

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral para la obtención del Grado Académico de:

Doctor en Química

en el campo de: Química Analítica

Desarrollo de métodos analíticos para la determinación de elementos químicos de relevancia toxicológica y su especiación elemental en cereales por espectrometrías de masas

Autor: Lic. Jonatan Schlotthauer

Dirección: Dra. Mirna Sigrist

Programa de Investigación y Análisis de Residuos y Contaminantes Químicos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral (PRINARC – FIQ – UNL)

Jurado: Dra. Adriana María Sales, Dr. Héctor Casimiro Goicoechea, Dra. Mariela Pistón

Jurados Suplente: Dra. Alicia Mollo, Dra. María Alejandra Maine

Índice

Resumen	6
Abstract	8
1. Introducción	11
1.1. Aspectos toxicológicos y legislaciones	11
1.2. Especiación química	15
1.3. Metodologías analíticas	19
1.3.1. Técnicas instrumentales para análisis elemental	19
1.3.2. Preparación de muestras	22
1.3.3. Separaciones cromatográficas	25
1.3.4. Identificación de nuevas especies químicas.....	26
1.4. Elementos y especiación en cereales	30
1.5. Objetivos	35
1.5.1. Objetivo general.....	35
1.5.2. Objetivos específicos.....	35
2. Materiales y métodos.....	37
2.1. Reactivos y soluciones.....	37
2.2. Instrumentación	39
2.3. Muestras	39
3. Metales totales	42
3.1. Optimización instrumental	42
3.1.1. Selección de estándares internos.....	43
3.1.2. Selección de isótopos.....	46
3.1.3. Interferencia del Cl sobre el As	49
3.1.4. Uso de regresión ponderada para la calibración	51
3.1.5. Optimización de la secuencia de lavado	53
3.2. Estudios del tratamiento de muestra	59
3.2.1. Tratamiento de muestra por vía húmeda.....	60
3.2.2. Una primera comparación entre vía húmeda y vía seca	66
3.2.3. Ensayos de blancos en mufla.....	69
3.2.1. Conclusiones sobre el tratamiento de muestras por vía seca y vía húmeda	72
3.3. Método para la cuantificación de metales totales	73
3.3.1. Procedimiento.....	73
3.4. Validación del método.....	74
3.4.1. Linealidad	74

3.4.2.	Límite de detección y cuantificación	75
3.4.3.	Efecto de matriz	77
3.4.4.	Veracidad	78
3.4.5.	Precisión	83
3.4.6.	Conclusiones del proceso de validación	87
3.5.	Análisis de muestras	87
3.5.1.	Análisis estadístico	88
3.5.2.	Muestras de harina	89
3.5.1.	Muestras de arroz	95
3.5.2.	Muestras de Trigo	104
4.	Especiación	111
4.1.	Extracción	111
4.1.1.	Optimización multivariada	111
4.1.2.	Optimización del tiempo de extracción	115
4.2.	Estudio de la separación cromatográfica	117
4.2.1.	Condiciones experimentales	118
4.2.2.	Factores cromatográficos	120
4.2.3.	Cálculos semiempíricos	122
4.2.4.	Resultados	123
4.3.	Corrección con ISTD	140
4.4.	Método para el análisis de especiación de As	141
4.4.1.	Procedimiento	141
4.5.	Validación HPLC-ICP-MS	143
4.5.1.	Linealidad	143
4.5.2.	Límites de detección y cuantificación	144
4.5.3.	Efecto de matriz	145
4.5.4.	Veracidad	145
4.5.5.	Precisión	148
4.5.6.	Conclusiones del proceso de validación	150
4.6.	Análisis de muestras	150
4.6.1.	Muestras de arroz	150
4.6.2.	Muestras de harina	161
4.7.	Estudios sobre la identidad de Unk2	162
4.7.1.	Oxidación con H ₂ O ₂	162
4.7.2.	Comparación con extractos de algas marinas	163
4.7.3.	Análisis por HPLC-ESI-MS/MS	165

5. Conclusiones	173
Referencias.....	177
Anexo	187

Resumen

En esta tesis doctoral se desarrollaron dos métodos analíticos basados en ICP-MS para el análisis de muestras de cereales en grano y procesados, con especial énfasis en identificar y dimensionar los puntos críticos que frecuentemente deterioran la performance analítica a niveles ultratrazas. Esto se vuelve particularmente importante cuando se trata de elementos de relevancia toxicológica como los estudiados en este trabajo.

Por un lado, un método fue desarrollado para la cuantificación del contenido total de As, Cd, Pb y Hg a niveles ultratrazas. Se estudiaron distintas alternativas de tratamiento de muestra, dándole especial importancia a los valores del blanco, los cuales son determinantes para los límites de detección y cuantificación. También se estudió la influencia de potenciales interferencias en la determinación, como la presencia de Cl o C residual en la solución de muestra. Una digestión asistida por microondas, con HNO_3 7 mol/L y H_2O_2 , permitió obtener los valores de blanco más bajos, con una buena eficiencia de digestión y con una acidez final compatible con el instrumento. El método desarrollado fue validado, obteniéndose muy buenas cifras de mérito, y fue aplicado al análisis de muestras reales. Se analizaron distintos tipos y variedades de arroces y harinas de trigo obtenidas del mercado, y también semillas de trigo de distintas localidades. Se observaron niveles cuantificables de As, Cd y Hg en casi todas las muestras de arroz mientras que solo algunas tuvieron concentraciones cuantificables de Pb. En cuanto a las muestras de granos y harina de trigo, As y Cd fueron cuantificables en todas las muestras, pero Pb y Hg solo en algunas de ellas. Se realizaron análisis estadísticos y en algunos casos se observaron diferencias estadísticamente significativas entre tipos o variedades de un mismo cereal. En el caso del trigo, se observaron marcadas diferencias en la concentración según el sitio de producción.

Por otro lado, se desarrolló un método analítico para el análisis de especiación de As por HPLC-ICP-MS en las muestras mencionadas. Para la extracción de las especies de As de la muestra se encontró como condiciones óptimas el uso de HNO_3 0,14 mol/L, a una temperatura de 125 °C y un tiempo de extracción de 30 mi-

nutos en horno microondas. Con estas condiciones se obtuvo una eficiencia de extracción promedio del 94%. Se estudió exhaustivamente la separación cromatográfica, la cual fue basada en intercambio aniónico fuerte. Para ello se propuso el uso de dicarboxilatos como eluyentes, los cuales tienen ventajas sobre el carbonato o el fosfato, que son los eluyentes más usados. Se estudió una serie de dicarboxilatos y se relacionó su estructura química con el comportamiento cromatográfico observado. Los mejores resultados fueron obtenidos con oxalato de amonio. Utilizando oxalato de amonio a pH 8,33 y un gradiente de elución desde 5 mmol/L hasta 40 mmol/L se obtuvo una excelente separación cromatográfica en un tiempo de 6,5 minutos, la cual a su vez presentó una alta robustez en los tiempos de retención, incluso inyectando extractos en medio ácido sin dilución. El método desarrollado fue validado y nuevamente se obtuvieron muy buenas cifras de mérito. En cuanto a las muestras de arroz, pudieron cuantificarse las cuatro especies de As estudiadas (arsenito, arsenato, monometilarsinato y dimetilarsinato), además de que se encontraron picos cromatográficos de especies de identidad desconocida. Las cuatro especies estudiadas fueron cuantificables en la gran mayoría de las muestras y se observaron algunas diferencias según el tipo de arroz, especialmente al comparar el arroz refinado con el parbolizado o el integral. En las muestras de harina trigo se observó una clara predominancia de las especies inorgánicas y una mayor proporción de arsenato en las muestras de harina leudante.

Abstract

In this doctoral thesis, two analytical methods based on ICP-MS were developed for the analysis of grain and processed cereal samples, with special emphasis on identifying the critical points that frequently deteriorate analytical performance at ultratrace levels. This becomes particularly important when dealing with elements of toxicological relevance such as those studied in this work.

On one hand, a method was developed for the quantification of the total content of As, Cd, Pb and Hg at ultratrace levels. Different sample treatment alternatives were studied, with special attention given to blank values, which are crucial for detection and quantification limits. The influence of potential interferences on the determination, such as the presence of residual Cl or C in the sample solution, was also investigated. Microwave-assisted digestion, with 7 mol/L HNO₃ and H₂O₂, allowed obtaining the lowest blank values, with good digestion efficiency and final acidity compatible with the instrument. The developed method was validated, yielding very good figures of merit, and was applied to the analysis of real samples. Various types and varieties of rice and wheat flours obtained from the market, as well as wheat seeds from different locations, were analyzed. Quantifiable levels of As, Cd and Hg were observed in almost all rice samples while only some of them had quantifiable concentrations of Pb. As for wheat grain and flour samples, As and Cd were quantifiable in all samples, but Pb and Hg only in some of them. Statistical analyzes were carried out and in some cases statistically significant differences were observed between types or varieties of the same cereal. Marked differences in concentration were observed in wheat depending on the production site.

On the other hand, an analytical method for As speciation analysis by HPLC-ICP-MS in the mentioned samples was developed. For the extraction of As species from the sample, optimal conditions were found to be the use of 0.14 mol/L HNO₃ at a temperature of 125 °C and an extraction time of 30 minutes in a microwave oven. Under these conditions, an average extraction efficiency of 94% was achieved. The chromatographic separation was thoroughly studied, which was based on strong anion exchange. For this, the use of dicarboxylates as eluents was proposed, which have advantages over carbonate or phosphate, which are the most used eluents. A series

of dicarboxylates was studied and their chemical structure was related to the observed chromatographic behavior. The best results were obtained with ammonium oxalate. Using ammonium oxalate at pH 8.33 and a gradient elution from 5 mmol/L to 40 mmol/L, excellent chromatographic separation was achieved in 6.5 minutes, which also exhibited high robustness in retention times, even when injecting extracts in acidic medium without dilution. The developed method was validated, and again, very good figures of merit were obtained. Regarding rice samples, all four studied As species (arsenite, arsenate, monomethylarsonate, and dimethylarsinate) could be quantified, and chromatographic peaks of species of unknown identity were found. All four species studied were quantifiable in the vast majority of samples, and some differences were observed depending on the type of rice, especially when comparing refined rice with parboiled or whole rice. In wheat flour samples, a clear predominance of inorganic species and a higher proportion of arsenate in the self-rising flour samples were observed.

Capítulo 1

Introducción

1. Introducción

Argentina es uno de los mayores productores y exportadores de materias primas y productos agropecuarios, siendo los cereales uno de los ejes centrales de dicha producción. La capacidad productiva de nuestro país permite que, además de procurar el abastecimiento total del mercado interno, algunos cereales como trigo, arroz y maíz sean también exportados. Esto hace que sea de especial interés conocer la calidad nutricional y seguridad alimentaria de los cereales producidos.

1.1. Aspectos toxicológicos y legislaciones

Plomo, cadmio, arsénico y mercurio son los principales elementos químicos que normalmente se consideran tóxicos, estando los cuatro en la lista de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de las diez sustancias químicas de mayor preocupación para la salud pública [1]. Estos elementos presentan tanto toxicidad aguda como crónica [2-5]. A su vez, se ha comprobado la carcinogenicidad del Cd y sus compuestos [6] y del As y sus compuestos inorgánicos [6], mientras que los compuestos inorgánicos de Pb se consideran probablemente carcinogénicos [7]. Según la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), el mercurio y sus compuestos inorgánicos actualmente se encuentran en el Grupo 3, que suma a los agentes "no clasificables según su carcinogenicidad en humanos" [8] (la cual no significa que no sean carcinogénicos, si no que no se dispone de evidencia [9]), mientras que el metilmercurio se lo considera posiblemente carcinogénico [8]. La arsenobetaina y otros compuestos orgánicos de arsénico no metabolizados en humanos también se encuentran en el Grupo 3 [6], junto al mercurio. Además de los efectos carcinogénicos, la toxicidad crónica presentada por estos elementos es muy amplia y abarca un gran número de órganos. Se han observado daños neurológicos, renales, cardiovasculares, hematológicos, inmunológicos, dermales, respiratorios, gastrointestinales, reproductivos y de desarrollo [2-5].

En alimentos no se encuentran niveles que presenten riesgos agudos, pero sí pueden presentar niveles traza que contribuyen a la ingesta crónica de estos tóxicos. La Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades (ASTDR) de los Estados Unidos ha establecido Niveles de Riesgo Mínimo (MRL) para un gran número

de sustancias. Un MRL es definido como una estimación de la exposición humana diaria a una sustancia que es probable que no presente un riesgo apreciable de efectos adversos a la salud durante un período de exposición especificado [4]. Estas estimaciones solo contemplan efectos adversos no-carcinogénicos [4]. En la Tabla 1.1 se muestran los MRL orales establecidos por ASTDR para Pb, Cd, As y Hg, y algunos compuestos formados por ellos.

Tabla 1.1. MRL orales establecidos para Pb, Cd, As y Hg.

Sustancia	Duración ^a	MRL (µg/kg peso corporal/día)	Referencia
Arsénico inorgánico	Aguda	5	[4]
	Crónica	0,3	
Ácido Monometilarsónico (MMA)	Intermedia	100	[4]
	Crónica	10	
Ácido Dimetilarsínico (DMA)	Crónica	20	[4]
Plomo	-	No establecido ^b	[2]
Cadmio	Intermedia	0,5	[3]
	Crónica	0,1	
Mercurio inorgánico	Aguda	2	[5]
	Intermedia	0,01	
Metilmercurio	Crónica	0,1	[5]

^a Aguda: 1 a 14 días, Intermedia: 15 a 364 días, Crónica: 1 año o más.

^b Se han observado efectos adversos a los niveles más bajos estudiados, por lo que aún no se ha podido establecer un MRL

Por otra parte, el Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios Conjunto de la Organización Mundial de la Salud y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (JECFA) establece ingestas semanales provisionales tolerables (PTWI) o ingestas mensuales provisionales tolerables (PMTI), los cuales se basan, como los MRL, en el mínimo nivel de ingesta donde no se observan efectos adversos [10]. En la Tabla 1.2 se muestran los valores que ha establecido la JECFA para los cuatro elementos antes mencionados.

JECFA actualmente no tiene ingestas tolerables establecidas para plomo y arsénico inorgánico, debido a que los valores anteriormente establecidos fueron retirados.

Los valores de PTWI de 25 µg/kg peso corporal/semana para el Pb y de 15 µg/kg peso corporal/semana para el As fueron retirados en las últimas revisiones publicadas, ya que el análisis de nuevos estudios toxicológicos indican que dichas ingestas no se encuentran exentas de potenciales efectos adversos en la salud [11,12].

Tabla 1.2. Ingestas provisionales tolerables establecidas por JECFA

Sustancia	PTWI (µg/kg peso corporal/semana)	PTMI (µg/kg peso corporal/mes)	Ref
Arsénico Inorgánico	No establecido ^a	No establecido ^a	[11]
Plomo	No establecido ^a	No establecido ^a	[12]
Cadmio	-	25	[12]
Mercurio Inorgánico	4	-	[11]
Metilmercurio	1,6	-	[13]

^aNo se ha podido determinar una ingesta que no presente efectos adversos en la salud

Transformando los valores propuestos por JECFA a ingestas diarias, puede verse que los valores son diferentes a los de ASTDR. Esto no es poco común teniendo en cuenta las incertidumbres que pueden presentar los estudios toxicológicos a niveles muy bajos. Más allá de las discrepancias, puede verse que en muchos casos los efectos tóxicos se presentan con ingestas diarias crónicas en el orden de los µg para una persona promedio. Esto hace que sea de suma importancia la cuantificación del contenido de estos elementos a niveles ultratraza en los alimentos que consumimos.

El MERCOSUR, a través de la Resolución GMC N° 12/11 establece niveles máximos para distintos contaminantes inorgánicos en alimentos. En ella se han establecido valores máximos para As, Cd y Pb en cereales y alimentos derivados de ellos. El Hg no se encuentra regulado actualmente en este tipo de alimentos. En la Tabla 1.3 se extraen algunos de los límites presentados en dicha norma.

En la Resolución GMC N° 18/21 se establecen niveles máximos de As inorgánico (iAs) de 0,35 y 0,20 mg/kg para arroz descascarado (arroz integral) y arroz pulido, respectivamente. Esta legislación es la primera del MERCOSUR que regula el contenido de determinadas especies químicas de un elemento en lugar del contenido total.

Tabla 1.3. Límites máximos de As, Cd y Pb establecidos en el MERCOSUR para algunos alimentos basados en cereales

Categoría	Límites máximos (mg/kg)		
	As	Cd	Pb
Cereales y productos de y a base de cereales, excluidos trigo, arroz y sus productos derivados y aceites	0,3	0,1	0,2
Trigo y sus derivados excepto aceite	0,3	0,2	0,2
Arroz y sus derivados excepto aceite	0,3 ^a	0,4	0,2

^a Derogado por resolución GMC N° 18/21

La Unión Europea recientemente ha hecho más estrictos algunos de los límites para ciertos alimentos. En la Tabla 1.4 se presentan los límites máximos establecidos según el Reglamento (UE) 2023/915 de la Comisión. En el caso del As, todos los límites presentados en la tabla corresponden a iAs. Al igual que con la normativa de MERCOSUR, no hay límites establecidos para el contenido de Hg en cereales.

Tabla 1.4. Límites máximos de As, Cd y Pb establecidos en la UE para algunos alimentos basados en cereales

Categoría	Límites máximos (mg/kg)	
	As	Pb
Cereales		0,2
		Cd
Cebada y centeno		0,05
Arroz, quinoa, salvado de trigo y gluten de trigo		0,15
Trigo candeal (<i>Triticum durum</i>)		0,18
Germen de trigo		0,2
Cereales, excepto los mencionados anteriormente		0,1
		iAs
Arroz pulido		0,15
Arroz descascarado (integral) y arroz sancochado (parbolizado)		0,25
Harina de arroz		0,25
Tortitas de arroz, obleas de arroz, galletitas de arroz, pasteles de arroz, copos de arroz y arroz hinchado para desayuno		0,3
Arroz destinado a la producción de alimentos para lactantes y niños de corta edad		0,1
Bebidas no alcohólicas a base de arroz		0,03

Por su parte, en el Codex Alimentarius se establecen valores límites de iAs, Pb y Cd iguales a los del MERCOSUR.

Es llamativo que algunos de los límites máximos establecidos son relativamente altos si se los compara con la ingesta diaria promedio de estos alimentos y los bajos MRL y PTWI presentados anteriormente. Tomando los datos de la 2º Encuesta Nacional de Nutrición y Salud (ENNyS 2), organizada por la Secretaría de Gobierno de Salud del Ministerio de Salud y Desarrollo Social, pueden calcularse las ingestas diarias promedio de diversos alimentos para distintos grupos etarios. Tomando como ejemplo el arroz blanco, para un argentino mayor de 18 años el cálculo resulta en una ingesta promedio de 11,79 g de arroz por día. Si este arroz contuviese 0,35 mg/kg de Cd (lo cual sería permisible según la legislación del MERCOSUR), la ingesta diaria de arroz aportaría 4,13 µg de Cd por día. Esto supone una ingesta del 59% del LMR propuesto por ASTDR para el Cd, solo teniendo en cuenta el arroz blanco. Este ejemplo no pretende ser un análisis de riesgo, que es mucho más complejo de llevar a cabo, pero ilustra la disonancia que hay entre los valores máximos permitidos en alimentos y la toxicidad de algunos elementos. Esto adquiere especial importancia cuando se trata de alimentos ampliamente consumidos, como lo son los cereales, y especialmente el arroz, el trigo y sus derivados. En un análisis llevado a cabo por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) se encontró que los granos y cereales son los principales contribuyentes a la ingesta de Cd en la dieta de los europeos [14]. Lo mismo ocurre con el As; de hecho, en un estudio realizado en el PRINARC se ha estimado que, a pesar de tener bajas concentraciones de As, el trigo es el segundo mayor contribuyente a la ingesta diaria de As de los argentinos, después del agua de bebida conteniendo más de 0,01 mg/L (nivel guía de OMS)[15]

1.2. Especiación química

La toxicidad no solo depende del elemento, sino también de la forma química en la que se encuentra. Como puede verse en los MRL establecidos por ASTDR, los compuestos orgánicos de As ácido dimetilarsínico (DMA) y ácido monometilarsónico (MMA), entre otros, son menos tóxicos que los compuestos inorgánicos. Entre los compuestos inorgánicos de As se encuentran a su vez el ácido arsenioso (H_3AsO_3) y el ácido arsénico (H_3AsO_4), o sus formas desprotonadas arsenito (As(III)) y arsenato

(As(V)), respectivamente. De estos dos, el As(III) es más tóxico, al menos en términos de toxicidad aguda [16,17]. Además de estas, existe un gran número de especies químicas de As. Entre ellas pueden mencionarse las formas trivalentes del DMA y el MMA, las cuales son aún más tóxicas que las especies inorgánicas [17,18], aunque solo suelen hallarse en muestras biológicas de estudios metabólicos ya que son muy inestables [18]. También existen compuestos tiolados de As (donde los átomos de oxígeno son sustituidos por átomos de azufre), el ion tetrametilarsonio, el óxido de trimetilarsina y especies orgánicas más complejas como la arsenobetaina, arsenocolina, arsenoazúcares, arsenolípidos, entre otras [16]. Algunas de estas especies se consideran prácticamente no tóxicas (como la arsenobetaina [19]), mientras que para muchas otras aún no se conoce mucho sobre su toxicidad [19,20]. En la Figura 1.1 se muestra la estructura química de algunas de las especies de As más comunes.

Algo similar ocurre con el Hg, el cual generalmente se encuentra como Hg inorgánico o el catión orgánico metilmercurio (MeHg). Existen otras especies de Hg, como el etilmercurio, fenilmercurio, dimetilmercurio, timerosal, entre otras, aunque estas son mucho menos frecuentes. Como ocurre con el As, las toxicidades de estas especies difieren [21,22]. Pb y Cd también forman especies organometálicas, pero estas son antropogénicas, no de origen natural. Los compuestos organometálicos del Cd no suelen hallarse en el ambiente debido a que son inestables y se descomponen rápidamente. En cuanto al Pb, la especie organometálica más estudiada es el tetraetilo de plomo, utilizado como antidetonante en combustibles. Este aditivo se encuentra actualmente prohibido en la mayoría de los países, incluyendo Argentina desde 1996, con lo cual ya no es común encontrarlo en el ambiente [23]. En la Figura 1.2 se muestran algunas de las especies de Pb, Cd y Hg más comunes.

Estas diferencias de toxicidad, así también como de movilidad, biodisponibilidad, reactividad, entre otras, dieron lugar al campo de la especiación química. La especiación ha sido definida por la IUPAC como la distribución de un elemento en especies químicas definidas, siendo una especie química la forma específica de un elemento definida en función de su composición isotópica, estado electrónico o de oxidación, y/o estructura molecular o compleja [24]. A su vez, se ha definido el análisis de especiación como la actividad analítica de identificar y/o medir las cantidades de una o más especies químicas en una muestra [24].

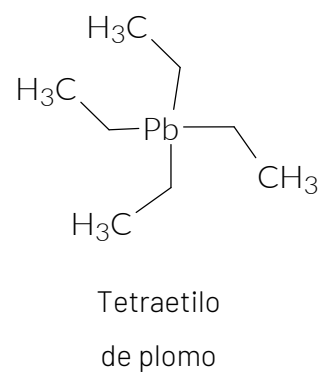
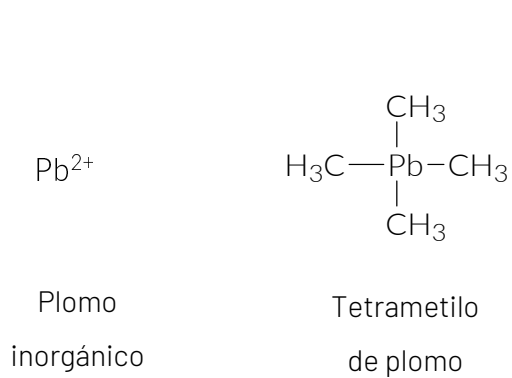
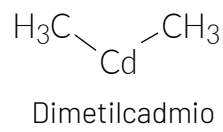
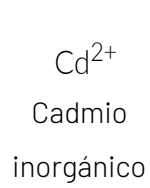
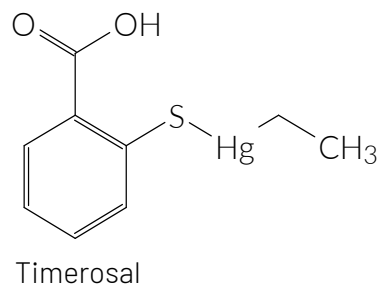
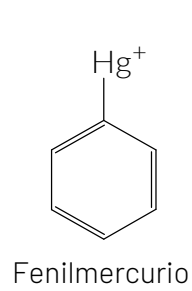
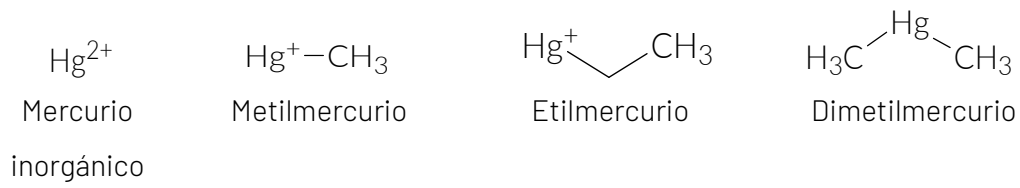


Figura 1.2. Estructuras de las especies más comunes de Hg, Cd y Pb.

En función de lo mencionado anteriormente, es evidente que en algunos casos es necesario llevar a cabo un análisis de especiación para estimar correctamente el riesgo que puede implicar la presencia de un elemento en un alimento. Esto es particularmente importante para el As en cereales, que en el caso del arroz puede presentarse en concentraciones mucho más elevadas que Hg, Pb y Cd y formando un gran número de compuestos que difieren ampliamente en su toxicidad. Por este motivo, los estudios de especiación de este trabajo se focalizaron en As.

1.3. Metodologías analíticas

1.3.1. Técnicas instrumentales para análisis elemental

Existe una amplia variedad de técnicas analíticas disponibles para llevar a cabo la determinación de elementos químicos [25-28]. Sin embargo, los elementos tóxicos suelen encontrarse en niveles extremadamente bajos, los cuales no todas las técnicas pueden alcanzar. Algunas de las técnicas más ampliamente usadas son la espectrometría de absorción atómica con horno de grafito (GFAAS), la espectrometría de absorción o fluorescencia atómicas con generación de vapor químico (CVGAAS, CVGAFS), la espectrometría de emisión óptica con plasma inducido por microondas (MIP-OES), la espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) y la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). Si bien las técnicas basadas en AAS y AFS pueden alcanzar en algunos casos los límites de detección necesarios para estas determinaciones, la naturaleza monoelemental de la determinación hace mucho más laborioso el análisis cuando se deben determinar varios analitos distintos. En este sentido, las técnicas basadas en plasma suponen una ventaja, ya que permiten la determinación de un gran número de elementos en un período de unos pocos segundos. Dentro de estas técnicas, ICP-MS es claramente la más adecuada debido a sus extremadamente bajos límites de detección instrumentales, que frecuentemente se encuentran por debajo de los $\mu\text{g/L}$ e incluso de los ng/L . A esto se suma también un amplio rango lineal, la posibilidad de usar estándares internos para corregir efectos de matriz y deriva instrumental y la posibilidad de llevar a cabo análisis isotópicos. Esta técnica también es fácilmente adaptable a análisis de especiación, acoplando previamente un cromatógrafo líquido o gaseoso para llevar a cabo la separación y utilizando el

ICP-MS como detector. A pesar de estas ventajas, el elevado costo instrumental y de operación de ICP-MS hace que sea particularmente importante optimizar el análisis, agilizando los tiempos de medición y llevando a cabo adecuados tratamientos de muestra que faciliten la determinación y maximicen la vida útil del equipo, sin sacrificar performance analítica. Este propósito fue uno de los ejes del presente trabajo, con la particularidad de que los experimentos de esta tesis fueron los primeros en llevarse a cabo con la instrumentación ICP-MS adquirida oportunamente por el PRINARC.

