandes, T., López-Sánchez, J. F. & Da Silva, M. M. Establishment of a method for determination of arsenic species in seafood by LC-ICP-MS. *Food Chem.* **173**, 1073–1082 (2015).
293. Tang, F. *et al.* Arsenic Speciation in Honeysuckle (*Lonicera japonica* Thunb.) from China. *Biol. Trace Elem. Res.* **168**, 269–275 (2015).
294. Ruiz-Chancho, M. J. *et al.* Arsenic speciation in plants growing in arsenic-contaminated sites. *Chemosphere* **71**, 1522–1530 (2008).
295. Schmidt, L. *et al.* A feasible method for As speciation in several types of seafood by LC-ICP-MS/MS. *Food Chem.* **255**, 340–347 (2018).
296. Matsumoto-Tanibuchi, E., Sugimoto, T., Kawaguchi, T., Sakakibara, N. & Yamashita, M. Determination of inorganic arsenic in seaweed and seafood by LC-ICP-MS: Method validation. *J. AOAC Int.* **102**, 612–618 (2019).
297. Komorowicz, I. *et al.* Arsenic speciation in mushrooms using dimensional chromatography coupled to ICP-MS detector. *Chemosphere* **233**, 223–233 (2019).
298. Naruwaka, T., Raber, G., Itoh, N. & Inagaki, K. A New Candidate Reference Material for Inorganic Arsenic and Arsenosugars in Hijiki Seaweed: First Results from an Inter-laboratory Study. *Anal. Sci.* **36**, 233–239 (2020).
299. Lorenc, W., Kruszka, D., Kachlicki, P., Kozłowska, J. & Barańkiewicz, D. Arsenic species and their transformation pathways in marine plants. Usefulness of advanced hyphenated techniques HPLC/ICP-MS and UPLC/ESI-MS/MS in arsenic species analysis. *Talanta* **220**, (2020).

300. Moreira, C. M. *et al.* Arsenic speciation in white wine by LC-ICP-MS. *Food Chem.* **126**, 1406–1411 (2011).
301. D’Amato, M., Aureli, F., Ciardullo, S., Raggi, A. & Cubadda, F. Arsenic speciation in wheat and wheat products using ultrasound- and microwave-assisted extraction and anion exchange chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **26**, 207–213 (2011).
302. Batista, B. L., Nacano, L. R., De Souza, S. S. & Barbosa, F. Rapid sample preparation procedure for As speciation in food samples by LC-ICP-MS. *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* **29**, 780–788 (2012).
303. Ruiz-Chancho, M. J., Taleshi, M. S., Goessler, W. & Francesconi, K. A. A method for screening arsenolipids in fish oils by HPLC-ICPMS. *J. Anal. At. Spectrom.* **27**, 501–504 (2012).
304. Sele, V. *et al.* Arsenic-containing fatty acids and hydrocarbons in marine oils - Determination using reversed-phase HPLC-ICP-MS and HPLC-qTOF-MS. *Talanta* **121**, 89–96 (2014).
305. Pereira, É. R. *et al.* Arsenic containing medium and long chain fatty acids in marine fish oil identified as degradation products using reversed-phase HPLC-ICP-MS/ESI-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* **31**, 1836–1845 (2016).
306. da Rosa, F. C. *et al.* Arsenic speciation analysis in rice milk using LC-ICP-MS. *Food Chem. X* **2**, (2019).
307. Herath, I., Kumarathilaka, P., Bundschuh, J., Marchuk, A. & Rinklebe, J. A fast analytical protocol for simultaneous speciation of arsenic by Ultra-High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) hyphenated to Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) as a modern advancement in liquid chromatography approaches. *Talanta* **208**, (2020).
308. Matsumoto, E., Sugimoto, T., Kawaguchi, T., Sakakibara, N. & Yamashita, M. Determination of inorganic arsenic in fish oil and fish oil capsules by LC-ICP-MS. (2020) doi:10.1093/jaoacint/qsaa135/5918018.

309. Barnet, L. S., Pozebon, D., Dressler, V. L. & Cioato, D. Method validation for As speciation in rice using LC-ICP-MS and the inorganic arsenic limit for Brazilian rice. *J. Food Compos. Anal.* **99**, (2021).
310. Hong, S., Choi, S. D. & Khim, J. S. Arsenic speciation in environmental multimedia samples from the Youngsan River Estuary, Korea: A comparison between freshwater and saltwater. *Environ. Pollut.* **237**, 842–850 (2018).
311. Lajin, B. & Goessler, W. Fluoroalkylamines: Novel, Highly Volatile, Fast-Equilibrating, and Electrospray Ionization-Mass Spectrometry Signal-Enhancing Cationic Ion-Interaction Reagents. *Anal. Chem.* **92**, 10121–10128 (2020).
312. Amin, M. H. Al *et al.* Estimation of daily intake of arsenolipids in Japan based on a market basket survey. *Food Chem. Toxicol.* **118**, 245–251 (2018).
313. Shi, Q. *et al.* Pharmacokinetic properties of arsenic species after intravenous and intragastrical administration of arsenic trioxide solution in cynomolgus macaques using HPLC-ICP-MS. *Molecules* **24**, (2019).
314. Nogueira, R., Melo, E. A., Figueiredo, J. L. C., Santos, J. J. & Do Nascimento Neto, A. P. Arsenic speciation in fish and rice by HPLC-ICP-MS using salt gradient elution. *J. Braz. Chem. Soc.* **29**, 1593–1600 (2018).
315. Grotti, M., Terol, A. & Todolí, J. L. Speciation analysis by small-bore HPLC coupled to ICP-MS. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* vol. 61 92–106 (2014).
316. Schmidt, L. *et al.* Arsenic speciation in seafood by LC-ICP-MS/MS: Method development and influence of culinary treatment. *J. Anal. At. Spectrom.* **32**, 1490–1499 (2017).
317. Gupta, V. K. *et al.* Arsenic speciation analysis and remediation techniques in drinking water. *Desalination and Water Treatment* vol. 40 231–243 (2012).
318. Lee, S. H., Yang, S. J., Lee, Y. & Nam, S. H. Feasibility of quantitative inorganic arsenic speciation at the parts-per-trillion level using solid phase extraction and femtosecond laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. Sci. Technol.* **12**, (2021).

