

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA**

GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



**“CONTROL DE LA TOXICIDAD EN ARROZ
DE PROCEDENCIA IRANÍ”**

TRABAJO FIN DE GRADO

Julio 2014

Autor: Marina Cano Lamadrid

Tutor: Francisco Burló Carbonell

RESUMEN

Es bien conocido que la exposición al arsénico, sobre todo el inorgánico (As-i), tiene efectos adversos sobre el ser humano. Hoy en día la Unión Europea (UE) no tiene regulado el límite de la concentración de arsénico en arroz y en productos a base de este cereal para poder ser comercializados. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) está en proceso de recopilación de datos de concentraciones de diferentes zonas y productos no sólo de países pertenecientes a la UE, sino del resto del mundo para establecer el límite. Por ello, es útil conocer la concentración media de arsénico de un país productor de arroz como es Irán.

ABSTRACT

It is well known that arsenic exposure, particularly inorganic species (i-As), has adverse effects on humans. Nowadays, the European Union (EU) has not still regulated the maximum residue content of arsenic in commercial samples of rice and rice-based products. The European Food Safety Authority (EFSA) is collecting data from different rice-producing regions and concentrations of products not only from EU countries but also from other parts of the world to finally set up this maximum threshold. Because of this, it is useful to know the average arsenic concentration of the rice from rice-producing countries, such as Iran.

Palabras clave: arsénico, *Oryza sativa*, especiación, Irán, elementos traza.

Keywords: arsenic, *Oryza sativa*, speciation, speciation, trace elements.

1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. ARSÉNICO	9
1.1.1. Arsénico inorgánico (As-i).....	9
1.1.2. Arsénico orgánico (As-o)	10
1.1.3. Fuentes de contaminación por arsénico.....	11
1.1.4. Metabolismo y toxicidad del arsénico.....	12
1.1.5. Arsénico en alimentos.....	14
1.1.6. Arsénico en arroz.....	15
1.1.7. Arsénico en productos a partir de arroz.....	17
1.1.8. Límites de ingesta. Legislación.....	18
1.2. ARROZ	20
1.2.1. Procesado del arroz.....	20
1.2.2. Producción y consumo del arroz.....	22
1.2.3. Arroz en la República Islámica de Irán.....	24
2. OBJETIVOS	25
3. MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL	29
3.2. ARSÉNICO TOTAL	29
3.2.1. MATERIALES	29
3.2.1.1. Equipos	29
3.2.1.2. Material	31
3.2.1.3. Reactivos	32
3.2.1.4. Limpieza	33
3.2.1.5. Recomendaciones generales	33
3.2.2. MUESTRAS	34
3.2.2.1. Material de referencia	34
3.2.2.2. Muestras de arroz de Irán	34
3.2.2.3. Preparación de la muestra	37

3.2.2.4.	MÉTODO ANALÍTICO	37
3.2.2.5.	Determinación de arsénico total	37
3.2.2.6.	Mineralización	38
3.2.2.6.1.	Medición de arsénico total por espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros	
3.2.2.6.2.	Tratamiento estadístico	
3.3.	ESPECIACIÓN ARSÉNICO	42
3.3.1.	MATERIALES	42
3.3.1.1.	Equipos	42
3.3.1.2.	Material	43
3.3.1.3.	Reactivos	44
3.3.1.4.	Limpieza	45
3.3.1.5.	Recomendaciones generales	46
3.3.2.	MUESTRAS	46
3.3.2.1.	Muestras de arroz de Irán	46
3.3.2.2.	Preparación de la muestra	46
3.3.3.	MÉTODO ANALÍTICO	47
3.3.3.1.	Determinación de especies de As [As (III), As (V), AMMA Y ADMA].	47
3.3.3.1.1.	Medición de especies de As [As (III), As (V), AMMA y ADMA] mediante HPLC-HG-AFS.	
3.3.3.1.2.	Tratamiento estadístico	
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
4.1.	ARSÉNICO TOTAL	52
4.1.1.	CONTENIDO DE ARSÉNICO TOTAL EN MUESTRA DE REFERENCIA	52
4.1.2.	ARSÉNICO TOTAL EN MUESTRAS DE ARROZ ANALIZADAS	53
4.1.2.1.	Calibración inicial para la determinación de Arsénico total en las muestras de arroz	53
4.1.2.2.	Resultados de Arsénico total en las muestras de arroz	55
4.2.	ESPECIACIÓN ARSÉNICO	60

4.2.1. ESPECIES ARSENICALES EN LAS MUESTRAS DE ARROZ ANALIZADAS	60
4.2.1.1. Calibración para la determinación de las especies arsenicales en las muestras de arroz	60
4.2.1.2. Resultados de las especies arsenicales en las muestras de arroz	63
4.3. COMPARACIÓN DE LOS DOS MÉTODOS	67
5. CONCLUSIONES	68
6. BIBLIOGRAFÍA	70



Número de citas bibliográficas: 45

Número Tablas: 23

Número de Figuras: 39

Número de Gráficos: 10

Tabla 1.....	Pag 9
Tabla 2.....	Pag 10
Tabla 3.....	Pag 11
Tabla 4.....	Pag 19
Tabla 5.....	Pag 23
Tabla 6.....	Pag 26
Tabla 7.....	Pag 27
Tabla 8.....	Pag 35
Tabla 9.....	Pag 40
Tabla 10-Tabla 11.....	Pag 49
Tabla 12.....	Pag 50
Tabla 13.....	Pag 53
Tabla 14.....	Pag 54
Tabla 15.....	Pag 55
Tabla 16.....	Pag 58
Tabla 17-Tabla 18.....	Pag 61
Tabla 19.....	Pag 62
Tabla 20.....	Pag 63
Tabla 21.....	Pag 64
Tabla 22.....	Pag 66
Tabla 23.....	Pag 67
Figura 1.....	Pag 13
Figura 2.....	Pag 15
Figura 3.....	Pag 21
Figura 4.....	Pag 24
Figura 5.....	Pag 25

Figura 6 –Figura 11.....	Pag 30
Figura 12.....	Pag 31
Figura 13.....	Pag 32
Figura 14-Figura 25.....	Pag 36
Figura 26-Figura 29.....	Pag 37
Figura 30.....	Pag 38
Figura 31.....	Pag 41
Figura 32-Figura 33.....	Pag 42
Figura 34.....	Pag 43
Figura 35-Figura 37.....	Pag 44
Figura 38.....	Pag 47
Figura 39.....	Pag 50
Gráfico 1.....	Pag 17
Gráfico 2.....	Pag 23
Gráfico 3.....	Pag 54
Gráfico 4-Gráfico 5.....	Pag 57
Gráfico 6.....	Pag 59
Gráfico 7.....	Pag 61
Gráfico 8-Gráfico 9.....	Pag 62
Gráfico 10.....	Pag 63

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ARSÉNICO

El arsénico es un elemento químico que se encuentra en el grupo V de la tabla periódica cuyo símbolo es As, tiene la capacidad de formar aleaciones con metales y enlazarse de forma covalente con el carbono, hidrógeno y oxígeno. Un elemento que se comporta de esta forma se denomina metaloide. Algunas propiedades del As se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Propiedades del As.

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

Según las condiciones del medio, en la naturaleza se pueden encontrar diversas formas arsenicales, por ello se clasifican entre compuestos orgánicos e inorgánicos, con propiedades diferentes y distintos niveles de toxicidad.

1.1.1 Arsénico inorgánico (As-i)

El arsénico inorgánico se puede encontrar de forma trivalente o pentavalente, estos últimos son menos tóxicos que los trivalentes debido a que

la afinidad con los grupo tiol (-SH) de las proteínas es menor (Kreppel *et al.* 1993).

Los compuestos más frecuentes de As-i trivalente son el trióxido de arsénico, arsenito de sodio y tricloruro de arsénico (**Tabla 2**).

En cuanto a la forma pentavalente se encuentra el pentóxido de arsénico, ácido arsénico y arseniatos de plomo y calcio (Goyer, 1986).

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

Tabla 2. Nomenclatura de diversos compuestos arsenicales pertenecientes al medio ambiente (W.H.O. 1981)

Arsénico inorgánico trivalente, As (III)	
NOMBRE	FÓRMULA
Óxido de arsénico (III)	As ₂ O ₃ ó As ₄ O ₆
Ácido arsenioso	H ₃ AsO ₃
Ácido metaarsenioso	HAsO ₂
Sales del ác. ortoarsenioso	H ₂ AsO ₃ ³⁻ , HAsO ₃ ²⁻
Cloruro de arsénico (III)	AsCl ₃
Sulfuro de arsénico (III)	As ₂ S ₃
Arsina	AsH ₃
Arsenito de cobre	Cu (AsO ₂) ₂

1.1.2 Arsénico orgánico (As-o)

Las formas orgánicas de As (presentadas en la **Tabla 3**) suelen estar presentes en la naturaleza en una concentración menor que las especies inorgánicas. El aumento de su concentración se debe a las reacciones de metilación debidas a la actividad de la enzima arsenito reductasa presentes en bacterias y algas.

El ácido dimetilarsínico (ADMA) y el ácido monometilarsónico (AMMA) son las formas de As-o dominantes, encontrándose en ambos casos de forma pentavalente (Hasegawa *et al.* 1999). Además se han encontrado otros compuestos orgánicos derivados del As en organismos marinos como son la arsenobetaina, arsenocolina, arsenolípidos y arsenoazúcares (WHO, 1981). De la misma forma se pueden encontrar especies trivalentes orgánicas como el ácido arsanílico o formas mezcladas como consecuencia de la biometilación por organismos del suelo, y el agua (Goyer, 1986).

Tabla 3. Nomenclatura de diversos compuestos arsenicales pertenecientes al medio ambiente (W.H.O. 1981).

Arsénico orgánico	
NOMBRE	FÓRMULA
Ácido monometilarsónico (AMMA)	$\text{CH}_3\text{AsO}(\text{OH})_2$
Ácido dimetilarsínico (ADMA)	$(\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH})$
Óxido de trimetilarsina	$(\text{CH}_3)_3\text{AsO}$
Metilarsina	CH_3AsH_2
Dimetilarsina	$(\text{CH}_3)_2\text{AsH}$
Trimetilarsina	$(\text{CH}_3)_3\text{As}$
Ácido arsanílico	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{AsO}(\text{OH})_2$
Arsenobetaina	$(\text{CH}_3)_3\text{AsCH}_2\text{COOH}$
Arsenocolina	$(\text{CH}_3)_3\text{As}+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
Dialquilcloroarsina	R_2AsCl

1.1.3 Fuentes de contaminación por arsénico

Los elementos químicos del grupo V de la tabla periódica son muy abundantes en la corteza terrestre, el As ocupa el tercer lugar de éstos (Catherine E. Housecreft, Alan G. Sharpe 2006), en forma de arseniatos, arsenitos y óxidos de arsénicos. Las fuentes de contaminación por As pueden deberse a procesos naturales (erupciones volcánicas, ciclo biológico de microorganismos, plantas, animales...) o bien a procesos derivados de la actividad humana (emisión residuos, uso de plaguicidas y fertilizantes).

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

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

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

1.1.4 Metabolismo y toxicidad del arsénico

Las principales vías de exposición al As para los seres vivos son el aire, agua, los alimentos y el suelo. La intoxicación por As en humanos se da principalmente a través de la ingesta de alimentos con elevada concentración de este metaloide.

La digestión y la absorción intestinal son procesos que vienen influenciados por diversos factores que determinan el paso de los elementos al torrente sanguíneo. La biodisponibilidad es la cantidad de arsénico susceptible al paso al torrente sanguíneo. La bioaccesibilidad hace referencia a la proporción de arsénico presente inicialmente en el alimento que es liberado en la fase acuosa dentro del tracto gastrointestinal.

Por tanto, la toxicidad del arsénico depende de su estado de oxidación y su solubilidad. El As-i tiene una mayor biodisponibilidad que el As-o (Domínguez Carmona, 2009). El arsénico se diferencia de la mayor parte del resto de los elementos químicos en que los compuestos inorgánicos son más tóxicos que los compuestos orgánicos (O'Neill, 1995). El arsenito y arseniato (formas inorgánicas) muestran un nivel de toxicidad elevada en comparación con las especies organoarsenicales (Pardo Martínez *et al.* 2001), debido a que son más hidrosolubles. Entre las formas inorgánicas, las que presentan mayor toxicidad son las trivalentes respecto a las pentavalentes (ATSDR, 1989). (Figura 1).

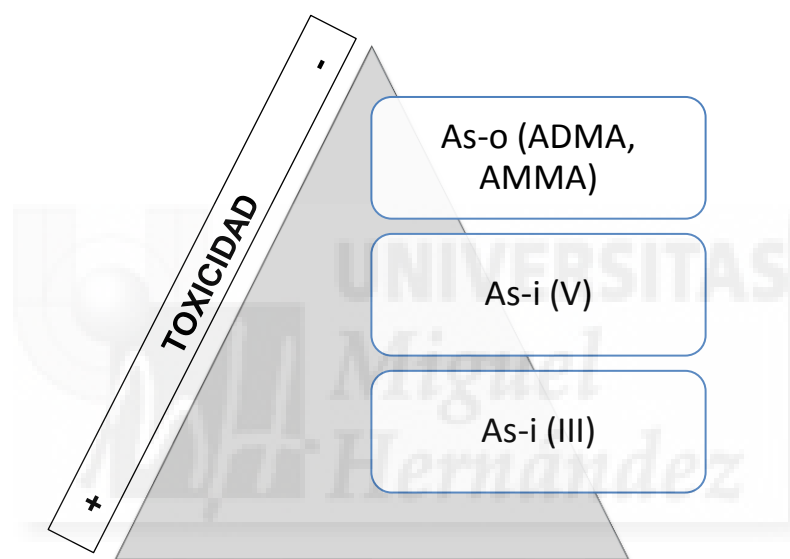


Figura 1. Toxicidad de las diferentes especies arsenicales.

Cuando este elemento alcanza el torrente sanguíneo tras la absorción es captado por los leucocitos, aunque si la dosis es elevada el As acaba almacenándose en los hematíes y se distribuye a través del organismo llegando al hígado, pulmones, bazo, piel y riñón. El As se une a las proteínas y a los grupos sulfhidrilo inhibiendo la acción de las enzimas, impidiendo así el correcto funcionamiento celular e incluso afectando a la estructura del ADN, por hipometilación (Sciandrello *et al.* 2004). De ahí que sea considerado como un compuesto cancerígeno con factor 1 (IARC, 1987). La Agencia Internacional de Investigación del Cáncer incluye el As-i en el grupo de los compuestos carcinogénicos para el ser humano (Tsuda *et al.* 1992).

La principal vía metabólica de detoxificación del As es la metilación, generándose compuestos como los ácidos monometilarsónico, dimetilarsínico o trimetilarsónico, es decir, los compuestos inorgánicos se transforman en orgánicos, siendo una respuesta protectora del organismo. Su eliminación se realiza tanto por vía urinaria o biliar por las heces cuando el As no es absorbido como por vía epitelial y mediante las uñas y pelo (Gibson *et al.* 1982).