1.3.1.1. Fundamentos básicos de ICP-MS

ICP-MS, como todas las espectrometrías de masa, se basa en separar y detectar iones en función de su relación masa/carga (m/z). Los espectrómetros de masa básicamente se componen de una fuente de iones, un analizador de masas y un detector. En el caso de ICP-MS la fuente de iones es el plasma, el analizador de masas en equipos de baja resolución suele ser un cuadrupolo, y el detector es un multiplicador de electrones secundarios. En la Figura 1.3 se muestra un esquema de un equipo ICP-MS.

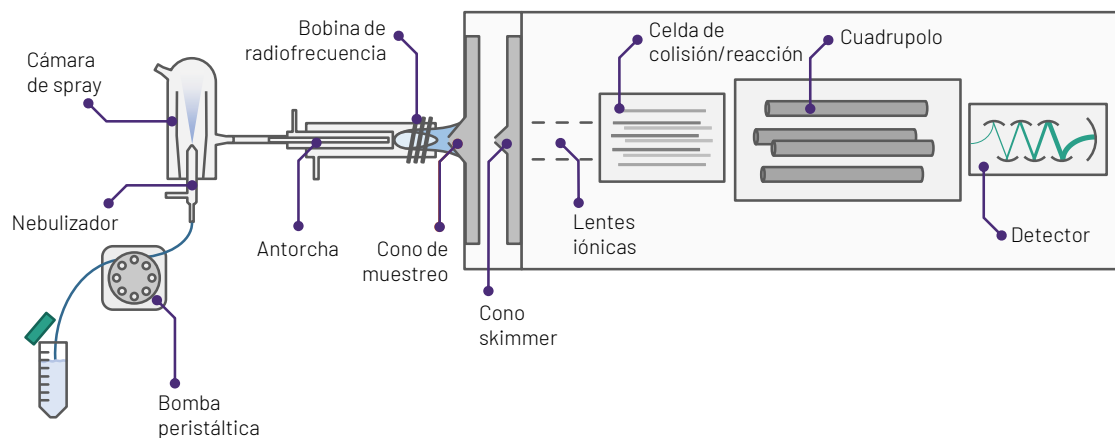


Figura 1.3. Esquema de un equipo ICP-MS basado en cuadrupolo.

La solución de muestra, que puede combinarse a través de una T con una solución de estándar interno, es impulsada por una bomba peristáltica y es introducida en el nebulizador. Este genera una fina niebla dentro de una cámara de spray, que solo transfiere las gotas más pequeñas a la antorcha del plasma.

El plasma generado por la ionización de Ar en las técnicas de ICP suele tener temperaturas de entre 7000 y 10000 K. Este plasma es lo suficientemente energético como para descomponer las moléculas que ingresan a él y también ionizar la mayoría de los elementos, al menos parcialmente. El grado de ionización de un elemento en el plasma (es decir, la cantidad de átomos que se ionizan respecto a la cantidad de átomos en total de ese elemento) puede estimarse de manera razonable a partir de la ecuación de Saha, que involucra, entre otros parámetros, la temperatura y el potencial de ionización del elemento [29]. Los elementos con menor potencial de ionización presentarán un mayor grado de ionización y consecuentemente, al menos en principio, una mayor sensibilidad. Elementos como los metales alcalinos y los lantánidos presentan potenciales de ionización bajos (<7 eV), por lo que generalmente se encontrarán en forma de iones en un plasma convencional, y no como átomos neutros. Por otro lado, la mayoría de los no metales presentan potenciales de ionización altos (>11 eV), y solo un pequeño porcentaje de sus átomos serán ionizados en el plasma (<5%). Los elementos que posean un segundo potencial de ionización lo suficientemente bajo, como los metales alcalinos térreos y los lantánidos, pueden perder un segundo electrón, dando valores de m/z a la mitad de la masa del isótopo. Esto es indeseable, ya que conduce a las interferencias de doble carga, donde el analito y el elemento doblemente cargado tienen la misma m/z .

Los iones generados en el plasma atraviesan dos conos, el cono de muestreo y el cono skimmer, que conforman la interfase entre la región de alto vacío del espectrómetro y el plasma que se encuentra a presión atmosférica. Estos iones son conducidos por una serie de lentes iónicas, las cuales los extraen, coliman y separan de las especies neutras, y posteriormente los introducen en el analizador de masas o en una celda de colisión/reacción. La mayoría de los equipos modernos cuentan con estas celdas de colisión/reacción antes del analizador de masas para reducir las interferencias de iones poliatómicos. Estas interferencias por iones poliatómicos son, como su nombre lo indica, interferencias generadas por iones compuestos por más de un átomo, cuya m/z coincide con el del analito. Ejemplos típicos de estas interferencias son el $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ sobre el $^{75}\text{As}^+$ o el $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ sobre el $^{56}\text{Fe}^+$. Para la supresión de estas interferencias, las celdas de colisión/reacción, que son cámaras con un hexapolo u octapolo en su interior, son presurizadas con un gas que puede ser

He, H₂, NH₃, entre otros. El hexapolo u octapolo mantiene enfocado el haz de iones y lo conduce a través del gas que contiene la celda. Existen varios mecanismos por los cuales pueden eliminarse estas interferencias, como la formación de aductos con una m/z distinto al analito, transferencia de carga del ion poliatómico a una molécula del gas de la celda, disociaciones inducidas por colisión o el uso de discriminación por energía cinética. Este último mecanismo, el cual fue usado en este trabajo, aprovecha la diferencia de radio iónico de las especies poliatómicas con respecto a las monoatómicas, como el analito. Dado que los iones poliatómicos suelen ser de mayor tamaño, colisionan un mayor número de veces con el gas de la celda, y consecuentemente pierden mayor energía que los monoatómicos. Aplicando un pequeño potencial positivo a la salida de la celda puede impedirse el paso de los iones poliatómicos, mientras que los monoatómicos conservan energía suficiente para superar esta barrera energética.

A la salida de la celda de colisión/reacción se encuentra el analizador de masas, que en el caso del equipo usado en este trabajo se trata de un cuadrupolo. Este analizador está compuesto de cuatro barras paralelas a las que se les aplican voltajes de radiofrecuencia y de corriente continua. Cambiando estos voltajes se permite secuencialmente el paso de una única m/z. El paso de una dada m/z está sincronizado con el sistema de detección, de manera que el detector "cuenta" las señales que obtiene por unidad de tiempo para cada m/z, dando lugar a la respuesta instrumental, que son las cuentas por segundo (CPS). El detector consiste en un multiplicador de electrones secundarios, el cual funciona de manera análoga a un fotomultiplicador, solo que los primeros electrones en lugar de ser liberados por el impacto de un fotón son liberados por el impacto de un ion.

1.3.2. Preparación de muestras

En cuanto al tratamiento de las muestras, la digestión ácida asistida por microondas en sistemas cerrados se ha impuesto en las últimas décadas como la técnica de elección para la descomposición de la matriz de la muestra [30,31]. Varias ventajas justifican este hecho. Por un lado, la posibilidad de calentar la mezcla ácida a mayor temperatura que el punto de ebullición de los ácidos usados y la presión generada

durante la reacción aumentan la eficiencia de la descomposición respecto a sistemas abiertos. Por otro lado, los sistemas cerrados minimizan el riesgo de contaminación de las muestras por el ambiente de laboratorio y de pérdida de elementos volátiles, lo cual es especialmente importante en análisis a niveles ultratrazo. A su vez, el calentamiento por microondas es mucho más eficiente que el calentamiento tradicional por conducción y convección, lo cual acorta significativamente los tiempos de tratamiento de muestra. A pesar de esto, estos sistemas no están libres de inconvenientes. Si bien generalmente las muestras se alcanzan a disolver completamente, la destrucción de la materia orgánica no es total. En trabajos donde se analizaron por resonancia magnética nuclear [32] y HPLC-UV [33] soluciones obtenidas de digestiones microondas, se ha demostrado la resistencia de algunos compuestos orgánicos a su descomposición, especialmente en el caso de los compuestos aromáticos. Por otra parte, el aumento de presión ocasionado por la liberación de gases durante la reacción de descomposición limita la masa máxima de muestra que puede ser tratada en un recipiente. Esto es especialmente importante en análisis a niveles muy bajos, donde es deseable minimizar el factor de dilución del método.

Claramente el uso de sistemas abiertos implica el riesgo de volatilización de analitos y contaminación de la muestra, sin embargo, teniendo las precauciones necesarias para minimizar estos riesgos, resulta de interés estudiar si los menores factores de dilución no compensan estos riesgos. La calcinación en mufla a elevadas temperaturas y la digestión ácida en placa calefactora son ejemplos de estrategias que hacen uso de sistemas abiertos para el tratamiento de muestras. Estas técnicas, hoy en día consideradas anticuadas frente a los modernos y costosos digestores microondas, podrían aportar algunas ventajas al análisis ultratrazo [30]. Por ejemplo, la calcinación en mufla a 450°C permite la destrucción completa de la materia orgánica, obteniéndose finalmente cenizas blancas que pueden ser disueltas en un ácido adecuado para su posterior medición instrumental. A su vez, al utilizar solo pequeñas cantidades de ácido para la disolución de las cenizas, se logra reducir el aporte de los reactivos al blanco. El uso de aditivos como sales de magnesio o H_2SO_4 ha demostrado su utilidad para evitar la pérdida de ciertos analitos por volatilización [30], la cual es una de las mayores desventajas del tratamiento por mufla. Otra de

las cualidades del tratamiento por calcinación es la capacidad de procesar grandes cantidades de muestra y llevar a volúmenes finales pequeños. Esto resulta en un factor de dilución mucho menor que los que son posibles de alcanzar en métodos de digestión por vía húmeda. Aun así, debe evaluarse cuidadosamente esta alternativa ya que no debe perderse de vista que también pueden estar concentrándose potenciales interferentes y que una solución tan concentrada puede llevar a efectos de matriz.

En el caso del análisis de especiación, la etapa de preparación de las muestras es un punto crítico del método analítico. En general se utilizan extracciones en condiciones moderadas, que logren la extracción cuantitativa de los analitos, pero que no comprometan la identidad de las especies químicas. En este sentido los tratamientos de muestra descritos anteriormente para la determinación del contenido total no son aplicables al análisis de especiación. Se han reportado diversas estrategias para llevar a cabo estas extracciones. El uso de metanol o mezclas de metanol y agua ha sido ampliamente reportado para los estudios de especiación de As [34]. Si bien este extractante es lo suficientemente suave como para no ocasionar interconversión de especies, en general no se alcanzan extracciones cuantitativas del As presente en la muestra [35–38] o se requieren tiempos de extracción muy largos [39]. A su vez, el extracto debe ser evaporado y reconstituido en medio acuoso [39] para evitar inconvenientes causados por el metanol en la separación cromatográfica y en el plasma. Se han propuesto también extracciones enzimáticas, usando amilasas [40,41], celulasas [42] y/o proteasas [43–45]. La especificidad de las enzimas y las condiciones moderadas de temperatura y pH necesarias para su uso minimizan el riesgo de interconversión de especies. Sin embargo, las eficiencias de extracción no siempre son cuantitativas [36,42,45], requieren largos tiempos de extracción [40–42,44], la presencia de sales en la solución enzimática puede dificultar la posterior separación cromatográfica [46], son reactivos de un costo relativamente elevado, y además se ha reportado que pueden aportar cantidades significativas de analito al blanco de reactivos [42,46]. A pesar de esto, las extracciones enzimáticas encuentran utilidad en los estudios de bioaccesibilidad, donde se reproducen las condiciones del sistema digestivo *in vitro*. La hidrólisis ácida es otra de las técnicas que ha sido popularmente usada para los análisis de especiación. Una gran

variedad de ácidos en distintas concentraciones ha sido propuesta para llevar a cabo la extracción [34,36,47-49]. Las eficiencias de extracción usando ácidos generalmente son altas, sin embargo, existe un riesgo de interconversión de especies debido a las condiciones de pH y temperatura generalmente utilizadas. Recientemente se ha reportado que los extractos ácidos podrían comprometer la integridad de compuestos tioarsenicales presentes en las muestras [41,44]. A su vez, la acidez resultante del extracto debe ser tenida en cuenta ya que puede interferir con las separaciones por intercambio iónico. Además de las diversas soluciones extractantes, se han estudiado distintas técnicas para llevar a cabo la extracción. Entre ellas pueden mencionarse algunas técnicas clásicas, como agitación mecánica, soxhlet y calentamiento en baño de agua o placa calefactora, y otras técnicas más modernas como extracciones con ultrasonido y calentamiento asistido por microondas [34,49].

1.3.3. Separaciones cromatográficas

Los análisis de especiación generalmente requieren una etapa separativa, de manera que las especies lleguen individualmente al detector. En cuanto a la separación cromatográfica para el análisis de especiación de As, la cromatografía de intercambio aniónico fuerte se ha impuesto como la mejor alternativa para la separación de las especies As(III), As(V), DMA y MMA [34,50-52]. La naturaleza de ácido débil de estas especies hace que a pHs neutros o ligeramente básicos se presenten como aniones, permitiendo ser separadas por intercambio aniónico. Un gran número de métodos se han publicado para llevar a cabo esta separación. Es frecuente el uso de fases estacionarias de tipo intercambio aniónico fuerte, como lo son aquellas con soporte polimérico de poliestireno divinilbenceno funcionalizado con grupos amonio cuaternarios. En cuanto a las fases móviles, las basadas en fosfato o carbonato son las más populares [34,50,52]. El uso de fosfatos tiene la ventaja de su capacidad buffer a pH neutro o ligeramente básico, sumado a su adecuado poder de elución que permite obtener corridas cromatográficas en tiempos relativamente cortos con una adecuada resolución. Sin embargo, el uso de fosfatos trae el riesgo de la acumulación de especies poliméricas de P en los conos de la interfase del ICP-MS [50,53,54], lo cual puede generar deriva instrumental de la señal y limitar la vida útil de estas costosas partes del instrumento. Por otro lado, los carbonatos, como el

carbonato de amonio, son totalmente compatibles con el sistema ICP-MS, siendo descompuestos fácilmente en el plasma y evitando el problema de depósitos en las partes del equipo. A pesar de esto, debido al bajo poder de elución del carbonato, las corridas cromatográficas son marcadamente más largas, siendo frecuentemente necesarios más de 15 minutos para separar las cuatro especies [34,55]. Una alternativa poco estudiada es el uso de eluyentes basados en aniones orgánicos, como los carboxilatos y dicarboxilatos. Particularmente los dicarboxilatos tienen una serie de ventajas para el análisis de especiación de As, como son sus pKa en un rango entre 1,2 y 5,7; la relativa facilidad con la que pueden ser descompuestos en el plasma y su excelente poder de elución a pH neutro o ligeramente básico. Algunas aplicaciones a esta separación pueden encontrarse en la bibliografía [56], pero no se encuentran estudios detallados sobre la influencia de estos compuestos en la separación.

1.3.4. Identificación de nuevas especies químicas

La identificación de las especies presentes en una muestra es uno de los desafíos más grandes del análisis de especiación. Si bien ICP-MS ofrece límites de detección generalmente inalcanzables por otras técnicas para este tipo de análisis, tiene el inconveniente de que no aporta información estructural sobre la especie detectada. Al ingresar al plasma, la especie se descompone totalmente en sus átomos, perdiéndose la posibilidad de sacar conclusiones sobre la estructura de la molécula original. Debido a esto, la identidad de las especies es frecuentemente asignada a través de los tiempos de retención cromatográficos [57]. Sin embargo, esto tiene varios inconvenientes. Por un lado, en un mismo pico pueden coeluir varias especies, que es lo que ocurre con las especies poco retenidas y aquellas que no interactúan con la fase estacionaria. Por otro lado, debe garantizarse que la matriz de las muestras no resulte en corrimientos de los tiempos de retención respecto de los estándares, ya que esto podría llevar a una identificación incorrecta. A su vez, hay muchas especies de las cuales aún no se dispone de estándares comerciales, como es el caso de los arsenoazúcares, arsenolípidos, entre otras. Estos inconvenientes del uso de los tiempos de retención como medio de identificación llevan a la necesidad de utilizar técnicas complementarias que aporten información estructural para la

elucidación de la estructura química del compuesto. Para estos fines se han empleado técnicas como resonancia magnética nuclear [58], técnicas basadas en rayos X [59–61] y espectrometrías de masa moleculares [62,63]. Si bien RMN permite reconstruir completamente la estructura de la especie a través de los espectros, es necesario purificar el compuesto y obtener generalmente al menos 1 mg de este para los ensayos. Esta tarea es especialmente compleja, y en algunos casos imposible, teniendo en cuenta que muchas especies pueden encontrarse en las muestras a niveles menores de 50 µg/kg. Por otro lado, las técnicas basadas en rayos X tienen la ventaja de que permiten analizar muestras sólidas, evitando problemas de estabilidad durante la extracción o separación cromatográfica. Sin embargo, es necesario contar con estándares de las especies a confirmar y algunas de estas especies no pueden ser distinguidas por esta técnica, que es el caso de las que presentan entornos químicos muy similares alrededor del átomo de As [57]. A su vez, para obtener límites de detección lo suficientemente bajos se hace necesario utilizar radiación de sincrotrón, y aun así muchas especies pueden no ser detectada por esta técnica [57]. Por su parte, las espectrometrías de masa moleculares han sido las más usadas para la identificación de especies desconocidas [57,62–64]. Las espectrometrías de masa en tándem con ionización por electrospray (ESI-MS/MS) y las espectrometrías de masa de alta resolución como las basadas en tiempo de vuelo (ESI-TOF-MS) permiten obtener información estructural con cantidades de analito mucho menores que RMN y rayos X. Estas técnicas a su vez pueden utilizarse por infusión directa (introduciendo la muestra directamente en el espectrómetro) o llevando a cabo previamente una separación, dada su relativa facilidad de acoplamiento con técnicas cromatográficas. Esto ha sido ampliamente utilizado en estudios de especiación centrados en la identificación de nuevos compuestos y en la identificación de picos observados por HPLC-ICP-MS que no coinciden en tiempo de retención con los estándares disponibles. Diversas especies han sido identificadas de esta forma, como arsenoazúcares, arsenolípidos, tioarsenatos, diversos metabolitos, entre otros [57,62,63].

1.3.4.1. Fundamentos básicos de ESI-MS/MS

La ionización por electrospray es una técnica de ionización suave donde solutos presentes en una solución pueden ser transferidos a la fase gas como iones. Estos

solutos pueden ya encontrarse como iones en la solución o pueden ser especies neutras que adquieren una carga al asociarse con otra especie cargada. El proceso del electrospray consiste en tres etapas: la producción de gotas cargadas; la reducción de tamaño de las gotas por evaporación y desintegración, formando gotas muy pequeñas y altamente cargadas; y finalmente el proceso de formación de los iones en fase gas a partir de estas últimas gotas pequeñas.

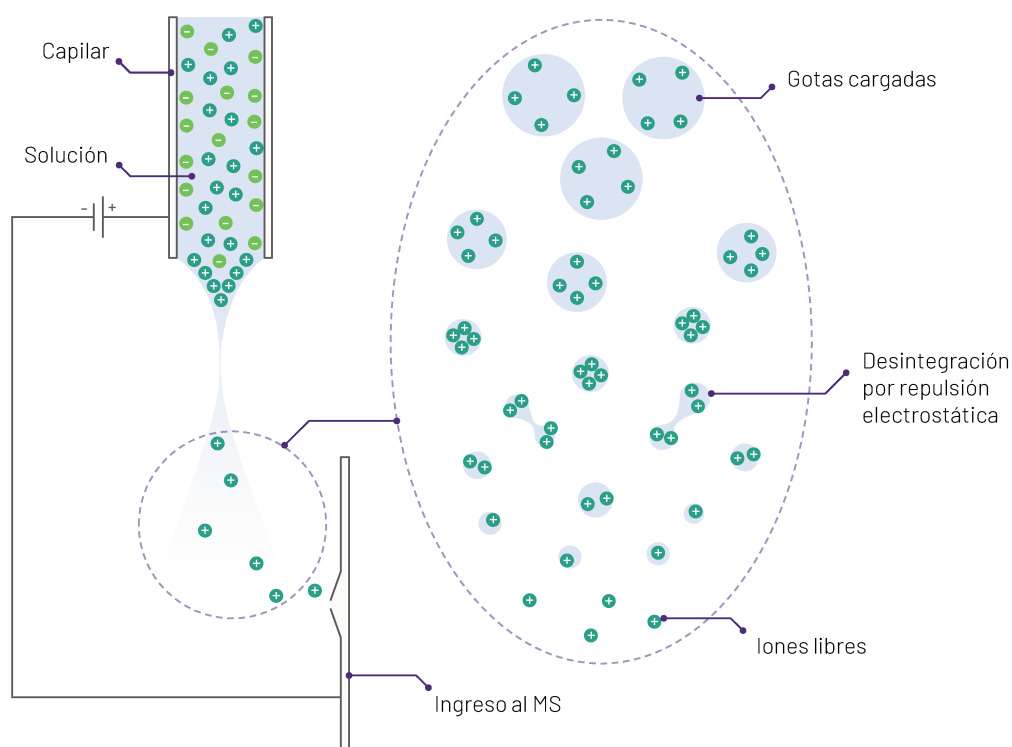


Figura 1.4. Esquema de la generación de un electrospray

En la Figura 1.4 se esquematiza el proceso de generación del electrospray. En primer lugar, la solución que contiene el analito es conducida a un capilar al cual se le aplica un potencial positivo o negativo. Debido a la polarizabilidad y el momento dipolar de las moléculas del solvente, el campo eléctrico genera una doble capa eléctrica y un enriquecimiento de iones del mismo signo que el potencial aplicado cerca del menisco. Esto a su vez genera la desestabilización del menisco y la formación de un cono y un *jet* cargado con un exceso de cargas eléctricas del mismo signo, el cual a su vez luego se divide en gotas también cargadas. La evaporación del solvente en estas gotas acerca las cargas eléctricas, hasta que la repulsión electrostática desestabiliza la gota y genera la emisión de un nuevo *jet* y una serie de gotas más pe-

queñas, también cargadas. Este proceso se repite hasta que en algún punto se generan iones libres en fase gas. Se han propuesto distintos mecanismos para esta etapa y es un tema aún en discusión. Estos iones son luego conducidos al analizador de masas, donde son separados y luego detectados. [65] Tanto ESI como ICP son técnicas de ionización, la diferencia radica en que ESI es una ionización suave que permite obtener iones del analito con su estructura intacta (o bien formando un aducto); mientras que ICP es una ionización extremadamente energética, donde se obtienen iones de los elementos que forman el analito, perdiéndose toda información estructural.

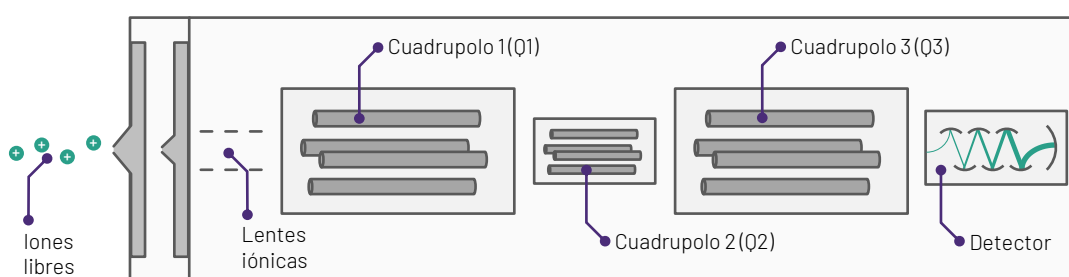


Figura 1.5. Esquema de un espectrómetro de masa en tándem de triple cuadrupolo (QqQ)

Como analizador de masas se pueden usar distintas configuraciones, como cuadrupolos, trampas de iones, espectrómetros de tiempo de vuelo, entre otros. Son frecuentes las combinaciones consecutivas de más de un analizador, obteniendo lo que se conoce como espectrometría de masa en tándem. Configuraciones de este estilo que se encuentran frecuentemente son la de triple cuadrupolo y la de Q-Trap, donde entre dos cuadrupolos (Q1 y Q3) o un cuadrupolo y una trampa de iones se encuentra otro cuadrupolo (Q2), hexapolo u octapolo que actúan como celda de reacción. En esta celda los iones provenientes de Q1 sufren fragmentaciones, las cuales son luego analizadas por Q3. Para llevar a cabo estas fragmentaciones existen distintas alternativas, pero la más popular es la disociación inducida por colisiones (CID, también abreviado como CAD), donde los iones se fragmentan por colisiones con un gas inerte [66]. En la Figura 1.5 se esquematiza un espectrómetro de masa con configuración de triple cuadrupolo. Esta disposición en tándem es de gran utilidad ya que permite obtener información estructural sobre el ion aislado en Q1 y mejora notablemente la relación señal/ruido. Con esta configuración a su vez se obtie-

nen varios modos de adquisición del espectro de masas. Entre ellos se puede mencionar el *Full Scan*, donde el instrumento opera como un simple cuadrupolo y barre un amplio rango de masas; el *Single Ion Monitoring* (SIM), donde el instrumento se detiene en una única m/z (o en un rango acotado de ellas); el *Product Scan*, donde se buscan los fragmentos generados por un ion aislado con el primer cuadrupolo; el *Precursor Scan*, donde se opera de manera inversa que en *Product Scan*, buscando los precursores que generan un determinado fragmento; y el *Selected Reaction Monitoring* (SRM) o *Multiple Reaction Monitoring* (MRM), donde Q1 y Q3 están fijos en pares de valores de m/z relacionados a fragmentaciones características del analito (transiciones).

La información que se obtiene de estos modos de adquisición es útil en la dilucidación de la estructura química del analito. Las fragmentaciones que se dan en un análisis MS/MS siguen en líneas generales los principios de la química orgánica [67], por lo que, en principio, es posible reconstruir la estructura del ion precursor a partir de los fragmentos generados. Especialmente valiosa es la información brindada por las técnicas de alta resolución, ya que permiten determinar la fórmula molecular de un ion a partir de su masa exacta.

El acoplamiento de una técnica separativa como la cromatografía líquida a un sistema de espectrometría de masa en tándem mejora sustancialmente sus capacidades ya que permite separar al analito de la matriz. Esto permite identificar y cuantificar compuestos en mezclas complejas. En esta configuración la coelución de más de un componente no es un problema tan serio como con otros detectores ya que la espectrometría de masa en tándem aporta selectividad adicional al análisis.