319. McCalley, D. V. A study of column equilibration time in hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A* **1554**, 61–70 (2018).
320. B'Hymer, C. & Caruso, J. A. Arsenic and its speciation analysis using high-performance liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* vol. 1045 1–13 (2004).
321. Ma, J., Shu, H., Yang, B., Byrne, R. H. & Yuan, D. Spectrophotometric determination of pH and carbonate ion concentrations in seawater: Choices, constraints and consequences. *Anal. Chim. Acta* **1081**, 18–31 (2019).
322. Paré, J. R. J. *B61anger (Editors) Instrumental Methods in Food Analysis*.
323. Linge. *Back to Basics Review Quadrupole ICP-MS: Introduction to Instrumentation, Measurement Techniques and Analytical Capabilities*. (2009).
324. Theory, Design, and Operation of a Dynamic Reaction Cell for ICP-MS. *At. Spectrosc.* **20**, 45–53 (1999).
325. Giesmann, U. & Greb, U. *High resolution I C P-M S-a new concept for elemental mass spectrometry. Fresenius J Anal Chem* vol. 350 (1994).
326. Yamada, N. Kinetic energy discrimination in collision/reaction cell ICP-MS: Theoretical review of principles and limitations. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy* vol. 110 31–44 (2015).
327. Weerasundara, L., Ok, Y. S. & Bundschuh, J. Selective removal of arsenic in water: A critical review. *Environmental Pollution* vol. 268 (2021).
328. Formenton, G. *et al.* PM10-bound arsenic emissions from the artistic glass industry in Murano (Venice, Italy) before and after the enforcement of REACH authorisation. *J. Hazard. Mater.* **406**, (2021).
329. Chen, B. *et al.* Arsenic speciation in hair and nails of acute promyelocytic leukemia (APL) patients undergoing arsenic trioxide treatment. *Talanta* **184**, 446–451 (2018).
330. Todorov, T. I., Ejniak, J. W., Mullick, F. G. & Centeno, J. A. Arsenic speciation in urine and blood reference materials. *Microchim. Acta* **151**, 263–268 (2005).

331. Saengow, U., Vijitpongjinda, S., Yimthiang, S., Wattanapisit, A. & Thaicharoen, S. Urinary arsenic concentration among residents of an arsenic-endemic area in southern Thailand and its related factors: Three decades after mitigation attempts. *Groundw. Sustain. Dev.* **16**, (2022).
332. Hall, M. *et al.* Blood arsenic as a biomarker of arsenic exposure: Results from a prospective study. *Toxicology* **225**, 225–233 (2006).
333. Takayama, Y. *et al.* Associations between blood arsenic and urinary arsenic species concentrations as an exposure characterization tool. *Sci. Total Environ.* **750**, (2021).
334. Simpson, L. A., Thomsen, M., Alloway, B. J. & Parker, A. A dynamic reaction cell (DRC) solution to oxide-based interferences in inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) analysis of the noble metals. *J. Anal. At. Spectrom.* **16**, 1375–1380 (2001).
335. Wilschefski, S. C. & Baxter, M. R. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Introduction to Analytical Aspects. *Clin. Biochem. Rev.* **40**, 115–133 (2019).
336. Todolí, J. L. & Mermet, J. M. Sample introduction systems for the analysis of liquid microsamples by ICP-AES and ICP-MS. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy* vol. 61 239–283 (2006).
337. Thomas, R. Dynamic reaction cell ICPMS for Trace Metal Analysis of Semiconductor Materials. *Anal. Chem.* **422**, 1–7 (2003).
338. Nowell, G. M., Pearson, D. G., Ottley, C. J., Schwieters, J. & Dowall, D. Long-term performance characteristics of a plasma ionisation multi-collector mass spectrometer (PIMMS): The thermofinnigan neptune. in 307–320 (2007). doi:10.1039/9781847551689-00307.
339. D’Ilio, S., Violante, N., Majorani, C. & Petrucci, F. Dynamic reaction cell ICP-MS for determination of total As, Cr, Se and V in complex matrices: Still a challenge? A review. *Analytica Chimica Acta* vol. 698 6–13 (2011).