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

- Piel: cáncer de piel, hiperqueratosis y melanosis.
- Hígado: cirrosis y ascitis.
- Pulmón: cáncer de pulmón si es inhalado el metaloide.
- Sistema circulatorio: pie negro por necrosis en las extremidades.
- Malformaciones en el feto, ya que es un agente teratógeno.

El mayor envenenamiento de la historia fue en Bengala Occidental (India), zona afectada por la contaminación de las aguas subterráneas. El problema fue que el agua de riego y potable contaminada por As-i, llegaban a cultivos como el arroz con elevada capacidad de retención de estas especies. La exposición crónica en esta zona radica en que el arroz es la base de la alimentación de esta zona suponiendo un 60 % de su alimentación, provocó una ingesta dietética de As-i significativa (Signes *et al.* 2008a).

1.1.5 Arsénico en alimentos

El arsénico ha sido detectado en la mayoría de los alimentos, pero dependiendo del alimento la especie arsenical mayoritaria varía. El porcentaje del As-i con respecto al As-t presente varía desde el 0 % en peces de agua salada al 75 % en otros productos de origen vegetal (CEPA, 1993).

Se ha realizado una serie de estudios sobre el contenido de As en alimentos. Martí *et al.* (2008) analizaron los metales pesados (As, Cd, Hg y Pb)

en diferentes productos alimentarios de origen español. Los resultados muestran que los alimentos de mayor contenido fueron los de origen marino, con una media de 350 $\mu\text{g As-t/kg}$ producto y el arroz 180 $\mu\text{g As-t/kg}$ producto.

Por otro lado, Signes *et al.* (2008b) estudiaron el contenido de As-t en alimentos de Bengala Occidental (India), mostrando un mayor contenido por tratarse de cultivos procedentes de un área geográfica con suelos y aguas de riego altamente contaminadas por As. Como ejemplos podemos citar: Rábano $167 \pm 5 \mu\text{g/kg}$ y zanahoria $121 \pm 2 \mu\text{g/kg}$.

1.1.6 Arsénico en arroz

La principal causa de la acumulación de As en el arroz es su modo de cultivo; el arroz se cultiva en condiciones de inundación (anaerobiosis) que comportan una elevada disponibilidad del As para las plantas (Signes *et al.* 2008). Los suelos inundados ofrecen un ambiente único para el crecimiento y nutrición del arroz (**Figura 2**).



Figura 2. Forma de cultivo del arroz

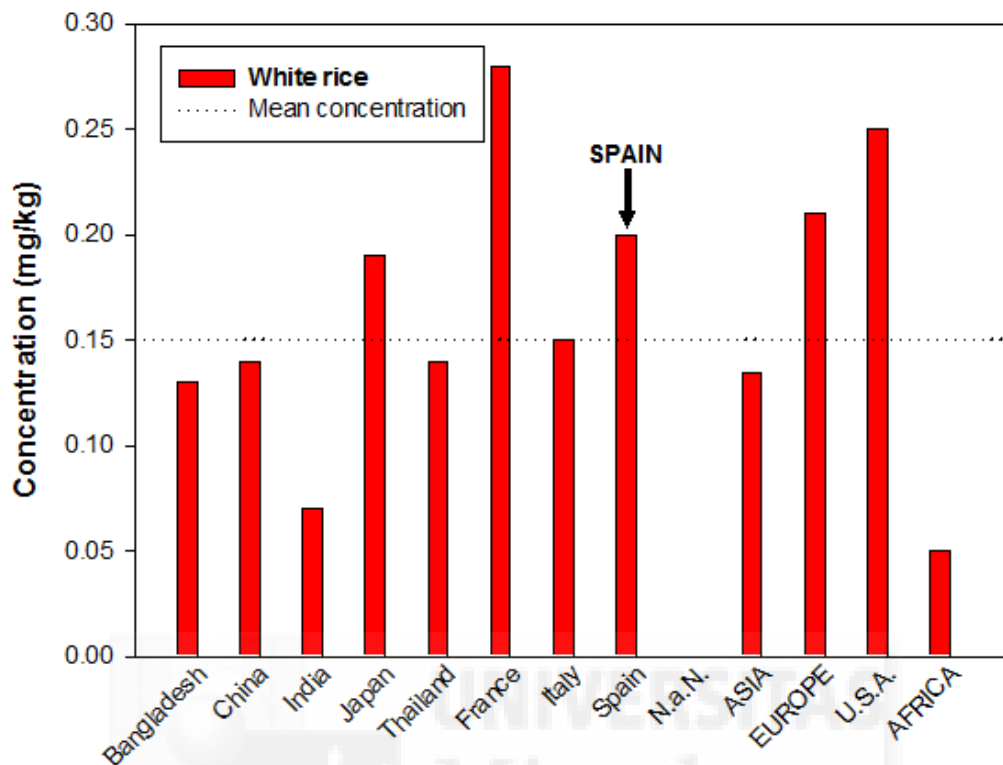
El arsenito es la forma dominante, mientras que el arseniato, ADMA y AMMA están presentes en cantidades poco significativas. El arsenito muestra un alto transporte activo hacia el interior de las raíces debido a que es la especie más móvil, contrariamente, el transporte de ADMA y AMMA es el más

bajo. Las plantas de arroz adaptadas completamente a medios anaerobios, oxigenan su rizosfera mediante la formación de placas de oxi-hidróxidos de hierro. La formación de placas de hierro está condicionada por la presencia de fósforo, hay un incremento en la formación de placas de hierro conforme disminuye la concentración de fósforo. Estas placas son las encargadas de secuestrar el As, conforme aumente la cantidad de As secuestrado en las placas, habrá menos translocación de As a otras partes de la planta. Otro factor que determina la cantidad de placas de hierro que se forman y por tanto la translocación de As, es la variedad de arroz.

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

La forma de cultivo de este cereal, comentado anteriormente, es clave en el contenido de arsénico, debido a que la inundación de los suelos hace más biodisponible el As cuando las plantas absorben el agua y de esta forma llega a las partes comestibles. Además Juhasz *et al.* (2006) concluyeron, que la biodisponibilidad del As es dependiente del cultivar, del arsénico presente en el agua de riego y de la presencia y naturaleza de la especiación de As en el agua de cocción. En este estudio se estimó una biodisponibilidad para el ser humano en el arroz cocido del 33 % del As-o y del 89 % de As-i.

El equipo de Meharg *et al.* (2009) analizó el contenido de As en arroces de diferente origen. Los datos obtenidos son los que se muestran en la **Gráfico 1**.

Gráfico 1. Contenido de arsénico total en arroz de diferente origen (Meharg, 2009)

1.1.7 Arsénico en productos a partir de arroz

Debido a la problemática de la presencia de arsénico en arroz de diferentes zonas se ha investigado el contenido de arsénico en diferentes productos a base de arroz.

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

Munera-Picazo *et al.* (2014), estudiaron la presencia de As-t en diferentes grupos de productos destinados para personas celíacas (pastas, pan, cereales de desayuno, galletas con chocolate, galletas “maría”)

comparándolas con productos control con gluten en cada uno de los grupos. Se concluyó que existía una correlación positiva entre el porcentaje de arroz y el contenido en As-t, siendo indetectable en las muestras control ya que éstas contienen harina de maíz u otras féculas en lugar de harina de arroz.

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

1.1.8 Límites de ingesta. Legislación

Según la Norma General del *Codex Alimentarius* para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos y piensos, la definición de contaminante se define como:

“Cualquier sustancia no añadida intencionalmente al alimento, que está presente en dicho alimento como resultado de la producción (incluidas las operaciones realizadas en agricultura, zootecnia y medicina veterinaria), fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, transporte o almacenamiento de dicho alimento o como resultado de contaminación ambiental. Este término no abarca fragmentos de insectos, pelo de roedores y otras materias extrañas”

El nivel máximo del Códex (NM) para un contaminante en un producto alimenticio es la concentración máxima de esa sustancia que la Comisión del *Codex Alimentarius* recomienda se permita legalmente en dicho producto.

Los NM en arroz se encuentran de la forma siguiente:

- 300 µg/kg de As-i o As-t en arroz sin elaborar
- 200 µg/kg de As-i en arroz pulido

Por otra parte, el comité de expertos de la FAO y la OMS (JEFCA) propuso como ingesta tolerable semanal provisional (ISTP) de As-i el valor siguiente:

- 15 µg/kg a la semana (2 µg/kg al día).

A pesar de que se proponen recomendaciones sobre las concentraciones máximas de ingesta, globalmente, excepto China, no se encuentran normas de seguridad alimentaria (entendiéndose como inocuidad alimentaria) que determinen la concentración máxima de As que pueden presentar diferentes alimentos para poder comercializarse.

Como se ha mencionado, la excepción es China, quien tiene limitadas las concentraciones máximas de As-i que pueden presentar diferentes tipos de alimentos (**Tabla 4**).

Tabla 4. Estándar de seguridad alimentaria en China para As-i (mg/kg) en diferentes productos.

PRODUCTO	As-i (µg/kg)
Arroz	150
Harina	100
Pescado	100
Otros cereales	200

En Junio del 2012 en la reunión sobre las Normas Alimentarias del *Códex Alimentarius* en Roma (Italia), se trató el tema sobre el anteproyecto de los niveles máximos de arsénico en arroz. La delegación China que es la encargada del As presentó una serie de problemas en cuanto al NM de arsénico en arroz. Los principales problemas fueron: hay estudios que demuestran que si la base de la dieta es el arroz los NM deberían ser menores, falta datos de diferentes especies y zonas de cultivos de arroces para poder concretar los NM, no hay suficientes datos fiables para determinar los NM de arsénico inorgánico en arroz y uno de los problemas más importantes, es la falta de métodos validados para la determinación de arsénico total y de su especiación.

Hoy en día se están realizando estudios en diferentes laboratorios para la validación de métodos analíticos.

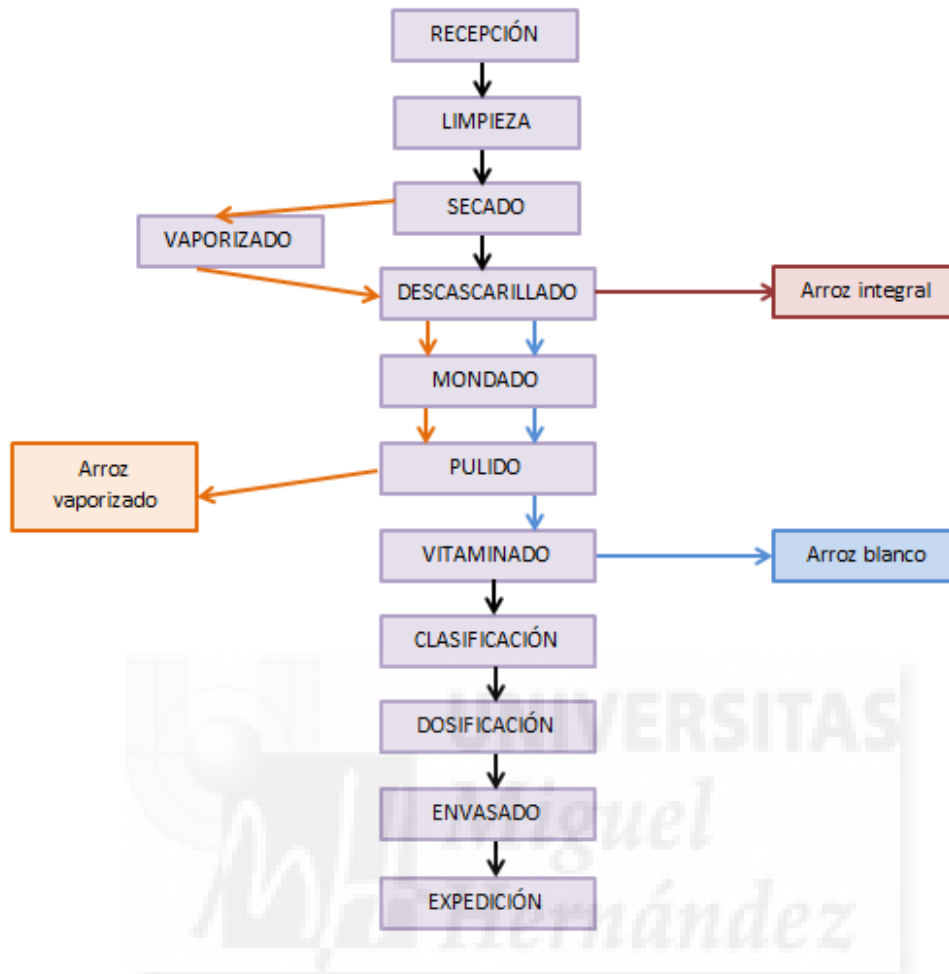
Por parte de la Unión Europea la concentración de arsénico en el arroz no está regulada, hoy en día está en trámite. Se están agrupando datos de concentraciones de este metaloide en diferentes zonas no solamente de la UE sino a nivel mundial para poder establecer un límite y de esta forma regular el mercado de las materias primas con concentraciones superiores al límite establecido en el futuro.

1.2 ARROZ

El arroz (*Oryza Sativa*) es una monocotiledónea que se encuentra dentro de la familia de las gramíneas y subfamilia de las *Poaceas*, familia botánica muy rica tanto en la parte silvestre como la cultivada. En ella se encuentran los cereales más importantes como son el arroz, trigo y maíz (Rosello, 2004).

1.2.1 Procesado del arroz

El objetivo del procesado del arroz es adaptar el cereal para el consumo humano. Se muestra en la **Figura 3** el diagrama de flujo del procesado industrial del arroz, cuya explicación de cada una de las operaciones se encuentra a continuación.

Figura 3. Diagrama de flujo del procesado industrial del arroz

Tras la recepción de la materia prima se produce una limpieza eliminándose las impurezas (físicas y biológicas), mediante corrientes de aire y tamices vibratorios de diferente tamaño de poro.

El secado se realiza ya que el grano recién recolectado tiene un contenido en humedad elevada (19-23 %) que puede ocasionar un riesgo biológico y microbiológico.

El descascarillado es la etapa en la que se elimina el 95 % de la cáscara del grano de arroz, el producto que se obtiene es el arroz integral (conserva el salvado y el germen).

La operación de mondado consiste en eliminar el salvado del grano, perdiendo grandes aportes nutricionales como vitaminas, minerales y fibra. Por lo que conserva el germen que es la reserva energética del grano (mayor

contenido en grasas) se debe realizar un pulido para evitar el enranciamiento del grano durante su almacenamiento, obteniéndose el arroz blanco.

El vitaminado es una técnica muy reciente que consiste en la inmersión de los granos en una disolución rica en vitaminas.

Los parámetros de calidad clasifican el grano final para poder ser dosificado y envasado.

1.2.2 Producción y consumo del arroz.

El arroz es un cereal básico en la alimentación de muchas culturas; su producción es predominante respecto a otros granos, es un alimento importante en la dieta por su aporte calórico y se considera el principal cereal destinado a la alimentación.

La producción de arroz en la UE está dominada por Italia (36,3 %) y España (21,5 %), por tanto, España es uno de los principales proveedores de arroz para uso alimentario en la UE. Además en España la cantidad de suministro de alimentos en el 2009 se encuentra entre 32 y 47 g/persona/día, arroz elaborado y arroz cáscara, respectivamente. Por lo que la ingesta en nuestro país es elevada (FAOSTAT 2013).