1.4. Elementos y especiación en cereales

En la bibliografía se encuentran muchos reportes del contenido de elementos tóxicos de cereales consumidos en distintos países. En menor medida se encuentran también publicaciones sobre los cereales producidos en Argentina.

En cuanto al arroz, en arroces consumidos en Suecia se han encontrado niveles promedio de Pb, Cd y As de 0,004; 0,024 y 0,20 mg/kg respectivamente, mientras que

las mismas muestras tuvieron un contenido promedio de 0,11 mg/kg de As inorgánico [68]. Por otro lado, en un trabajo realizado en Bélgica se mencionan concentraciones promedio de As en muestras de arroz blanco de 0,216 mg/kg, con un promedio de 0,172 mg/kg de As inorgánico [69]. En un estudio donde se analizaron arroces producidos en China los niveles promedio de As, Cd y Pb fueron de 0,089; 0,087 y 0,036 mg/kg respectivamente [70]. Otro estudio sobre arroces chinos mostró concentraciones promedio de As de 0,154 mg/kg y de 0,002 mg/kg para Hg [71]. Arroces pulidos consumidos en Brasil han mostrado concentraciones promedio de As y Cd de 0,105 y 0,013 mg/kg, respectivamente [72]. En Italia se hallaron concentraciones medianas de 0,020 mg/kg para el Pb y de 0,025 mg/kg para el Cd [73]. Respecto al análisis de especiación, estudios sobre las especies de As presentes en el arroz han sido ampliamente reportados en la bibliografía internacional [40,43,47,69,74-82]. La capacidad del arroz para acumular cantidades relativamente altas de distintas especies de As es reconocida ya hace mucho tiempo. Se ha reportado especialmente la presencia de las especies inorgánicas As(III) y As(V) y las especies orgánicas MMA y DMA. Un número de estudios ha demostrado que el contenido de As total y sus especies en arroz depende del origen geográfico del mismo, siendo estas diferencias bastante marcadas en algunos casos [75,76,81,83,84]. En general, se observan las concentraciones más bajas en arroces producidos en África, mientras que arroces producidos en Europa y América presentaron concentraciones más altas [83].

En cuanto al trigo y sus productos derivados, en un estudio en Polonia se encontró en granos de trigo un promedio de 0,0028 mg/kg de Hg [85], mientras que otro trabajo en este mismo país halló concentraciones promedio de Pb y Cd de 0,023 y 0,034 µg/kg, respectivamente [86]. Similarmente, en trigos producidos en Italia se encontraron concentraciones medianas de Pb de 0,020 mg/kg y de Cd de 0,040 mg/kg [73]. En muestras de trigo producidas en una región de China se encontraron valores promedio de Cd de 0,032 mg/kg [87]. Por otro lado, en muestras de granos de trigo de Bélgica se observaron concentraciones promedio de As de 0,022 mg/kg, siendo en promedio 0,021 mg/kg As inorgánico [69]. En un amplio estudio llevado sobre trigos producidos en Italia se encontró una concentración promedio de As de 0,009 mg/kg [88]. Este mismo estudio también mostró que, en promedio, el 95% del

As está presente en formas inorgánicas, mientras que detectaron también pequeñas cantidades de DMA y MMA. Resultados similares fueron obtenidos en otro trabajo también llevado a cabo en Italia [89] y otro en Pakistán [90]. En este último la concentración media fue de 0,105 mg/kg y los autores lo adjudicaron al riego con agua subterránea con elevados niveles de As. Otro trabajo estudió trigos producidos en algunos países de Europa y encontró que trigos producidos en un lugar de Francia tenían elevadas concentraciones de As. Estas muestras tenían concentraciones aproximadamente un orden de mayores que los demás sitios. Esto fue adjudicado al elevado contenido de As presente en el suelo [91]. El análisis de especiación llevado a cabo en ese trabajo solo mostró la presencia de especies inorgánicas en el trigo.

Algunos estudios también se han llevado a cabo en Argentina. Londonio et al. (2019) han determinado el contenido de varios elementos químicos en muestras comerciales de arroz pulido y productos de arroz, observándose la ya conocida acumulación de As (media: 0,237 mg/kg), además de concentraciones en el nivel de las ultratrazas de Cd (media: 0,006 mg/kg) y Pb (media: 0,025 mg/kg), entre otros [92]. El Hg se encontró por debajo del límite de detección de 0,05 mg/kg. Por su parte, Bermudez et al. (2011) analizaron muestras de trigo de sitios potencialmente contaminados de la provincia de Córdoba hallando en promedio niveles de Pb y Cd de 0,088 mg/kg y 0,017 mg/kg, respectivamente, entre otros elementos [93]. Arsénico no fue detectado en ninguna de las muestras, sin embargo, esto posiblemente se deba a que la técnica utilizada (análisis por activación neutrónica) no tuvo la suficiente sensibilidad para este elemento. Hg no fue determinado en este estudio. En un estudio realizado por Lavado et al. (2006) se analizaron muestras de trigo, maíz y soja cultivadas en sitios considerados "no contaminados" y sitios "potencialmente afectados" de la provincia de Buenos Aires [94]. Los autores hallaron concentraciones de Cd de 0,03 mg/kg; 0,11 mg/kg y 0,17 mg/kg para maíz, trigo y soja, respectivamente. Sin embargo, es más sorprendente el contenido de Pb hallado, que fue de 4,59 mg/kg; 1,45 mg/kg y 0,45 mg/kg, para maíz, trigo y soja, respectivamente. Estos niveles son marcadamente más elevados que los reportados en la bibliografía y fueron hallados tanto en los sitios considerados prístinos como en los potencialmente contamina-

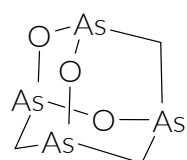
dos. As y Hg no fueron determinados en este estudio. Estudios en otros países sugieren que el contenido de Hg en trigos generalmente es menor a 0,03 mg/kg [85,95], sin embargo, no se encuentran publicados reportes del contenido de este metal en trigos producidos en nuestro país.

Respecto al análisis de especiación, en trabajos publicados se encuentra que los arroces producidos en Argentina en general siguen un patrón de especiación similar a los arroces estadounidenses [75-77], donde el contenido de especies orgánicas está fuertemente correlacionado al contenido de As total, mientras que el contenido de As inorgánico varía relativamente poco respecto del As total [78-80]. Este patrón de especiación es distinto al de los arroces producidos en otras regiones como China y Europa, donde la concentración de As inorgánico también aumenta marcadamente con la concentración de As total [75].

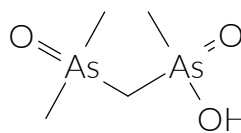
En cuanto al análisis de especiación de As en muestras de trigo, no se encuentran publicados actualmente estudios sobre las especies de As presentes en muestras de este cereal que hayan sido producidas localmente. Como fue mencionado anteriormente, se ha estimado que el trigo puede ser el alimento que más As aporta a nuestra dieta [15]. A su vez, si el trigo local sigue la misma tendencia que el producido en otras partes del mundo, es esperable que casi la totalidad de este As sea inorgánico. Esto hace que el análisis de especiación en este cereal sea de especial interés, ya que permitiría hacer un análisis más certero del riesgo toxicológico que implica el consumo de As a través de este alimento.

A pesar de que prácticamente todos los estudios de especiación de As en cereales se han centrado en las cuatro especies antes mencionadas, hay reportes de la presencia de especies desconocidas en muestras de arroz, las cuales son evidenciadas por picos cromatográficos que no coinciden en tiempo de retención con los de los estándares de las especies comúnmente estudiadas [40,41,43,44,47,74,96]. A pesar de esto, solo algunos de estos trabajos han identificado las especies desconocidas, entre las cuales se encontró al catión tetrametilarsonio [96] y el anión dimetiltioarsenato [41,43]. Durante el trabajo llevado a cabo en esta tesis se han detectado picos cromatográficos que no coinciden con ninguna de las 4 especies típicamente presentes en el arroz. A su vez, estos picos tampoco desaparecen con la adición de

H₂O₂ durante las extracciones, lo cual descarta la posibilidad de que se trate de los tioarsenatos reportados por otros autores. Recientemente (2022) se ha publicado un reporte de la identificación de una nueva especie de As en muestras de arroz de Estados Unidos [97]. La estructura de esta especie, identificada como ácido dimetilarsonildimetilarsínico, se muestra en la Figura 1.6. Es llamativa la presencia de dos átomos de arsénico en esta especie. Hasta el momento, la arsenicina A era la única especie con más de un átomo de As presente naturalmente en la biota [98,99]. El comportamiento cromatográfico y la resistencia al H₂O₂ presentado por la nueva especie de As identificada es similar a lo observado con el pico desconocido hallado en este trabajo, por lo que es de esperarse que pueda tratarse del mismo compuesto.



Arsenicina A



Ácido

dimetilarsonildimetilarsínico

Figura 1.6. Estructuras de la Arsenicina A y el ácido dimetilarsonildimetilarsínico

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo general

El objetivo general de esta tesis es generar conocimientos que contribuyan a la actual base científica disponible sobre el contenido y especiación de elementos tóxicos presentes en cereales de consumo masivo producidos en el país.

Con este trabajo se propone generar nuevas metodologías analíticas que permitan la determinación de elementos químicos de interés toxicológico a niveles ultratraza en cereales. A su vez, se propone el desarrollo de metodologías analíticas que permitan identificar y cuantificar individualmente las distintas especies de los elementos que sean de interés en el área de la especiación química. Para ello se estudiará la aplicación de técnicas de espectrometría de masa y separaciones cromatográficas, como así también distintas estrategias de preparación de muestra.

1.5.2. Objetivos específicos

- Estudiar y comparar distintas estrategias de preparación de muestra basadas en métodos clásicos y métodos asistidos por radiación microondas para el posterior análisis por ICP-MS.
- Desarrollar y validar metodologías analíticas basadas en ICP-MS para la cuantificación del contenido total de elementos químicos de interés toxicológico a niveles ultratraza en muestras de cereales.
- Evaluar distintas estrategias de preparación de muestra para análisis de especiación que permitan la extracción cuantitativa de los analitos sin interconversión de especies.
- Estudiar nuevas alternativas de separación por cromatografía de intercambio iónico para las especies que resulten de interés.
- Desarrollar y validar metodologías basadas en HPLC-ICP-MS para el análisis de especiación.
- Aplicar los métodos validados a muestras de cereales.
- Estudiar la presencia de especies desconocidas en muestras reales.

Capítulo 2

Materiales y Métodos

2. Materiales y métodos

2.1. Reactivos y soluciones

A lo largo de todo este trabajo se utilizó agua ultrapura (ASTM Tipo I) obtenida de un equipo Milli-Q Reference®, alimentado con agua destilada. La resistividad del agua ultrapura siempre fue de al menos 18,2 MΩ cm.

El ácido nítrico (HNO₃ 65%, Merck, EMSURE®) y el ácido clorhídrico (HCl 37%, Merck, EMSURE®) utilizados fueron bidestilados en un equipo de destilación subboiling modelo distillacid BSB939-IR, marca Berghof.

Además, se utilizaron en distintas etapas de este trabajo otros reactivos, los cuales son listados a continuación:

- Ácido sulfúrico (H₂SO₄) 95-97%, Merck, EMSURE®.
- Peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 30%, Merck, EMSURE®.
- Nitrato de magnesio hexahidratado (Mg(NO₃)₂·6 H₂O), Merck, EMSURE®.
- Hidróxido de amonio (NH₄OH) 25-30%, Cicarelli, pro-análisis.
- Hidróxido de sodio (NaOH) perlitas, Cicarelli, pro-análisis.
- Fenolftaleína, Cicarelli, pro-análisis.
- Ácido oxálico dihidratado, Merck, EMSURE®.
- Ácido succínico (99%), Cicarelli, pro-análisis.
- Ácido DL-málico (99%), Cicarelli, pro-análisis.
- Ácido L-tartárico (99%), Cicarelli, pro-análisis.
- Biftalato de potasio (99,8%), Anedra, pro-análisis.
- Ácido tartrónico (97%), Sigma-Aldrich.
- Ácido glutárico (99%), Sigma-Aldrich.
- Ácido malónico (99%) y ácido adípico fueron provistos por Prof. Érico M. M. Flores. El ácido adípico fue purificado por recristalización en agua y secado a 105 °C por dos horas.
- Ácido 4-hidroxibenzoico (>99%), Sigma-Aldrich.

Se utilizaron además las siguientes soluciones estándar:

- Arsenato 1000 mg/L, como As: solución trazable a SRM de NIST, adquirida de Merck (TraceCERT®).
- Arsenito 1000 mg/L, como As: preparado por disolución de As_2O_3 (>99%, Bio-pack) en una mínima cantidad de NaOH 1 mol/L, neutralización del exceso de NaOH con HCl 6 mol/L y finalmente llevado a volumen con HCl 0,12 mol/L.
- DMA 1000 mg/L, como As: preparado por disolución de ácido dimetilarsínico (99%, Sigma-Aldrich) en agua ultrapura.
- MMA 1000 mg/L, como As: preparado por disolución de ácido monometilarsínico (>98%, ChemService) en agua ultrapura.
- Soluciones estándar individuales de arsenito, arsenato, DMA y MMA 1 mg/L, como As, preparadas por dilución de las soluciones madre con HNO_3 0,14 mol/L.
- Solución estándar multielemental "Initial Calibration Verification, standard 3" (SCPScience):
 - 10 mg/L: Ag, Al, As, Ba, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Mo, Mn, Ni, Pb, Sb, Se, Th, Tl, U, V, Zn
 - 100 mg/L: Sr.
 - 1000 mg/L: Ca, Fe, K, Mg, Na.
- Solución estándar de Hg, 10 mg/L (Inorganic Ventures)
- Solución para estándar interno "ICP-MS Internal Standard Mix" (Agilent):
 - 100 mg/L: ^6Li , Sc, Ge, Rh, In, Tb, Lu, Bi.
 - Diluida a 800 $\mu\text{g/L}$ en HNO_3 0,7 mol/L
- Solución de sintonización (Agilent)
 - 100 mg/L: Li, Mg, Y, Ce, Tl, Co
 - Diluida a 1 $\mu\text{g/L}$ en HNO_3 0,28 mol/L

Además, se utilizaron resinas de intercambio aniónico fuerte SBG1P-OH-ID, marca Resintech, basadas en un gel poroso de poliestireno funcionalizado con aminas cuaternarias.

2.2. Instrumentación

Un ICP-MS Agilent 7900 fue utilizado para las determinaciones. El mismo contó con un suministro de Ar (99,99998%) para el plasma y He (99,99999%) para la celda de colisión.

Para las separaciones cromatográficas se utilizó una bomba HPLC cuaternaria Agilent 1260 Infinity con una columna Hamilton PRP-X100 (250x4.1 mm, 10 µm) y una precolumna Hamilton PRP-X100 (20x2.1 mm, 10 µm). Todas las conexiones del sistema HPLC fueron realizadas con tuberías de PEEK (0,13 mm i.d.). La salida de la columna fue conectada a una pieza T, donde se combinó con estándar interno antes del ingreso al nebulizador del ICP-MS.

Las digestiones y extracciones microondas fueron llevadas a cabo en un sistema Milestone Ethos ONE con un rotor SK-10 equipado con 10 recipientes de TFM®, los cuales soportan una presión máxima de 100 bar y una temperatura máxima de 300°C. Uno de los recipientes cuenta con una sonda de temperatura, la cual permite al equipo ajustar la potencia del microondas en función de las temperaturas seteadas.

Las digestiones vía seca fueron realizadas en una mufla automática Tecnodalvo.

Para los ensayos por ESI-MS/MS se utilizó un Sciex QTRAP 4000, con el mismo sistema cromatográfico que el ICP-MS

2.3. Muestras

Se analizaron muestras de arroz, trigo y harina de trigo. Las muestras de trigo corresponden a ensayos llevados a cabo por el INTA en las estaciones experimentales de Paraná, Marcos Juárez y Reconquista. Las muestras representan distintas variedades de trigo, algunas comerciales y algunas en desarrollo por el INTA, las cuales fueron cultivadas en las tres estaciones experimentales. De estas variedades, algunas son de ciclo corto y otras de ciclo largo.

Las muestras de arroz y harina fueron adquiridas en supermercados y dietéticas de Santa Fe y Entre Ríos. Se adquirieron muestras de distintas marcas comerciales entre los años 2018 y 2022. Entre las muestras de arroz se analizaron muestras de arroz

pulido, arroz parbolizado y arroz integral. A su vez se incluyeron principalmente las variedades Largo Fino y Doble Carolina, además de 4 muestras de arroz Yamaní, una de Corto Japones y una de arroz Glutinoso. Todas las muestras de Doble Carolina, así como la de arroz glutinoso y Corto Japonés son arroces pulidos. En cuanto a la harina de trigo, se incluyeron muestras de harina integral, harina 000, harina 0000 y harina leudante.

Se analizaron un total de 117 muestras: 30 muestras de trigo, 46 de arroz y 41 de harina de trigo. En la Tabla 2.1 se muestra el número de muestras analizadas por cada matriz.

Tabla 2.1. Número de muestras analizadas por matriz

Matriz	Muestras analizadas
Arroz pulido	21
Arroz parbolizado	11
Arroz integral	14
Harina integral	10
Harina 000	10
Harina 0000	10
Harina leudante	11
Trigo	30 (10 por región)

Capítulo 3

Metales Totales

3. Metales totales

En este capítulo se describe el desarrollo, validación y aplicación del método empleado para la cuantificación del contenido total de Pb, Cd, As y Hg en las muestras estudiadas. Se hace énfasis en la etapa de preparación de muestra, la cual suele ser la etapa más crítica del proceso analítico en el análisis ultratraza.

3.1. Optimización instrumental

En las técnicas monoelementales, como AAS, es común durante el desarrollo del método optimizar las condiciones instrumentales y operacionales para obtener la mejor señal analítica del analito con el que se está trabajando. En ICP-MS, al ser usado mayormente como técnica multielemental, se deben seleccionar condiciones que representan soluciones de compromiso para todos los analitos estudiados. Las condiciones óptimas para distintos elementos pueden depender de muchos factores, como su masa, primer y segundo potencial de ionización, potenciales interferencias, entre otras. A esto se suma también la gran complejidad del sistema, que implica la optimización de las condiciones del sistema de introducción de muestra, el plasma, las lentes electrostáticas y la celda de colisión y reacción. Debido a esto, actualmente la optimización generalmente se lleva a cabo a través de algoritmos incluidos en los softwares de los equipos modernos, los cuales optimizan la señal de algunos elementos representativos, distribuidos en todo el rango de masas, mientras que minimizan la señal de ciertas interferencias. Para ello, se aspira una solución llamada solución de sintonización o *tuning solution*, la cual contiene una serie de elementos que son utilizados para la optimización. La solución utilizada en este trabajo es provista por el fabricante del equipo y contiene 1 µg/L de Li, Y, Ce, Tl y Co en medio de HNO₃ 2% (v/v). Los isótopos de Li, Y, Co y Tl son utilizados para optimizar la sensibilidad en todo el rango de masas, mientras que el Ce es usado para minimizar las interferencias por óxidos (representada por la relación CeO⁺/Ce⁺) y por iones con doble carga (representada por Ce⁺²/Ce⁺). Aspirando esta solución, el instrumento realiza una optimización sobre los potenciales de las diferentes lentes para maximizar la sensibilidad y minimizar las interferencias. Esta optimización es

llevada a cabo a diario antes de la medida, ya que los valores óptimos pueden modificarse con el tiempo al variar el estado de los conos, las lentes y demás componentes del instrumento.

Las condiciones del plasma (como la potencia de la radiofrecuencia, la profundidad de muestreo, caudales de gases, entre otras), del sistema de introducción de muestra (como el caudal de la bomba peristáltica y del gas de nebulización) y el caudal de He de la celda de colisión usados fueron los recomendados por el fabricante. Valores distintos de los recomendados fueron evaluados, sin embargo, no se observaron mejoras significativas en la performance, salvo un aumento de la sensibilidad al reducir la distancia de la antorcha a los conos. Sin embargo, esto aumenta el riesgo de contaminar y obstruir los conos y el interior del instrumento con componentes de la muestra, por lo que se decidió continuar con los valores recomendados por el fabricante. También se observó que la sensibilidad es inversamente proporcional al caudal de He de la celda de colisión, pero caudales demasiado bajos no garantizan la eliminación eficiente de las interferencias poliatómicas, por lo que se continuó con la solución de compromiso propuesta por el instrumento. Como se verá más adelante, en el presente trabajo la capacidad de detección del método no termina siendo limitada por la sensibilidad instrumental, si no por la reproducibilidad de los blancos. Esto es frecuente en el análisis a niveles extremadamente bajos [100].

Las condiciones típicamente utilizadas se muestran en la Tabla 3.1. Como fue mencionado anteriormente, los voltajes de las lentes pueden variar ligeramente de un día a otro. Sin embargo, no se observaron grandes desviaciones de estos valores.

3.1.1. Selección de estándares internos

La capacidad multielemental de las espectrometrías atómicas basadas en plasma hace que sea posible el uso de estándares internos (ISTDs) para corregir algunos efectos de matriz y la deriva instrumental. En el caso de ICP-MS, como ISTDs se utilizan isótopos de elementos pocos comunes que presenten masas y potenciales de ionización similares a los del analito de interés. Esto hace que generalmente sea necesario disponer de varios ISTDs si se determina una gran variedad de analitos. Isótopos comúnmente utilizados como ISTD son ^6Li , ^9Be , ^{45}Sc , ^{72}Ge , ^{89}Y , ^{103}Rh , ^{115}In , ^{159}Tb , ^{175}Lu , ^{209}Bi , entre otros.

Tabla 3.1. Condiciones instrumentales usadas

Adquisición			
Modo de adquisición	Espectro		
Patrón de pico	1 punto por pico (<i>peak hopping</i>)		
Réplicas	3		
Barridos/Réplica	100		
Plasma			
Potencia RF	1550 W		
Matching RF	1,8 V		
Caudal de gas de plasma	15 L/min		
Profundidad de muestreo	10,0 mm		
Introducción de muestra			
Caudal de gas carrier	1,07 L/min		
Caudal Makeup Gas	0,00 L/min		
Nebulizador	Concéntrico, MicroMist™		
Cámara de nebulización	Doble paso, concéntrica, 2 °C		
Toma de muestra	1 ml/min, 25 s		
Estabilización	0,3 ml/min, 30 s		
Caudal de muestra	0,3 ml/min		
Lavado 1	HCl 0,5 mol/L, 0,3 ml/min, 20 s		
Lavado 2	HNO ₃ 0,7 mol/L, 0,3 ml/min, 40 s		
Cono de muestreo	Níquel		
Cono Skimmer	Níquel		
Celda de colisión			
Caudal de He	4 ml/min		
OctP Bias	-18 V		
OctP RF	190 V		
Energy Discrimination	5 V		
Lentes			
Extract 1	0 V	Cell Entrance	-40 V
Extract 2	-230 V	Cell Exit	-60 V
Omega Bias	-95 V	Deflect	3,4 V
Omega Lens	10,4 V	Plate Bias	-60 V

Para llevar a cabo esta corrección, el ISTD debe ingresar al plasma junto con el analito. Para ello existen dos alternativas: se pueden fortificar individualmente con ISTD las soluciones a analizar o se puede combinar constantemente el caudal de muestra que ingresa al equipo con un caudal de una solución de ISTD a través de una conexión T de las tuberías luego de la bomba peristáltica. Esta última alternativa tiene las ventajas de que no introduce el error de pipeteo del ISTD a la cuantificación, que la concentración del ISTD no se altera si es necesario diluir la muestra y además que simplifica el procedimiento. La desventaja es que el caudal de ISTD ingresado diluye las soluciones de muestra que alcanzan el plasma. Sin embargo, en la configuración utilizada en este trabajo este inconveniente fue mínimo ya que el caudal de ISTD es aproximadamente 16 veces menor que el caudal de muestra. Se utilizó para preparar la solución de ISTD una mezcla comercial provista por el fabricante, la cual contiene Bi, Ge, In, ⁶Li, Lu, Rh, Sc y Tb a una concentración de 100 mg/L. Esta solución es diluida a una concentración de 800 µg/L, y debido al caudal 16 veces menor de la solución de ISTD, llegan al plasma aproximadamente 50 µg/L de los elementos antes mencionados. La concentración exacta de la solución de ISTD no es importante mientras que la misma se mantenga constante a lo largo de toda la determinación. En la Tabla 3.2 se muestra el estándar interno utilizado para cada analito, los cuales fueron asignados procurando similitud en masa y potencial de ionización entre ISTD y analito. Para la corrección por estándar interno, se dividen las CPS del analito por las CPS de su ISTD. Estas relaciones son la nueva respuesta instrumental que se utiliza para construir las curvas de calibrado y para la cuantificación corregida por ISTD.

Tabla 3.2. ISTD utilizado para cada analito

Analito	Estándar Interno
As	Ge
Cd	Rh
Hg	Bi
Pb	Bi

3.1.2. Selección de isótopos

En los casos en los que un elemento presenta más de un isótopo, puede seleccionarse uno o más de ellos para llevar a cabo la cuantificación. La selección dependerá fundamentalmente de la abundancia isotópica (la cual es uno de los factores que afectan la sensibilidad) y de potenciales interferencias.

En la Tabla 3.3 se presentan los isótopos de los analitos y los ISTD y sus abundancias relativas. Se encuentran resaltados los isótopos seleccionados en cada caso.

De los elementos estudiados, As, Rh y Bi son monoisotópicos, por lo que inevitablemente deben seleccionarse sus isótopos ^{75}As , ^{103}Rh y ^{209}Bi . La interferencia poliatómica $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$ sobre el ^{75}As es probablemente una de las más conocida. Sin embargo, los equipos modernos con celdas de colisión permiten remover eficientemente esta interferencia. Se analizará en profundidad esta interferencia en la Sección 3.1.3.

En cuanto al Cd, todos los isótopos, excepto el ^{111}Cd , presentan solapamiento isobárico con otros elementos (Pd, Sn e In). El isótopo ^{111}Cd solo presenta interferencias poliatómicas, y ninguna de ellas involucra el Ar o exclusivamente elementos presentes en la atmósfera, por lo que puede esperarse que no sean de gran magnitud y pueden ser removidas fácilmente por la celda de colisión.

Para el Hg, los solapamientos isobáricos se presentan para los isótopos menos abundantes. Si bien el W es un elemento que es poco probable encontrarlo en elevadas concentraciones en muestras de alimentos, en experiencias fuera de esta tesis, la celda de colisión mostró poca performance para la eliminación de la interferencia WO^+ . Por este motivo, y teniendo en cuenta que junto con las muestras aquí analizadas se cuantificaban también otras de matrices diferentes ajenas a esta tesis, se decidió optar por el isótopo ^{201}Hg , el cual aún resulta una sensibilidad adecuada, pero sin las interferencias del W.

El caso del Pb es particular ya que al ser sus isótopos principales de origen radiogénico, su abundancia relativa varía ampliamente según el origen del metal [101]. Si se selecciona un único isótopo del Pb para la cuantificación, y su abundancia relativa es distinta entre los estándares y las muestras, se incurrirá en un error sistemático en la cuantificación. Esto ocurre ya que una misma concentración de Pb tendrá

Tabla 3.3. Elementos medidos, sus isótopos estables y abundancias relativas.