340. Tanner, S. D., Baranov, V. I. & Bandura, D. R. *Reaction cells and collision cells for ICP-MS: a tutorial review. Spectrochimica Acta Part B* vol. 57 (2002).
341. Determination of Total Arsenic Concentration in Clinical Samples for Epidemiological Studies Using ICP-MS. *At. Spectrosc.* **23**, 170–175 (2002).
342. Vanhaecke, F., Vanhoe, H., Dams, R. & Vandecasteele, C. *THE USE OF INTERNAL STANDARDS IN ICP-MS. Talanta* vol. 39 (1992).
343. Bolea-Fernandez, E., Rúa-Ibarz, A., Resano, M. & Vanhaecke, F. To shift, or not to shift: Adequate selection of an internal standard in mass-shift approaches using tandem ICP-mass spectrometry (ICP-MS/MS). *J. Anal. At. Spectrom.* **36**, 1135–1149 (2021).
344. Finley-Jones, H. J. & Holcombe, J. A. Evaluation of internal standard predictions across instrumental platforms in inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **24**, 837–841 (2009).
345. Navarro Serrano, I., Llorente Ballesteros, M. T., Sánchez Fernández Pacheco, S., Izquierdo Álvarez, S. & López Colón, J. L. Total and speciated urinary arsenic levels in the Spanish population. *Sci. Total Environ.* **571**, 164–171 (2016).
346. *ARSENIC AND SOLUBLE COMPOUNDS AS As (ARSENIC CAS NO: 7440-38-2) Biological Exposure Index (BEI) review CONTENTS.* (2020).
347. Book, G. *IUPAC Gold Book.*
348. Long, G. L. & Winefordner, J. D. Limit of Detection: A Closer Look at the IUPAC Definition. *Anal. Chem.* **55**, 712A-724A (1983).
349. Allegrini, F. & Olivieri, A. C. IUPAC-consistent approach to the limit of detection in partial least-squares calibration. *Anal. Chem.* **86**, 7858–7866 (2014).
350. Rodríguez, P. F., Martín-Aranda, R. M., López Colón, J. L. & de Mendoza, J. H. Ammonium acetate as a novel buffer for highly selective robust urinary HPLC-ICP-MS arsenic speciation methodology. *Talanta* **221**, 121494–121502 (2021).
351. Scheer, J. *et al.* Arsenic species and selected metals in human urine: Validation of HPLC/ICPMS and ICPMS procedures for a long-term population-based epidemiological study. *Anal. Methods* **4**, 406–413 (2012).

352. Jones, D. R. *et al.* Development and validation of a biomonitoring method to measure As, Cr, and Ni in human urine samples by ICP-UCT-MS. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **234**, (2021).
353. Schmied, A., Murawski, A., Kolossa-Gehring, M. & Kujath, P. Determination of trace elements in urine by inductively coupled plasma-tandem mass spectrometry – Biomonitoring of adults in the German capital region. *Chemosphere* **285**, (2021).
354. Goullé, J. P. *et al.* Metal and metalloid multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair: Reference values. in *Forensic Science International* vol. 153 39–44 (2005).
355. Caldwell, K. L. *et al.* Levels of urinary total and speciated arsenic in the US population: National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2004. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* **19**, 59–68 (2009).
356. Heitland, P. *et al.* Application of ICP-MS and HPLC-ICP-MS for diagnosis and therapy of a severe intoxication with hexavalent chromium and inorganic arsenic. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **41**, 36–40 (2017).
357. Quarles, C. D. *et al.* Analytical method for total chromium and nickel in urine using an inductively coupled plasma-universal cell technology-mass spectrometer (ICP-UCT-MS) in kinetic energy discrimination (KED) mode. *J. Anal. At. Spectrom.* **29**, 297–303 (2014).
358. Hou, H. *et al.* Arsenic Species Analysis at Trace Level by High Performance Liquid Chromatography with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Int. J. Anal. Chem.* **2019**, (2019).
359. Button, M., Koch, I., Watts, M. J. & Reimer, K. J. Arsenic speciation in the bracket fungus *Fomitopsis betulina* from contaminated and pristine sites. *Environ. Geochem. Health* **42**, 2723–2732 (2020).
360. Hwang, I. M. *et al.* Determination of Toxic Elements and Arsenic Species in Salted Foods and Sea Salt by ICP-MS and HPLC-ICP-MS. *ACS Omega* **6**, 19427–19434 (2021).

361. Shittu, A., Esfandi, R. & Tsopmo, A. Chromium and arsenic speciation analysis in meats by HPLC-ICP-MS in the presence of hydrolyzed oat proteins with radical scavenging activities. *Heliyon* **6**, (2020).
362. Pang, Y. *et al.* High Performance Liquid Chromatography-Determination of Different Speciations of Arsenic in Cosmetics by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. in *Journal of Physics: Conference Series* vol. 1881 (IOP Publishing Ltd, 2021).
363. Tanabe, C. K. *et al.* Matrix Extension and Multilaboratory Validation of Arsenic Speciation Method EAM §4.10 to Include Wine. *J. Agric. Food Chem.* **65**, 4193–4199 (2017).
364. Lindemann. Stability studies of arsenic, selenium, antimony and tellurium species in water, urine, fish and soil extracts using HPLC/ICP-MS. *Fresenius J Anal Chem* **368**, 214–220 (2000).
365. Xie, R., Johnson, W., Spayd, S., Hall, G. S. & Buckley, B. Arsenic speciation analysis of human urine using ion exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **578**, 186–194 (2006).
366. Grau-Perez, M. *et al.* Arsenic exposure, diabetes-related genes and diabetes prevalence in a general population from Spain. *Environ. Pollut.* **235**, 948–955 (2018).
367. Hata, A. *et al.* HPLC-ICP-MS speciation analysis of arsenic in urine of Japanese subjects without occupational exposure. *J. Occup. Health* **49**, 217–223 (2007).
368. Lee, S. G. *et al.* Exposure Levels and Contributing Factors of Various Arsenic Species and Their Health Effects on Korean Adults. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **82**, 391–402 (2022).
369. Rivera-Núñez, Z., Meliker, J. R., Meeker, J. D., Slotnick, M. J. & Nriagu, J. O. Urinary arsenic species, toenail arsenic, and arsenic intake estimates in a Michigan population with low levels of arsenic in drinking water. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* **22**, 182–190 (2012).