Por otra parte, el arroz en la India es un alimento básico para la alimentación de la cultura india, las kcal/persona/día en Bangladesh en el 2009 es de 1727. La ingesta de este cereal en Bangladesh en el 2009 siendo de 475 y 712 g/persona/día, arroz elaborado y arroz cáscara, respectivamente (FAOSTAT 2013).

A pesar de la gran producción de trigo en Irán, la cantidad de suministro de arroz en la República Islámica de Irán en el 2009 duplica a España, siendo 63 y 95 g/persona/día arroz elaborado y cáscara, respectivamente (FAOSTAT 2013).

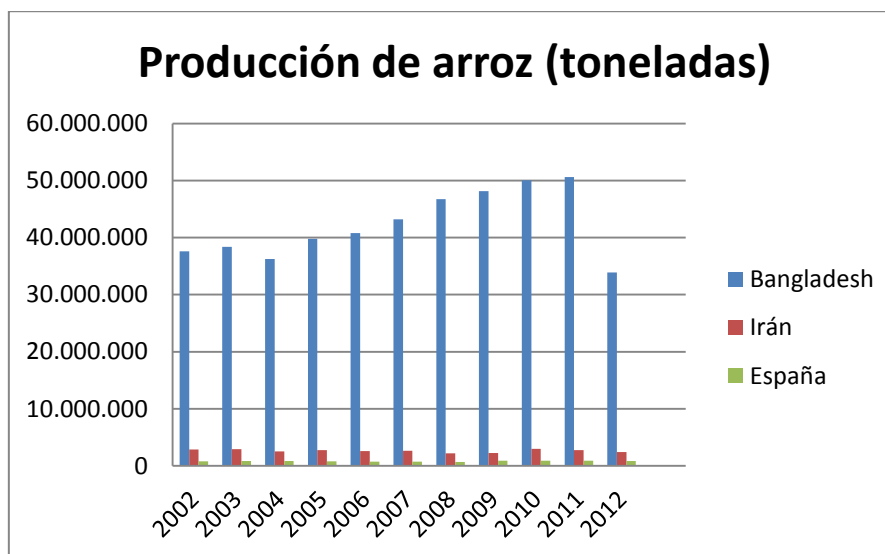
En la **Tabla 5** y **Gráfico 2** siguientes se muestran las toneladas producidas de arroz en Bangladesh, Irán y España en los últimos años. Los

datos son los registrados en la base de datos FAOSTAT 2013. Como se puede observar, la producción de la República Islámica de Irán se encuentra muy por encima de la producción española.

Tabla 5. Producción de arroz en los últimos años (FAOSTAT 2013)

País	Bangladesh	Irán	España
Año	Producción de arroz (toneladas)		
2002	37.593.000	2.888.000	818.920
2003	38.361.420	2.931.138	855.000
2004	36.235.976	2.542.443	833.131
2005	39.795.618	2.736.843	824.114
2006	40.773.000	2.612.175	724.351
2007	43.181.000	2.664.237	723.426
2008	46.742.000	2.183.962	665.200
2009	48.144.000	2.253.416	913.754
2010	50.061.200	3.012.739	927.817
2011	50.627.000	2.746.562	927.554
2012	33.889.632	2.400.000	881.100

Gráfico 2. Producción de arroz en los últimos años (FAOSTAT 2013)



1.2.3 Arroz en la República Islámica de Irán

La superficie de Irán es de 1.648.195 km² (un tercio de ésta es tierra cultivable), poco más de tres veces la extensión de España. Ocupa buena parte del sudoeste asiático. Irán comparte fronteras, terrestres y marítimas, con 15 estados.

La diversidad abarca desde desiertos asombrosamente áridos a frondosos bosques húmedos. Otro contraste son las grandes cordilleras, formadas por altos picos, y las llanuras litorales que se extienden a orillas de los mares que bañan las costas iraníes (Mar

Figura 4. Mapa de Irán



Caspio y Golfo pérsico). También están presentes numerosos ríos que desembocan en los mares mencionados (**Figura 4**).

La variabilidad de la geografía provoca diferente climatología a lo largo de su extensión, en el Norte las temperaturas son bajas y una elevada humedad, en la zona céntrica las temperaturas son bajas pero con escasa humedad. Ambas zonas mencionadas contrastan con las elevadas temperaturas de la zona Sur del país.

Como se ha observado en el punto anterior, la producción y el consumo de arroz en Irán es elevada.

En todo el territorio, se observan diferentes zonas de producción y procesado. En la **Figura 5** se muestra el mapa de Irán donde se localizan las provincias productoras de este cereal (**Tabla 6**) en las que cada una de ellas es diferente el tipo de irrigación.

Figura 5. Mapa de las provincias de Irán.



Tabla 6. Provincias y ciudades productoras de arroz en Irán. Localización.

Provincia	Ciudades	Tipo de irrigación	Localización en Irán
Guilán	Astaneh	Río Sepidroud	Norte
	Rasht		
	Talesh		
Mazandarán	Amol	Río Haraz 20 % Pozo subterráneo	Norte
	Mahmudabad	Río Sorkhroud	
	Fereydun kenar	Río Haraz	
Khouzestan	Ramhormoz	Pozo subterráneo	Sur-oeste
Isfahan (Esfahan)	Lenjan	Río Zayanderud	Centro
Lorestan	Borujerd	Pozo subterráneo	Oeste
Illam	Chardaval	Río Seimare	Oeste

El cultivo y procesado del arroz de las zonas mencionadas de producción es muy similar, a excepción de algunas (Guilán y Mazandarán). En éstas, una vez recolectadas algunas de las variedades de arroz cultivadas, sufren un proceso de ahumado en el mismo cultivar para darles sabor.

Existen diferentes variedades de arroz que se cultivan en las provincias citadas. En la **Tabla 7** se muestran las variedades más comunes y consumidas en las diferentes zonas.

Tabla 7. Variedades de arroces en Irán

Provincia	Ciudades	Variedad (nombre pérsico)	Variedad (en inglés)
Guilán	Astaneh	Doudi Sadri Roghani	Smoked Sadri Roghani
		Dom Siah Ostokhani	Dom Siah Ostokhani
		Hashemi Astaneh	Hashemi Astaneh
	Rasht	Doudi Sadri Roghani	Smoked Sadri Roghani
	Talesh	Doudi Tohfeh Guilan	Smoked Tohfeh Guilan
Mazandarán	Amol	Tarem Hashemi	Tarem Hashemi
		Shiroudi	Shiroudi
	Mahmudabad	Tarem Hashemi	Tarem Hashemi
		Tarem Atri	Tarem Atri
Fereydun kenar	Doudi Ziba Shamshiri	Doudi Ziba Shamshiri	
Khuzestan	Ramhormoz	Champa	Champa
Isfahan (Esfahan)	Lenjan	Lenjun	Lenjun
Lorestan	Borujerd	Tarem	Tarem
Illam	Chardaval	Shamshiri	Shamshiri

2. OBJETIVOS

El presente Trabajo Fin de Grado tiene como objetivos los siguientes:

- Determinar el contenido de arsénico total en arroz de procedencia iraní.
- Determinar las diferentes formas de As en las muestras de procedencia iraní.
- Tratar de relacionar los contenidos de As según el tipo de riego, zonas y tratamientos con fertilizantes.
- Comparar el contenido de As con las de otros países.
- Estimación del riesgo asociado al consumo de arroz de procedencia iraní.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

En el presente trabajo se llevó a cabo el análisis de 15 muestras de arroz procedentes de diferentes zonas de La República Islámica de Irán.

La finalidad de este experimento es determinar la concentración de As total y la cuantificación de las especies arsenicales orgánicas (AMMA, ADMA) y las inorgánicas [As (III), As (V)] en las diferentes muestras.

La determinación del arsénico total en estos productos se llevó a cabo por medio de la técnica de espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros (HG-AAS).

La determinación de las especies arsenicales se llevó a cabo por medio de la técnica de cromatografía líquida con generador hidruros con detector de fluorescencia atómica (HPLC-HG-AFS).

3.2. ARSÉNICO TOTAL

3.2.1. MATERIALES

3.2.1.1. Equipos

Los equipos utilizados tanto para la preparación de las muestras como para la determinación de arsénico en ellas son los siguientes:

- Molino con mortero RM100 (**Figura 6**).
- Balanza de precisión *Mettler Toledo* modelo AG204. (máx. 210 g; d = 0,1mg) (**Figura 7**).
- Sistema Milli-Q de obtención de agua ultrapura, modelo MIIPAK 40 MILLIPORE (Gif-Sur-Yvette, Francia) (**Figura 8**).
- Micropipetas *Nichiryo*, *Nichipet* EX de 1000-5000 μ L y *Thermo scientific*, *Finepipete* F2 de 100-1000 μ L (**Figura 9**).
- Horno de aire *Selecta*, de 0-200 °C (Barcelona).
- Baño de arena *FALC*, modelo BS70 (**Figura 10**).

- Termómetro digital de 10-150 °C (**Figura 11**).
- Horno mufla *Hobersal*, modelo 12 PR/300 serie BB.
- Espectrómetro de absorción/emisión atómica (HG-AAS) UNICAM 969 AA *Spectrometer*, con generador de hidruros UNICAM VP 90 *Vapour System* (SOLAR) (**Figura 12**).

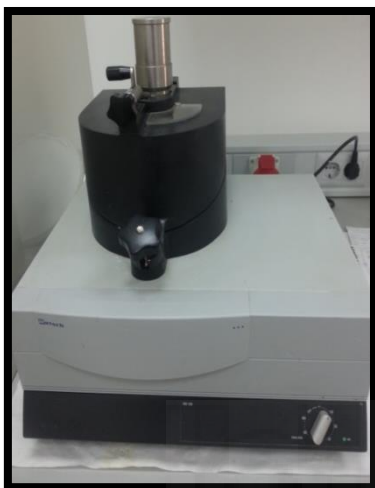


Figura 6. Molino



Figura 7. Balanza



Figura 8. Sistema Milli-Q



Figura 9. Pipetas



Figura 10. Baño de arena



Figura 11. Termómetro



Figura 12. HG-AAS

3.2.1.2 Material

- Material de vidrio como tubos, vasos de precipitados, embudos, probetas y matraces aforados de diversas medidas (**Figura 13**).
- Crisoles de porcelana con tapa de 40 mL (**Figura 13**).
- Papel de filtro cuantitativo sin cenizas ALBET 145, *Filalbet, S. L.* Gramaje (g/m^2)=80; velocidad de filtración Herzberg ($\text{s}/1000 \text{ mL}$)=383; diámetro del poro (μm)=7-11; cenizas (%) $\leq 0,007$.
- Parafilm PM996.



Figura 13. Material de vidrio y crisoles

3.2.1.3 Reactivos

- Agua ultrapura desionizada mediante el sistema Milli-Q (MILLIPORE, Gif-Sur Yvette, Francia), de resistividad específica = 18,2 M Ω /cm.
- Ácido nítrico, HNO₃, concentrado al 65 % de la marca *Merk*. Con garantía de contenido máximo de As de 0,000001 %.
- Ácido clorhídrico, HCl, concentrado al 37 % de la marca *Merk*. Con garantía de contenido máximo en arsénico de 0,010 mg/kg.
- Yoduro potásico, KI, con una riqueza del 99 % de la marca *Rectapur*.
- Ácido ascórbico, C₆H₈O₆, con una riqueza del 99,7 % de la marca *Panreac Química*.
- Borohidruro sódico, NaBH₄, con una pureza del 99 %, de la marca *Acros Organic*.
- Hidróxido de sodio, NaOH, con una riqueza del 98 %, de la marca *Panreac Química*, máximo de impurezas de arsénico de 0,00004 %.
- Sodio meta-arsenito, NaAsO₂, con una pureza del 98 %, de la marca *Panreac Química*.
- Óxido de magnesio, MgO, con una riqueza del 90 % de la marca *Panreac Química*.

- Nitrato de magnesio, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, con una riqueza del 98% de la marca *Panreac Química*.
- Agente reductor (5 % (m/v) KI + 5 % (m/v) ácido ascórbico).
- Agente mineralizante (20 % (m/v) MgNO_3 + 2 % (m/v) MgO).
- Agente reductor (generador de hidruros): Se disuelve 4 g de NaOH en 800 mL de agua ultrapura y se añaden 14 g de borohidruro, agitando hasta su disolución y se enrasa hasta 1 L con agua ultrapura (1,4 % NaBH_4 + 0,1 M NaOH).
- Medio ácido para la generación de hidruros (HCl 10 %): Se toman 100 mL de HCl concentrado y se enrasa hasta 1 L con agua ultrapura.

3.2.1.4 Limpieza

Como en otros estudios (Laserna, 1985; Pomeranz *et al.* 1984; Cornelis, 1993), se enfatizó la necesidad de una limpieza exhaustiva del material de vidrio y de porcelana usado en este trabajo. Para ello se lavó previamente con agua desionizada y jabón neutro y sin fosfatos (*Derquim LM 02*) y posteriormente enjuagado con agua ultrapura. Tras este lavado inicial se realizó un baño con una disolución de ácido nítrico (HNO_3) al 30 % (v/v) durante 24 horas. Tras este periodo se enjuagó con agua desionizada seguida de agua ultrapura desionizada por triplicado para ser secado finalmente al aire.

3.2.1.5 Recomendaciones generales

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

- Extremar las precauciones en cuanto a limpieza del material que, a su vez, debe ser lo más inerte posible.
- Asimismo, los reactivos deben tener una pureza elevada, exentos de metales. Hay que evitar al máximo la contaminación procedente del aire o polvo presente en el laboratorio.
- Reducir, en lo posible, el número de pasos necesarios para la determinación así como del material empleado.

- Observar estrictamente los procedimientos de preparación de muestras, vigilando los tiempos y las temperaturas.
- Realizar los análisis al menos por triplicado contrastando los resultados con otros laboratorios.

3.2.2 MUESTRAS

3.2.2.1 Material de referencia

El material de referencia que fue utilizado para evaluar la eficacia tanto de los protocolos de digestión y mineralización de las muestras como del método analítico de cuantificación usados en este trabajo fue el GBW07603 “arbusto, ramas, hojas” que posee valores certificados para As-t de 1,25 µg/g. El material certificado fue proporcionado por *LGC Deselaers, S. L.* (Barcelona, España) y producido por el *Institute of Geophysical and Geochemical Exploration* de China.

3.2.2.2 Muestras de arroz de Irán

Las muestras de arroz estudiadas fueron recolectadas en el verano del 2012 y adquiridas a través de la Facultad de Ciencias Animales y Tecnología Alimentaria (Faculty of Animal Science and Food Technology) de la Universidad de Agricultura y Recursos Naturales Ramin (Ramin Agriculture and Natural Resources University) de Irán. En la **Tabla 8** mostrada a continuación se presentan las muestras analizadas en este trabajo fin de grado con sus especificaciones como provincia y ciudad de origen, tipo de irrigación...

La toma de muestras fue realizada según la producción de cada una de las zonas citadas en la Introducción, por ello, la mayor parte de las muestras tienen su origen en las provincias del Norte del país, siendo minoría el resto de éstas.