Elemento	Analito/ISTD	Isótopo	Abundancia relativa (%)	Potenciales interferencias ^a
As	Analito	75	100	ArCl ⁺ , GeH ⁺
		106	1,25	¹⁰⁶ Pd
		108	0,89	¹⁰⁸ Pd, MoO ⁺
		110	12,47	¹¹⁰ Pd, K ₂ O ₂ ⁺ , MoO ⁺ , GeAr ⁺
Cd	Analito	111	12,80	K ₂ O ₂ H ⁺ , MoO ⁺ ,
		112	24,11	¹¹² Sn, Ca ₂ O ₂ ⁺ , Ar ₂ O ₂ ⁺ , GeAr ⁺ , MoO ⁺
		113	12,23	¹¹³ In, Ca ₂ O ₂ H ⁺ , Ar ₂ O ₂ H ⁺ , GeAr ⁺ , MoO ⁺
		114	28,75	¹¹⁴ Sn, MoO ⁺ , GeAr ⁺
		116	7,51	¹¹⁶ Sn, InH ⁺ , MoO ⁺
		196	0,15	¹⁹⁶ Pt
Hg	Analito	198	10,04	¹⁹⁸ Pt, WO ⁺
		199	16,94	WO ⁺
		200	23,14	WO ⁺
		201	13,17	-
		202	29,74	WO ⁺
		204	6,82	²⁰⁴ Pb
Pb	Analito	204	1,4	²⁰⁴ Hg
		206	24,1 ^b	-
		207	22,1 ^b	-
		208	52,4 ^b	-
Ge	ISTD	70	20,38	⁷⁰ Zn, ArNO ⁺ , Cl ₂ ⁺ , ClO ₂ ⁺ , SO ₂ ⁺
		72	27,31	Ar ₂ ⁺ , FeO ⁺ , ArS ⁺ , Cl ₂ ⁺ , ClO ₂ ⁺ , SO ₂ ⁺
		73	7,76	Ar ₂ H ⁺ , ArS ⁺ , ClO ₂ ⁺ ,
		74	36,72	⁷⁴ Se, Ar ₂ ⁺ , ArS ⁺ , Cl ₂ ⁺ , NiO ⁺
		76	7,83	⁷⁶ Se, Ar ₂ ⁺ , ArS ⁺
Rh	ISTD	103	100	ArCu ⁺
Bi	ISTD	209	100	-

^a Solo se muestran las interferencias poliatómicas formadas por los elementos más abundantes en el tipo de muestras analizadas. Los isótopos de las interferencias poliatómicas fueron omitidos por simplicidad.

^b Las abundancias isotópicas varían ampliamente según el origen geográfico [101]

distintas abundancias del isótopo seleccionado, y por lo tanto resultará en señales instrumentales también diferentes. Para evitar este error, lo que se propone generalmente es usar como señal instrumental la suma de los isótopos radiogénicos ^{206}Pb , ^{207}Pb y ^{208}Pb , la cual presenta mucha menos variabilidad geográfica [102]. El isótopo ^{204}Pb (que no es radiogénico) no puede ser utilizado en instrumentos de baja resolución ya que se encuentra solapado con el ^{204}Hg . Este isótopo a su vez es de muy baja abundancia, lo que perjudicaría la sensibilidad.

Finalmente, para el Ge se selecciona el isótopo ^{72}Ge ya que los demás se encuentran solapados con isótopos de Zn y Se, o presentan una menor abundancia. Las interferencias poliatómicas en esta relación masa/carga pueden ser eliminadas por la celda de colisión. La interferencia $^{36}\text{Ar}^{36}\text{Ar}^+$ no es muy abundante a pesar de estar formada por Ar, ya que el isótopo ^{36}Ar solo tiene una abundancia del 0,33%. Por otra parte, las interferencias por Fe, Cl y S pueden ser removidas eficientemente por la celda siempre y cuando no se encuentran en concentraciones excesivamente altas, como podría ser el caso si se usase H_2SO_4 o HCl para la preparación de las muestras.

En la Tabla 3.4 se presentan los isótopos seleccionados y los tiempos de integración asignados a cada uno. Al Hg se le asignó un tiempo de integración de 1 s por réplica ya que de esta manera se observó una mejora sustancial en la precisión instrumental. Los demás elementos presentaron precisiones adecuadas con un tiempo de integración de 0,3 s

Tabla 3.4. Isótopos monitoreados y sus tiempos de integración

Isótopo	Tiempo de integración (s)
^{72}Ge	0,3
^{75}As	0,3
^{103}Rh	0,3
^{111}Cd	0,3
^{201}Hg	1
^{206}Pb	0,3
^{207}Pb	0,3
^{208}Pb	0,3
^{209}Bi	0,3

3.1.3. Interferencia del Cl sobre el As

Como fue mencionado en la sección anterior, la presencia de Cl en la solución de muestra puede dar lugar a la formación de $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$, que se solapa con el isótopo ^{75}As [103]. Esta interferencia no solo limita el uso de HCl para la preparación de muestras, sino que también hace que se deba tener en cuenta el contenido de Cl propio de la muestra. Si bien actualmente los instrumentos vienen equipados con celdas de colisión y reacción para la reducción de interferencias, éstas tienen sus limitaciones. En soluciones donde el contenido Cl sea excesivamente alto, se puede llegar a sobrepasar la capacidad de la celda para eliminar la interferencia $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$, dando lugar a sobrestimaciones. Este podría ser el caso de soluciones en HCl, aguas de mar o alimentos con sal agregada (NaCl). Una de las matrices de interés en este trabajo es harina leudante, la cual frecuentemente es adicionada con sal durante su elaboración.

El As es un elemento monoisotópico, por lo que no presenta un perfil isotópico característico. En cambio, el Cl tiene dos isótopos estables, ^{35}Cl y ^{37}Cl , con abundancias relativas de 75,77% y 24,23%, respectivamente, con lo cual sí presenta un perfil isotópico característico. Esto permite diferenciar, en cierta medida, si una señal a m/z 75 se debe a ^{75}As o a $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$, ya que, si este último es el caso, también se debe observar una señal a m/z 77 debido a $^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}$. Esta es la base de las ecuaciones de corrección que se utilizan en equipos sin celda para la remoción de interferencias poliatómicas.

Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, se decidió evaluar el efecto de distintos niveles de Cl en la señal del As monitoreando las m/z 75 y 77. Para ello se prepararon soluciones de HCl en concentraciones de 0; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 y 1 mol/L y fueron medidas por ICP-MS con celda de colisión, usando las condiciones de la Tabla 3.1. Se calcularon las concentraciones aparentes de As a partir de la señal a m/z 75, y se calculó la relación entre las señales a m/z 75 y 77. Si esta relación se aproxima a la relación isotópica del Cl ($75,77\%/24,23\% = 3,13$), puede inferirse que lo que se está midiendo es mayormente ArCl^+ y no As. Por el contrario, si la misma es mayor que 3,13 es porque la señal se origina mayoritariamente por la presencia de As.

Tabla 3.5. Concentraciones de As aparentes en las distintas soluciones de HCl, corregidas por blanco

Concentración HCl (mol/L)	Concentración aparente de As ($\mu\text{g/L}$)	Relación 75/77
0 (agua ultrapura)	-	5,21
0,005	0,001	4,96
0,01	0,002	4,75
0,05	0,012	3,31
0,1	0,030	3,02
0,5	0,143	2,84
1	0,341	3,23

En la Tabla 3.5 se presentan las concentraciones aparentes de As y la relación entre las m/z 75 y 77 para cada solución de HCl. A su vez, en la Figura 3.1 se presentan las señales y la relación 75/77 para cada solución. Para el cálculo de las concentraciones aparentes, al resultado de cada solución de HCl se le restó la concentración obtenida para el agua ultrapura. Como puede verse, la concentración aparente de As aumenta con la concentración de HCl. Esto puede deberse a la interferencia ArCl^+ o a la presencia de una contaminación de As en HCl. A concentraciones bajas de HCl, la relación 75/77 es mayor que la relación isotópica del Cl, por lo que es de esperarse que esta señal se deba a As presente en el ácido. Por el contrario, a medida que la concentración de HCl aumenta, la relación 75/77 se aproxima a la natural del Cl. Esto sugiere que en estas soluciones predomina la interferencia ArCl^+ . Esto parece observarse a partir de la solución de 0,05 mol/L.

Durante el desarrollo de esta tesis se comparó la señal a m/z 35 (^{35}Cl) de soluciones de muestra digeridas y estándares de HCl. Es decir, se estimó el contenido de Cl de las soluciones. Se constató que las soluciones de muestra siempre daban una señal menor que un estándar de HCl 0,015 mol/L, incluso para las harinas leudantes. Teniendo en cuenta esto y lo expuesto anteriormente, es de esperarse entonces que usando la celda de colisión el contenido de Cl de las muestras no aporte un sesgo significativo a la cuantificación de As. Según la Tabla 3.5, puede verse que una concentración de Cl de 0,01 mol/L generaría una concentración aparente de As de 0,002 $\mu\text{g/L}$, la cual puede considerarse despreciable para los propósitos de este trabajo.

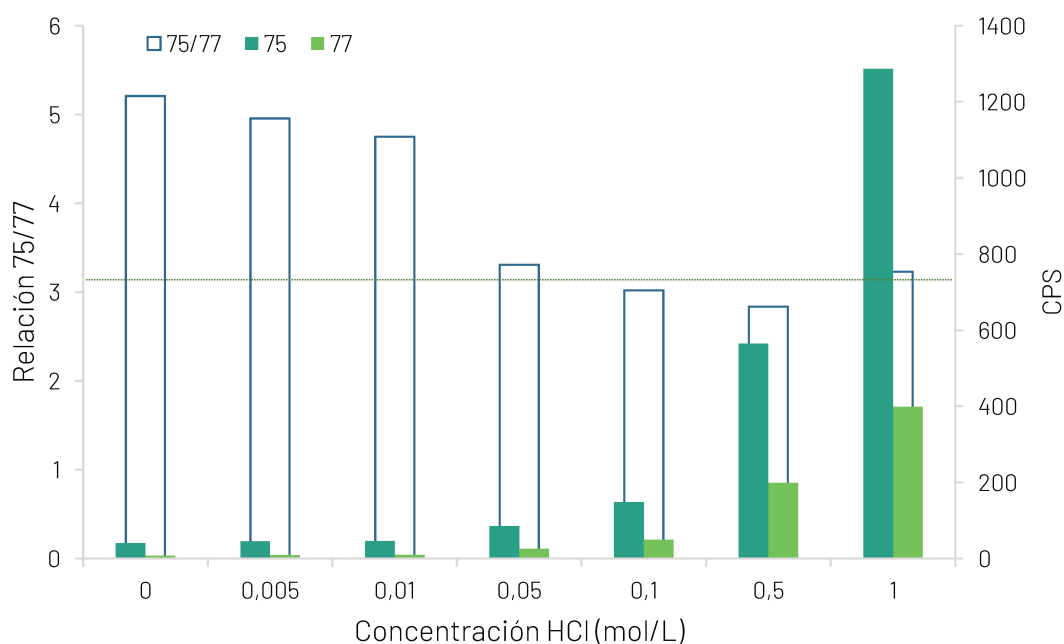


Figura 3.1. Resultados obtenidos en el estudio de la interferencia del Cl. Señales (CPS) y relación obtenida para las m/z 75 y 77. La línea punteada representa la relación isotópica natural del Cl(3,13)

3.1.4. Uso de regresión ponderada para la calibración

Así como en la mayoría de las técnicas instrumentales, la cuantificación por ICP-MS normalmente requiere de la construcción de una curva de calibrado que relacione la respuesta instrumental (CPS) con la concentración del analito en solución. Es deseable que esta relación sea de tipo lineal, lo cual permite el ajuste de una recta por el método de regresión de mínimos cuadrados. Una de las ventajas inherentes a la tecnología de ICP-MS es el amplio rango lineal con el que cuenta, habiéndose reportado rangos lineales de hasta 11 órdenes de magnitud en instrumentos modernos [29].

Al construir curvas de calibrado en el rango de 0,1 a 50 $\mu\text{g/L}$ se observó que generalmente la regresión lineal simple no ajustaba bien los puntos de concentración más baja. Siendo esta la región de la curva donde se espera encontrar la mayoría de las muestras, es de especial importancia un correcto ajuste de estos estándares. En la Figura 3.2a se presenta como ejemplo la curva de calibrado de Cd, la cual a simple vista parece tener un ajuste adecuado. Sin embargo, como se ve en la Figura 3.2b, que presenta una ampliación de la región más baja de la curva, la regresión lineal simple no logra ajustar correctamente los estándares más bajos.

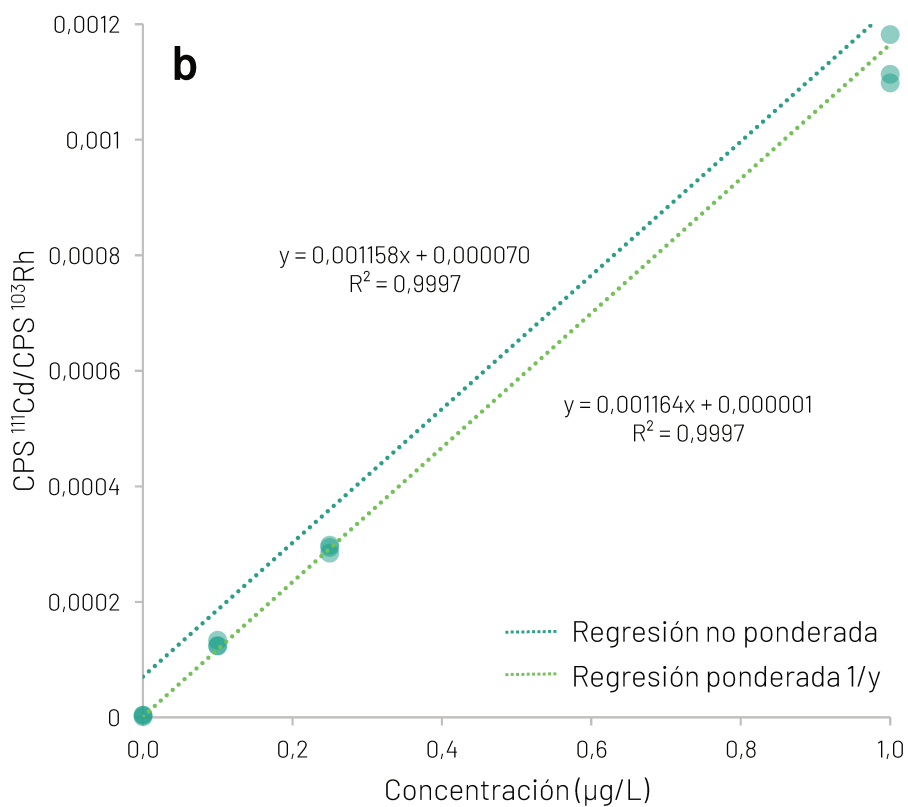
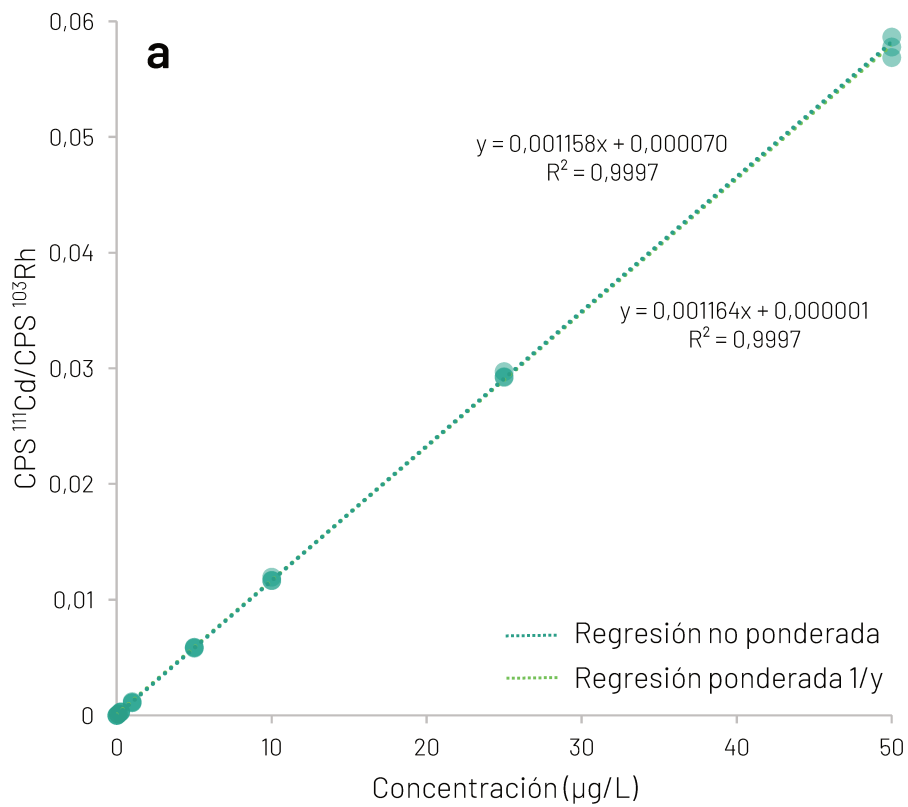


Figura 3.2. (a) Curva de calibrado de Cd, con ajuste por regresión lineal simple y con ponderación 1/y. (b) Aumento sobre la región de bajas concentraciones.

En función de esto, se evaluó el uso de regresiones ponderadas para favorecer el ajuste de estos puntos. El uso de una regresión $1/y$, donde y es la respuesta instrumental, da mayor peso a los estándares más bajos, por lo que esta fue la ponderación evaluada. En la Figura 3.2b se observa cómo al aplicar esta ponderación se logra ajustar estos puntos bajos, manteniendo un ajuste adecuado para los puntos más altos, como puede verse en la Figura 3.2a. El software del instrumento incluye la opción de aplicar esta ponderación, por lo que su uso no supone una dificultad adicional.

3.1.5. Optimización de la secuencia de lavado

Entre la introducción de una muestra y otra al equipo se debe llevar a cabo un lavado del sistema de introducción de muestra aspirando una solución adecuada de manera que la señal del analito vuelva a su línea de base antes de la medición de la próxima muestra. Si este lavado no es llevado a cabo correctamente se produce el llamado "efecto de memoria", en el cual muestras de elevada concentración pueden afectar las mediciones de las muestras siguientes. Este efecto depende de la química del analito, y en ICP-MS es especialmente conocido el efecto de memoria causado por el Hg [104-107].

La elevada tendencia del Hg a presentar efecto de memoria hace que sean necesarios tiempos de lavado elevados entre muestra y muestra, lo cual puede afectar seriamente la frecuencia analítica. El tiempo de lavado puede ser mayor o menor dependiendo de la composición de la solución de lavado utilizada. Las soluciones más comunes son ácidos inorgánicos, como HNO_3 y HCl en diversas concentraciones, generalmente menores a 5% (v/v). Se han propuesto otras soluciones para analitos problemáticos como el Hg, sin embargo, no hay un consenso en la bibliografía sobre la solución de lavado óptima para este fin. Algunas soluciones de lavado reportadas consisten en concentraciones más elevadas de HCl , soluciones de 2-mercaptoetanol, EDTA, H_2O_2 , NH_4OH , Au, y surfactantes como Tritón X-100, entre otras [104-107]. Los ácidos son comúnmente usados ya que suelen estar presentes en las muestras y aseguran un pH que mantiene los metales en solución. El HCl tiene la particularidad de que aporta iones Cl^- que pueden formar complejos con distintos metales y se

creo que esto puede facilitar el lavado. De forma similar, el 2-mercaptoetanol y el EDTA también forman complejos con distintos metales.

Se estudió la eficiencia de distintas soluciones de lavado reportadas en bibliografía y recomendadas por el fabricante. Las soluciones estudiadas fueron:

- HNO_3 5% (v/v)
- HCl 5% (v/v)
- HNO_3 3% (v/v) + HCl 3% (v/v)
- HCl 15% (v/v)
- NH_4OH 4% (v/v)
- HCl 15% (v/v) + H_2O_2 15% (v/v)
- NH_4OH 15% (v/v) + H_2O_2 15% (v/v)
- 2-Mercaptoetanol 0,05% (v/v)
- EDTA (no sódico) 0,1% (m/v) + Tritón X-100 0,0075% (v/v) + NH_4OH 0,67% (v/v) + H_2O_2 1% (v/v)

Para evaluar la eficiencia de cada solución de lavado, se registró en función del tiempo la señal del isótopo ^{201}Hg al introducir una solución de 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ de un estándar multielemental preparado en HNO_3 0,7 mol/L (5% (v/v)) y al retirar el estándar e ingresar distintas soluciones de lavado. También se registró la señal del ^{111}Cd , para comparar los resultados del Hg con un elemento fácil de lavar como el Cd. Todas las soluciones fueron introducidas a un caudal de 0,3 ml/min. La señal fue registrada durante un período de entre 5 y 6 minutos en total.

Debido a pequeñas variaciones en los tiempos de cambio de solución, los límites del pico obtenido con el estándar no coinciden perfectamente. Esto no es de mayor importancia ya que solo se desea evaluar la eficiencia de cada solución para remover al analito del sistema de introducción de muestra. A los fines de llevar a cabo la comparación, se alinearon los límites derechos del pico del estándar, es decir, cuando ya no ingresaba más solución de estándar al plasma. Las líneas de base también fueron ligeramente distintas para cada solución de lavado, posiblemente debido a impurezas en los reactivos. Para facilitar la comparación, las gráficas fueron desplazadas, alineando las líneas de base obtenidas antes del ingreso de estándar al

plasma. Cabe aclarar que la forma de la gráfica no es alterada por estos ajustes, sino que solo su posición respecto a los ejes.

En la Figura 3.3 se presentan los resultados de los lavados con soluciones solo compuestas por ácidos inorgánicos. En la Figura 3.3b se ve que el HCl elimina más rápidamente el Hg que el HNO₃ y se alcanza la línea de base más rápidamente (para el HNO₃ solo se registraron 5 minutos de señal). A pesar de esto, en la ampliación presentada en la Figura 3.3a se observa que incluso con el HCl son necesarios casi 4 minutos de lavado desde que deja de ingresar el estándar al plasma para volver a alcanzar el valor de la línea de base.

Por otra parte, en la Figura 3.4 se encuentran los resultados obtenidos con las demás soluciones de lavado, además del HNO₃ y el HCl para facilitar la comparación. Puede verse que el agregado de otros reactivos o el uso de medio básico empeora la situación, dando como resultado tiempos de lavado más largos. También se observó que la solución compuesta por HCl 15% (v/v) + H₂O₂ 15% (v/v) es demasiado inestable, liberándose constantemente una cantidad importante de O₂ por la descomposición del H₂O₂. Al parecer el acomplejamiento por parte del 2-mercaptoetanol o el EDTA no es favorable para el lavado del Hg del sistema. El uso de estas soluciones también parece dar algún tipo de efecto de matriz y/o retrasar el tiempo de estabilización de la señal, ya que como puede verse en la Figura 3.4, la señal no se estabiliza en el mismo nivel máximo con las diferentes soluciones.

A modo de comparación, en la Figura 3.5 se presenta el comportamiento del Cd en estos ensayos. El Cd es un elemento que típicamente no presenta efecto de memoria, y como puede verse dicha figura, la señal vuelve rápidamente a la línea de base una vez que deja de ingresar el estándar al plasma. A diferencia del Hg, con el Cd las soluciones de NH₄OH resultaron en tiempos de lavado ligeramente más cortos. Las demás soluciones presentaron comportamientos similares. En la Figura 3.6 se compara el comportamiento del Cd y el Hg con la solución de HNO₃ 5% (v/v), normalizando las señales a una misma sensibilidad para facilitar la comparación. Es evidente no solo la dificultad para eliminar el Hg del sistema de introducción de muestra, sino también el mayor tiempo de estabilización necesario para obtener una señal estable.

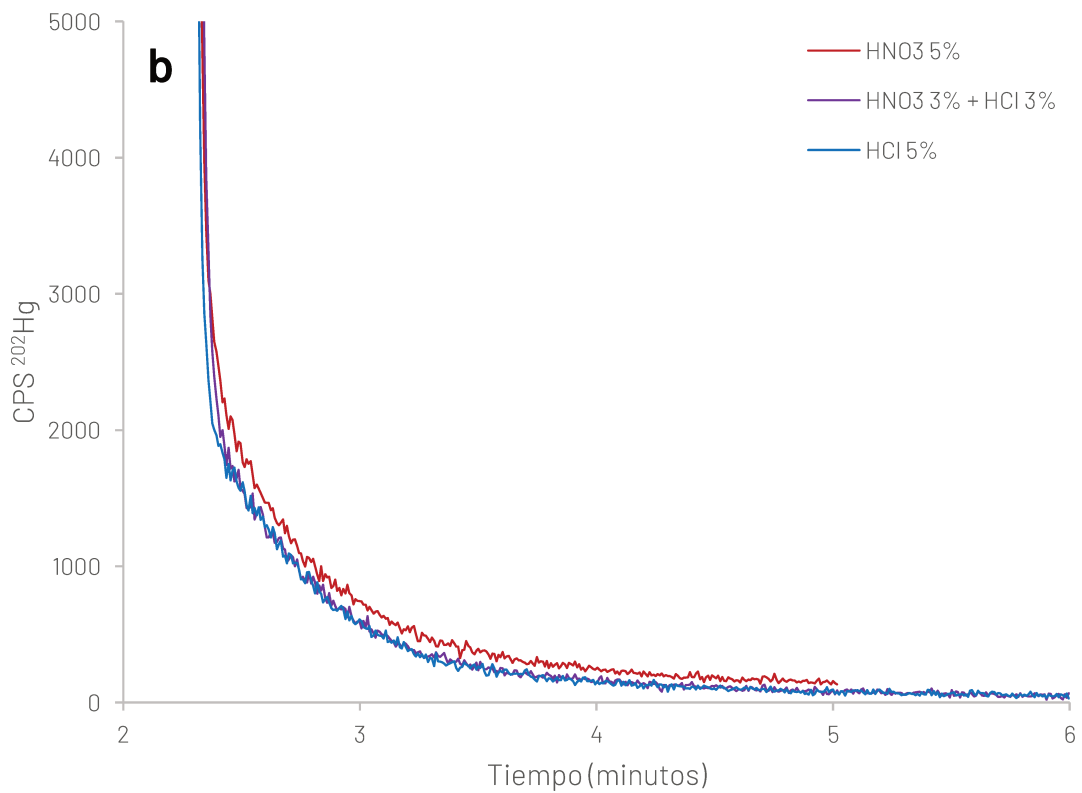
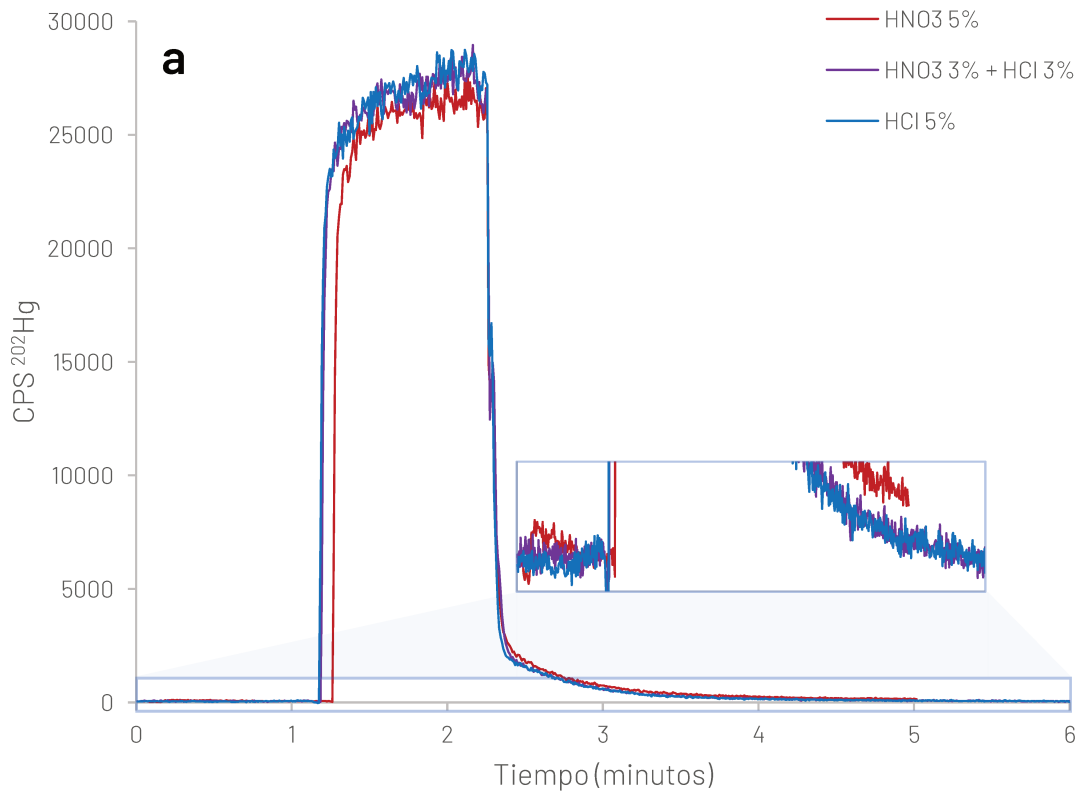


Figura 3.3. (a) Ensayos de lavado de Hg con soluciones ácidas. Ampliación en la región de la línea de base. (b) Ampliación de la región de efecto de memoria.