370. Marín-Guirao, L., Lloret, J., Marín, A., García, G. & García Fernández, A. J. Pulse-discharges of mining wastes into a coastal lagoon: Water chemistry and toxicity. *Chem. Ecol.* **23**, 217–231 (2007).
371. García-Lorenzo, M. L., Pérez-Sirvent, C., Molina-Ruiz, J. & Martínez-Sánchez, M. J. Mobility indices for the assessment of metal contamination in soils affected by old mining activities. *J. Geochemical Explor.* **147**, 117–129 (2014).
372. Martínez-López, S., Martínez-Sánchez, M. J., Gómez-Martínez, M. del C. & Pérez-Sirvent, C. Assessment of the risk associated with mining-derived arsenic inputs in a lagoon system. *Environ. Geochem. Health* **42**, 2439–2450 (2020).
373. Regalado, J. J. *et al.* Micropropagation of *Asparagus macrorrhizus*, a Spanish endemic species in extreme extinction risk. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* **132**, 573–578 (2018).
374. Muñoz-Vera, A., García, G. & García-Sánchez, A. Metal bioaccumulation pattern by *Cotylorhiza tuberculata* (Cnidaria, Scyphozoa) in the Mar Menor coastal lagoon (SE Spain). *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22**, 19157–19169 (2015).
375. Serrano, R. *et al.* The role of *Cymodocea nodosa* on the dynamics of trace elements in different marine environmental compartments at the Mar Menor Lagoon (Spain). *Mar. Pollut. Bull.* **141**, 52–60 (2019).
376. Romero, D., Barcala, E., María-Dolores, E. & Muñoz, P. European eels and heavy metals from the Mar Menor lagoon (SE Spain). *Mar. Pollut. Bull.* **158**, (2020).
377. Aylward, L. L., Ramasamy, S., Hays, S. M., Schoeny, R. & Kirman, C. R. Evaluation of urinary speciated arsenic in NHANES: Issues in interpretation in the context of potential inorganic arsenic exposure. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **69**, 49–54 (2014).
378. Shen, H. *et al.* Factors affecting arsenic methylation in arsenic-exposed humans: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Environmental Research and Public Health* vol. 13 (2016).

379. Torres-Sánchez, L. *et al.* Sex differences in the reduction of arsenic methylation capacity as a function of urinary total and inorganic arsenic in Mexican children. *Environ. Res.* **151**, 38–43 (2016).
380. Su, Z. *et al.* Arsenic, tobacco use, and lung cancer: An occupational cohort with 27 follow-up years. *Environ. Res.* **206**, (2022).
381. Gamboa-Loira, B., Cebrián, M. E. & López-Carrillo, L. Physical activity, body mass index and arsenic metabolism among Mexican women. *Environ. Res.* **195**, (2021).
382. Montero, M. D. P., Mora-Urda, A. I., Anzid, K., Cherkaoui, M. & Marrodan, M. D. Diet quality of Moroccan adolescents living in Morocco and in Spain. *J. Biosoc. Sci.* **49**, 173–186 (2017).
383. Khalis, M. *et al.* Update of the Moroccan food composition tables: Towards a more reliable tool for nutrition research. *J. Food Compos. Anal.* **87**, (2020).
384. *World Food and Agriculture - Statistical Yearbook 2020. World Food and Agriculture - Statistical Yearbook 2020* (FAO, 2020). doi:10.4060/cb1329en.
385. España, G. de. *Informe del consumo alimentario en España 2018*. (2018).
386. Recio-Vega, R. *et al.* Association between polymorphisms in arsenic metabolism genes and urinary arsenic methylation profiles in girls and boys chronically exposed to arsenic. *Environ. Mol. Mutagen.* **57**, 516–525 (2016).
387. Lindberg, A. L. *et al.* Gender and age differences in the metabolism of inorganic arsenic in a highly exposed population in Bangladesh. *Environ. Res.* **106**, 110–120 (2008).
388. Fischer, L. M. *et al.* Sex and menopausal status influence human dietary requirements for the nutrient choline 1-3. *Am J Clin Nutr* vol. 85 <https://academic.oup.com/ajcn/article/85/5/1275/4632979> (2007).
389. Cohen, E., Margalit, I., Shochat, T., Goldberg, E. & Krause, I. Gender differences in homocysteine concentrations, a population-based cross-sectional study. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **29**, 9–14 (2019).