Tabla 8. Información sobre las muestras analizadas

	Nombre pérsico	Especie	Provincia de origen	Ciudad	Tipo de irrigación	Especificaciones	Localización en Irán
1	Doudi Sadri Roghani	Sadri	Guilan	Astaneh	Río Sepidroud	Ahumado del arroz	Norte
2	Dom Siah Ostokhani	Domsiah	Guilan	Astaneh	Río Sepidroud		Norte
3	Shiroudi	Shiroudi	Mazandaran	Amol	Río Haraz	20 % de la irrigación de pozos subterráneos	Norte
4	Hashemi Astaneh	Hashemi	Guilan	Astaneh	Río Sepidroud		Norte
5	Doudi Sadri Roghani	Sadri	Guilan	Rasht	Río Sepidroud	Ahumado del arroz	Norte
6	Doudi Tohfeh Guilan	Sadri	Guilan	Talesh	Río Shafaroud	Ahumado del arroz	Norte
7	Tarem Hashemi	Hashemi	Mazandaran	Mahmudabad	Río Sorkhroud		Norte
8	Tarem Atri	Tarem	Mazandaran	Mahmudabad	Río Sorkhroud		Norte
9	Shamshiri	Hashemi	Mazandaran	Fereydun kenar	Río Haraz		Norte
10	Tarem Hashemi	Tarem	Mazandaran	Amol	Río Haraz		Norte
11	Champa	Champa	Khouzestan	Ramhormoz	Pozos subterráneos		Sudoeste
12	Doudi Ziba Shamshiri	Tarem	Mazandaran	Fereydun kenar	Río Haraz	Ahumado del arroz	Norte
13	Lenjun	Lenjum	Isfahan	Lenjan	Río Zayanderud		Centro
14	Tarem	Tarem	Lorestan	Borujerd	Pozos subterráneo		Oeste
15	Shamshiri	Shamshiri	Ilam	Chardaval	Río Seimare		Oeste

A continuación se muestran las imágenes de cada una de las muestras analizadas.



Figura 14. Muestra 1



Figura 15. Muestra 2

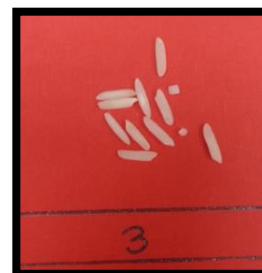


Figura 16. Muestra 3.

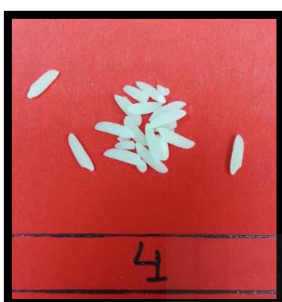


Figura 17. Muestra 4.

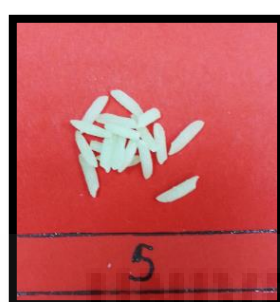


Figura 18. Muestra 5.

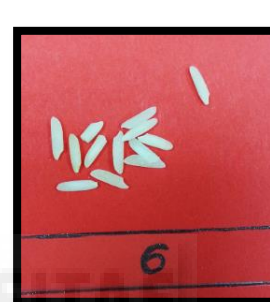


Figura 19. Muestra 6.



Figura 20. Muestra 7.



Figura 21. Muestra 8.

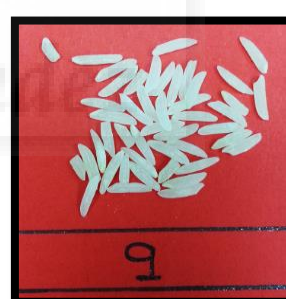


Figura 22. Muestra 9.



Figura 23. Muestra 10.

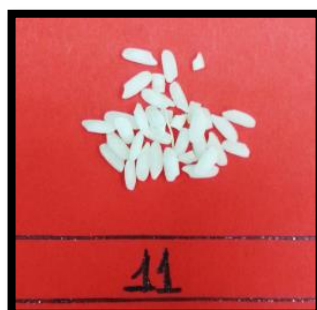


Figura 24. Muestra 11.

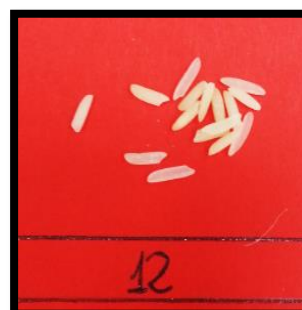


Figura 25. Muestra 12.

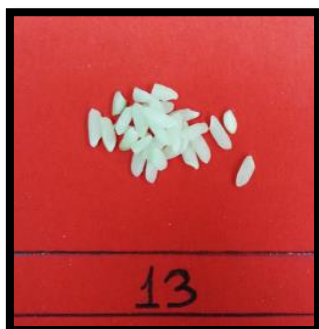


Figura 26. Muestra 13.

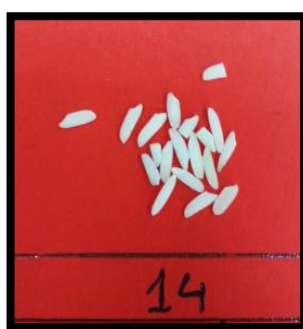


Figura 27. Muestra 14



Figura 28. Muestra 15.

3.2.2.3 Preparación de la muestra

Las muestras objeto de estudio se molieron en un *Molino con mortero RM100 (Figura 6)* hasta la obtención de la harina homogénea de arroz. A continuación cada una de las muestras se envasaron en bolsas de plástico cerradas herméticamente y debidamente codificadas. Se introdujeron en un desecador para evitar la rehidratación durante todo el experimento (Figura 29).



Figura 29. Desecador para las muestras.

3.2.3 MÉTODO ANALÍTICO

3.2.3.1 Determinación de arsénico total

El método analítico usado para la determinación de As-t en arroz fue por mineralización ácida, método habitualmente empleado para la determinación de elementos traza en alimentos (Barberá *et al.* 1989; Alegría *et al.* 1990;

AOAC, 1990; Schumacher *et al.* 1993). Se realizó digestión húmeda (deseccación previa de las muestras por calentamiento en baño de arena) para su posterior mineralización en horno mufla como puede observarse en el diagrama de flujo de la **Figura 30**.

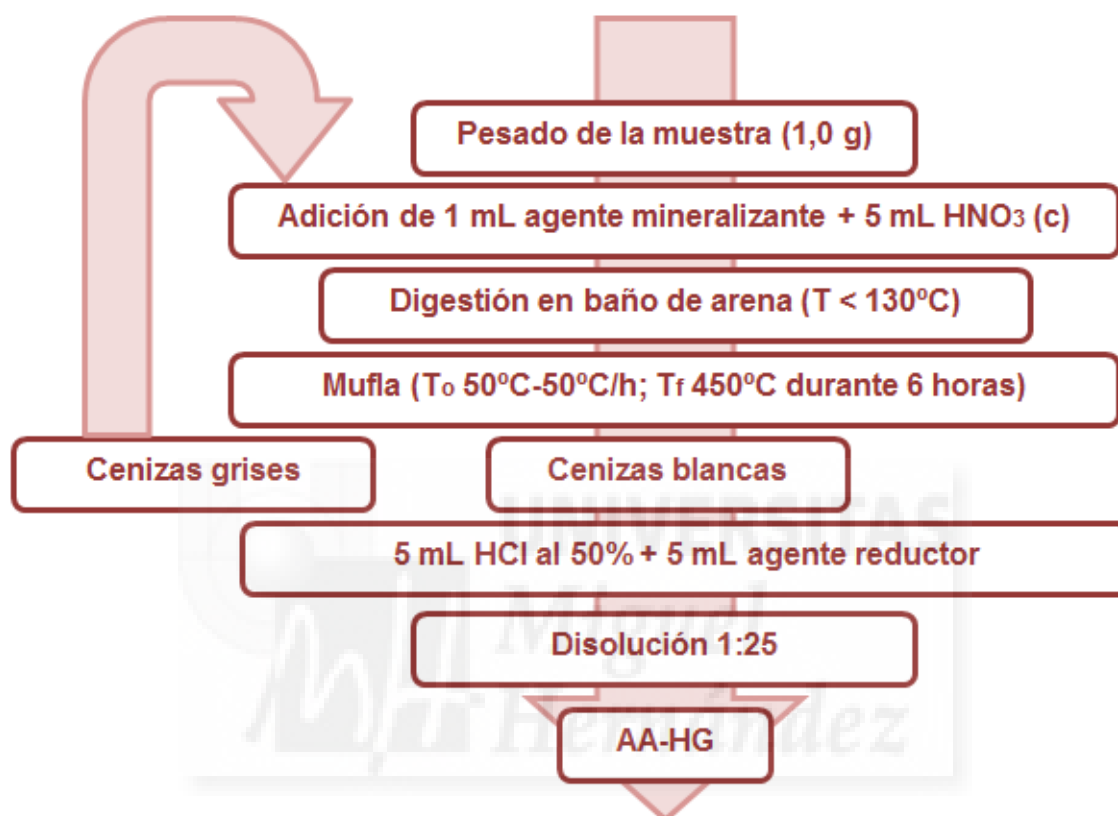


Figura 30. Método analítico empleado para el As-t.

3.2.3.1.1 Mineralización

Las cantidades pesadas en una báscula de precisión Metler Toledo (**Figura 7**), se introdujeron en crisoles de porcelana previamente codificados. De cada muestra se realizaron 3 repeticiones además de un blanco también triplicado.

Tras el pesado de las muestras, a cada crisol se le adicionó 1 mL de agente mineralizante [20 % (m/v) de $MgNO_3$ + 2 % (m/v) de MgO] y 5 mL de HNO_3 concentrado. Estos dos reactivos facilitan la transformación de las especies orgánicas e inorgánicas del As. Esta reacción se realizó con la ayuda

de calor por medio de un baño de arena con la precaución de no sobrepasar los 130 °C para evitar la volatilización y pérdida del analito. Este proceso se alargó aproximadamente 6 horas hasta que las muestras quedaron totalmente secas.

Después de la desecación se realizó la mineralización en un horno mufla Hobersal, aplicando un programa temperatura-tiempo específico. La temperatura inicial fue de 50 °C y la final de 450 °C con un incremento de 50 °C/h. Cuando la mufla alcanzó los 450 °C, las muestras permanecieron a esa temperatura durante 6 horas. Si tras ese tiempo las muestras en forma de cenizas no habían alcanzado un color blanco, se debía repetir todo el proceso de digestión en baño de arena (sólo con 5 mL de HNO₃) y mineralización en horno mufla.

Una vez obtenidas las cenizas blancas y enfriadas, se adicionaron 5 mL de HCl al 50 % y 5 mL de agente reductor [5 % (m/v) de KI y 5 % (m/v) de ácido ascórbico]. Se dejó reaccionar durante 30 minutos a temperatura ambiente con la finalidad de reducir el As (V) a As (III) y optimizar la generación de la arsina durante la medición en AAS-HG. Tras este tiempo el procedimiento continuó con el filtrado de la disolución a través de papel de filtro Albet 145. El líquido filtrado de cada muestra se introdujo en matraces de 25 mL enrasándose con agua ultrapura desionizada.

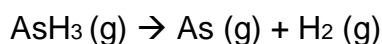
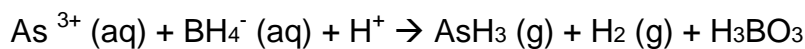
Posteriormente la disolución final obtenida se introduce en tubos de ensayo codificados para facilitar la medición en el equipo de espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros (**Figura 12**).

3.2.3.1.2 Medición de arsénico total por espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros

Esta técnica consiste en la volatilización de hidruros de arsénico o arsina (H₃As) por acción de agentes reductores en medio ácido. La base en la que se fundamenta esta técnica es la transformación de los compuestos minerales de As obtenidos tras la correspondiente mineralización/digestión, en un hidruro de arsénico o arsina, por medio de un agente reductor, como es el borohidruro de

sodio (NaBH_4) en medio ácido (HCl 10 %). (Maitani *et al.* 1987; Derache, 1990; Sun *et al.* 2002).

Las reacciones químicas que rigen esta técnica para el caso del arsénico son:



La determinación de As-t de las muestras se llevó a cabo mediante espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros. Fue llevada a cabo con un espectrómetro de absorción atómica *Unicam* modelo *Solaar 969* dotado de un generador de hidruros *Unicam Solaar VP90*. (**Figura 12**). Todo ello bajo unas determinadas condiciones instrumentales empleadas que disponen en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Condiciones instrumentales

Longitud de onda	193,7 nm
Rendija	0,7 nm
Caudal acetileno	4,1 - 4,6 L/min
Caudal aire	1,025 – 1,15 L/min
Llama	Aire – acetileno (0,8 L/min)
Gas portador	Argón (250 mL/min)
Volumen muestra	2 mL
Reductor empleado	NaBH_4 al 1,4 % y NaOH al 0,4 %
Agente acidificante	HCl al 10 % (v/v)
Intensidad de la lámpara	8 mA

Al mismo tiempo, se midieron patrones realizados previamente con los que se realizará la recta de calibrado. Para ello se partió de sal arsenical sodio meta-arsenito (NaAsO_2) que se utilizó para obtener una disolución con concentración 1000 mg/L (1000 ppm). A partir de ésta se obtuvo una concentración de 1 mg/L (1000 ppb) al extraer 1 mL y diluirla en 1 L de agua ultrapura. De esta disolución se realizaron otras intermedias hasta obtener concentraciones de 2, 4, 6, 8 y 10 $\mu\text{g/L}$ (ppb) (**Figura 31**).

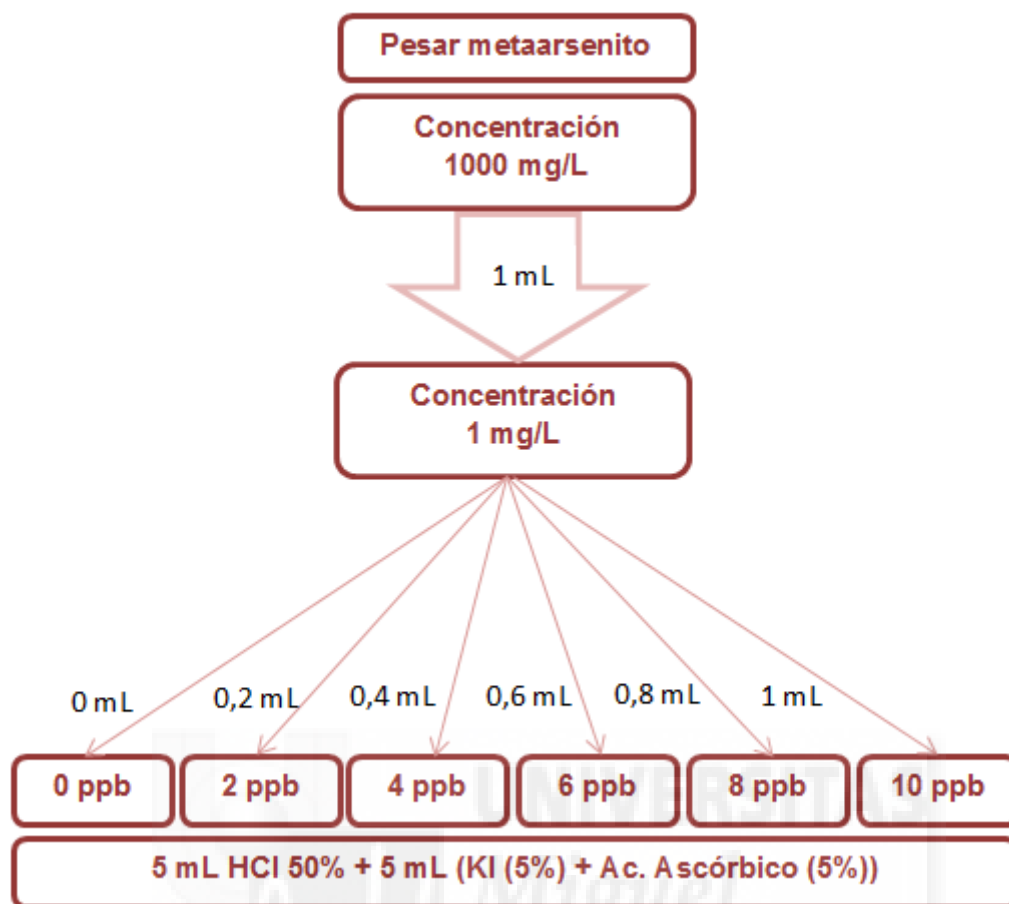


Figura 31. Esquema para la realización de los patrones de As-t.