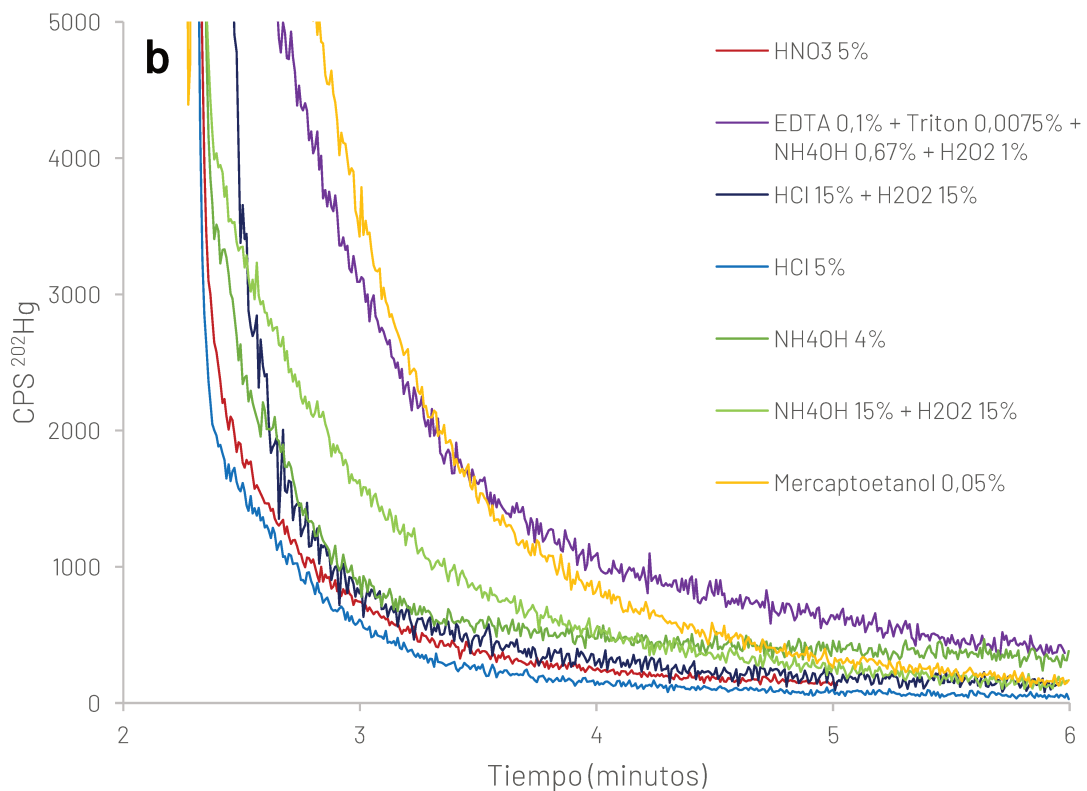
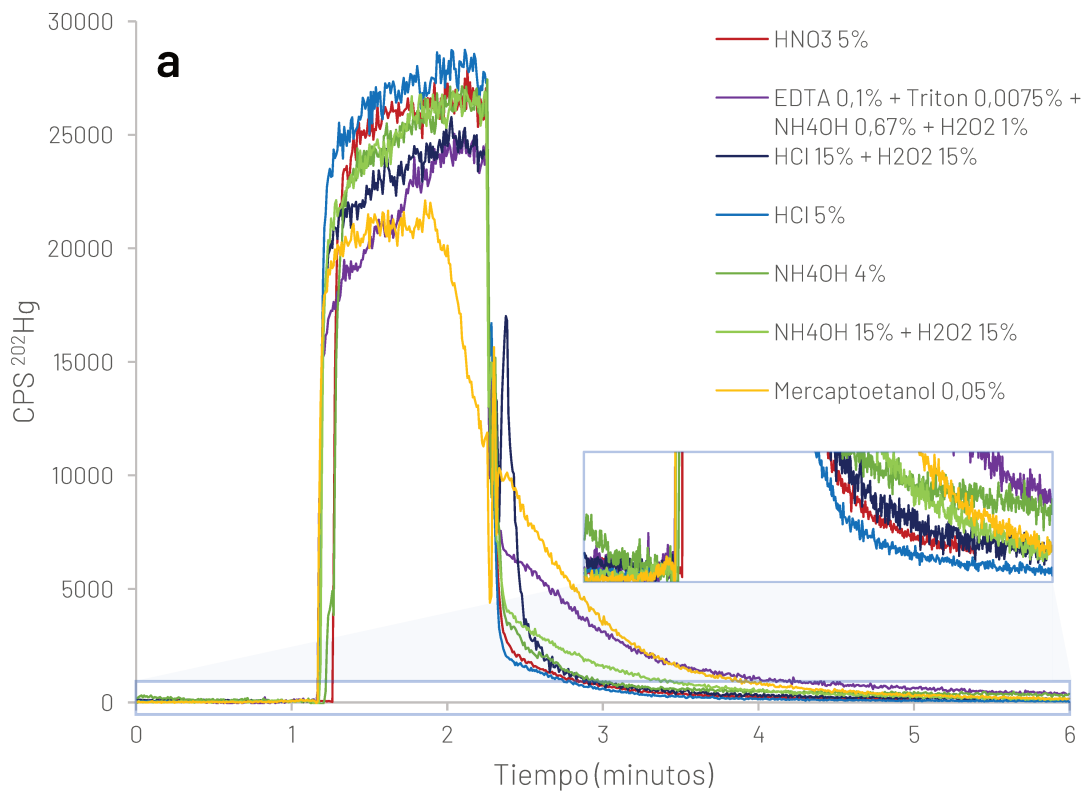


Figura 3.4. (a) Ensayos de lavado de Hg con otras soluciones. Ampliación en la región de la línea de base. (b) Ampliación de la región de efecto de memoria.

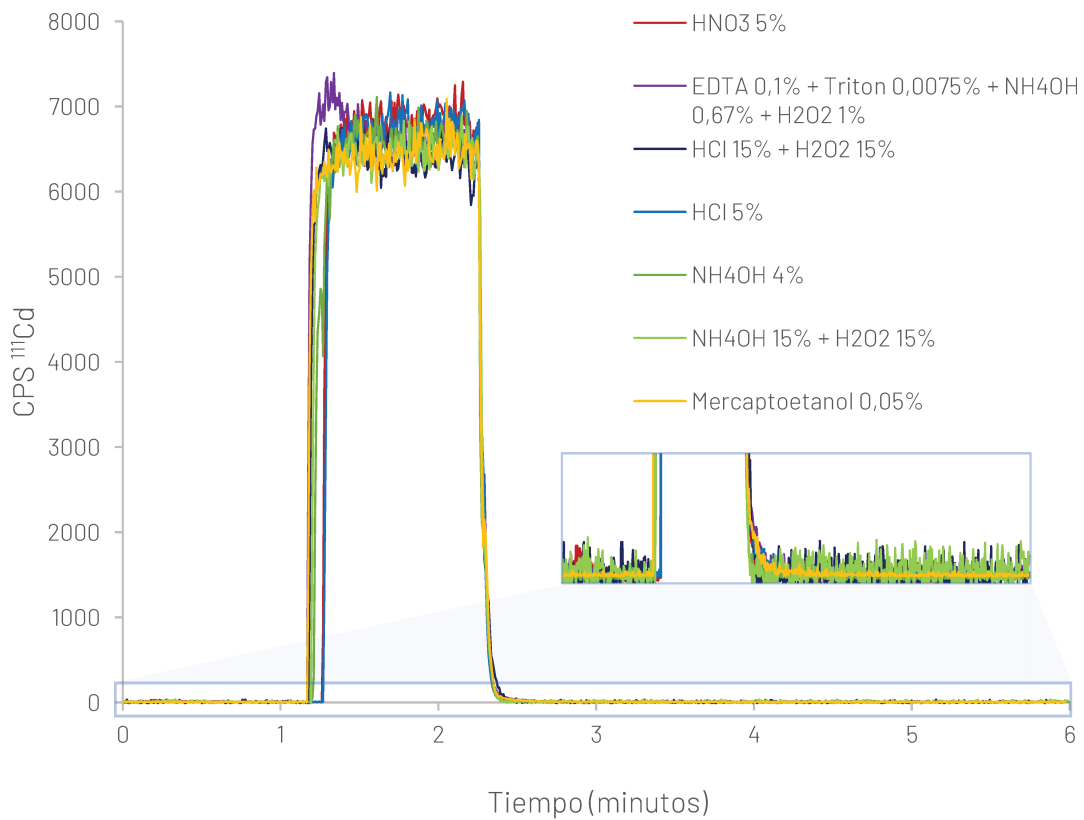


Figura 3.5. Ensayos de lavado de Cd con diversas soluciones. Ampliación en la región de la línea de base.

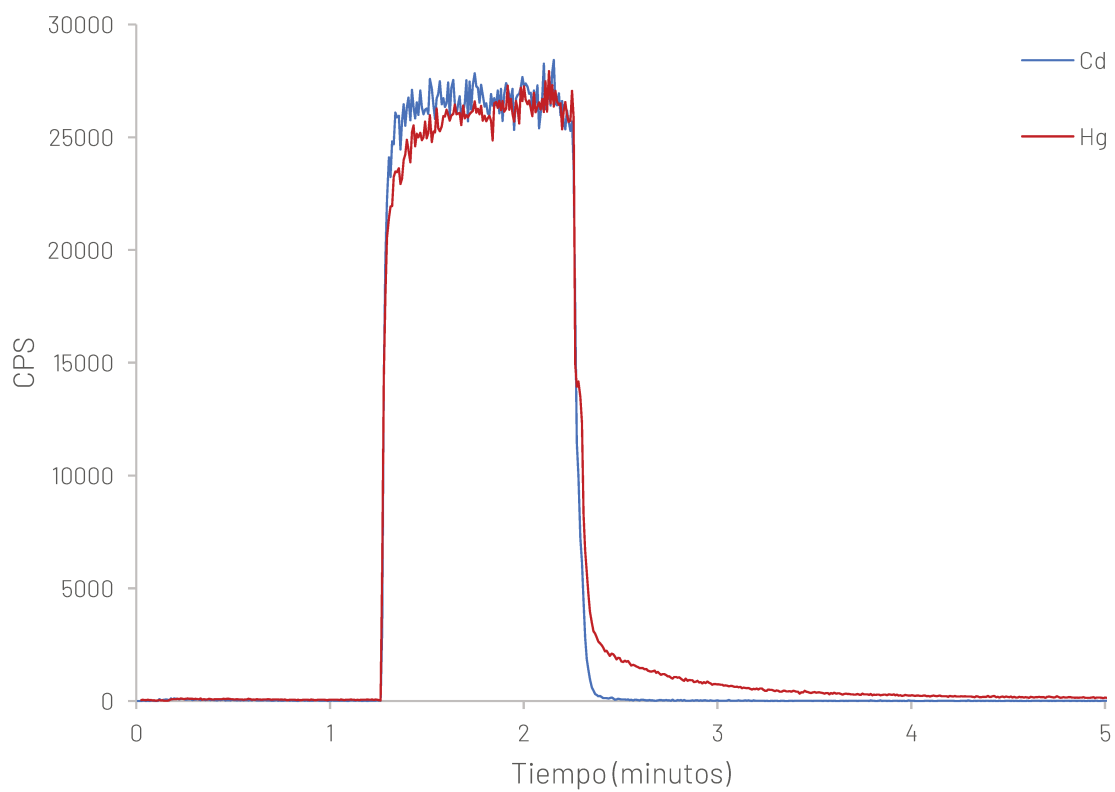


Figura 3.6. Comparación del lavado de Hg y Cd con HNO_3 5% (v/v). Sensibilidad normalizada.

Teniendo en cuenta que ninguna solución mejoró sustancialmente el lavado del Hg, se decidió mantener la concentración de Hg de las soluciones de muestra y estándares por debajo de los 2 µg/L. Esto no es una limitación importante, ya que la mayoría de las muestras, incluidas las estudiadas en este trabajo, resultan en concentraciones de Hg mucho menores. En cuanto a los lavados, se decidió realizar un primer enjuague rápido en agua ultrapura para lavar el exterior de la manguera de muestra, seguido de un lavado durante 20 segundos con HCl 5% (v/v) y por último lavado durante 40 segundos con HNO₃ 5% (v/v). Este segundo lavado es importante para eliminar el HCl del sistema, ya que, como fue mencionado anteriormente, la presencia de Cl puede dar lugar a interferencias poliatómicas. De hecho, con tiempos menores que 40 segundos para el HNO₃ se observaron interferencias de ³⁵Cl¹⁶O sobre el isótopo ⁵¹V.

Vale la pena mencionar que existe un tiempo muerto sustancial desde que comienza a ingresar una solución y hasta que llega al plasma. Este tiempo es aprovechado para comenzar la secuencia de lavado mientras aún se está midiendo la solución de muestra, aumentando la frecuencia analítica. Esto es automatizado por el software de manera de asegurar que no ingrese solución de lavado mientras aún se está midiendo.

Aplicando la secuencia antes descrita y manteniendo las concentraciones por debajo de los 2 µg/L de Hg se logró minimizar el efecto de memoria a niveles que no interfirieron con las determinaciones. Cabe aclarar que la mayoría de las muestras presentaron niveles de Hg muy bajos y las muestras adicionadas fueron medidas al final de cada corrida.

3.2. Estudios del tratamiento de muestra

Se evaluaron distintas alternativas para la preparación de las muestras antes de la determinación instrumental. En primer lugar, se estudió la digestión de las muestras por vía húmeda, utilizando HNO₃ y calentamiento en horno microondas. Sin embargo, como fue mencionado en 1.3.2, la masa limitada de muestra que puede ser digerida, sumado a las altas concentraciones de ácido requeridas, conducen a altos factores de dilución para lograr la acidez necesaria en la solución de medida. Esto

motivó el interés por estudiar la posibilidad de aplicar un tratamiento por calcinación en mufla y redisolución de las cenizas en medio ácido diluido. Si bien esta alternativa no sería útil para la determinación de Hg, tendría las ventajas de poder preconcentrar la muestra y reducir el uso de reactivos. Se llevaron a cabo distintos ensayos para comparar el rendimiento de la digestión vía seca en comparación con la digestión vía húmeda, los cuales serán descritos en las subsecciones siguientes. A pesar de que este capítulo de tesis se centra en la determinación de Pb, Cd, As y Hg, durante las experiencias preliminares de optimización, aprovechando la capacidad multielemental de ICP-MS, se determinó un gran número de elementos. Si bien la discusión se centrará en los cuatro analitos de interés, también se comentará brevemente sobre los resultados obtenidos para otros elementos.

Es importante mencionar que todo el material de laboratorio fue rigurosamente descontaminado antes de su utilización. El material plástico, como los tubos de 15 ml y 50 ml, fue descontaminado con HNO_3 10% (v/v) durante al menos 24 horas y enjuagado repetidas veces con agua ultrapura antes de su uso. El material de vidrio y porcelana, como vasos de precipitado y tapas de crisoles, fue descontaminado de la misma manera que el material de plástico, pero adicionalmente para estos ensayos fue sometido a un baño con HNO_3 20% (v/v) en caliente, enjuagado repetidas veces con agua ultrapura y secado en estufa antes de su uso. El material de vidrio calibrado, como los matraces, fue descontaminado a temperatura ambiente con agua regia al 10% (v/v), la cual en experiencias realizadas fuera de esta tesis demostró ser útil para la eliminación de trazas de Hg. El material de plástico no fue descontaminado con esta solución, ya que se observó que tendía a volverse frágil luego de ser expuesto a la misma.

3.2.1. Tratamiento de muestra por vía húmeda

Según las recomendaciones del fabricante, para realizar las digestiones de matrices orgánicas, se pesan entre 0,5 y 1 g de muestra (dependiendo de la matriz) y se tratan con 10 ml de HNO_3 concentrado y 1 ml de H_2O_2 en recipientes cerrados a 180 °C. En el caso de muestras de cereales y harinas, el fabricante recomienda no pesar más de 0,5 g de muestra. Esto se debe a que se puede generar una presión excesiva durante la descomposición. Esto fue comprobado en pruebas llevadas a cabo en esta tesis,

donde al intentar digerir 1 g de arroz con HNO_3 concentrado se observó un exceso de presión en los recipientes, evidenciado por el venteo de NO_2 durante la etapa de calentamiento.

Esta digestión resulta en la disolución completa de la mayoría de las matrices, pero se debe llevar a volúmenes finales altos debido a la elevada acidez remanente. Como fue recién mencionado, los volúmenes finales elevados sumados a la limitada masa de muestra pesada perjudican a la capacidad de detección del método. Por este motivo se estudió la eficiencia de distintas concentraciones de HNO_3 para llevar a cabo esta digestión.

3.2.1.1. Efecto de la concentración de HNO_3 en la digestión

Se evaluaron concentraciones de HNO_3 de 100, 75, 50 y 25 % (v/v), las cuales corresponden a 14; 10,5; 7 y 3,5 mol/L, respectivamente. En algunos ensayos preliminares se observó que el HNO_3 diluido resultaba en una presión final significativamente menor que el HNO_3 concentrado. Esta presión no fue medida, sino que es evidente durante la liberación de los gases de reacción al abrir los recipientes del microondas. Con ácido diluido y aumentando la masa de muestra a 1 g no se observó una excesiva presión al finalizar la digestión. Por este motivo, para las pruebas con HNO_3 3,5; 7 y 10,5 mol/L se pesó 1 g de muestra. Para el HNO_3 14 mol/L se evaluó el uso de 0,75 g para no usar una masa de muestra tan distinta a la de las demás concentraciones. Dado que esta masa no dio un exceso de presión, se continuó con la misma para el HNO_3 concentrado. Se realizó por triplicado la digestión de una muestra de arroz con 10 ml de las soluciones de HNO_3 antes mencionadas y 1 ml de H_2O_2 . Se aplicó una rampa de temperatura de 15 minutos desde temperatura ambiente hasta 180 °C, y esta se mantuvo durante 15 minutos adicionales. Los digeridos obtenidos fueron llevados a 50 ml con agua ultrapura.

Como puede verse en la Figura 3.7, se obtuvieron soluciones translucidas sin sólidos suspendidos con todas las digestiones. A simple vista, las digestiones con menos HNO_3 resultaron en soluciones más amarillas. La digestión con HNO_3 concentrado resultó en soluciones casi incoloras.

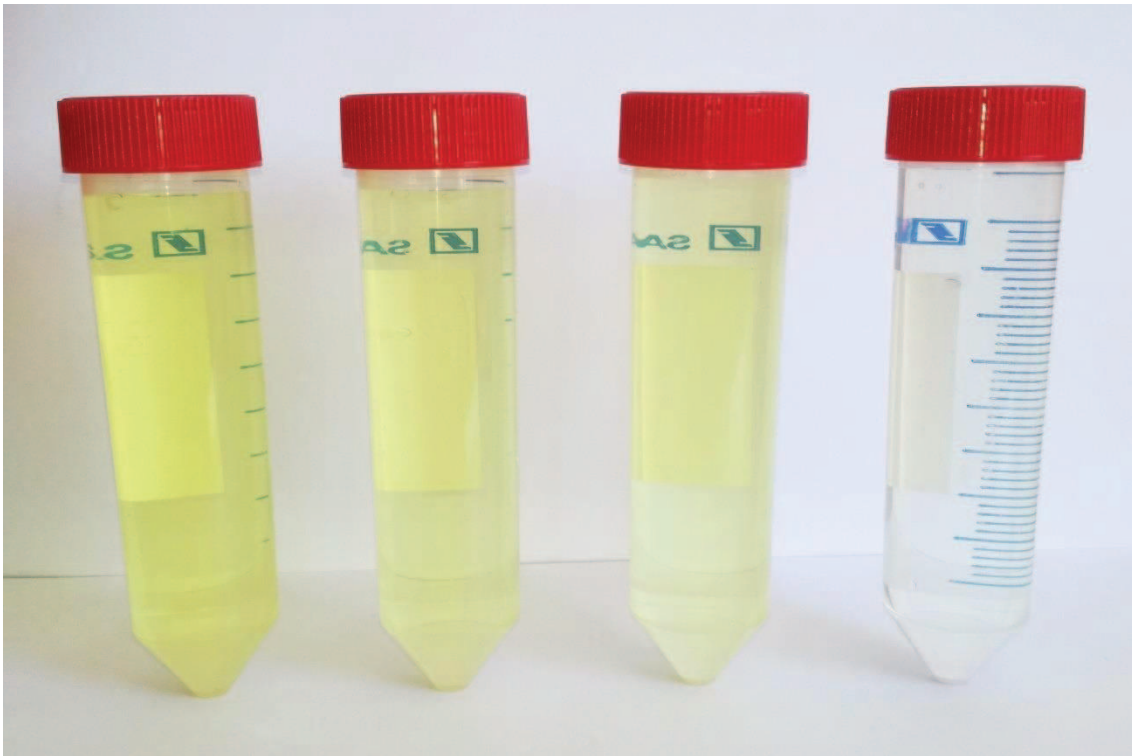


Figura 3.7. Soluciones obtenidas luego de la digestión con distintas concentraciones de HNO_3 . Concentración de HNO_3 usada, de izquierda a derecha: 3,5; 7; 10,5 y 14 mol/L

A estas soluciones se les determinó la acidez titulable y el contenido de C disuelto. Para la acidez se llevaron a cabo titulaciones con NaOH 0,1 mol/L hasta el viraje de la fenolftaleína. Para la determinación de C se utilizó el ICP-MS. Si bien el C no es un elemento típicamente medido por ICP-MS, se ha descrito su utilización para esta determinación [108]. Se prepararon estándares de 0; 25; 50; 100; 250 y 500 mg/L de C a partir de ácido oxálico dihidratado en medio de HNO_3 0,7 mol/L y se registraron las CPS del isótopo ^{13}C , usando como ISTD ^6Li . Si bien la señal de fondo es relativamente alta (equivalente a unos 23 mg/L), se pudo construir una curva de calibrado y medir las muestras. La curva de calibrado obtenida se muestra en la Figura 3.8. El origen de la elevada señal de fondo es probablemente CO_2 presente en la atmósfera o en el suministro de Ar. Se observó también que la precisión entre las muestras mejoraba al burbujear las mismas con Ar previo a la medida para eliminar el CO_2 disuelto. Teniendo esto en cuenta, se burbujegó Ar en cada muestra a un caudal de aproximadamente 300 ml/min durante unos 20 segundos antes de la medida.

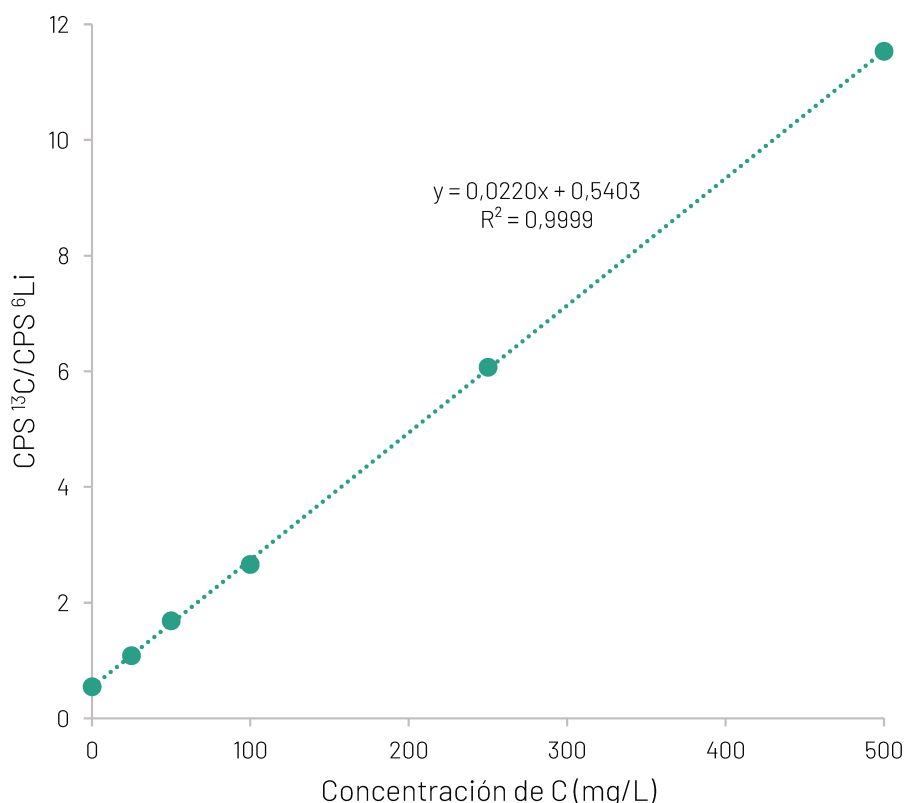


Figura 3.8. Curva de calibrado obtenida para la cuantificación de C disuelto

En la Tabla 3.6 y la Figura 3.9 se muestran los resultados obtenidos para las determinaciones de C y acidez. En ambos casos las concentraciones refieren al contenido en la solución final de 50 ml. Como era esperado, la concentración de HNO₃ utilizada para la digestión tiene un gran efecto en la concentración final de C en la solución de muestra, obteniéndose concentraciones de C menores a medida que se utiliza HNO₃ más concentrado para la digestión. A pesar de esto, la acidez remanente es notablemente mayor en las soluciones digeridas con ácidos más concentrados.