390. Munshi, M. N., Stone, A., Fink, L. & Fonseca, V. *Hyperhomocysteinemia Following a Methionine Load in Patients With Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus and Macrovascular Disease. Metabolism* vol. 45 (1996).
391. Antonelli, R., Shao, K., Thomas, D. J., Sams, R. & Cowden, J. AS3MT, GSTO, and PNP polymorphisms: Impact on arsenic methylation and implications for disease susceptibility. *Environmental Research* vol. 132 156–167 (2014).
392. Olmos, V., Astolfo, M. A., Sassone, A. H. & Villaamil Lepori, E. C. The level of exposure affects the arsenic urinary methylation profile of a population of children. *J. Hazard. Mater.* **415**, (2021).
393. Huang, Y. K. *et al.* Arsenic exposure, urinary arsenic speciation, and the incidence of urothelial carcinoma: A twelve-year follow-up study. *Cancer Causes Control* **19**, 829–839 (2008).
394. Bustaffa, E., Gorini, F., Bianchi, F. & Minichilli, F. Factors affecting arsenic methylation in contaminated Italian areas. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **17**, 1–21 (2020).
395. Zhang, Q. *et al.* Joint effects of urinary arsenic methylation capacity with potential modifiers on arsenicosis: A cross-sectional study from an endemic arsenism area in Huhhot Basin, northern China. *Environ. Res.* **132**, 281–289 (2014).
396. Zhang, Z., Deng, C., Lu, Q. & Richardson, B. *Age-dependent DNA methylation changes in the ITGAL (CD11a) promoter. Mechanisms of Ageing and Development* vol. 123 www.elsevier.com/locate/mechagedev (2002).
397. Cui, D. & Xu, X. Dna methyltransferases, dna methylation, and age-associated cognitive function. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 19 (2018).
398. Luo, J., Mills, K., le Cessie, S., Noordam, R. & van Heemst, D. Ageing, age-related diseases and oxidative stress: What to do next? *Ageing Research Reviews* vol. 57 (2020).
399. Yin, L. & Kufe, D. MUC1-C oncoprotein blocks terminal differentiation of chronic myelogenous leukemia cells by a ROS-mediated mechanism. *Genes and Cancer* **2**, 56–64 (2011).

400. Srinivas, U. S., Tan, B. W. Q., Vellayappan, B. A. & Jeyasekharan, A. D. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biology* vol. 25 (2019).
401. Yang, D. *et al.* DNA methylation: A new regulator of phenolic acids biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza*. *Ind. Crops Prod.* **124**, 402–411 (2018).
402. Michalak, E. M., Burr, M. L., Bannister, A. J. & Dawson, M. A. The roles of DNA, RNA and histone methylation in ageing and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 20 573–589 (2019).
403. Siddiqui, M. H. *et al.* Melatonin and calcium function synergistically to promote the resilience through ROS metabolism under arsenic-induced stress. *J. Hazard. Mater.* **398**, (2020).
404. Marano, K. M. *et al.* Arsenic exposure and tobacco consumption: Biomarkers and risk assessment. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **64**, 225–232 (2012).
405. Li, Y., Wang, D., Li, X., Zheng, Q. & Sun, G. A potential synergy between incomplete arsenic methylation capacity and demographic characteristics on the risk of hypertension: Findings from a cross-sectional study in an arsenic-endemic area of inner Mongolia, China. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **12**, 3615–3632 (2015).
406. Zhang, X. *et al.* Serum folate levels and urinary arsenic methylation profiles in the US population: NHANES, 2003–2012. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* **29**, 323–334 (2019).
407. Thomas, C. E. *et al.* Urinary cotinine is as good a biomarker as serum cotinine for cigarette smoking exposure and lung cancer risk prediction. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **29**, 127–132 (2020).
408. Kim, S. Overview of cotinine cutoff values for smoking status classification. *International Journal of Environmental Research and Public Health* vol. 13 (2016).
409. Richter, P., Faroon, O. & Pappas, R. S. Cadmium and cadmium/zinc ratios and tobacco-related morbidities. *International Journal of Environmental Research and Public Health* vol. 14 (2017).

410. Ganguly, K., Levänen, B., Palmberg, L., Åkesson, A. & Lindén, A. Cadmium in tobacco smokers: A neglected link to lung disease? *European Respiratory Review* vol. 27 (2018).
411. Mérida-ortega, Á., López-carrillo, L., Rangel-moreno, K., Ramirez, N. & Rothenberg, S. J. Tobacco smoke exposure and urinary cadmium in women from Northern Mexico. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **18**, (2021).
412. Napierala, M. *et al.* The influence of tobacco smoke exposure on selected markers of oxidative stress, kidneys and liver function in the serum of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Pharmacol. Reports* **71**, 1293–1298 (2019).
413. Su, C. T. *et al.* The relationship between obesity, insulin and arsenic methylation capability in taiwan adolescents. *Sci. Total Environ.* **414**, 152–158 (2012).
414. Pace, C., Smith-Gagen, J. & Angermann, J. Arsenic methylation capacity and metabolic syndrome in the 2013–2014 U.S. National health and nutrition examination survey (NHANES). *Int. J. Environ. Res. Public Health* **15**, (2018).
415. Gomez-Rubio, P. *et al.* Association between body mass index and arsenic methylation efficiency in adult women from southwest U.S. and northwest Mexico. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **252**, 176–182 (2011).
416. Fu, Y. *et al.* Arsenic speciation and bioaccessibility in raw and cooked seafood: Influence of seafood species and gut microbiota. *Environ. Pollut.* **280**, (2021).
417. Polak-Juszczak, L. & Szlinder Richert, J. Arsenic speciation in fish from Baltic Sea close to chemical munitions dumpsites. *Chemosphere* **284**, (2021).
418. Wang, Z. *et al.* Arsenic Speciation of Edible Shrimp by High-Performance Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (HPLC-ICP-MS): Method Development and Health Assessment. *Anal. Lett.* **52**, 2266–2282 (2019).
419. Lin, C. *et al.* In vitro bio-accessibility and distribution characteristic of each arsenic species in different fishes and shellfishes/shrimps collected from Fujian of China. *J. Hazard. Mater.* **420**, (2021).