3.2.3.1.3 Tratamiento estadístico

Los datos resultantes de esta determinación fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA) y Test de Rangos Múltiples (Test de Tukey) tras previamente calcular el valor medio, la mediana, la desviación típica y el error de la medida.

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el paquete estadístico STATGRAPHICS 5.0 Plus.

3.3 ESPECIACIÓN ARSÉNICO

3.3.1 MATERIALES

3.3.1.1 Equipos

- Molino con mortero RM100 (**Figura 6**).
- Balanza de precisión *Mettler Toledo* modelo AG204. (máx. 210 g; d = 0,1 mg) (**Figura 7**).
- Sistema Milli-Q de obtención de agua ultrapura, modelo MIIPAK 40 MILLIPORE (Gif-Sur-Yvette, Francia) (**Figura 8**).
- Micropipetas *Nichiryo*, *Nichipet* EX de 1000-5000 μL y *Thermo scientific*, *Finepipete* F2 de 100-1000 μL (**Figura 9**).
- Horno de aire *Selecta*, de 0-200 $^{\circ}\text{C}$ (Barcelona).
- Baño de agua *Thermostatic bath Thade Raypa* (**Figura 32**).
- Centrífuga C30P *B.Braun Biotech International* (**Figura 33**).
- Cromatógrafo líquido- generador hidruros-detector fluorescencia atómica (HPLC-HG-AFS) (**Figura 34**).
- Congelador a -19 $^{\circ}\text{C}$.



Figura 32. Baño de agua



Figura 33. Centrífuga



Figura 34. HPLC-HG-AFS

3.3.1.2 Material

- Material de vidrio como tubos, vasos de precipitados, embudos, probetas y matraces aforados de diversas medidas (**Figura 13**).
- Tubos de centrifuga de HDPE de 60 mL con tapa (**Figura 35**).
- Papel de filtro cuantitativo sin cenizas ALBET 145, *Filalbet, S. L.* Gramaje (g/m^2)=80; velocidad de filtración Herzberg ($\text{s}/1000 \text{ mL}$)=383; diámetro del poro (μm)=7-11; cenizas (%) $\leq 0,007$.
- Filtros de Nylon de 45 micras (**Figura 36**).
- Viales pequeños (**Figura 37**)



Figura 35. Tubos centrífuga



Figura 36. Filtros



Figura 37. Viales

3.3.1.3 Reactivos

- Agua ultrapura desionizada mediante el sistema Milli-Q (MILLIPORE, Gif-Sur Yvette, Francia), de resistividad específica = 18,2 MΩ/cm.
- Ácido trifluoroacético, TFA, con una pureza del 98% de la marca Sigma Aldrich (USA).
- Hidróxido de sodio, NaOH, con una riqueza del 98 %, de la marca *Panreac Química*, máximo de impurezas de arsénico de 0,00004 %.

- Ácido clorhídrico, HCl, concentrado al 37 % de la marca *Merk*. Con garantía de contenido máximo en arsénico de 0,010 mg/kg.
- Borohidruro sódico, NaBH₄, con una pureza del 99 %, de la marca *Acros Organic*.
- Agente reductor (generador de hidruros): Se disuelve 4 g de NaOH en 800 mL de agua ultrapura y se añaden 14 g de borohidruro, agitando hasta su disolución y se enrasa hasta 1 L con agua ultrapura (1,4 % NaBH₄ + 0,1 M NaOH).
- Medio ácido para la generación de hidruros (HCl 12,5 %): Se toman 125 mL de HCl concentrado y se enrasa hasta 1 L con agua ultrapura.
- KH₂PO₃, con garantía de un máximo de arsénico de 0,00005 %.
- K₂HPO₄, con garantía de un máximo de arsénico de 0,00005 %.
- Sodio meta-arsenito, NaAsO₂, con una pureza del 98 %, de la marca *Panreac Química*.
- Na₂HAsO₄ * 7 H₂O.
- (CH₃)₂AsNaO₂ * 3 H₂O.
- Monosodium acid methane arsonato, CH₄AsNaO₃ * 1,5 H₂O, con una pureza 99,5 % de la marca Chem Service.

3.3.1.4 Limpieza

Como en otros estudios (Laserna, 1985; Pomeranz *et al.* 1984; Cornelis, 1993), se enfatizó la necesidad de una limpieza exhaustiva del material de vidrio y de porcelana usado en este trabajo. Para ello se lavó previamente con agua desionizada y jabón neutro y sin fosfatos (*Derquim* LM 02) y posteriormente enjuagado con agua ultrapura. Tras este lavado inicial se realizó un baño con una disolución de ácido nítrico (HNO₃) al 30 % (v/v) durante 24 horas. Tras este periodo se enjuagó con agua desionizada seguida de agua ultrapura desionizada por triplicado para ser secado finalmente al aire.

3.3.1.5 Recomendaciones generales

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

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

3.3.2 MUESTRAS

3.3.2.1 Muestras de arroz de Irán

Las muestras analizadas son las descritas en el apartado **3.2.2.2.**

Muestras de arroz de Irán (Tabla 7).

3.3.2.2 Preparación de la muestra

Las muestras objeto de estudio se molieron en un *Molino con mortero RM100 (Figura 6)* hasta la obtención de la harina homogénea de arroz. A continuación cada una de las muestras se envasó en bolsas de plástico cerradas herméticamente y debidamente codificadas. Se introdujeron en un desecador para evitar la rehidratación durante todo el experimento (**Figura 29**).

3.3.3 MÉTODO ANALÍTICO

3.3.3.1 Determinación de especies de As (As (III), As (V), AMMA y ADMA).

El método analítico utilizado para la extracción de las especies arsenicales (As (III), As (V), AMMA y ADMA) fue descrito por Heitkemper Vela *et al.* (2001) y por Signes-Pastor *et al.* (2008c). Consiste en una extracción con ácido trifluoro-acético, método en el que se extrae perfectamente las especies inorgánicas y orgánicas de la muestra (en nuestro caso, diferentes tipos de arroz molido y seco). Tras la extracción durante 6 horas, se aplica una fuerza centrífuga para obtener el sobrenadante, a continuación se realiza un filtrado para poder realizar la determinación de forma correcta (**Figura 38**). Hasta la medición de las especies arsenicales, se mantienen las muestras a -19°C .

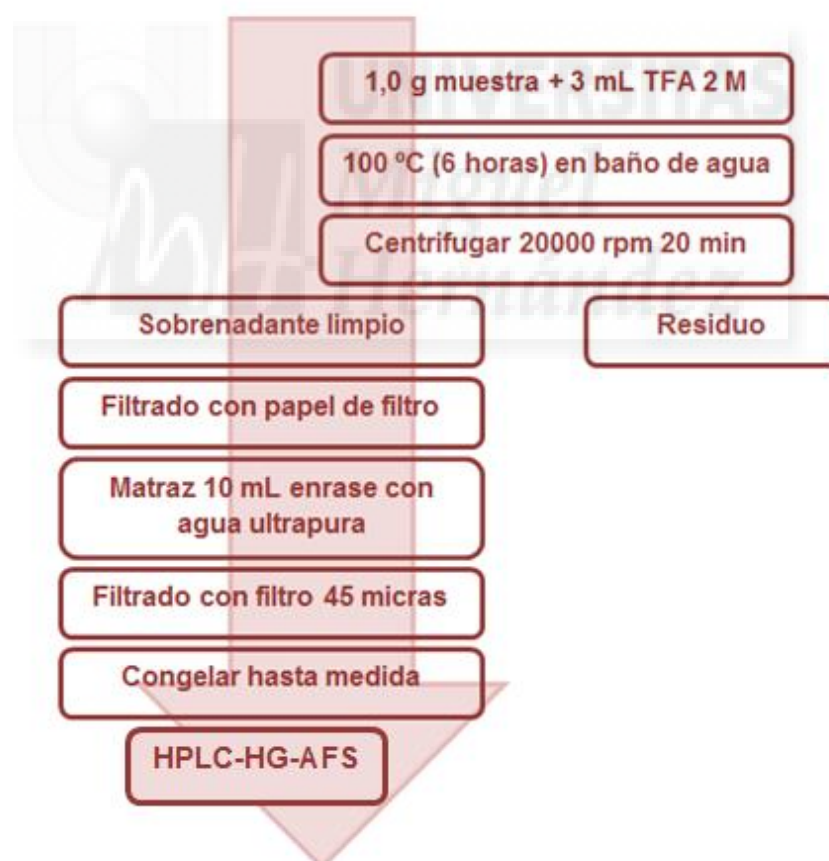


Figura 38. Método analítico empleado para la especiación del As.

3.3.3.1.1 Medición de las especies de As [As (III), As (V), AMMA y ADMA] mediante HPLC - HG - AFS.

Esta técnica consiste en el acoplamiento de un generador de hidruros en un equipo HPLC con un detector de fluorescencia atómica.

El equipo usa la cromatografía de cambio aniónico fuerte (Strong Anion Exchange, SAX) para separar el arsénico en sus especies orgánicas e inorgánicas [As (III), As (V), AMMA y ADMA]. El SAX va reteniendo en la columna las diferentes especies y cada una de ellas tarda un tiempo concreto y diferente en atravesarla.

Tras la separación de las especies arsenicales, éstas pasan por el generador de hidruros, el cual las formas inorgánicas [As (III), As (V)] se transforman en arsina (H_3As) y las formas orgánicas AMMA y ADMA, se transforman en dimetilarsina. Esta etapa está formada por un sistema reductor gracias al borohidruro en medio ácido unido a un separador gas – líquido.

La última fase del equipo es el detector de fluorescencia atómica. La fluorescencia atómica es un proceso de desactivación de la radiación que existe tras la excitación de los átomos libres por la absorción de radiación de una longitud de onda específica desde una fuente de excitación apropiada (Mester and Fodor, 1997).

El funcionamiento de esta técnica se explica a continuación:

Una vez obtenido el sobrenadante de la muestra limpio y filtrado como se ha explicado anteriormente, se descongela y se inyectan 200 μL de ésta, uniéndose mediante un *loop* al caudal llamado fase móvil y pasa a la columna HPLC SAX donde realiza un gradiente cambiando a mayor concentración la solución fosfato.

De los 200 μL inyectados, solamente se analizan 50 μL siguiendo las condiciones cromatográficas adecuadas. La separación de las diferentes especies de arsénico tiene lugar en 15 minutos, con un caudal de la fase móvil de 0,8 mL/min. El orden en el que se separan según los tiempos de retención (obtenidos al realizar las rectas de calibrado de cada una de las especies ya

que varían según las condiciones experimentales) en la pre-columna y la columna es el siguiente: As (III), ADMA, AMMA y As (V).

La generación de hidruros de arsénico ocurre aparte, añadiendo HCl y NaBH₄ con una bomba peristáltica, ambos con caudal de 2 mL/min.

El arsénico volátil es alcanzado por el separador gas-líquido mientras que el argón arrastra éste hasta el detector. Previamente a la detección, el flujo de gas es secado con un tubo secador de membrana higroscópica. Otro flujo de argón (100 mL/min) en el generador de hidruros mejora el transporte al separador de gas-líquido.

Una vez separados llega al sistema de detección por fluorescencia y gracias al *software* se pueden obtener los tiempos de retención, el área generada y por tanto las concentraciones de cada una de las especies de cada una de las muestras.

Las condiciones instrumentales fueron las siguientes:

Tabla 10. Parámetros HPLC

Fase móvil	1,36 g KH ₂ PO ₃ y 1,74 g K ₂ HPO ₄ en 1L agua ultrapura ajustar pH 6 con HCl 50 %.
Volumen inyectado	50 µL
Caudal	0,8 mL/min

Tabla 11. Parámetros generador de hidruros

Medio ácido	12,5 % HCl
Agente reductor	1,4 % (m/v) NaBH ₄ + 0,1M NaOH
Caudal de argon	200 mL/min en el separador g-l

Al mismo tiempo, se midieron patrones realizados previamente con los que se realizará la recta de calibrado. Para ello se partió de las sales arsenicales: NaAsO_2 , $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, $\text{CH}_4\text{AsNaO}_3 \cdot 1,5 \text{H}_2\text{O}$ y $(\text{CH}_3)_2\text{AsNaO}_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$.

A partir de las sales se realizaron patrones 1000 ppm (mg/L) de cada una de las especies que se midieron [As (III), As (V), AMMA y ADMA]. A partir de éstas se realizaron las disoluciones intermedias de 1 ppm (mg/L) (**Figura 39**) hasta obtener concentraciones de 10, 20, 30, 40 y 50 ppb ($\mu\text{g/L}$) (**Tabla 12**).

Los patrones para la especiación del arsénico son patrones multiespecies, es decir, en la misma disolución se añaden la misma concentración de los diferentes compuestos.

Figura 39. Obtención de las disoluciones intermedias de cada una de las especies arsenicales.

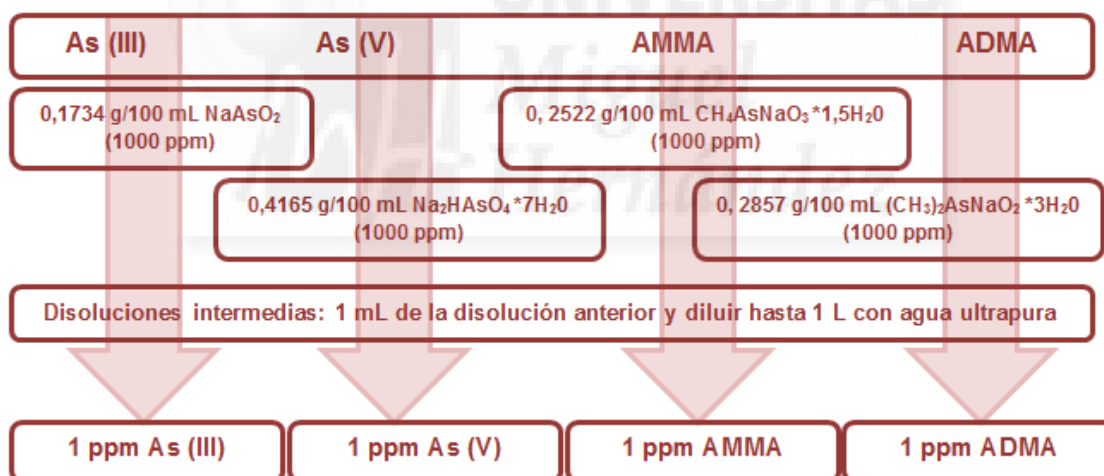


Tabla 12. Patrones para la especiación del arsénico.