Tabla 3.6. Concentraciones de C y acidez remanente en las soluciones de muestras digeridas con distintas concentraciones de HNO₃

Concentración de HNO ₃ para la digestión (mol/L)	Acidez remanente (mol/L)	% Acidez remanente respecto a conc. inicial	Concentración de C (mg/L)
3,5	0,23 ± 0,01	32 ± 1,4	885 ± 46
7	0,62 ± 0,12	44 ± 8,8	522 ± 54
10,5	1,15 ± 0,03	55 ± 1,7	253 ± 29
14	2,44 ± 0,03	87 ± 1,2	203 ± 24

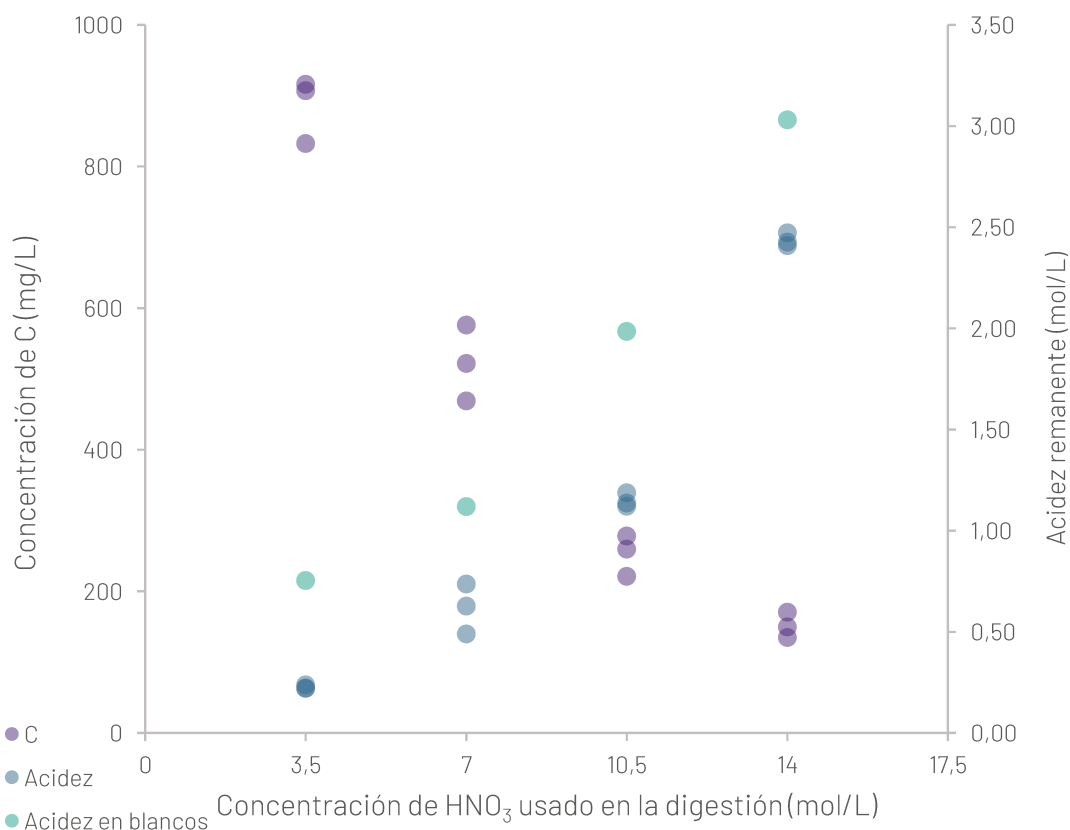


Figura 3.9. Concentraciones de C y acidez remanente en las soluciones obtenidas luego de la digestión con distintas concentraciones de HNO₃.

Si bien el principal objetivo de la digestión es solubilizar la muestra destruyendo la mayor cantidad de materia orgánica posible, no debe perderse de vista que una elevada cantidad de acidez residual puede perjudicar al instrumento y causar efectos de matriz. Los estándares de calibración son preparados en HNO₃ 0,7 mol/L, por lo que idealmente la acidez remanente debería encontrarse en torno a este valor para evitar diluciones adicionales.

Como fue mencionado anteriormente, con el HNO₃ concentrado se tuvo que digerir una cantidad menor de muestra para evitar un exceso de presión en los recipientes de microondas. Además de esto, la elevada acidez remanente en las soluciones haría necesario aplicar una dilución adicional con respecto a las demás digestiones antes de la medida instrumental, lo cual perjudicaría la capacidad de detección del método. Puede verse que las demás digestiones resultaron en concentraciones de ácido residuales mucho más bajas, aunque también con un mayor contenido de C.

Para evaluar si este contenido de C residual afectaría la determinación, se prepararon 6 soluciones estándar multielementales de 10 µg/L en medio de HNO₃ 0,7 mol/L y con concentraciones de C de 0, 200, 400, 600, 800 y 1000 mg/L. Dado que en las soluciones de digeridos se ha reportado que el C residual está generalmente en la forma de moléculas aromáticas [32,33], para la adición de C se utilizó ácido 4-hidroxibenzoico. Las soluciones fueron medidas y se comparó el resultado de las que fueron adicionadas con C respecto del estándar que no fue adicionado. En la Tabla 3.7 se resumen los resultados de este ensayo.

Tabla 3.7. Efecto de la concentración de C en la respuesta de los distintos analitos

Concentración de C adicionada (mg/L)	Relación porcentual con la solución no adicionada (%)			
	As	Cd	Hg	Pb
200	101,3	98,2	103,3	100,0
400	103,5	99,7	103,0	100,5
600	104,5	97,6	101,8	96,8
800	106,7	96,8	106,0	97,3
1000	110,3	100,5	105,1	97,0

En el caso del As, puede verse que un aumento en el contenido de C lleva a un aumento casi directamente proporcional de la señal. El aumento de la señal del As por la presencia de C en el plasma ya ha sido reportado, aunque el mecanismo de esta interferencia aun no es claro [109,110]. Con los demás elementos no se observa una relación tan claramente proporcional. Es posible que en este caso las desviaciones respecto del 100% se deban a errores aleatorios.

En función de lo presentado anteriormente, se decidió descartar la digestión con HNO₃ 3,5 mol/L, ya que esta daría en resultados de As erróneos debido a su elevado contenido de C. Se decidió continuar con la digestión con HNO₃ 7 mol/L, ya que la acidez resultante de esta digestión no requeriría diluciones adicionales y el contenido de C incurriría en errores menores al 5%. Como se verá en la etapa de validación, se logró demostrar la veracidad y la ausencia de efecto de matriz en la determinación de los distintos analitos, incluido el As, por lo que el C residual de esta digestión no parece afectar significativamente los resultados.

3.2.2. Una primera comparación entre vía húmeda y vía seca

A los fines de tener una primera comparación para el tratamiento de muestras para ICP-MS, se analizaron 3 muestras de distintas matrices por quintuplicado: una muestra de trigo, una muestra de arroz y una muestra de harina de trigo. Estas muestras fueron tratadas por vía seca y vía húmeda previo a la medida instrumental.

3.2.2.1. Tratamiento vía seca

Para la mineralización vía seca por mufla se utilizaron vasos de precipitados de 50 ml. Si bien es más común el uso de crisoles de porcelana, en experiencias previas a esta tesis se vio que los crisoles resultaban generalmente en blancos más altos que los vasos de precipitados.

Se pesó en vasos de precipitados 1 g de cada muestra. Estos vasos fueron cubiertos con una tapa de crisol (con el objetivo de reducir el riesgo de contaminación por parte del ambiente) y fueron colocados en la mufla, donde se les aplicó un programa de calentamiento con una rampa de temperatura de 50 °C/h hasta 450 °C, manteniendo esa temperatura 5 horas. De la misma manera se prepararon 3 blancos con vasos vacíos. No se adicionaron reactivos en la primera etapa de calcinación.

De este primer tratamiento se obtuvieron cenizas oscuras para todas las muestras. A estas cenizas y a los vasos de blanco se les agregaron 4 ml de HNO₃ 7 mol/L y fueron calentados en plancha calefactora, siempre ligeramente tapados, hasta la evaporación completa del ácido adicionado. Los vasos fueron colocados nuevamente en mufla, siendo calentados con una rampa de 200 °C/h hasta 450 °C, manteniendo esa temperatura durante 2 horas.

A las cenizas obtenidas y blancos se les adicionaron 2 ml de HNO₃ 7 mol/L y se les aplicó un calentamiento suave en plancha durante una hora aproximadamente. Si bien las cenizas se disolvieron instantáneamente al agregar el HNO₃, este calentamiento adicional fue llevado a cabo para minimizar el riesgo de pérdida de analito por adsorción en el material y para "limpiar" las tapas y las paredes de los vasos al establecerse un reflujó suave (sin ebullición). Finalmente, todas las muestras fueron llevadas a 15 ml en tubos de polipropileno con agua ultrapura.

3.2.2.2. Tratamiento vía húmeda

Para el tratamiento por vía húmeda se utilizó el método antes descrito. Se pesó 1 g de muestra por quintuplicado en los recipientes de MW y se le adicionaron 10 ml de HNO₃ 7 mol/L y 1 ml H₂O₂ 30%. También se prepararon 3 blancos con cada matriz (9 blancos en total). Las muestras fueron calentadas con una rampa de 15 minutos a 180 °C, manteniendo esa temperatura durante 15 minutos adicionales. Una vez frías, las soluciones obtenidas son llevadas a 50 ml en tubos de polipropileno con agua ultrapura. Todas las matrices resultaron en soluciones amarillas translúcidas.

3.2.2.3. Análisis de los resultados

Luego de la medida instrumental de todas las soluciones obtenidas, se calcularon las concentraciones en muestra sustrayendo los blancos de reactivos correspondientes y afectando por el factor de dilución adecuado. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.8 y en la Figura 3.10. Puede verse que hay diferencias notables entre los dos tratamientos de muestra evaluados. En primer lugar, el tratamiento en mufla generalmente resulta en una mayor variabilidad. La excepción es el Hg, pero esto se debe a que este elemento se volatiliza completamente en la mufla; pese a que esto es ya ampliamente conocido [30], los resultados obtenidos para Hg se presentan en la Tabla 3.8. Especialmente notorio es el caso del Pb. La menor precisión puede ser adjudicada a contaminaciones por el ambiente, especialmente teniendo en cuenta que las muestras procesadas en mufla permanecen abiertas a la atmósfera durante mucho tiempo. Durante el desarrollo de este trabajo, el Pb fue el elemento que más frecuentemente presentó contaminaciones aleatorias, incluso en muestras tratadas en MW (aunque a concentraciones mucho menores).

Tabla 3.8. Resultados de la comparación de digestión vía húmeda y vía seca (promedio ± desviación estándar)

Muestra	Digestión	As (µg/kg)	Cd (µg/kg)	Hg (µg/kg)	Pb (µg/kg)
Harina	MW	6,23 ± 1,25	8,98 ± 0,20	10,29 ± 8,24	2,54 ± 2,40
	Mufla	3,75 ± 0,22	12,14 ± 3,50	0,84 ± 0,5	22,86 ± 7,26
Trigo	MW	12,70 ± 0,68	20,86 ± 0,75	1,47 ± 0,39	35,28 ± 10,62
	Mufla	9,97 ± 1,24	22,71 ± 1,11	0,23 ± 0,08	67,92 ± 54,80
Arroz	MW	102,34 ± 3,01	22,28 ± 1,19	4,42 ± 2,75	40,06 ± 6,10
	Mufla	84,04 ± 29,67	31,25 ± 17,17	0,17 ± 0,11	165,68 ± 102,50

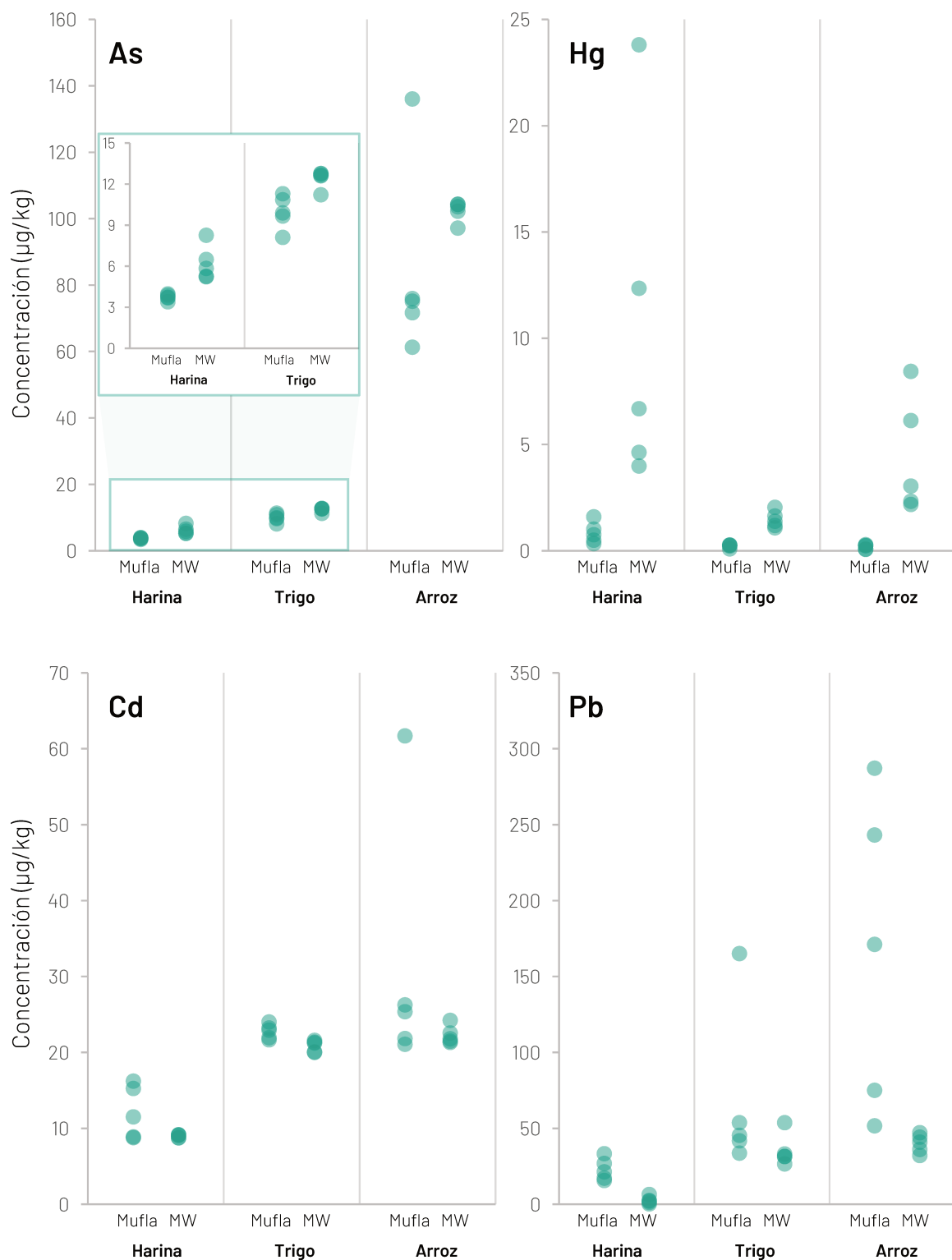


Figura 3.10. Concentraciones obtenidas para las muestras procesadas por vía seca y húmeda. El inserto muestra un aumento de los resultados para harina y trigo.

Por otro lado, también puede verse que los resultados promedio son diferentes según el tratamiento de muestra empleado. El Pb resultó en concentraciones mayores por mufla, probablemente debido a contaminaciones, mientras que el As resultó en concentraciones menores. La volatilización de As en mufla también ha sido ampliamente reportada en la bibliografía [30], pero para el caso de este elemento es dependiente de la matriz y puede ser minimizada con el uso de adyuvantes de calcinación, como las sales de Mg [30].

Vale la pena mencionar que varios otros elementos presentaron comportamientos similares a lo antes descrito, mientras que otros arrojaron resultados similares por ambos métodos de digestión. Elementos como Fe, Mn, V, Ca, Mg, P, Cu, Zn, Mo y los lantánidos, entre otros, dieron resultados similares por MW y mufla, tanto en valor promedio como en dispersión. Por otro lado, elementos como Na, Cs, Ag, Ni, Cr, Be, entre otros, presentaron diferencias según el método de digestión usado.

3.2.3. Ensayos de blancos en mufla

Debido a la alta variabilidad que presentaron las muestras de trigo, harina y arroz procesadas por mufla, se decidió continuar estudiando los blancos obtenidos por esta vía de digestión. Para esto se evaluó el impacto de dos variables sobre el valor y la dispersión obtenida del análisis de los blancos. Las variables consideradas fueron la condición en la que se encontraban los vasos de precipitado usados (nuevos o usados), y si fueron usadas tapas de crisoles para taparlos o si se mantuvieron destapados durante todo el procedimiento. La condición de uso fue una variable estudiada, ya que, con el uso en mufla, el vidrio borosilicato tiende a atacarse y desvitrificarse, quedando más opaco y áspero que el vidrio nuevo. Esto puede aumentar su superficie, aumentando también el número de sitios activos donde se adsorban analitos y contaminantes.

3.2.3.1. Preparación de los blancos

Con 5 vasos nuevos y 14 vasos usados se repitió todo el procesamiento anteriormente descrito (pero solo con blancos) y tapando con tapa de crisol solo 12 de ellos (2 nuevos y 10 usados). Se repitió también la etapa de adición de 4 ml de HNO₃ 7 mol/L y el segundo calentamiento en mufla. Finalmente, las soluciones fueron llevadas a 15 ml y medidas por ICP-MS.

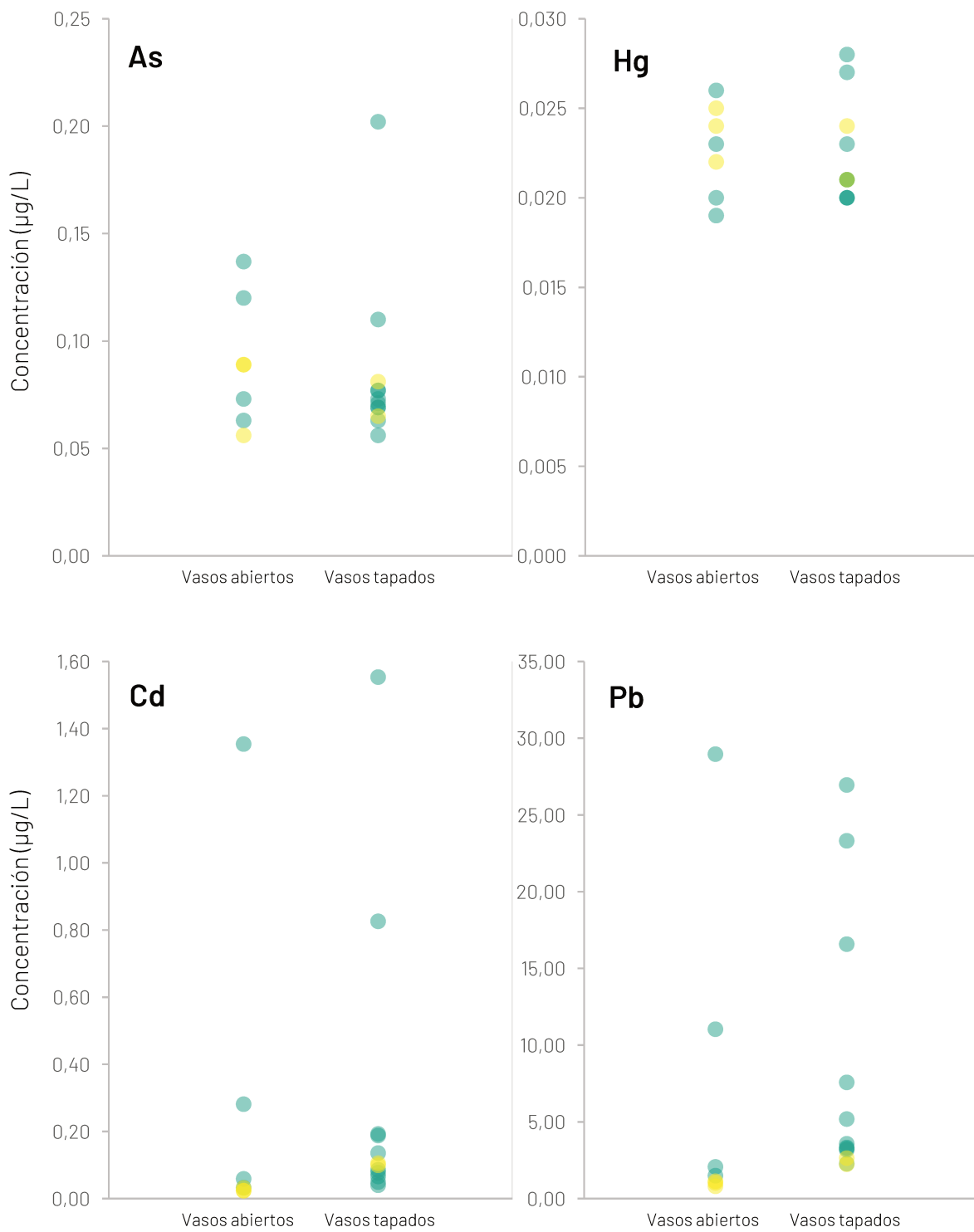


Figura 3.11. Concentraciones obtenidas para los blancos procesados por mufla. Los puntos verdes representan los vasos usados, mientras que los amarillos los vasos nuevos.

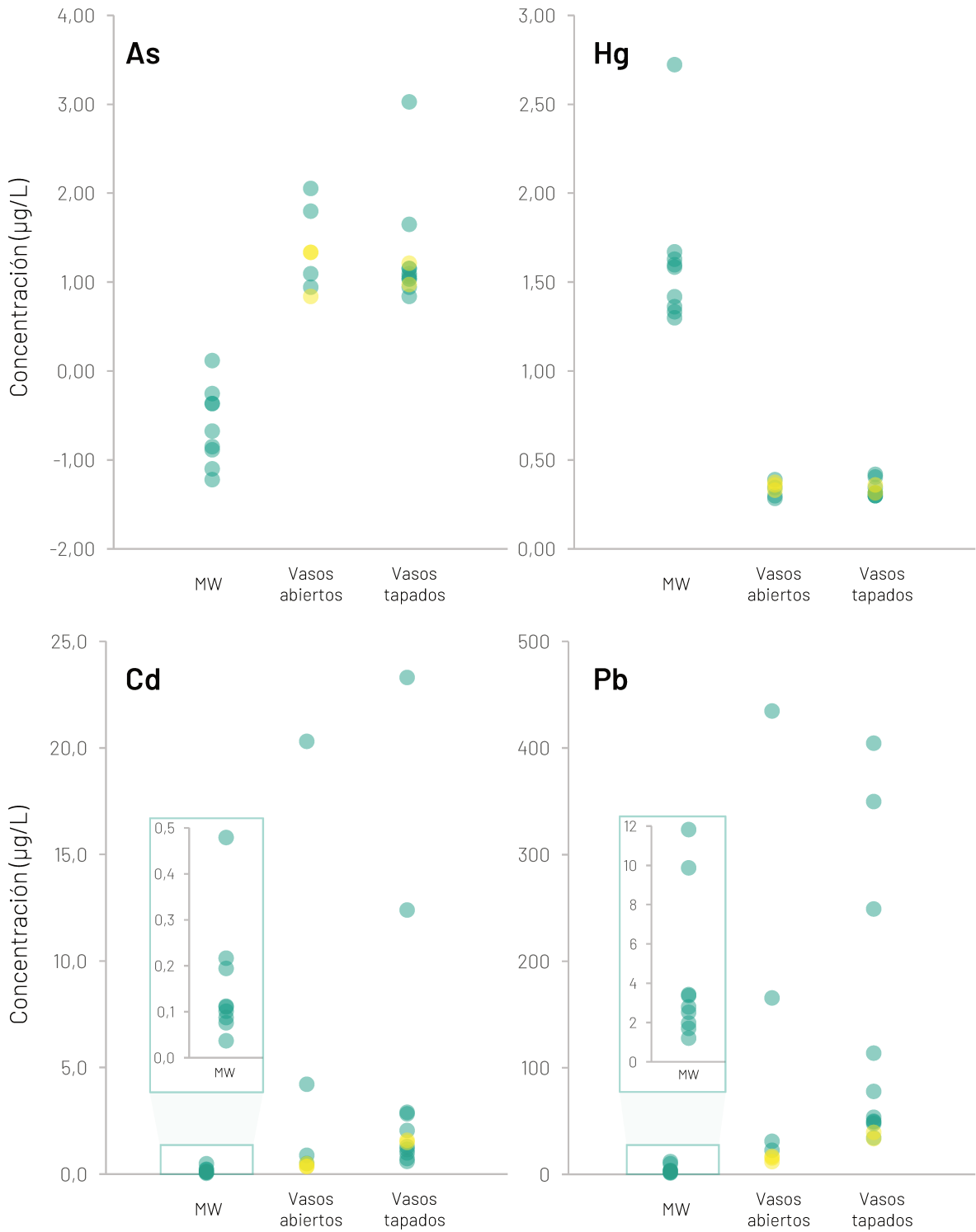


Figura 3.12. Comparación de los valores de blancos de reactivos (afectados por factor de dilución) del tratamiento por mufla y microondas.

3.2.3.2. Análisis de los resultados

Los resultados se presentan en la Figura 3.11. Puede verse que el hecho de tapar los vasos no parece reducir los valores de blanco. De hecho, en el caso del Pb parece aumentarlo. Esto fue observado también en otros elementos, como Cu, Ag, Sn, Mg y Na, entre otros. El análisis de los resultados para el Hg no es de mucha relevancia, ya que como fue mencionado anteriormente, el mismo se volatiliza completamente durante el calentamiento en mufla. En cuanto a la condición en la que se encontraba el vidrio, puede verse que, en el caso del Cd y el Pb, los blancos de mayor concentración se obtuvieron generalmente para vasos usados, con su superficie desvitrificada. Esta tendencia fue observada para muchos otros elementos, como K, Mn, Cu, Ni, Sb, entre otros. Parece ser que, a pesar del agresivo proceso de descontaminación utilizado, la superficie del vidrio puede seguir conteniendo impurezas que son luego liberadas durante el análisis. Teniendo en cuenta que la superficie del vidrio se ataca relativamente rápido en mufla con algunos tipos de muestra (especialmente las de alto contenido de metales alcalinos) esto sería una limitante importante a la hora de implementar este sistema de tratamiento de muestra para determinaciones ultratraza. Es importante notar que estos blancos son altos para una técnica como ICP-MS, pero son adecuados para los niveles traza cuantificados por técnicas menos sensibles, como FAAS.