420. Luvonga, C., Rimmer, C. A., Yu, L. L. & Lee, S. B. Determination of total arsenic and hydrophilic arsenic species in seafood. *J. Food Compos. Anal.* **96**, (2021).
421. Sarwar, T., Khan, S., Muhammad, S. & Amin, S. Arsenic speciation, mechanisms, and factors affecting rice uptake and potential human health risk: A systematic review. *Environ. Technol. Innov.* **22**, (2021).
422. Carbonell-Barrachina, Á. A. *et al.* Inorganic arsenic contents in rice-based infant foods from Spain, UK, China and USA. *Environ. Pollut.* **163**, 77–83 (2012).
423. Domínguez-González, M. R., Barciela-Alonso, M. C., Calvo-Millán, V. G., Herbelo-Hermelo, P. & Bermejo-Barrera, P. The bioavailability of arsenic species in rice. *Anal. Bioanal. Chem.* **412**, 3253–3259 (2020).
424. Jahns, L. *et al.* Intake of seafood in the US varies by age, income, and education level but not by race-ethnicity. *Nutrients* **6**, 6060–6075 (2014).
425. Love, D. C. *et al.* Food sources and expenditures for seafood in the United States. *Nutrients* **12**, 1–11 (2020).
426. Lin, H., Chen, S., Shen, C. & Chu, C. *Arsenic Speciation in Fish on the Market.* *Journal of Food and Drug Analysis* vol. 16 (2008).
427. Raber, G. *et al.* An improved HPLC-ICPMS method for determining inorganic arsenic in food: Application to rice, wheat and tuna fish. *Food Chem.* **134**, 524–532 (2012).
428. Biancarosa, I. *et al.* Replacing fish meal with insect meal in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*) does not impact the amount of contaminants in the feed and it lowers accumulation of arsenic in the fillet. *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* **36**, 1191–1205 (2019).
429. Zhang, W., Wang, W. X. & Zhang, L. Comparison of Bioavailability and Biotransformation of Inorganic and Organic Arsenic to Two Marine Fish. *Environ. Sci. Technol.* **50**, 2413–2423 (2016).

Anexo I.-Lista de figuras

Figura 1. Equilibrios de disociación de ácido arsenioso	27
Figura 2. Equilibrios de disociación del ácido arsénico	27
Figura 3. Especies monometiladas de arsénico más relevantes.	28
Figura 4. Especies dimetiladas de arsénico más relevantes	29
Figura 5. Estructura química del TMAO.....	30
Figura 6. Clasificación de las principales familias de arsenoazúcares.....	31
Figura 7. Clasificación de las principales familias de arsenolípidos(AsLip).....	32
Figura 8. Estructura química de la arsenobetaína y la arsenocolina.....	33
Figura 9. Estructuras químicas del ácido arsanílico y sus derivados, tioarsenicales y otros metabolitos secundarios.....	34
Figura 10. Diagrama de Purboix del arsénico. ⁷⁶	39
Figura 11. Esquema básico del ciclo biogeoquímico	44
Figura 12. Estructura química del arsenoplatin deducida a partir de difracción de rayos X.....	48
Figura 13. Ruta metabólica del arsénico explicado mediante el mecanismo de Challenger ^{143,144,147}	52
Figura 14. Ruta metabólica del arsénico explicado mediante el mecanismo de Hayawaka ^{152,153}	54
Figura 15. Esquema básico de un HPLC.....	70
Figura 16. Esquema básico de un ICP/MS ³²⁴	71
Figura 17. Órbita de estabilidad de un ion en un cuadrupolo ³²⁵	73
Figura 18. Esquema de calibración del método de arsénico total por ICP/MS.....	82
Figura 19. Esquema de preparación de las disoluciones intermedias para el método de especiación de arsénico	83
Figura 20. Preparación del patrón interno para arsénico total.....	85
Figura 21. Preparación del patrón interno para arsénico especiado	85
Figura 22. Flujo de trabajo para el mantenimiento preventivo del equipo. ϕ_{neb} =flujo de nebulización.....	89
Figura 23. Nomenclatura, abreviatura, estructura química y constantes de acidez (pKa) de las principales especies de arsénico	94
Figura 24. Formas resonantes del fostato y acetato como medio de estimar la estabilidad de ambos aniones.	95