Patrones (ppb)	mL 1 ppm As (III)	mL 1 ppm As (V)	mL 1 ppm AMMA	mL 1 ppm ADMA	mL enrase
10	1	1	1	1	100
20	2	2	2	2	100
30	3	3	3	3	100
40	4	4	4	4	100
50	5	5	5	5	100

3.3.3.1.2 Tratamiento estadístico

Los datos resultantes de esta determinación fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA) y Test de Rangos Múltiples (Test de Tukey) tras previamente calcular el valor medio y la mediana.

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el paquete estadístico STATGRAPHICS 5.0 Plus.



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La exposición de As a través de la alimentación es un factor de elevada importancia para el ser humano. El arroz, como se ha mencionado en el apartado de Introducción, es un cereal de gran consumo a nivel mundial, sobre todo en determinados países donde es la base de la alimentación. La forma de producción del arroz en los cultivares son óptimos para concentrar As en el grano. Además del consumo de arroz propiamente dicho, hoy en día se realizan cada vez más productos a partir de este cereal debido a la celiaquía existente.

No existe un nivel máximo de ingesta de As en los alimentos al igual que no existe un límite máximo legal de este metaloide en los alimentos, solamente existen recomendaciones. La Unión Europea está desarrollando una serie de métodos oficiales para la determinación de As-t y As-i, éste último como se ha mencionado es el más peligroso para el ser humano. De la misma forma se está agrupando una serie de datos de niveles de As-t y As-i que presentan el arroz y otros alimentos en los diferentes países de la Unión Europea y en el resto de mundo para poder establecer un límite de As para poder ser comercializados.

A continuación se exponen los resultados obtenidos del estudio de las diferentes variedades de arroz analizadas procedentes de Irán.

4.1. ARSÉNICO TOTAL

4.1.1. CONTENIDO DE ARSÉNICO TOTAL EN MUESTRA DE REFERENCIA

Se requiere el uso de una muestra de referencia para la cuantificación de As-t, ya que se puede comprobar el correcto funcionamiento del análisis de cuantificación y del protocolo inicial. Esta muestra sigue el mismo proceso que el resto de muestras. Como se conoce la concentración de As-t de dicho material, según *LGC Deselaers*, se puede comparar con la concentración que se obtiene tras el experimento.

El valor de la muestra de referencia obtenido durante el estudio se muestra en la **Tabla 13**. Los resultados tras la medición son similares a los teóricos, no se encuentran diferencias significativas. Con el resultado obtenido se asegura el buen funcionamiento de los protocolos utilizados para el tratamiento de las muestras y la cuantificación de As-t.

Tabla 13. Valores de As-t en el material de referencia.

As-t LGC Deselaers ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	As-t Experimental ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
125 \pm 30	121 \pm 80

El grado de contaminación durante el experimento debido a los reactivos utilizados se puede comprobar mediante el uso de blancos. El contenido de As-t obtenido en estos se han restado de los valores experimentales obtenidos en las muestras estudiadas.

4.1.2. ARSÉNICO TOTAL EN LAS MUESTRAS DE ARROZ ANALIZADAS

4.1.2.1. Calibración inicial para la determinación de Arsénico total en las muestras de arroz

La obtención de la concentración de As-t de las muestras mediante espectrometría de absorción atómica exige la realización de una curva patrón a partir de concentraciones conocidas cada vez que se mida en el equipo relacionándolas con la absorbancia medida por el equipo.

Para obtener la curva patrón se prepararon 6 patrones de As de concentraciones diferentes de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 $\mu\text{g}/\text{L}$.

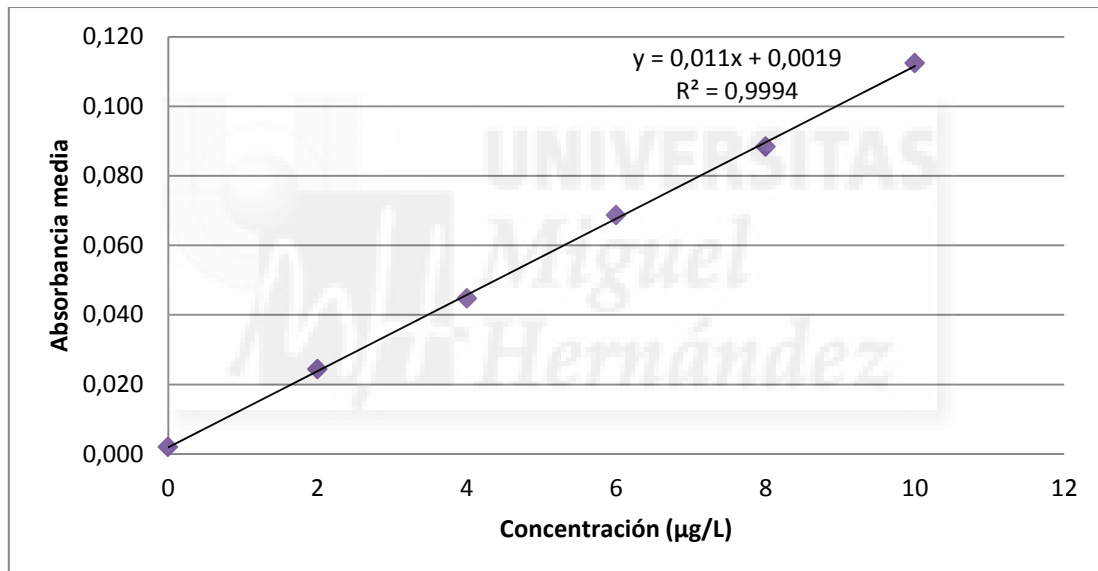
La determinación de As-t de las muestras se realizó en diferentes días, por lo que cada uno de ellos se realizó una curva patrón.

Los datos de absorbancia que se presentan son los promedios de las diferentes rectas patrones obtenidas (**Tabla 14**). A partir de ellos, se estableció la relación lineal mostrada en la figura que sigue a la tabla correspondiente (**Gráfico 3**). El coeficiente de determinación obtenido (R^2), fue 0,9994, siendo un valor aceptable para el análisis de As en este tipo de muestras y a niveles de $\mu\text{g}/\text{L}$.

Tabla 14. Absorbancia para patrones de arsénico total con concentración conocida.

Concentración (µg/L)	Absorbancia media
0	0,002
2	0,024
4	0,045
6	0,069
8	0,088
10	0,112

Gráfico 3. Recta de calibrado para la cuantificación de As-t en las muestras.



Mediante las ecuaciones obtenidas de cada una de las medidas de las rectas patrón se obtendrá la concentración de As-t de las muestras, teniendo en cuenta las diluciones realizadas y la contaminación de los blancos debida a los reactivos y la preparación de las muestras.

4.1.2.2. Resultados de Arsénico total en las muestras de arroz

Los resultados obtenidos para las muestras de arroz son los mostrados en la **Tabla 15**. Las especificaciones de cada una de las muestras analizadas se encuentran en la **Tabla 7 (3. Materiales y métodos)**.

Tabla 15. Concentraciones de As-t, expresadas en $\mu\text{g}/\text{kg}$ y mg/kg , en los diferentes tipos de arroces analizados procedentes de Irán.

Muestra	As-t ($\mu\text{g}/\text{kg}$)*	ES**
1	135	± 6
2	134	± 7
3	93,9	± 5
4	67,6	± 2
5	133	± 3
6	141	± 7
7	50,8	± 0
8	95,5	± 2
9	105	± 6
10	125	± 5
11	61,4	± 5
12	75,6	± 2
13	128	± 0
14	248	± 5
15	233	± 6
Media	122	± 4
Mediana	125	± 5

*Los valores son media de tres repeticiones; **los valores \pm representan el error estándar de las medias.

Las muestras 1, 2, 4, 5 y 6 son de Guilan, al norte de Irán, las cuales son bañadas por el agua del río Sepidroud, excepto la muestra 6 que es por el río Sha Faoud. En esta zona los valores obtenidos se encuentran entre los $60 \mu\text{g As-t}/\text{kg}$ y $161 \mu\text{g As-t}/\text{kg}$. Las muestras 1, 5 y 6 se tratan tras la recolección mediante un proceso de ahumado en el propio cultivar.

Las muestras 3, 7, 8, 9, 10 y 12 son de Mazandaran, al norte de Irán, las cuales tienen diferente tipo de irrigación. Las muestras 7 y 8 están bañadas por el río Sorkhroud, mientras que las muestras 3, 9, 10 y 12 por el río Haraz. En la

muestra 3, un 20 % del tipo de irrigación viene por los pozos subterráneos. Los valores de As-t de las muestras mencionadas de Manzadaran se encuentran entre 35 µg/kg y 137 µg/kg. Las muestras bañadas por el Río Sorkhroud se encuentran entre 35 µg/kg y 77 µg/kg, mientras que las que son bañadas por el Río Haraz están entre 76 µg/kg y 137 µg/kg. El valor máximo en esta zona coincide con la muestra 3 que el 20 % de su irrigación es de pozos subterráneos, con un valor de As-t de 137 µg/kg.

En el caso de la muestra 11 del Sur de Irán (Khouzestan) el valor obtenido de As-t, con un tipo de irrigación total de pozos subterráneos, es 14 µg/kg.

La muestra 13 tiene su origen en el centro de Irán (Isfahan) donde la irrigación viene dado por el río Zayanderud, su valor de As-t es 115 µg/kg.

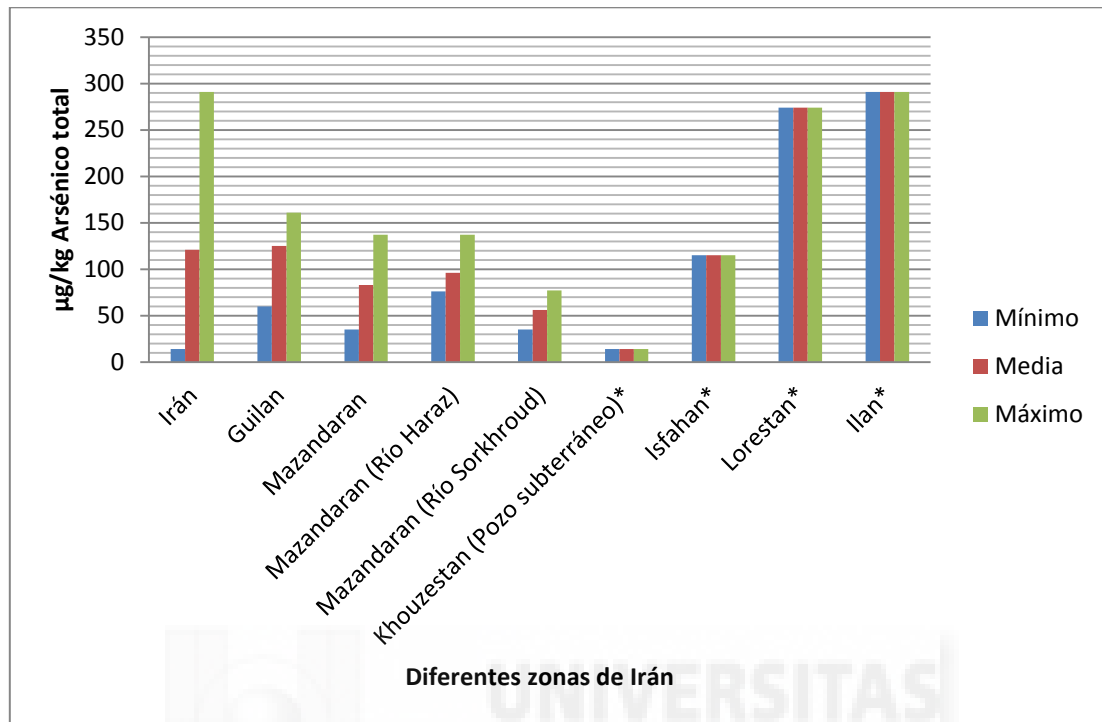
Por último, las muestras 14 y 15 que provienen del Oeste (Lorestan e Ilan, respectivamente) tienen valores de As-t de 274 y 291 µg/kg respectivamente. El tipo de irrigación de la muestra 14 proviene de los pozos subterráneos, mientras que en la muestra 15 proviene del Río Seimare.

En las **Gráfico 4** y **Gráfico 5** se muestran a modo resumen las diferentes zonas de Irán donde se han analizado diferentes arroces con el valor mínimo, media y máximo de As-t detectados (µg/kg), ya que como se ha mencionado en la Introducción, existen diferentes zonas de cultivo y éstas son muy diferentes entre sí en cuanto a la climatología, variedades de arroz cultivadas y tipo de irrigación. Por ello, las concentraciones obtenidas en cada una de ellas son muy diferentes entre sí.

Los datos resultantes de esta determinación fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA) y Test de Rangos Múltiples (Test de Tukey) tras previamente calcular la media y la mediana. Se realizó teniendo en cuenta la situación de los cultivares en el país (Norte, Centro, Oeste y Sur). Las observaciones que podemos realizar son las siguientes ($p < 0,001$):

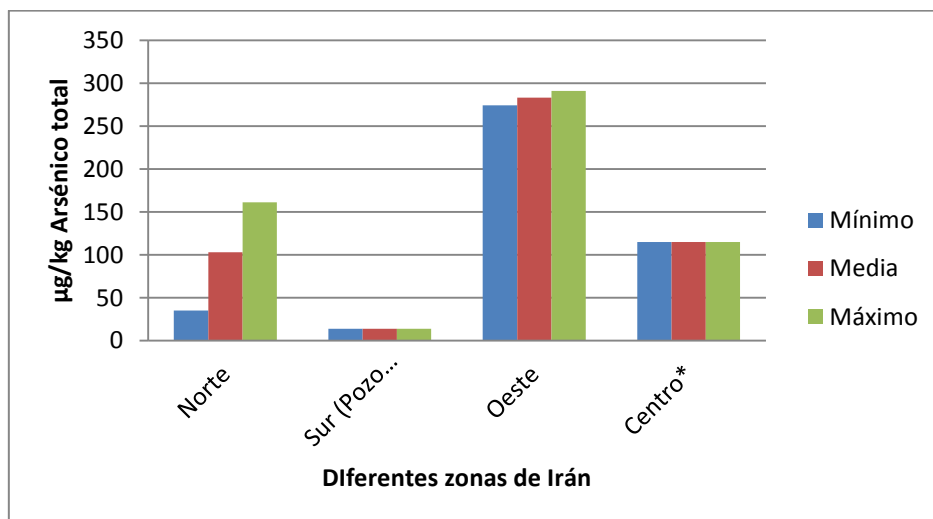
- Existen diferencias significativas entre las muestras procedentes del Oeste del país respecto a las procedentes del Norte, Centro y Sur.
- Entre Norte, Centro y Sur no existen diferencias significativas entre sí

Gráfico 4. Valores mínimos, medios y máximos de As-t ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en diferentes provincias de Irán.