3.2.1. Conclusiones sobre el tratamiento de muestras por vía seca y vía húmeda

En la Figura 3.12 se comparan los resultados obtenidos de los blancos de mufla con los blancos de MW, teniendo en cuenta los factores de dilución distintos (15 para mufla y 50 para MW). Puede verse claramente cómo para As, Cd y Pb los blancos de MW son mucho más bajos que los de mufla. Esta tendencia fue observada para la gran mayoría de los elementos. Las excepciones son los elementos que tienden a volatilizarse a la temperatura de la mufla.

Obtener menores valores de blanco implicaría suministrar a la mufla aire filtrado por filtros HEPA o colocarla en una sala limpia clase 100. Sin embargo, esto requiere instalaciones adicionales y un caudal de aire filtrado muy alto debido a que el uso de

muflas requiere también de una extracción constante de los humos y gases generados. A su vez, también debería cambiarse frecuentemente el material de vidrio utilizado para las digestiones por vía seca, según lo visto en la Sección 3.2.3.

Finalmente, dado que no se obtuvieron las ventajas esperadas con el uso de digestión vía seca, y teniendo en cuenta que para la determinación de Hg de todos modos se deberían realizar digestiones en sistemas cerrados, se decidió desestimar el tratamiento de muestras por vía seca, y se continuó el trabajo con digestiones por vía húmeda en sistema cerrado con microondas.

3.3. Método para la cuantificación de metales totales

En esta sección se describe el método finalmente adoptado para la cuantificación del contenido total de Pb, Cd, As y Hg en las muestras de trigo, harina y arroz.

3.3.1. Procedimiento

3.3.1.1. Tratamiento de muestra

Si la muestra consiste en granos enteros, como en el caso del trigo y el arroz, se debe realizar previamente una homogenización de una fracción representativa de la misma por molienda.

Se pesa 1 g de muestra en recipiente de microondas y se adicionan 10 ml de HNO_3 7 mol/L y 1 ml de H_2O_2 30%. Se cierra el recipiente y se coloca en horno microondas donde se le aplica un calentamiento con una rampa de temperatura de 15 minutos hasta 180 °C, manteniendo esta temperatura durante 15 minutos adicionales.

Una vez que el recipiente de microondas se encuentra a una temperatura menor a 60 °C, se lo abre y se trasvasa el contenido a tubo graduado de 50 ml. Se enjuaga el recipiente de microondas con agua ultrapura, colectando los enjuagues en el tubo que contiene la muestra. Finalmente se enrasa a 50 ml con agua ultrapura. Con cada set de muestras tratadas se debe procesar al menos un blanco de reactivos para corrección por blanco y una muestra fortificada para verificar la recuperación.

3.3.1.2. Medida instrumental

Se enciende el instrumento y se sigue la secuencia de encendido recomendada por el fabricante, incluyendo un precalentamiento, sintonización y optimización automática de los parámetros de las lentes, tomando como referencia los parámetros establecidos en la Tabla 3.1. Se monitorean los isótopos mencionados en la Tabla 3.4 y se aplica la corrección de la señal por ISTD según la Tabla 3.2. Entre medida y medida se realiza un primer enjuague rápido en agua ultrapura para lavar el exterior de la manguera de muestra, seguido de un lavado durante 20 segundos con HCl 5% (v/v) y por último lavado durante 40 segundos con HNO₃ 5% (v/v).

Se introducen, en orden creciente de concentración, estándares multielementales con concentraciones de 0; 0,1; 0,25; 1; 2; 5; 10; 25 y 50 µg/L preparados en medio de HNO₃ 0,7 mol/L por dilución de estándares comerciales concentrados. El Hg solo se incluye en los estándares hasta 2 µg/L para minimizar el efecto de memoria. Es recomendable luego de medir el último estándar, medir una solución de lavado como muestra para asegurarse el completo lavado del sistema. Se construyen las curvas de calibrado aplicando una regresión con una ponderación 1/y. Se elimina cualquier punto que se desvíe notoriamente de la tendencia lineal.

Una vez completadas las curvas de calibrado, se introducen las muestras, comenzando preferentemente por los blancos, continuando por las muestras y por último las muestras fortificadas. Las concentraciones obtenidas son corregidas por blanco y finalmente se las afecta por el factor de dilución, que involucra los 50 ml finales y la masa exacta pesada para la digestión.

3.4. Validación del método

3.4.1. Linealidad

Como fue mencionado anteriormente, una de las características de la técnica de ICP-MS es su extenso rango lineal que se extiende sobre varios órdenes de magnitud. Para el estudio de linealidad, se estudió el rango comprendido entre 0,1 y 50 µg/L. Si bien el rango lineal indudablemente es mucho más amplio, el rango de trabajo seleccionado cubre ampliamente las concentraciones esperables en el tipo de muestras analizadas. Se prepararon por triplicado soluciones estándar de 0; 0,1;

0,25; 1; 5; 10; 25 y 50 µg/L en medio de HNO₃ 0,7 mol/L y fueron medidas de menor a mayor concentración en el instrumento. Con la respuesta instrumental ($CPS_{\text{analito}}/CPS_{\text{ISTD}}$) y aplicando una ponderación 1/y, se calcularon las ecuaciones de las curvas de calibrado.

Para verificar el correcto ajuste de un modelo lineal se realizó una prueba de carencia de ajuste a través de análisis de la varianza. En la Tabla 3.9 se muestran los valores p obtenidos para cada uno de los analitos, ajustando un modelo lineal con ponderación 1/y. Como puede verse, todos los valores son mayores que 0,05, por lo que no hay evidencia de una falta de ajuste para un nivel de confianza del 95%.

Tabla 3.9. Valores p obtenidos para la prueba de falta de ajuste

Elemento	Valor p para la falta de ajuste
As	0,7642
Cd	0,1734
Hg	0,7339
Pb	0,5619

3.4.2. Límite de detección y cuantificación

En los métodos aplicados al análisis al nivel de trazas y ultratrazas unos de los parámetros más importantes son el límite de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ). Existen diversas aproximaciones para la estimación de estos límites. Frecuentemente se analiza un número adecuado de réplicas de una muestra blanco, es decir, una muestra que no contienen el analito de interés, se calcula la desviación estándar de los resultados y se la multiplica por un factor adecuado [111]. Esto no siempre es factible, ya que puede no ser posible obtener muestras que no contengan analito. En estos casos puede recurrirse al análisis muestras con un contenido del analito próximo a estos límites o de blancos de reactivos que hayan atravesado todo el procedimiento analítico [111].

Para la estimación de los LODs y LOQs del método se optó por esta última alternativa, ya que no es sencillo encontrar muestras con niveles no cuantificables de todos

los analitos de interés con técnicas tan sensibles como ICP-MS, y además los blancos preparados pudieron ser utilizados para la estimación de los límites de otros elementos no estudiados en este trabajo.

Para ello, se analizaron diez réplicas de blancos de reactivos que fueron procesados en distintos días en horno microondas. Estos blancos consistieron en 10 ml de HNO₃ 7 mol/L y 1 ml de H₂O₂ 30%, que fueron sometidos al programa de microondas descrito en la Sección 3.3.1.1, y llevados a 50 ml finales con agua ultrapura. Estos blancos fueron medidos por ICP-MS, se calculó la desviación estándar de las concentraciones obtenidas y se las multiplicó por 3 y por 10 para el LOD y el LOQ, respectivamente. Los límites resultantes se muestran en la Tabla 3.10 con dos cifras significativas.

Tabla 3.10. Límites de detección y cuantificación

Elemento	En solución		Final en muestra	
	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)
As	0,011	0,036	0,54	1,8
Cd	0,0029	0,0097	0,15	0,49
Hg	0,0054	0,018	0,27	0,90
Pb	0,045	0,15	2,2	7,5

Los límites alcanzados son considerados satisfactorios y lo suficientemente bajos para los análisis propuestos en este trabajo. Estos límites se encuentran ampliamente por debajo de los valores máximos permitidos mencionados en la Sección 1.1.

Un caso que vale la pena mencionar es el del Pb. Si bien este elemento presenta una muy elevada sensibilidad instrumental en términos de CPS por unidad de concentración, los límites alcanzados son mayores que para otros elementos. Esto se debe a que se observó una mayor variabilidad en los blancos de Pb. El origen de esta variabilidad se atribuyó a pequeñas contaminaciones aleatorias provenientes del ambiente de laboratorio. Este riesgo de contaminación es prácticamente ubicuo en el análisis ultratraza. Si bien se trabajó bajo condiciones estrictas de limpieza, tanto de ambiente como de reactivos y material de laboratorio, el Pb se presentó como el elemento con mayor riesgo de sufrir contaminaciones esporádicas a niveles sub µg/L, perjudicando la capacidad de detección.

3.4.3. Efecto de matriz

El efecto de matriz puede definirse como un cambio en la señal instrumental ocasionado por componentes de la muestra distintos del analito [112]. La presencia de efectos de matriz provoca errores sistemáticos en la cuantificación si esta se lleva a cabo por calibración externa, con estándares que no contienen la misma matriz que las muestras. Las formas más comunes de superar los efectos de matriz son modificar la preparación de la muestra (garantizando la descomposición o separación de los compuestos interferentes) o adoptando estrategias de calibración que compensen el efecto de la matriz. En esta última categoría se incluyen las calibraciones por adición estándar, matrix-matching y estándar interno. Como se mencionó anteriormente, las espectrometrías multielementales permiten la corrección por estándar interno, la cual debido a su simplicidad operativa respecto a adición estándar o matrix-matching, hace que sea una alternativa sumamente atractiva para la cuantificación.

Para evaluar la presencia de efectos de matriz en el método desarrollado, se compararon las pendientes de curvas de calibración preparadas sobre soluciones acuosas acidificadas (estándares externos) y sobre muestras procesadas (adición estándar), con y sin corrección por ISTD. Para los estándares externos se prepararon soluciones estándar de 0; 0,1; 0,25; 1; 2; 5; 10; 25 y 50 $\mu\text{g/L}$ en medio de HNO_3 0,7 mol/L. Para la calibración por adición estándar se tomó un digerido de una muestra de arroz al cual se le adicionaron las mismas concentraciones nominales que a los estándares externos. Los estándares resultantes fueron medidos por ICP-MS de manera alternada y en orden creciente de concentración.

Con las CPS obtenidas para los analitos se construyeron curvas de calibrado externas y por adición estándar, ambas con ponderaciones 1/y. Este par de curvas representan las calibraciones sin ISTD. Para la corrección por ISTD, como se mencionó en la Sección 3.1.1, se dividieron las CPS del analito por las CPS de su ISTD y se utilizaron estas relaciones como respuesta instrumental.

En la Tabla 3.11 se presentan las pendientes obtenidas para cada una de las curvas y la relación porcentual entre las pendientes de las curvas por adición estándar y por calibración externa.

Tabla 3.11. Estudio de efecto de matriz. Comparación de pendientes y uso de ISTD.

	Sin estándar interno			Con estándar interno		
	Externa (CPS/($\mu\text{g/L}$))	Adición estándar (CPS/($\mu\text{g/L}$))	Relación %	Externa (1/($\mu\text{g/L}$))	Adición estándar (1/($\mu\text{g/L}$))	Relación %
As	3,782E+03	3,893E+03	103	1,089E-02	1,102E-02	101
Cd	8,063E+03	8,129E+03	101	1,170E-03	1,159E-03	99
Pb	6,221E+03	6,484E+03	104	9,845E-04	1,014E-03	103
Hg	1,335E+05	1,327E+05	99	2,117E-02	2,076E-02	98

Como puede verse, los efectos de matriz obtenidos son muy pequeños (<4%), los cuales no justifican el uso de una técnica laboriosa como adición estándar para la calibración. De esta manera se concluye que no hay efectos de matriz significativos, y las cuantificaciones pueden ser llevadas a cabo por curvas de calibración externas. Si bien el efecto de matriz no es significativo, se continuó con el uso de ISTD ya que este permite a su vez corregir deriva instrumental y pequeñas fluctuaciones que pueda haber durante la medida. El ensayo de efecto de matriz no fue repetido con las demás matrices, sin embargo, en los ensayos de recuperación de las demás matrices se obtuvieron resultados adecuados, por lo que cabe esperar que estas tampoco presenten efectos de matriz significativos (ver Sección 3.4.4.1).

3.4.4. Veracidad

Según el Vocabulario Internacional de Metrología (VIM), confeccionado por el Comité Conjunto para las Guías en Metrología (JCGM), la veracidad de la medida está definida como la proximidad entre la media de un número infinito de valores medidos repetidos y un valor de referencia [113]. A su vez, el VIM también establece que la veracidad de medida no es una magnitud y no puede expresarse numéricamente, que la misma está inversamente relacionada con el error sistemático (pero no al error aleatorio) y que no debe utilizarse el término “exactitud de medida” en lugar de “veracidad de medida” y viceversa. Por su parte, la exactitud de la medida está definida como la proximidad entre un valor medido y un valor verdadero de un mensurando. En otras palabras, la exactitud contempla tanto los errores sistemáticos como los aleatorios, mientras que la veracidad solo está asociada a los primeros.

El valor estimado del error sistemático se conoce como sesgo [113]. Para su estimación, se compara la media de los resultados de un método con un valor de referencia. Para ello pueden utilizarse materiales de referencia, ensayos de recuperación sobre muestras adicionadas y/o la comparación con los resultados obtenidos por un método de referencia [111].

Para esta validación se realizaron ensayos de recuperación, análisis de material de referencia certificado y se analizaron muestras de un ensayo interlaboratorio internacional.

3.4.4.1. Ensayos de recuperación

Para los ensayos de recuperación se tomaron muestras de las distintas matrices analizadas y, una vez ya pesadas en los recipientes de microondas, se fortificaron con alícuotas del estándar multielemental y del estándar de Hg, de manera de obtener concentraciones finales adicionadas en el rango de 0,25 µg/L a 10 µg/L en el caso del estándar multielemental y desde 0,25 µg/L hasta 2 µg/L en el caso del Hg. Como fue mencionado en la Sección 3.1.5, el Hg fue estudiado hasta niveles más bajos debido a que las concentraciones elevadas presentan un fuerte efecto de memoria. Además, el tipo de muestras analizadas presentan concentraciones de Hg

Tabla 3.12. Porcentajes de recuperación promedio y desviaciones estándar (media ± sd) para las distintas matrices y analitos estudiados

	Conc. adic. (µg/L)	Conc. equiv. (µg/kg)	As	Cd	Hg	Pb	Criterio de aceptación
Trigo	0,25	12,5	102,9 ± 13,0	94,5 ± 16,1	105,5 ± 4,7	85,4 ± 13,3	60-115
	1	50	109,0 ± 11,3	101,0 ± 6,9	103,8 ± 2,8	105,5 ± 15,4	60-115
	10 ^a	500 ^b	103,7 ± 3,3	101,6 ± 1,7	101,8 ± 2,5	96,1 ± 1,3	80-110
Arroz	0,25	12,5	114,0 ± 17,2	93,7 ± 12,0	96,7 ± 8,9	89,0 ± 14,6	60-115
	1	50	112,2 ± 15,9	100,7 ± 5,2	95,9 ± 5,8	101,1 ± 6,7	60-115
	10 ^a	500 ^b	104,8 ± 2,6	98,0 ± 2,2	102,5 ± 2,4	96,9 ± 1,6	80-110
Harina	0,25	12,5	103,1 ± 14,3	102,9 ± 8,1	100,6 ± 1,5	110,2 ± 30,2	60-115
	1	50	104,7 ± 4,9	98,6 ± 3,1	98,2 ± 5,3	101,2 ± 10,7	60-115
	10 ^a	500 ^b	106,3 ± 7,0	99,0 ± 6,2	103,8 ± 5,9	101,4 ± 8,5	80-110

^a 2 µg/L en el caso de Hg

^b 100 µg/kg en el caso de Hg

bastante menores a este nivel. Este ensayo fue repetido diferentes días y con diferentes muestras. Se calcularon las recuperaciones promedio y las desviaciones estándar de las mismas. Para decidir si las recuperaciones obtenidas eran aceptables o no, se adoptaron los criterios de aceptación establecidos en la Guía de Requerimientos de Performance para Métodos Estándar de la AOAC [114]. En esta guía se establecen los valores de recuperación promedio esperables de un analito en función de la concentración en que se encuentra. Para utilizar los valores de esta tabla, la concentración nominal adicionada debe ser afectada por el factor de dilución del método, que en este caso es 50, ya que se pesa 1 g y se lleva a 50 ml. Es decir que una adición de 10 µg/L se corresponde a una concentración de 500 µg/kg en muestra.

La Tabla 3.12 presenta las recuperaciones promedio y las desviaciones estándar obtenidas a distintos niveles para cada una de las matrices estudiadas, junto al criterio de aceptación para cada nivel.

A partir de los resultados de la Tabla 3.12, puede verse que se obtuvieron recuperaciones promedio dentro de los criterios de aceptación para todas las matrices y niveles estudiados.

3.4.4.2. Participación en ensayos interlaboratorio

Se analizaron dos muestras de arroz pertenecientes a los ensayos interlaboratorio *Food Chemistry Proficiency Test 07324* y *Food Chemistry Proficiency Test 07314*, organizados por Fapas®, Fera Science Ltd. (Sand Hutton, York, Reino Unido). En estos ensayos se estudió el contenido de Cd, Pb, As y Hg, además de As inorgánico (el cual será discutido en el capítulo siguiente), en muestras de arroz pulido y arroz integral pulverizados. Aproximadamente 100 laboratorios participaron de cada ensayo, aplicando distintas metodologías y técnicas para las determinaciones.

Las muestras recibidas fueron analizadas por triplicado con el método desarrollado en esta tesis. Los resultados fueron enviados al organizador del interlaboratorio quien realizó el análisis estadístico de los resultados de todos los laboratorios, informando luego los valores asignados a cada analito, junto con su desviación estándar de proficiencia y los valores z asignados a cada laboratorio. Según es explicado en el informe del interlaboratorio, para el valor asignado se calculó la media robusta,

para la desviación estándar de proficiencia se utilizó la relación de Horwitz modificada (según reportado por Thompson [115]) y el valor z se calculó para cada analito y laboratorio como:

$$z = \frac{x - x_a}{\sigma_p}$$

Donde x es el valor informado por cada laboratorio para un dado analito, x_a es el valor asignado y σ_p es la desviación estándar de proficiencia.

Bajo una distribución normal, aproximadamente el 95% de los valores se encuentran en el rango de $-2 \leq z \leq 2$, por lo que se los considera resultados adecuados. Ocasionalmente, con una probabilidad de aproximadamente el 5%, algunos valores pueden aparecer en el rango de $2 \leq |z| \leq 3$. Valores en este rango deben ser estudiados a la luz de otros resultados para evaluar si realmente existe un sesgo o si son parte de la distribución normal. Valores z con $|z| > 3$ son esperables solo con una probabilidad de 0,33%, por lo que generalmente se los considera como indicadores de que los resultados obtenidos no son adecuados.

En la Tabla 3.13 se presentan los resultados obtenidos para ambos estudios interlaboratorio, junto con los parámetros estadísticos antes mencionados. Como concentración hallada se expresa el promedio del triplicado analizado.

Tabla 3.13. Resultados de los ensayos interlaboratorio

	Elemento	Concentración asignada ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	σ_p ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Concentración hallada ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Valor z
Interlaboratorio 07324 (Arroz Pulido)	As	308	58,8	318	0,16
	Cd	122	26,9	120	-0,09
	Pb	151	32,1	151	0,00
	Hg	148	31,6	156	0,27
Interlaboratorio 07314 (Arroz Integral)	As	240	47,7	244	0,09
	Cd	34,0	7,48	33,1	-0,12
	Pb	45,6	10,0	39,4	-0,62
	Hg	26,2	5,77	25,4	-0,14

Como puede verse en la tabla, todos los valores hallados fueron muy próximos a los valores asignados, resultando en $|z| < 1$ para todos los casos. Los resultados, por lo tanto, son considerados satisfactorios.

3.4.4.3. Análisis de material de referencia certificado (CRM)

Como CRM se contó con el ERM-BC211, el cual consiste en arroz pulverizado que tiene certificadas las concentraciones de As total, As inorgánico y DMA. Para el presente método, solo es de utilidad el valor de As total, mientras que los valores de As inorgánico y DMA fueron usados en la validación del método para análisis de especiación. Cabe aclarar que este CRM no tiene certificadas las concentraciones de los demás analitos estudiados.

El CRM fue analizado por triplicado por el método propuesto y los resultados de As se encuentran en la Tabla 3.14. En la Tabla 3.15 se presentan los valores informados en el certificado del CRM, los cuales fueron usados para las pruebas estadísticas.

Tabla 3.14. Resultados del análisis del CRM

n	Concentración hallada ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
1	248,0
2	258,6
3	249,6
Media	252,1
Desviación estándar	5,76

Tabla 3.15. Valores informados en el certificado del CRM

Parámetro	Valor
Valor certificado ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	260
Incertidumbre ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	13
Media ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	260,182
Desviación estándar ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	16,347
n	78

Para la comparación de las concentraciones halladas con la certificada, en primer lugar, se realizó un test-F para comparar la varianza informada en el certificado del CRM con la obtenida de las mediciones realizadas en el laboratorio. La diferencia de varianzas resultó estadísticamente no significativa ($p = 0,28$), por lo que se llevó a cabo un test-t con una varianza pooleada para la comparación de la media certificada con la media hallada. Este test-t mostró una diferencia estadísticamente no significativa ($p = 0,18$), por lo que no hay evidencia de un sesgo significativo en la determinación de As por el método propuesto.

En base a lo expuesto en las últimas tres secciones, puede concluirse que el método posee una veracidad adecuada, sin un sesgo significativo.

3.4.5. Precisión

La precisión de medida ha sido definida como la proximidad entre los valores medidos obtenidos en mediciones repetidas de un mismo objeto, o de objetos similares, bajo condiciones específicas [113]. Esta precisión suele expresarse numéricamente con medidas de dispersión tales como la desviación estándar o el coeficiente de variación. Las "condiciones específicas" antes mencionadas no son un detalle menor, ya que determinan el tipo de estimación obtenida de la precisión. Por un lado, se tiene la repetibilidad de la medición, la cual implica mínimas variaciones en las condiciones de medición (mismo analista, mismo instrumento, en un corto período de tiempo), mientras que la reproducibilidad implica grandes variaciones en las condiciones que se lleva a cabo la medida (laboratorios diferentes). Entre estos dos extremos se encuentra la precisión intermedia, la cual representa la precisión dentro de un único laboratorio, pero con mayor variabilidad en las condiciones de medición que la repetibilidad (distintos analistas, días y/o instrumentos) [111].

En este trabajo se evaluó tanto la repetibilidad como la precisión intermedia siguiendo las recomendaciones de EURACHEM [111], que propone un método para estimar ambas en simultáneo con un análisis de la varianza. Para ello, se analizan duplicados independientes de una muestra, maximizando la variación de las condiciones de medida entre duplicados de análisis (analistas, días, instrumentos, etc.). Este método tiene la ventaja de que aporta un número de grados de libertad más balanceado para la precisión intermedia y la repetibilidad que si se analiza un gran número

de réplicas y pocos grupos de mediciones (cómo sería, por ejemplo, 7 réplicas durante 3 días distintos) [111]. Luego de aplicar ANOVA, se obtiene una tabla como la siguiente:

Tabla 3.16. Tabla ANOVA modelo

Fuente de variación	Suma de cuadrados (SS)	v	Cuadrado medio (MS)	F	Valor-p
Entre grupos	SS_e	$p-1$	$MS_e = SS_e/(p-1)$	MS_e/MS_i	
Intra grupos	SS_i	$N-p$	$MS_i = SS_i/(N-p)$		
Total	$SST = SS_e + SS_i$	$N-1$			

A partir de esta tabla, la repetibilidad puede ser estimada con la variabilidad dentro de cada grupo, mientras que para la reproducibilidad intermedia se combina la variabilidad intragrupo e intergrupo.

Para la repetibilidad (s_r) se calcula la raíz cuadrada del cuadrado medio intragrupo (MS_i), el cual representa la varianza dentro de los grupos:

$$s_r = \sqrt{MS_i}$$

Para la precisión intermedia primero se calcula la contribución de los grupos a la variabilidad como:

$$s_p = \sqrt{\frac{MS_e - MS_i}{n}}$$

A continuación, se combinan las variabilidades intragrupo e intergrupo para obtener la precisión intermedia (s_I):

$$s_I = \sqrt{s_r^2 + s_p^2}$$

Se analizaron duplicados de una muestra de arroz y una muestra de trigo en distintos días, tanto de digestión como de medida instrumental, con distintos lotes de reactivos, distintas curvas de calibrado y distintas condiciones de las lentes electrostáticas optimizadas por el software. Si bien la precisión no fue estudiada exhaustivamente para todas las matrices, se eligieron estas dos matrices como representativas de todas las estudiadas. Es razonable esperar una precisión similar para las demás matrices no evaluadas. Por otro lado, al momento de la validación no se

contó con muestras que arrojen concentraciones cuantificables de todos los analitos. En el caso de la muestra de arroz, el Pb no fue cuantificable, mientras que en el trigo el Hg no fue cuantificable. Como se verá más adelante, la mayoría de las muestras analizadas presentaron concentraciones no cuantificables para estos analitos. Como es de esperarse, si se utilizan estos valores por debajo del límite de cuantificación para el cálculo, se obtienen imprecisiones inaceptablemente altas. Los resultados de las mediciones se presentan en la Tabla 3.17. Los resultados de los cálculos de precisión se presentan en la Tabla 3.18.

AOAC recomienda distintos niveles máximos de $\%RSD_r$ como aceptables en función de la concentración del analito [114]. Para concentraciones en el orden de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ se establecen $\%RSD_r$ máximos aceptables para la repetibilidad de 30%, 21% y 15%, respectivamente. Tomando el nivel de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ como referencia para la muestra de trigo, puede verse que los valores de $\%RSD_r$ obtenidos para As, Cd y Pb se encuentran por debajo del máximo recomendado por AOAC (21%). El Hg sería más adecuado compararlo con el límite recomendado para concentraciones de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, sin embargo, como fue mencionado anteriormente, este analito se encuentra por debajo del límite de cuantificación en la muestra utilizada para el estudio de precisión, lo cual conduce al cálculo de un $\%RSD_r$ inaceptablemente alto de 30,1%. En el caso de la muestra de arroz, puede verse que los valores de $\%RSD_r$ para As, Cd y Hg se encontraron por debajo incluso del nivel más estricto, correspondiente a 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (15%). Para el Pb se obtuvo un $\%RSD_r$ elevado debido a que se encontraba por debajo del LOQ.

En cuanto a los $\%RSD_i$ no hay valores de referencia establecidos en la bibliografía consultada, ya que generalmente se establecen los $\%RSD$ para la reproducibilidad en lugar de la precisión intermedia, la cual implica llevar a cabo ensayos interlaboratorio para su estimación. Sin embargo, para los analitos con concentraciones mayores al LOQ, puede verse en la Tabla 3.18 que en la mayoría de los casos los valores de $\%RSD_i$ son solo ligeramente mayores que los $\%RSD_r$ correspondientes. Incluso, comparando los valores de $\%RSD_i$ obtenidos con los valores máximos de $\%RSD_r$ de referencia, puede verse que ninguno de los valores obtenidos para la precisión intermedia supera el límite establecido para la repetibilidad, el cual es más estricto ya

que no maximiza la variabilidad en las condiciones de análisis (días, lotes de reactivos, etc.). Puede concluirse que la precisión intermedia del método es aceptable.