Figura 25. El efecto inductivo aumenta la basicidad de los aniones arsenicales	100
Figura 26. Estabilidad por resonancia de los aniones existentes en el sistema cromatográfico.....	101
Figura 27. Cromatograma típico de 100 µg/l para cada especie con la fase móvil de fosfato amónico	104
Figura 28. Cromatograma de una disolución de 100 µg/l de Na para medir el frente cromatográfico.....	108
Figura 29. Tiempo de retención de las seis especies analizadas	109
Figura 30. Curva de calibración de arsénico total para los patrones internos estudiados	111
Figura 31. Residuales estandarizados para cada calibración interna con los cinco candidatos a patrón interno. A) ⁸⁹ Y; B) ¹⁸⁶ Re; C) ¹⁰⁸ Rh; D) ⁷³ Ge; E) ²⁰⁸ Bi	114
Figura 32. Esquema superpuesto de los puntos del calibrado.....	120
Figura 33. Extracto del esquema superpuesto de la calibración aplicado sobre las cuatro especies de menor rango de calibración	120
Figura 34. Residuales obtenidos para: a)As ^{III} , b)DMA ^V , c)MMA ^V , d)As ^V , e)AC, f)AB	122
Figura 35. Comparación de un blanco de orina y una orina dopada con 100 µg/l de cloruro.....	125
Figura 36. Coeficientes de correlación de Pearson y P-value (Sig.[bilateral]) para cada biomarcador.....	131
Figura 37. Gráficos de correlación entre el arsénico total especiado (TSAs) y cada especie por separado. A) Arsenobetaína; B) Ácido dimetilarsínico (V); C) Ácido monometilarsínico (V); D) Arsénico inorgánico.....	132
Figura 38. Gráficos de correlación entre DMA ^V y AB.	132
Figura 39. Comparación entre las concentraciones de AB con las de arsénico total especiado (TSAs). A) España; B) Marruecos y “Otros países”	134
Figura 40. Comparación entre las concentraciones de DMA ^V con las de arsénico total especiado (TSAs). A) España; B) Marruecos y “Otros países”	135
Figura 41. Comparación entre las concentraciones de MMA ^V con las de arsénico total especiado (TSAs) para: A) España; B) Marruecos y Otros.....	136
Figura 42. Variación en los índices de metilación primario (PMI) y secundario (SMI) con el peso	143
Figura 43. Correlaciones encontradas para el consumo de pescado	145

Figura 44. Correlaciones encontradas para el consumo de arroz	146
Figura 45. Concentración de AB frente al consumo de pescado para cada país	147
Figura 46. Concentración de MMAV frente al consumo de pescado para cada país..	147
Figura 47. Concentración de DMAV frente al consumo de pescado para cada país ..	148
Figura 48. Concentración de AB frente al consumo de arroz para cada país.....	148
Figura 49. Concentración de DMA ^V frente al consumo de pescado para cada país ...	149
Figura 50. Concentración de MMA ^V frente al consumo de pescado para cada país...	149
Figura 51. Cromatograma de la muestra 70005161	151
Figura 52. Cromatograma de la muestra 70009155	152
Figura 53. Hábitos alimenticios en Estados Unidos.....	177
Figura 54. Comparación del consumo de alimentos ricos en proteína animal en Estados Unidos.....	177

Anexo II.-Lista de tablas

Tabla 1. Principales familias de compuestos inorgánicos de arsénico	28
Tabla 2. Valores de LD ₅₀ de algunos compuestos arsenicales ⁴⁵ . N/D significa no detectada.	57
Tabla 3. Principal sintomatología derivada de la exposición al arsénico en diversas zonas del organismo.	60
Tabla 4. Antecedentes de la especiación de arsénico en el s.XX	64
Tabla 5. Aplicaciones principales de HPLC-ICP/MS a lo largo del s.XXI.....	65
Tabla 6. Parámetros cromatográficos más relevantes.....	70
Tabla 7. Esquema de preparación de la calibración de especiación de arsénico	84
Tabla 8. Criterios de aceptación del Daily Performance Check.....	87
Tabla 9. Parámetros operacionales del ICP/MS ELAN DRC 6100 para la señal de ⁷⁵ As.	90
Tabla 10. Potencial de ionización y masa isotópica del arsénico y los patrones internos.	91
Tabla 11. Condiciones instrumentales de la metodología de arsénico total por ICP/MS.	92
Tabla 12. Tiempos de retención para las seis especies empleadas en función del pH con la fase móvil de 5 mM.	96
Tabla 13. Tiempos de retención para las seis especies empleadas en función del pH con la fase móvil de 10 mM.	96
Tabla 14. Tiempos de retención para las seis especies empleadas en función del pH con la fase móvil de 20 mM.	97
Tabla 15. Distribución de cargas en función del pH	97

Tabla 16. Parámetros cromatográficos del método de especiación de arsénico con fosfato amónico	103
Tabla 17. Diseño experimental con pH y concentración de fase móvil (mM) realizado	105
Tabla 18. Distribución de cargas en función del pH	105
Tabla 19. Tiempos de retención obtenidos para AcONH ₄ 5 mM en función del pH. ND=no detectado.....	105
Tabla 20. Tiempos de retención obtenidos para AcONH ₄ 10 mM en función del pH. ND=no detectado.....	105
Tabla 21. Tiempos de retención obtenidos para AcONH ₄ 20 mM en función del pH. ND=no detectado.....	106
Tabla 22. Tiempos de retención obtenidos para AcONH ₄ 40 mM en función del pH. ND=no detectado.....	106
Tabla 23. Esquema del gradiente cromatográfico utilizado para la especiación de arsénico.....	108
Tabla 24. Parámetros cromatográficos del método de especiación de arsénico con acetato amónico	109
Tabla 25. Condiciones instrumentales de la metodología de especiación de arsénico	110
Tabla 26. Valor medio del coeficiente de correlación (r^2), pendiente del calibrado (m), la concentración media para cada nivel y el residual estandarizado asociado para las curvas de calibración (n=6) con Y como patrón interno	111
Tabla 27. Valor medio del coeficiente de correlación (r^2), pendiente del calibrado (m), la concentración media para cada nivel y el residual estandarizado asociado para las curvas de calibración (n=6) con Rh como patrón interno.	112
Tabla 28. Valor medio del coeficiente de correlación (r^2), pendiente del calibrado (m), la concentración media para cada nivel y el residual estandarizado asociado para las curvas de calibración (n=6) con Re como patrón interno.....	112
Tabla 29. Valor medio del coeficiente de correlación (r^2), pendiente del calibrado (m), la concentración media para cada nivel y el residual estandarizado asociado para las curvas de calibración (n=6) con Ge como patrón interno	112
Tabla 30. Valor medio del coeficiente de correlación (r^2), pendiente del calibrado (m), la concentración media para cada nivel y el residual estandarizado asociado para las curvas de calibración (n=6) con Bi como patrón interno	112