*Al disponer de una sola muestra de esta zona, los valores mínimos, medias y valores máximos coinciden.

Gráfico 5. Valores mínimos, medios y máximos de As-t ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en diferentes zonas de Irán.



*Al disponer de una sola muestra de esta zona, los valores mínimos, medias y valores máximos coinciden.

En la Introducción se mencionó la cantidad consumida de arroz según FAOSTAT 2013 por persona y día, según el dato que nos ofrece 0,063 y 0,095 kg/persona/día, elaborado y cáscara respectivamente, podemos calcular que al año una persona iraní consume alrededor de 23 y 35 kg de arroz elaborado y cáscara respectivamente.

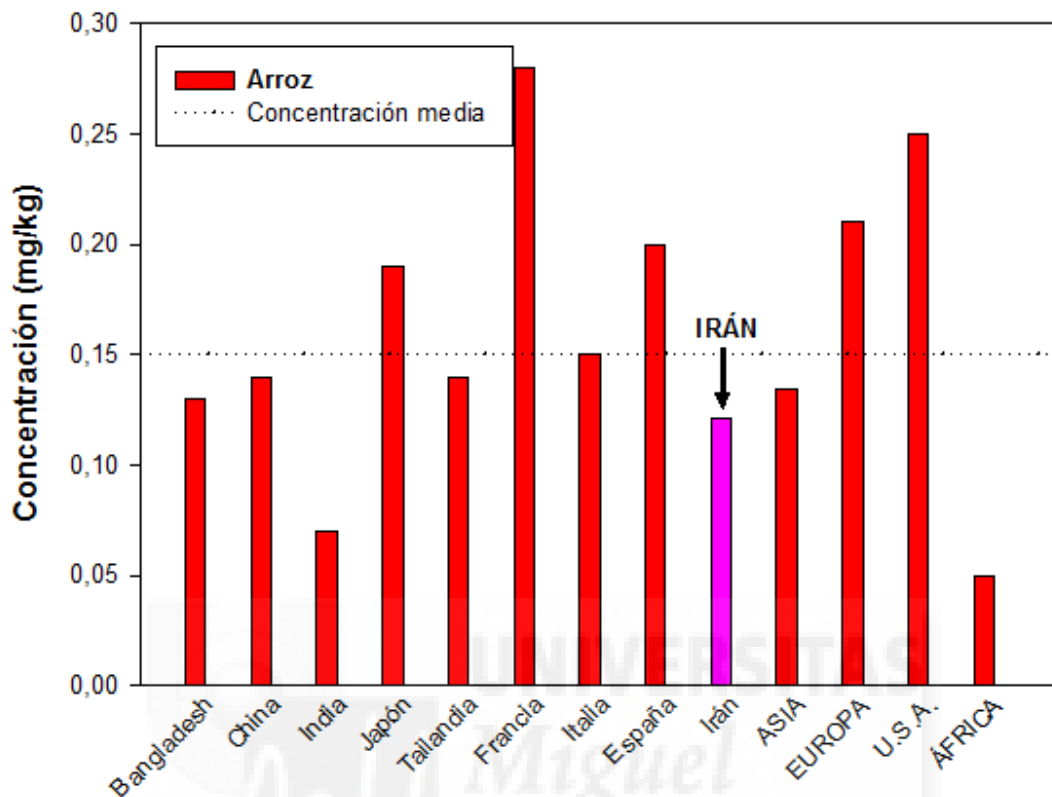
Si utilizamos la concentración mínima y máxima obtenida de As-t en este trabajo fin de grado con los datos que nos ofrecen en el párrafo anterior, podemos conocer la exposición aproximada de la población iraní al arsénico (Tabla 16).

Tabla 16. Exposición aproximada de As-t en la población de Irán.

Tipo de arroz	Mínima exposición (µg/persona/año)	Máxima exposición (µg/persona/año)	Media exposición (µg/persona/año)
Elaborado	322	6693	3508
Cáscara	490	10185	5338

Meharg *et al.* (2009) analizaron el contenido de As en arroces de diferente origen. A continuación se comparan los datos obtenidos de Irán en este trabajo con los demás países analizados por el equipo mencionado (Gráfico 6).

Gráfico 6. Comparación datos obtenidos por Meharg *et al.* (2009) de diferentes países y los obtenidos en el presente trabajo de Irán.



Se observa que el promedio de todas las muestras de arroz analizadas en el presente trabajo está por debajo de la concentración de As-t que presenta las muestras que analizaron el equipo de Meharg *et al.* (2009) en España. Por otro lado, se ha mencionado anteriormente que el consumo por persona y día de arroz en Irán duplica a la de España (FAOSTAT 2013), por tanto la exposición de la población iraní es mayor a la de España.

En la Introducción se menciona que el único país que tiene límites establecidos bastante restrictivos en cuanto a la concentración de As-t en el arroz es China, siendo de 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$, por lo que las muestras analizadas sí podría comercializarse en el país.

4.2. ESPECIACIÓN ARSÉNICO

4.2.1. ESPECIES ARSENICALES EN LAS MUESTRAS DE ARROZ ANALIZADAS

4.2.1.1. Calibración para la determinación de las especies arsenicales en las muestras de arroz

Para conocer la concentración de cada una de las especies arsenicales [As (III), ADMA, AMMA y As (V)] mediante HPLC - Generador de hidruros - Detección por fluorescencia, se debe realizar una recta patrón a partir de las concentraciones conocidas, relacionándolas con el área obtenida (mV*s).

Se prepararon 5 patrones multiespecies como se ha explicado en la **Tabla 12** (3. Materiales y métodos) con concentraciones de 10, 20, 30, 40 y 50 µg/L (ppb) de cada una de las especies arsenicales sujetas a ser analizadas [As (III), ADMA, AMMA y As (V)].

Los datos de las áreas obtenidas (mV*s) para cada una de las concentraciones se muestran en la **Tabla 17**, **Tabla 18**, **Tabla 19** y **Tabla 20**, para As (III), ADMA, AMMA y As (V), respectivamente. A partir de estas tablas, se establecieron las relaciones lineales mostradas en las **Gráfico 7**, **Gráfico 8**, **Gráfico 9** y **Gráfico 10**, para As (III), ADMA, AMMA y As (V), respectivamente. Los coeficientes de determinación (R^2), fueron 0,9914, 0,9967, 0,9981 y 0,9947 respectivamente, siendo valores aceptables para el análisis de las especies arsenicales mencionadas a niveles de µg/L.

Mediante las ecuaciones obtenidas de las rectas (**Gráfico 7**, **Gráfico 8**, **Gráfico 9** y **Gráfico 10**) se obtendrá la concentración de cada una de las especies arsenicales en cada una de las muestras, teniendo en cuenta las diluciones realizadas.

Tabla 17. Áreas para patrones de As (III) con concentración conocida junto al tiempo de retención.

As (III)		
Concentración (ppb)	t retención	Área (mV*s)
10	3,259	374,4731
20	3,219	749,2225
30	3,269	1165,5635
40	3,319	1669,3257
50	3,299	1910,4385

Gráfico 7. Recta de calibrado para la cuantificación de As (III) en las muestras.

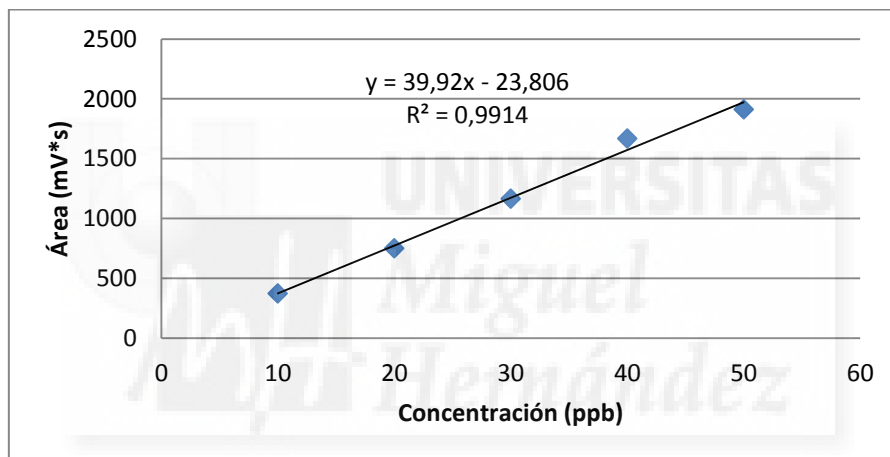


Tabla 18. Áreas para patrones de ADMA con concentración conocida junto al tiempo de retención.

ADMA		
Concentración (ppb)	t retención	Área (mV*s)
10	4,379	235,148
20	4,419	559,0228
30	4,469	903,1959
40	4,509	1171,7034
50	4,549	1439,3616

Gráfico 8. Recta de calibrado para la cuantificación de ADMA en las muestras.

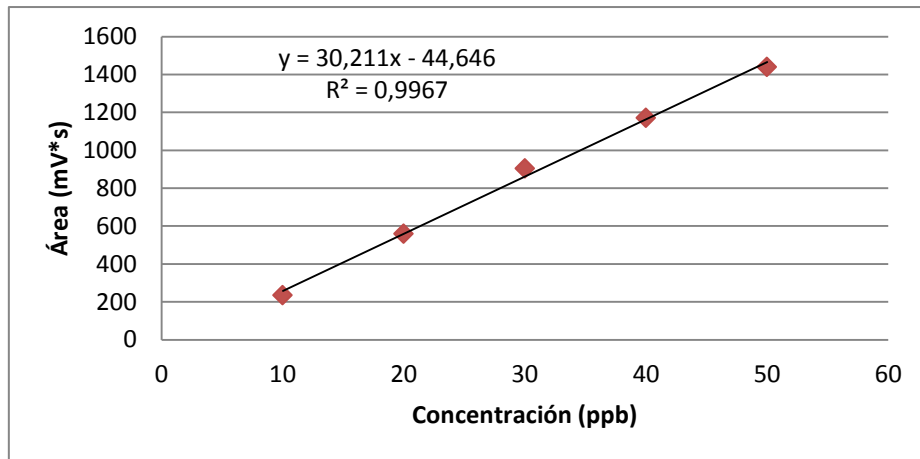


Tabla 19. Áreas para patrones de AMMA con concentración conocida junto al tiempo de retención.

AMMA		
Concentración (ppb)	t retención	Área (mV*s)
10	6,99	1678
20	6,99	3238
30	6,99	4871,4
40	6,99	6546,6
50	6,99	8502

Gráfico 9. Recta de calibrado para la cuantificación de AMMA en las muestras.

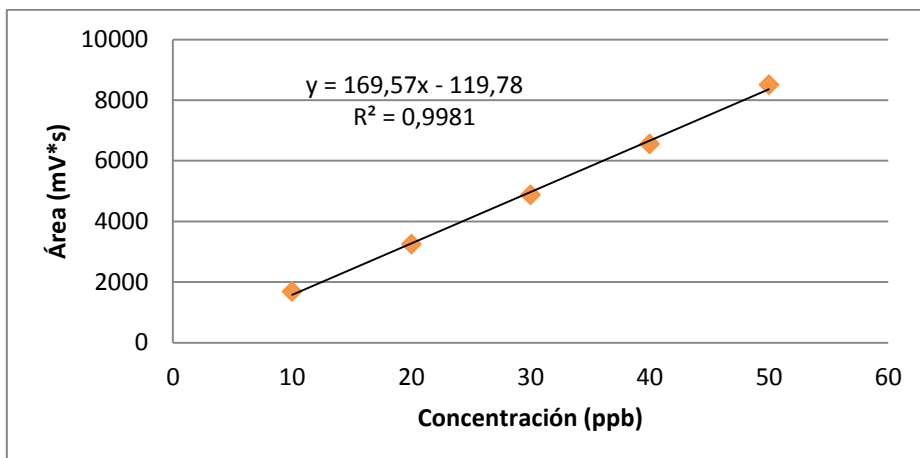
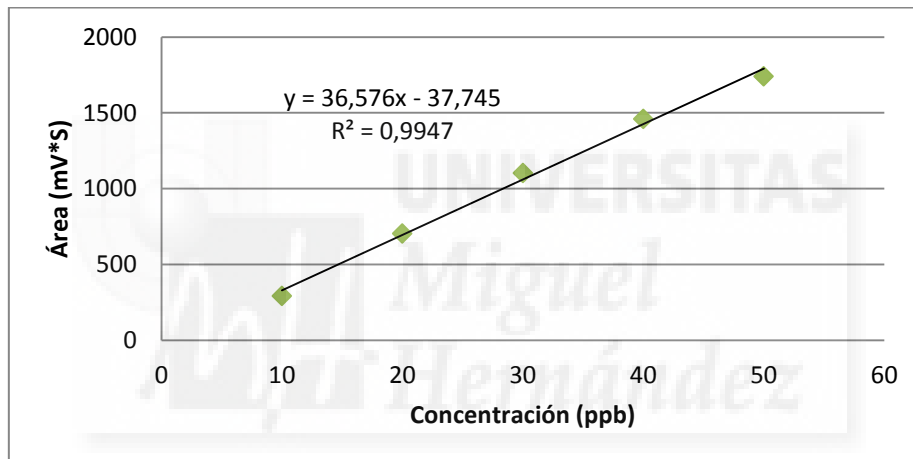


Tabla 20. Áreas para patrones de As (V) con concentración conocida junto al tiempo de retención.

As(V)		
Concentración (ppb)	t retención	Área (mV*s)
10	9,857	290,7529
20	9,947	702,8325
30	10,047	1103,0688
40	10,177	1460,0184
50	10,207	1740,9389

Gráfico 10. Recta de calibrado para la cuantificación de As (V) en las muestras.



4.2.1.2. Resultados de las especies arsenicales en las muestras de arroz

Los resultados obtenidos para las muestras de arroz son los mostrados en la **Tabla 21**.

Tabla 21. Concentraciones ($\mu\text{g}/\text{kg}$) de cada una de las especies arsenicales en cada una de las muestras.

Muestra	As (III) ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ADMA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	AMMA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	As (V) ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	As-i ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	As-o ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Suma especies ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
1	76,6	30,0	6,60	22,4	99,0	36,6	136
2	65,7	20,6	8,20	18,9	84,6	28,8	113
3	27,3	11,2	nd*	12,2	39,5	11,2	51,0
4	38,4	14,1	6,90	15,6	54,0	21,0	75,0
5	92,1	nd*	14,4	26,2	118	14,4	133
6	84,9	23,0	11,9	23,9	109	34,9	144
7	27,9	13,5	7,50	18,5	46,4	21,0	67,0
8	70,3	20,8	8,00	14,9	85,2	38,8	114
9	67,5	15,5	8,50	18,1	85,6	24,0	110
10	125	24,6	8,70	10,3	136	33,0	169
11	30,2	23,2	10,2	33,9	64,1	33,4	98,0
12	38,1	18,6	6,30	11,8	49,9	24,9	75,0
13	72,2	38,9	9,70	20,3	92,5	48,6	141
14	61,0	120	9,60	31,8	92,8	129	222
15	44,9	95,9	8,70	25,0	69,9	105	175
Media	61,0	34,0	9,00	26,7	82,0	40,0	121
Mediana	66,0	22,0	9,00	20,0	85,0	29,0	114

*nd significa que no existe suficiente concentración de ADMA/AMMA (en cada caso) en la muestra para ser cuantificada.

En la Introducción se menciona que el nivel máximo del Códex (NM) para el As-i en el arroz pulido es de 200 µg/kg. En todas las muestras analizadas no se supera esta concentración.

Los resultados obtenidos nos ofrecen una visión global del país en la que podemos decir que gran parte del As que presentan las muestras es As-i, excepto en dos de las muestras (14 y 15), en las que la mayor parte del As detectado está en forma de As-o.

Comparando la media y la mediana de las muestras, podemos mencionar que los valores de ambos son similares excepto en la cantidad de As-o donde la media es superior a la mediana. Se debe a que los valores tienden a valores cercanos a 29 µg/kg As-o, pero al tener dos muestras (14 y 15) valores muy superiores, la media alcanza el valor de 40 µg/kg.

Los datos resultantes de esta determinación fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA) y Test de Rangos Múltiples (Test de Tukey) tras previamente calcular la media y la mediana.

En el anterior análisis de varianza (As-t) se observaban diferencias significativas entre las muestras cultivadas en el Oeste respecto a las demás zonas. Se realizó de nuevo este análisis de varianza con las cantidades de As-i y As-o, para concretar a que se debía esa diferencia. Observando el As-i no existen diferencias significativas, mientras que el As-o muestra diferencias significativas respecto a las diferentes zonas. Por lo que la diferencia significativa entre el Oeste y el resto es la elevada cantidad que presenta de As-o.

En la Introducción se ha mencionado que las especies arsenicales inorgánicas son las que se deben controlar ya que provocan problemas en el ser humano. Con los resultados obtenidos podemos decir que el 67,8 % del As-t en todas las muestras analizadas es As-i.

En la **Tabla 22** se muestra la exposición de la población iraní al As-i, utilizando el porcentaje antes mencionado y los datos de FAOSTAT 2013.

Tabla 22. Exposición aproximada de As-i en la población de Irán.

Tipo de arroz	Mínima exposición ($\mu\text{g}/\text{persona}/\text{año}$)	Máxima exposición ($\mu\text{g}/\text{persona}/\text{año}$)	Media exposición ($\mu\text{g}/\text{persona}/\text{año}$)
Elaborado	218	4539	2378
Cáscara	322	6906	3619

Junto con los datos obtenidos y los datos de consumo de FAOSTAT 2013, una persona de 60 kg con un consumo entre 23 y 35 kg arroz al año, en una semana consume alrededor de 0,5 kg, por tanto, la ingesta semanal de As-i sería entre 0,33 y 1,13 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a la semana siendo el valor mínimo y máximo obtenido respectivamente.

Según el comité de expertos de la FAO y la OMS (JEFCA) propuso como ingesta tolerable semanal provisional (ISTP) de As-i el valor siguiente:

- 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a la semana (2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ al día).

Por lo que los valores obtenidos no superan al ISTP.

Como se ha comentado anteriormente, el único estándar que existe en el mundo sobre As en arroz lo tiene China con 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de As-i, por lo que las muestras analizadas entran dentro de este límite establecido.

4.3 COMPARACIÓN DE LOS DOS MÉTODOS

El valor obtenido en la determinación de As-t debe ser similar a la suma de los valores de las especies arsenicales. En la **Tabla 23** se muestran ambos valores para su comparación.

Tabla 23. Comparación de los valores del As-t y la suma de las especies obtenidas.

Muestra	As-t ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Suma As-i y As-o ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
1	135	136
2	134	113
3	93,9	51,0
4	67,6	75,0
5	133	133
6	141	144
7	50,8	67,0
8	95,5	114
9	105	110
10	125	169
11	61,4	97,5
12	75,6	74,8
13	128	141
14	248	222
15	233	175
Media	122	121
Mediana	125	114

Se observa una diferencia significativa entre algunos de los valores en algunas muestras, se debe tener en cuenta que puede ser debido a la heterogeneidad de las muestras al realizar la operación de molienda de las muestras. De la misma forma puede ser debido a que en la fase de almacenamiento las partículas más finas se hayan situado en la parte inferior y las más gruesas en la parte superior. Aun así, la media obtenida al sumar las especies arsenicales coincide con la media de As-t.

5. CONCLUSIONES

- La ingesta de As-t y As-i, a partir de los productos estudiados, no superó la Ingesta Semanal Tolerable Provisional, ISTP (15 µg/kg), propuesta por la OMS ni la EFSA. Por ello no existe riesgo para la salud en la población iraní. Aunque la incorporación de otros alimentos a la dieta puede aumentar la ingesta de este contaminante hasta niveles que sí pueden ser o llegar a ser peligrosos.
- El contenido medio de As en Irán es inferior a la media de este parámetro de otros países.
- El contenido de As-i, de los productos analizados, no superó el límite establecido del estándar de calidad de China (150 µg/kg). Por lo que podría comercializarse estos productos en dicho país cumpliendo con su legislación.
- Las elevadas concentraciones de As-o de los cultivares de arroz de la zona Oeste de Irán probablemente sea debida, entre otros factores, al uso de determinados fertilizantes y/o pesticidas, o bien, por las características del suelo.

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

- Aunque la ingesta de As no supere la ISTP recomendada, se cree que es inadmisibles que la población infantil o personas celíacas estén expuestas a esas concentraciones de As. Ya que la ISTP no diferencia entre niños y adultos, ni entre personas celíacas. Los niños tienen un metabolismo más sensible a los contaminantes; además, no hay evidencias científicas que describan los riesgos asociados a este tipo de contaminación en niños.

- Algunas opciones posibles para limitar este problema son:
 - Utilizar cultivares de arroz con absorción restringida de As (mediante prácticas de cultivo aeróbicas) para que no se transporte el metaloide hasta el grano comestible.
 - Abastecerse con arroz de las regiones con bajos contenidos de As, especialmente de As-i.
 - Emplear procedimientos de cocción que utilicen un mayor volumen de agua para favorecer la migración de As desde el grano hacia el agua de cocción.



6. BIBLIOGRAFÍA

- Alegría, A., Barberá, R., Farré, R., Lagarda, M.J. (1990).** Lead, cadmium and chromium content of edible vegetables grown in three different agricultural areas. *Food Additives and Contaminants*, 7: 25-22
- AOAC** (Asociation of Official Analytical Chemists).1990. Official methods of analysis. Ed. *Helrich K.*, Virginia (EEUU).
- Arnold W. 1987.** Arsenic. pp. 79-93. EN: Handbook on Toxicity of Inorganic Compounds. H.G. Seiler y H. Rigel (eds.). Marcel Dekker, New York (USA).
- ATSDR, 1989.** Decision guide for identifying substance-specific data needs related to toxicological profiles; Notice. *Federal Register*, 54: 37618-31634.
- Barberá, R., Farré, R., Lozano, A. (1989).** Oral intake of cadmium, lead, cobalt, chromium, nickel, copper, manganese and zinc in the Spanish diet, estimated by a duplicate meal study. *Journal of Micronutrients Analysis*, 6: 57-47.
- Blanco, J.C., López, F.A., Cirugeda, M.E. (1991).** Generalidades sobre contaminación metálica de los alimentos. Causas medioambientales de procesado y envasado. *Alimentaria*, 233: 31-25
- Burló, F., Rarmírez-Gandolfo, A., Signes-Pastor, A. J.Haris, P.I., Carbonell-Barrachina, A.A. (2012).** Arsenic Contents in Spanish infant rice, pureed infant foods, and rice. *Journal of Food Science*, 71: 19-15.
- Carbonell-Barrachina A.A., Burló F., Mitra K., Mataix J.J. (1995).** Arsénico en el sistema suelo-planta. Secretariado de publicaciones de la Universidad de Alicante, Alicante (España).
- Carbonell-Barrachina, A.A., Wu, X., Ramírez-Gandolfo, A., Norton, G.J., Burló, F., Deacon, C., Meharg. A.A. (2012).** Inorganic arsenic contents in rice based infant foods from Spain, UK, China and USA. *Environmental Pollution*, 163: 83-77.

- CEPA (Canadian Environmental Protection Agency). 1993.** List assessment report. Minister of supply and services Canada, Canada Communications Group. Ottawa (Canadá).
- Cornelis, R., Heinzow, B., Herber, R., Tomassen, J., Vather, M., Veseterberg, O. (1993).** Sample collection guidelines for trace elements in blood and urine. *Pure Applications of Chemistry*, 67: 1608-1575.
- Derache, J. 1990.** Toxicología y Seguridad de los Alimentos. (eds.). Omega. S.A., Barcelona (España)
- Dominguez Carmona, M. (2009).** El arsénico y la salud.
- Fabiani P.; Nguyen P.L. (1984)** La contamination des aliments para l'arsenic. *Ann. Fals. Exp.Chim*, 928: 341-331
- FAOSTAT, 2013** Visitada Marzo 2014
- Ghosh A.K., Bhattacharyya P., Pal R. (2004).** Effect of arsenic contamination on microbial biomass and its activities in arsenic contaminated soils of Gangetic West Bengal, India. *Environmental International*. 30: 491-399.
- Gibson, R.S, Cage, L.A. (1982).** Charges in hair arsenic levels in breast and bottle fed infants during the first year of onfancy. *Science Total Environment* 26: 40-33.
- Goyer R.A. 1986.** Toxic effects of metals. Pp. 582-635. EN: *Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons*, 4th ed. C.D. Klaasen, M.O. Amdur, J. Doull (eds.). McMillan, New York, NY (USA).
- Hasegawa, H., Matsui, M., Okamura, S., Hojo, M., Iwasaki, N., Sohrin, Y. (1999).** Arsenic speciaton including "hidden" arsenic in natural waters. *Appl. Organ. Chem.*, 13: 119-113.
- Heitkemper, D.T., Vela, N.P., Stewart, K.R., & Westphal, C.S. (2001).** Determination of total and speciated arsenic in rice by ion chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analysis of Atomic Spectrometry*, 16: 306-299.

Housecroft, C.E.; Sharpe, A.G. 2006. Química Inorgánica. (eds.). *Pearson Prentice Hall*. Pearson Education. S.A . (Reino Unido)

IARC (International Agency for Cancer Research). (1987). IAARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Overall Evaluation of Carcinogenicity. International Agency for Cancer Research, Lyon (Francia).

JEFCA (1981).

Juhasz, A., Smith, E., Weber, J., Rees, M., Rofe, A., Kuchel, T., Sasom, L., Nidu, R. (2006). In vivo Assessment of Arsenic Bioavailability in Rice and Its Significance for Human Health Risk Assessment. *Environmental Health Perspectives*, 114: 1831-1826.

Kreppel H., Baumam J.W., Liu J (1993). Induction of metallothionein by arseics in mice. *Fund Appl. Toxicol.* 20: 189-184.

Laserna S.S. 1985. Pérdidas y contaminación en análisis de trazas. *Química Analítica*, 4(1):1-22.

Maitani, T., Uchiyama. S., Saito, Y. (1987). Hydride generation-flame atomic-absortion spectrometry as an arsenic detector for high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 391: 168-161

Meharg A.A., Rahman M-M. (2003). Arsenic contamination of Bangladesh paddy field soils: implications for rice contribution to arsenic consumption. *Environmental Science Technology* 37: 234-229.

Meharg A.A. (2004). Arsenic in rice-understanding a new disaster for south-east Asia. *Trend Plant- Sci.* 9: 417-415.

Meharg, A.A., Williams, P.N., Adomako, E., Lawgali, Y.Y., Deacon, C. et al. (2009). Geographical variation in total and inorganic arsenic content of polished (white) rice. *Environmental Science and Technology*, 43: 1617-1612.

- Mester, Z. and Fodor, P. (1997).** Characteristics of the atomic fluorescence signals of arsenic in Speciation studies. *Spectrochimica Acta*, (Part B) 52: 1771-1763.
- Munera-Picazo, S., Ramón-Gandolfo, A., Burló F., Carbonell-Barachina A.A. (2014)** Inorganic and Total Arsenic Contents in Rice-based Foods for Children with Celiac Disease. *Journal of Food Science*, 79: 128-122.
- O'Neill, P. (1995)** Arsenic. En: Heavy Metals in Soils. Pp.105-121. (Ed. Alloway, B.J.) Blackie Academic & Professional, Londres.
- Pardo-Martínez, M.; Viñas, P.; Fisher, A. and Hill, S.J. (2001).** Comparison of enzymatic extraction procedure for use with directly coupled high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry for the speciation of arsenic in baby foods. *Analytica Chimica Acta*, 441: 36-29.
- Pomeranz, Y., Melona, C.E. (1984).** Food Analyses: Theory and practise. Ed. Chapman and Hall, Nueva York (EEUU).
- Roselló J. (2004).** El arroz un cereal maravilloso. *La Fertilidad de la Tierra*. 17: 29-26.
- Schumacher, M., Domingo, J.L., Llobet, J.M., Corbellá, J. (1993).** Dietary intake of copper, chromium, and zinc in Tarragona province, Spain. *Science of the Total Environment*, 132: 10-3.
- Sciandrello G., Caradonna F., Mauro M., Barbata G. (2004).** Arsenic-induced DNA hypomethylation effects chromosomal instability in mammalian cells. *Carcinogen*. 25: 417-413.
- Signes, A. J., Mitra, K., Burló, F., Carbonell-Barrachina, A.A. (2008a).** Effect of two different rice dehusking procedures on total arsenic concentration in rice. *European Food Research and Technology*, 226: 567-561.
- Signes, A. J., Mitra, K., Burló, F., Carbonell-Barrachina, A.A. (2008b).** Contribution of water and cooked rice to an estimation of the dietary intake

of inorganic arsenic in a rural village of west Bengal, India. *Food Additives and Contaminants*, 25: 50-41.

Signes, A. J., Mitra, K., Sarkhel, S., Hobbes, M., Burló, F., De Groot, W.T., Carbonell-Barrachina, A.A. (2008c). Arsenic speciation in food and estimation of the dietary intake of inorganic arsenic in a rural village of West Bengal, India. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 9474-9469.

Sun, H.W., Ha, J., Sun, J.M., Zhang, D.Q., Yang, L.L. (2002). Hydride generation or the direct determination of trace and ultra-trace level of arsenic and antimony in waters using derivative atomic absorption spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 374: 529-526.

Tsuda, T., Babazono, A., Ogawa, T., Hamad, H., Mino, Y., Aoyama, H. (1992). Inorganic arsenic: A dangerous enigma for mankind. *Applied Organometallic Chemistry*, 6: 322-309.

W.H.O (1981). Environmental Health Criteria 19. Arsenic. IPCS International Programme on Chemical Safety. WHO, Geneva (Suiza)

Williams P.n., Raab A., Feldmann J., Meharg A.A. (2007). High levels of arsenic in South Central US rice grain: consequences for human dietary exposure. *Environmental Science and Technology*. 41: 2183-2178