Tabla 31. Evaluación de la linealidad desde 0 hasta 500 µg/l mediante un test F de comparación entre el valor medio (\bar{X}) de la concentración obtenida para cada nivel, y la teórica	115
Tabla 32. Precisión y exactitud para los controles internos medidos con Y como patrón interno	116
Tabla 33. Precisión y exactitud para los controles internos medidos con Rh como patrón interno.....	116
Tabla 34. Precisión y exactitud para los controles internos medidos con Re como patrón interno	116
Tabla 35. Precisión y exactitud para los controles internos medidos con Ge como patrón interno	116
Tabla 36. Precisión y exactitud para los controles internos medidos con Bi como patrón interno	117
Tabla 37. Estadísticos de media, desviación estándar, test T y test F para la concentración de arsénico obtenida para un blanco de orina y una orina dopada con 100 mg/l de cloruros	118
Tabla 38. Valor medio del coeficiente de correlación (r^2), pendiente del calibrado (m), la concentración media para cada nivel y el residual estandarizado asociado para las curvas de calibración (n=6)	121
Tabla 39. Valor medio del coeficiente de correlación (r^2), pendiente del calibrado (m), la concentración media para cada nivel y el residual estandarizado asociado para las curvas de calibración (n=6)	121
Tabla 40. Valor medio del coeficiente de correlación (r^2), pendiente del calibrado (m), la concentración media para cada nivel y el residual estandarizado asociado para las curvas de calibración (n=6)	121
Tabla 41. Valor medio del coeficiente de correlación (r^2), pendiente del calibrado (m), la concentración media para cada nivel y el residual estandarizado asociado para las curvas de calibración (n=6)	121
Tabla 42. Valor medio del coeficiente de correlación (r^2), pendiente del calibrado (m), la concentración media para cada nivel y el residual estandarizado asociado para las curvas de calibración (n=6)	121
Tabla 43. Valor medio del coeficiente de correlación (r^2), pendiente del calibrado (m), la concentración media para cada nivel y el residual estandarizado asociado para las curvas de calibración (n=6)	122

Tabla 44. Áreas de pico para el patrón interno (IS) y las seis especies.....	123
Tabla 45. Coeficientes de variación de las áreas de pico patrón interno (IS) y los seis analitos.....	123
Tabla 46. Evaluación de la linealidad para las especies AC y AB.....	124
Tabla 47. Evaluación de la linealidad para las especies As ^{III} y As ^V	124
Tabla 48. Evaluación de la linealidad para las especies DMA ^V y MMA ^V	124
Tabla 49. Estadísticos de precisión y exactitud medidos como CV(%) y veracidad(%). Adicionalmente se utilizó la z-score como una segunda magnitud de exactitud	125
Tabla 50. Estadísticos de precisión y exactitud medidos como CV(%) y veracidad(%)	125
Tabla 51. Límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) para cada especie de arsénico medida	126
Tabla 52. Variables y biomarcadores empleadas en el estudio	128
Tabla 53. Media geométrica (GM), media aritmética (AM), mediana, percentil 95% y valores por debajo del LOD del arsénico total especiado (TSAs), el contenido de arsénico total (TAs) y de cada una de las especies.....	130
Tabla 54. Biomarcadores medidos en función del país de nacimiento de los participantes.....	133
Tabla 55. Biomarcadores en función del género y la edad de los participantes.....	137
Tabla 56. Influencia del tipo de país en los biomarcadores seleccionados	139
Tabla 57. Biomarcadores de arsénico e indicadores específicos del consumo de tabaco	141
Tabla 58. Influencia del IMC en la excreción de las distintas especies de arsénico ...	142
Tabla 59. Influencia del consumo de pescado y de arroz en los niveles de arsénico ..	144
Tabla 60. Correlaciones encontradas para las tres especies implicadas para el consumo de pescado y arroz	150
Tabla 61. Comparación de los estadísticos de precisión y exactitud con la bibliografía	153
Tabla 62. Comparación de LOD y LOQ con la bibliografía. NR significa no reportados	155
Tabla 63. Media aritmética (AM), media geométrica (GM), intervalo de confianza (IC), mediana y los datos para el percentil 95 para el arsénico total (TAs), la suma de especies (TSAs) y cada especie por separado expresados como µg/g creatinina.....	165
Tabla 64. Biomarcadores en función de la edad y el género	170

Tabla 65. Comparación de los biomarcadores de nuestro estudio y el del NHANES. 176