Tabla 3.17. Resultados individuales de las réplicas analizadas para el estudio de precisión

Matriz	Serie	Concentración ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			
		As	Cd	Hg	Pb
Trigo	1	12,46	18,56	0,30	20,14
		9,23	19,27	0,26	22,26
	2	11,27	18,85	0,70	21,37
		12,93	19,14	0,66	19,24
	3	9,94	18,28	-0,22	21,05
		10,09	18,98	-0,22	23,92
	4	9,29	19,23	0,00	21,15
		11,91	19,20	0,07	23,17
	5	10,23	18,58	0,29	26,02
		10,04	19,35	0,37	21,85
	6	12,54	18,29	0,44	37,39
		11,74	18,16	0,35	29,00
	7	12,19	17,84	0,51	25,14
		11,00	19,73	0,25	23,33
Arroz	1	252,97	11,80	2,24	3,02
		249,74	12,00	2,41	2,82
	2	237,11	12,29	1,91	4,48
		244,82	11,05	1,83	0,20
	3	256,03	11,92	2,15	1,21
		254,38	11,49	2,22	4,19
	4	258,02	12,07	1,75	3,95
		256,95	12,33	1,96	1,91
	5	249,12	11,88	2,04	3,28
		254,60	11,80	2,24	3,91
	6	245,79	11,03	2,51	0,42
		260,85	12,34	1,72	0,19
	7	257,44	11,86	1,98	5,54
		260,85	12,34	1,72	0,67

Tabla 3.18. Resultados de los cálculos de precisión

Matriz	Parámetro	As	Cd	Hg	Pb
Trigo	Promedio (µg/kg)	11,06	18,82	0,27 ^a	23,93
	s _r (µg/kg)	1,257	0,615	0,081	2,835
	s _p (µg/kg)	0,034	0,296	0,281	3,821
	s _i (µg/kg)	1,258	0,682	0,292	4,758
	%RSD _r	11,4	3,3	30,1	11,8
	%RSD _i	11,4	3,6	108,8	19,9
Arroz	Promedio (µg/kg)	252,76	11,87	2,05	2,56 ^a
	s _r (µg/kg)	8,392	0,298	0,270	1,504
	s _p (µg/kg)	4,795	0,301	0,087	0,925
	s _i (µg/kg)	9,665	0,424	0,284	1,766
	%RSD _r	3,3	2,5	13,2	58,8
	%RSD _i	3,8	3,6	13,9	69,1

^a Concentración menor al LOQ

3.4.6. Conclusiones del proceso de validación

Como fue expuesto en las secciones anteriores, el método evaluado arrojó resultados satisfactorios en todos los parámetros estudiados en el proceso de validación, y a partir de un trabajo muy minucioso pudieron obtenerse muy buenas cifras de mérito para niveles ultratraza. Puede concluirse entonces que el método se encuentra validado y que puede ser aplicado al análisis de muestras.

3.5. Análisis de muestras

El método desarrollado y validado fue aplicado al análisis de las muestras descritas en la Sección 2.3. Fue de particular interés ver cómo varían las concentraciones obtenidas según el tipo o grado de procesamiento de un dado cereal (pulido, molienda, agregado de aditivos, etc). Los resultados serán presentados en figuras en las subsecciones siguientes, donde a su vez se los compara con los límites de detección y cuantificación. Primeramente, se presentará un análisis visual de los datos y luego se procederá a un análisis estadístico más riguroso. Este último se restringirá a los

casos donde las concentraciones se hayan encontrado por encima del límite de cuantificación.

3.5.1. Análisis estadístico

Para evaluar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tipos de muestra estudiados se aplicó ANOVA de un factor. Para ello, en primer lugar, se verificaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad. Para esto se aplicó el test de Shapiro-Wilks sobre los residuos para verificar la normalidad de los mismos y el test de Levene sobre los conjuntos de datos para verificar su homocedasticidad. Cuando se observaron violaciones de los supuestos, se evaluó el uso de transformaciones para que estos se ajusten a estas condiciones necesarias para aplicar ANOVA. Para ello se evaluaron las transformaciones $\text{Log}(x)$, $1/x$, $x^{1/2}$, y $1/x^{1/2}$. Se aplicaron las transformaciones y se volvió a evaluar normalidad y homocedasticidad. Si las hipótesis nulas de estos tests no eran descartadas, se aplicó ANOVA sobre los datos transformados. Cuando ANOVA resultó significativo, se aplicó el test de Tukey-Kramer como prueba post-hoc para establecer qué grupos presentaban diferencias estadísticamente significativas entre sí. Para todas las pruebas se utilizó un nivel de significancia de 0,05.

Se evaluó el uso de pruebas no paramétricas, como el test de Kruskal-Wallis con test de Connor como prueba post-hoc, pero no siempre se cumplieron las condiciones para este tipo de pruebas. Por este motivo se prefirió el uso de transformaciones por sobre las pruebas no paramétricas. De todas maneras, se verificó que por ambas vías se llegaba a conclusiones equivalentes en cada caso.

Un inconveniente que se encontró con el análisis de los resultados de las muestras de arroz es que el número de muestras en cada categoría (tipo o variedad) estaba bastante desbalanceado. Los diseños desbalanceados son menos robustos a violaciones de los supuestos [116] y tienen menor poder estadístico, ya que la precisión de los estimados es menor para las categorías que tienen menor número de muestras. Esto conduce a un menor poder para detectar diferencias entre grupos. En cuanto al tipo de arroz, se contó con 14 muestras de arroz integral, 11 muestras de arroz parbolizado y 21 muestras de arroz pulido. La situación es un poco más complicada para el análisis de las variedades ya que del arroz Yamaní se dispuso de solo

4 muestras, del Doble Carolina 9 y del Largo Fino 33. Del Arroz Glutinoso y del Corto Japonés solo se dispuso de una muestra de cada uno, lo cual imposibilita cualquier prueba estadística. Esta distribución resultó así ya que en el mercado la variedad más abundante por amplia mayoría es el Largo Fino y el tipo de arroz más abundante es el pulido. A su vez, las 4 muestras de arroz Yamaní son integrales, las 9 muestras de Doble Carolina son pulidos, mientras que entre las de Largo Fino se encuentran integrales, parbolizados y pulidos. Nuevamente, esta distribución fue condicionada por la disponibilidad comercial de muestras. Por este motivo tampoco fueron aplicadas técnicas multivariadas como ANOVA de dos vías.

Por otro lado, en el caso de las muestras de trigo, la distribución de estas resulta en un diseño perfectamente balanceado. Se contó con dos variables categóricas independientes: ciclo (Largo o Corto) y lugar de producción (Paraná, Marcos Juárez o Reconquista). En este caso los datos fueron analizados por ANOVA de dos vías. Este análisis permite concluir también si existe una interacción entre las variables.

3.5.2. Muestras de harina

En la Figura 3.13 se presentan los resultados obtenidos para los distintos elementos y tipos de harina estudiados. En primera instancia, puede verse que la gran mayoría de las muestras presentaron concentraciones no cuantificables de Hg y Pb. Ninguna de las muestras presentó concentraciones por encima de los límites legales presentados en el Capítulo 1.

3.5.2.1. Pb

En el caso del Pb, solo algunas muestras de harinas refinadas presentaron concentraciones cuantificables de este elemento, siendo todas las integrales menores al LOQ. El hecho de que la mayoría de las concentraciones estén por debajo del LOQ limita la interpretación que puede hacerse sobre los resultados, pero estos parecen sugerir que las harinas más industrializadas pueden contener mayores concentraciones de este metal. Dentro de las harinas leudantes ninguna muestra fue menor al LOD, e incluso una de ellas mostró una concentración bastante más alta que las demás. Vale la pena mencionar que se repitió el análisis de todas las muestras que arrojaron resultados muy elevados para descartar la posibilidad de contaminaciones durante el procesamiento de muestra

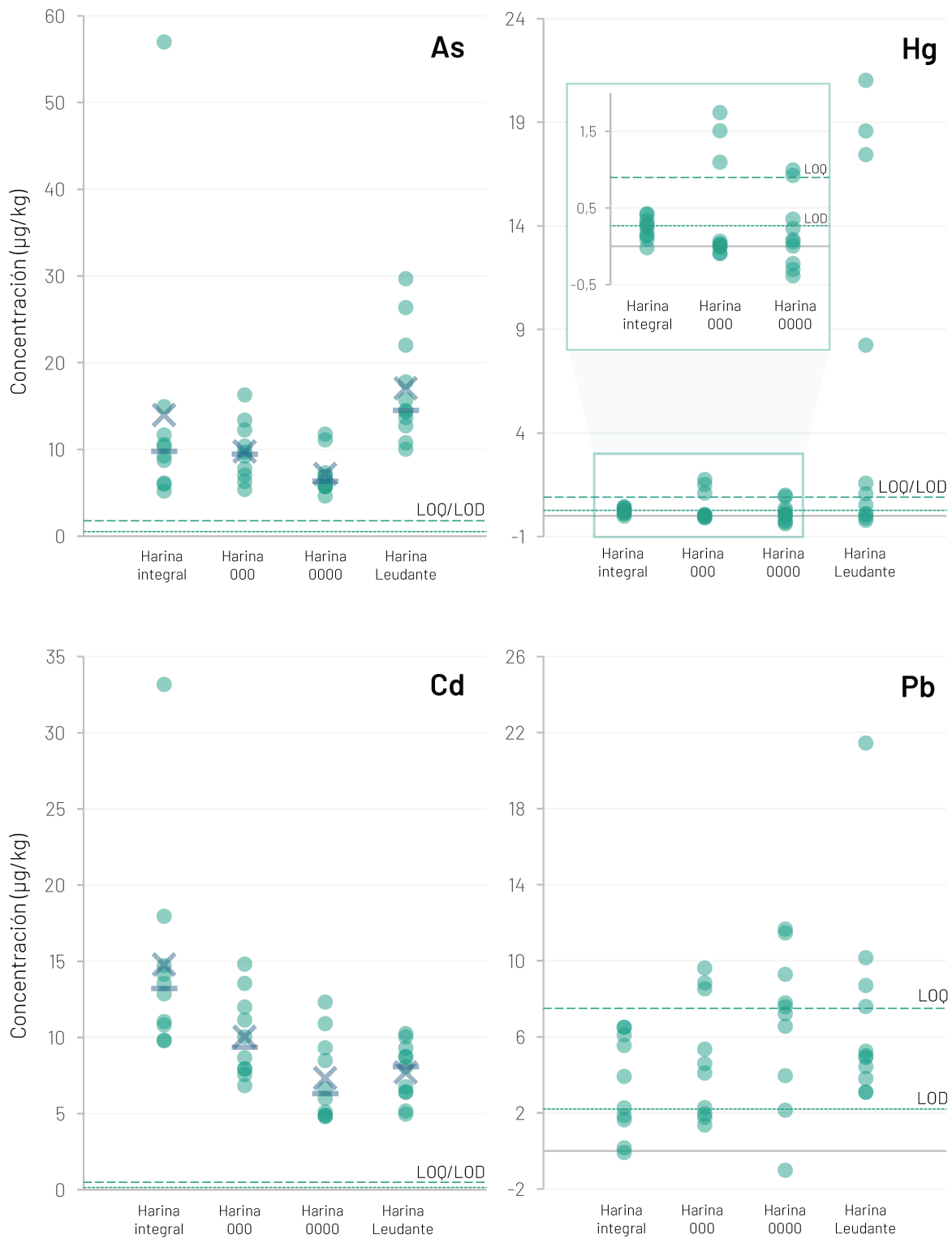


Figura 3.13. Resultados del análisis de las muestras de harina. Las líneas cortadas y punteadas representan los LOQs y LODs, respectivamente. Las cruces representan las medias aritméticas y las barras horizontales las medianas.

3.5.2.2. Hg

Para el Hg vuelve a observarse este comportamiento donde todas las harinas integrales fueron no cuantificables o no detectables, mientras que algunas muestras refinadas presentaron concentraciones cuantificables. También es llamativo en el caso de las harinas leudantes la presencia de muestras con concentraciones de Hg mucho más elevadas que las demás. Se observó también que la muestra que dio aproximadamente 21 µg/kg de Pb, también contiene cantidades cuantificables de Hg, a un nivel de 8 µg/kg. Finalmente, es importante mencionar que las cuatro muestras que contuvieron la mayor concentración de Hg pertenecen a la misma marca comercial. Todas las muestras de harina leudante con concentraciones de Hg por debajo de 4 µg/kg son de otras marcas.

No se observó esta misma tendencia en otros tipos de harina, ya que las muestras de harinas 000 y 0000 de esta marca no arrojaron concentraciones cuantificables. Los valores cuantificados para harina 000 y 0000 presentados en la Figura 3.13 son de otras marcas. Es posible entonces que el elevado contenido de Hg en estas harinas leudantes provenga de los aditivos alimentarios usados por esta marca y no de la propia harina. Según el CAA [117] y la reglamentación de MERCOSUR [118], las harinas acondicionadas pueden contener hasta un máximo de 4,5% de bicarbonato de sodio y 2% de diversos fosfatos, expresados como P₂O₅, entre otros aditivos. Los límites máximos de contaminantes establecidos en el CAA para los aditivos alimentarios son bastante elevados, encontrándose la gran mayoría de las veces en el orden de los mg/kg. Es posible entonces que los aditivos tengan una contribución significativa al contenido final de elementos tóxicos en harinas leudantes. Más estudios serían necesarios para confirmar esta hipótesis. Particularmente de interés sería llevar a cabo análisis químicos sobre los aditivos utilizados.

3.5.2.1. As

Con respecto a los resultados obtenidos para As, todas las muestras dieron concentraciones cuantificables. Haciendo un análisis visual, la harina leudante parece ser la de mayores concentraciones. Las 3 concentraciones más altas entre las harinas leudantes corresponden a una misma marca, aunque esta también presentó muestras con concentraciones más bajas. Nuevamente, es posible que el incremento en

las concentraciones de As se deba a los aditivos utilizados. En la Sección 3.1.3, se mencionó que las harinas leudantes podrían llegar a tener interferencias ArCl^+ por la sal agregada, sin embargo, en esa misma sección se mencionó también que teniendo en cuenta las señales de ^{35}Cl registradas, no se espera tener dicha interferencia sobre la medición del As.

Existe a su vez un valor atípicamente alto entre las harinas integrales, la cual se trataba de una muestra que declaraba provenir de producción agroecológica. En una comunicación telefónica con el productor de la empresa, se consultó si utilizaban cascarilla de arroz como enmienda orgánica para la producción de trigo. El productor declaró que no utilizaban cascarilla de arroz directamente, si no lecho de gallinero, el cual frecuentemente contiene esta. Sin embargo, también mencionó que la última vez que se aplicó esta enmienda fue aproximadamente 6 años antes de la adquisición de la muestra en cuestión. El productor también mencionó que el mismo molino que se utiliza para la producción de harina de trigo se usa para producir harina de arroz. Es posible entonces que el origen del elevado contenido de As (respecto a las otras muestras) se deba a una contaminación cruzada con arroz. No se observaron concentraciones anormalmente altas de los demás elementos para esta muestra.

3.5.2.2. Cd

En cuanto al Cd, además de que todas las muestras fueron cuantificables, parece existir una tendencia inversa que la de los demás elementos, donde las harinas más refinadas tienen un menor contenido de este metal. En granos de trigo con contenidos de Cd mucho más altos, se ha demostrado que, si bien el Cd se encuentra más concentrado en las capas más externas del grano (que son removidas durante su refinamiento), presenta una distribución más homogénea que otros elementos como el As [119,120]. Teniendo en cuenta esto, se debería haber visto esta misma tendencia de forma más marcada para el As, pero este no fue el caso. De todas maneras, este tipo de análisis con los datos presentes solo es tentativo, ya que las muestras de harina estudiadas fueron probablemente producidas a partir de distintos lotes de granos de trigo.

Una de las muestras de harina integral presentó una concentración inusualmente alta de Cd. Esta muestra es una harina que declara ser de producción orgánica y fue la única analizada de este tipo y marca, por lo que no es posible hacer inferencias sobre este resultado.

Finalmente, al contrario que con los elementos anteriores, las harinas leudantes no parecen tener mayores concentraciones de Cd que las demás harinas refinadas.

3.5.2.1. Análisis estadístico

El análisis estadístico fue aplicado a los elementos Cd y As, ya que fueron cuantificables en todas las muestras. Para el análisis no se incluyó la muestra de harina agroecológica en el caso del As y en el caso del Cd no se incluyó la harina orgánica. Estos datos se alejaban marcadamente de la tendencia mostrada por las demás muestras, y dado que había una diferencia real entre estas y las demás muestras (el método de producción y la posibilidad de contaminación cruzada), se decidió no incluirlas para evitar sesgar los resultados. En la Tabla 3.19 se presentan los resultados de los test de Shapiro-Wilks y Levene para estos elementos sin aplicar transformaciones.

Tabla 3.19. Tests de Shapiro-Wilks y Levene para las muestras de harina

Elemento	Shapiro-Wilks (normalidad)	Levene (homocedasticidad)
	Valor p	Valor p
As	0,02607	0,1840
Cd	0,01079	0,6985

En ambos casos los residuos siguen una distribución que no es normal (Shapiro-Wilks, $p = 0,02607$ y $p = 0,01079$), por lo que se evaluaron las transformaciones antes mencionadas. Para los dos elementos una transformación logarítmica resultó adecuada. En la Tabla 3.20 se muestran los resultados de los tests aplicados con los datos transformados, y en la Figura 3.14 se presenta una comparación gráfica de los datos originales y los transformados. Puede verse que con la transformación se consigue que se cumpla el supuesto de la normalidad, mientras que se mantiene la homocedasticidad. Estos datos transformados son los que son utilizados para ANOVA.

Tabla 3.20. Tests de Shapiro-Wilks y Levene para las muestras de harina con los datos transformados logarítmicamente

Elemento	Shapiro-Wilks (normalidad)	Levene (homocedasticidad)
	Valor p	Valor p
As		
Transf: log	0,1659	0,9331
Cd		
Transf: log	0,1338	0,2677

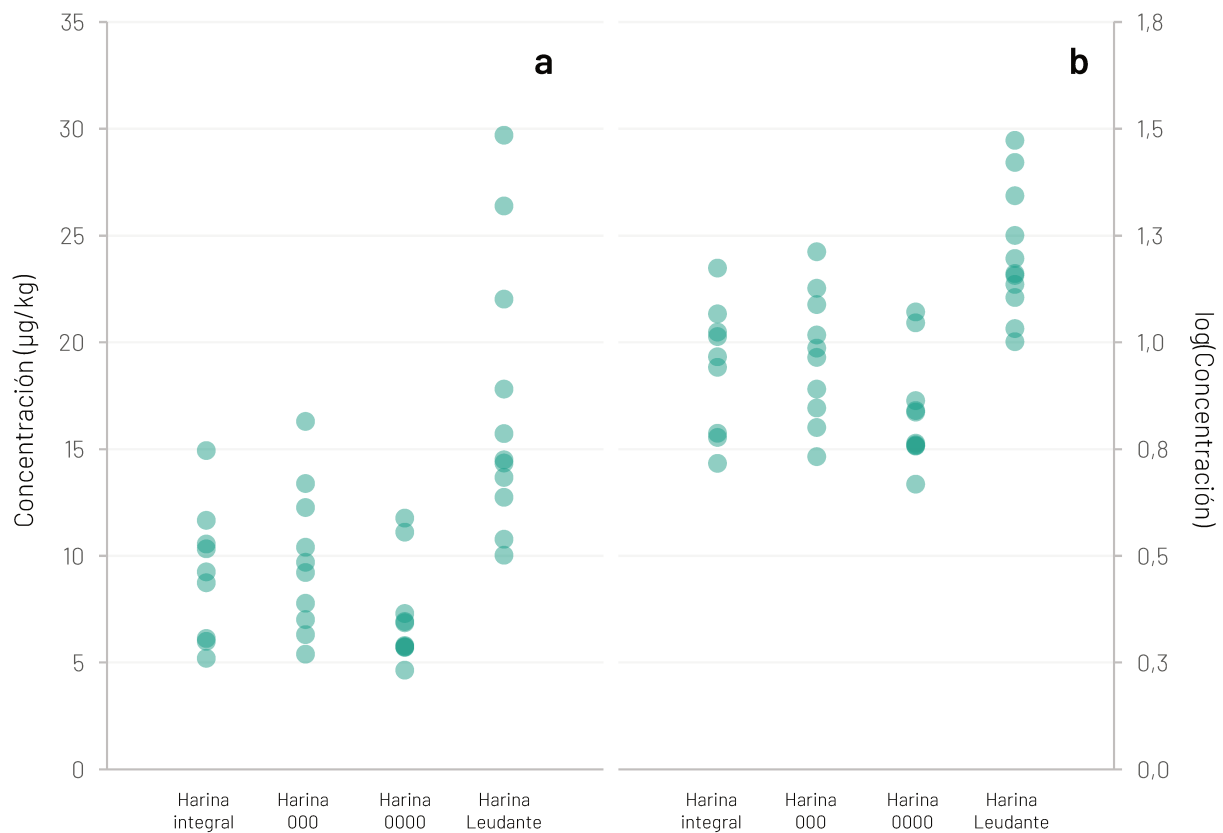


Figura 3.14. Concentraciones de As en harinas. (a) datos originales, (b) datos transformados

En la Tabla 3.21 se resumen los resultados obtenidos del ANOVA y las pruebas de Tukey-Kramer sobre los datos transformados. En cuanto al As, quedó demostrado que la harina leudante es estadísticamente diferente de las demás, mientras que el resto de las harinas no pueden ser distinguidas entre ellas. Con respecto al Cd, la harina integral es estadísticamente diferente de la harina 0000 y de la harina leudante, pero no de la 000. A su vez, también la harina 000 y 0000 presentan una diferencia estadísticamente significativa con un $p = 0,043$.

Tabla 3.21. Resultados de ANOVA y test de Tukey-Kramer para As y Cd en harina.

Elemento	ANOVA	Contraste	Tukey-Kramer
	Valor p		Valor p
As Transf: log	1,22 E-05	Integral - 0000	0,417
		Leudante - 0000	7,6 E-06
		000 - 0000	0,211
		Leudante - Integral	1,45 E-03
		000 - Integral	0,981
		000 - Leudante	3,25 E-03
Cd Transf: log	1,41 E-04	Integral - 0000	2,45 E-04
		Leudante - 0000	0,904
		000 - 0000	0,043
		Leudante - Integral	1,26 E-03
		000 - Integral	0,220
		000 - Leudante	0,158

3.5.2.2. Correlaciones

Se evaluó también si existía alguna correlación entre las concentraciones de As y Cd. En la Figura 3.15 se presentan los datos de concentración de As en función de concentración de Cd. No se observó ninguna correlación significativa entre estas variables por regresión lineal simple ($p > 0,05$ en todos los casos).

3.5.1. Muestras de arroz

En la Figura 3.16 se muestran los resultados obtenidos para cada elemento según el tipo y variedad de arroz. Al igual que con la harina, todas las muestras tuvieron concentraciones cuantificables de Cd y As. A su vez, la gran mayoría de las muestras presentaron concentraciones de Hg por encima del LOQ. Para el Pb, la mayoría de las muestras presentaron concentraciones no cuantificables. Nuevamente, ninguna de las muestras presentó niveles de Cd y Pb por encima de los permitidos por las legislaciones mencionadas en el Capítulo 1. El caso del iAs se discute en el capítulo siguiente.

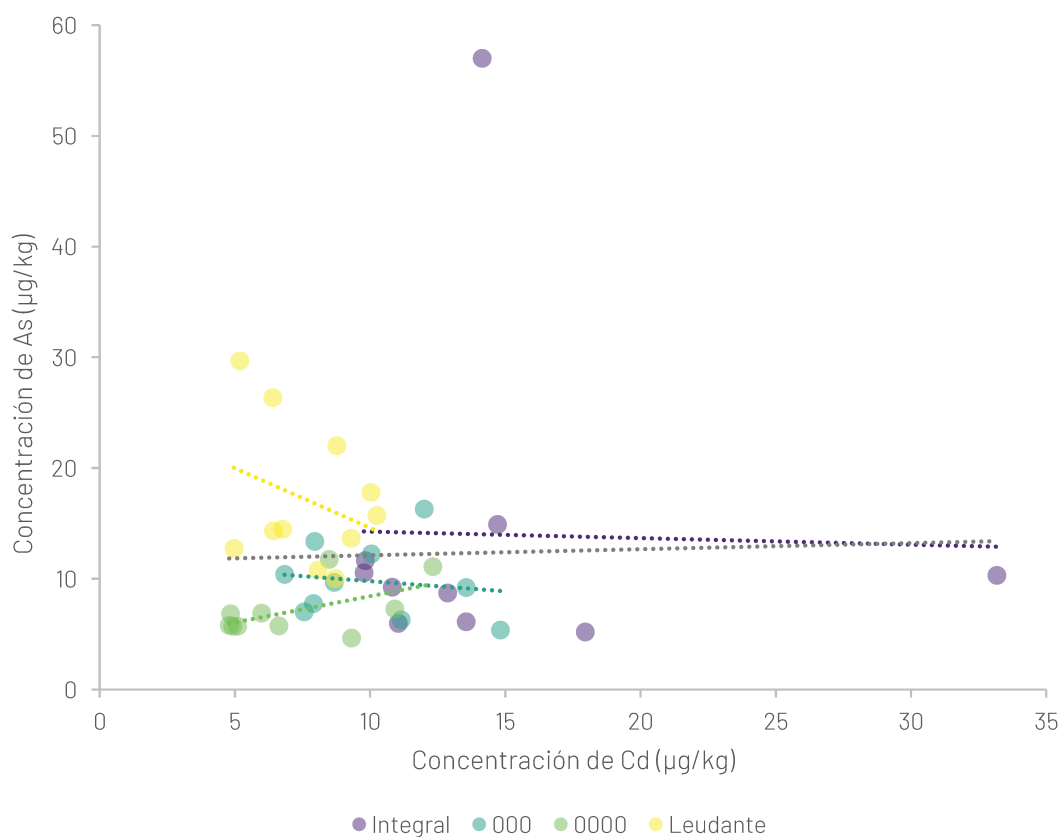


Figura 3.15. Gráfico de dispersión de las concentraciones de Cd y As. Las líneas punteadas representan las rectas de regresión obtenidas por mínimos cuadrados. La recta punteada gris representa la regresión sobre todos los datos.

3.5.1.1. As

Como era esperado, el caso del As en el arroz se diferencia totalmente de los demás. Las concentraciones son notablemente más altas que las de los demás elementos, e incluso que las del propio As en las muestras de harina. Se puede observar que las concentraciones de As tienden a ser más altas en los arroces integrales y parbolizados que en los pulidos. Sin embargo, también se encuentran arroces pulidos con concentraciones excepcionalmente altas de As.

No parecen verse grandes diferencias entre variedades. Los arroces pulidos Doble Carolina presentaron concentraciones similares que los Largo Fino, y en ambos casos se observaron valores atípicamente altos. Por su parte, los arroces integrales de variedad Yamaní presentaron concentraciones similares que los Largo Fino, aunque en uno de ellos se halló un valor muy elevado de 1154 µg/kg.

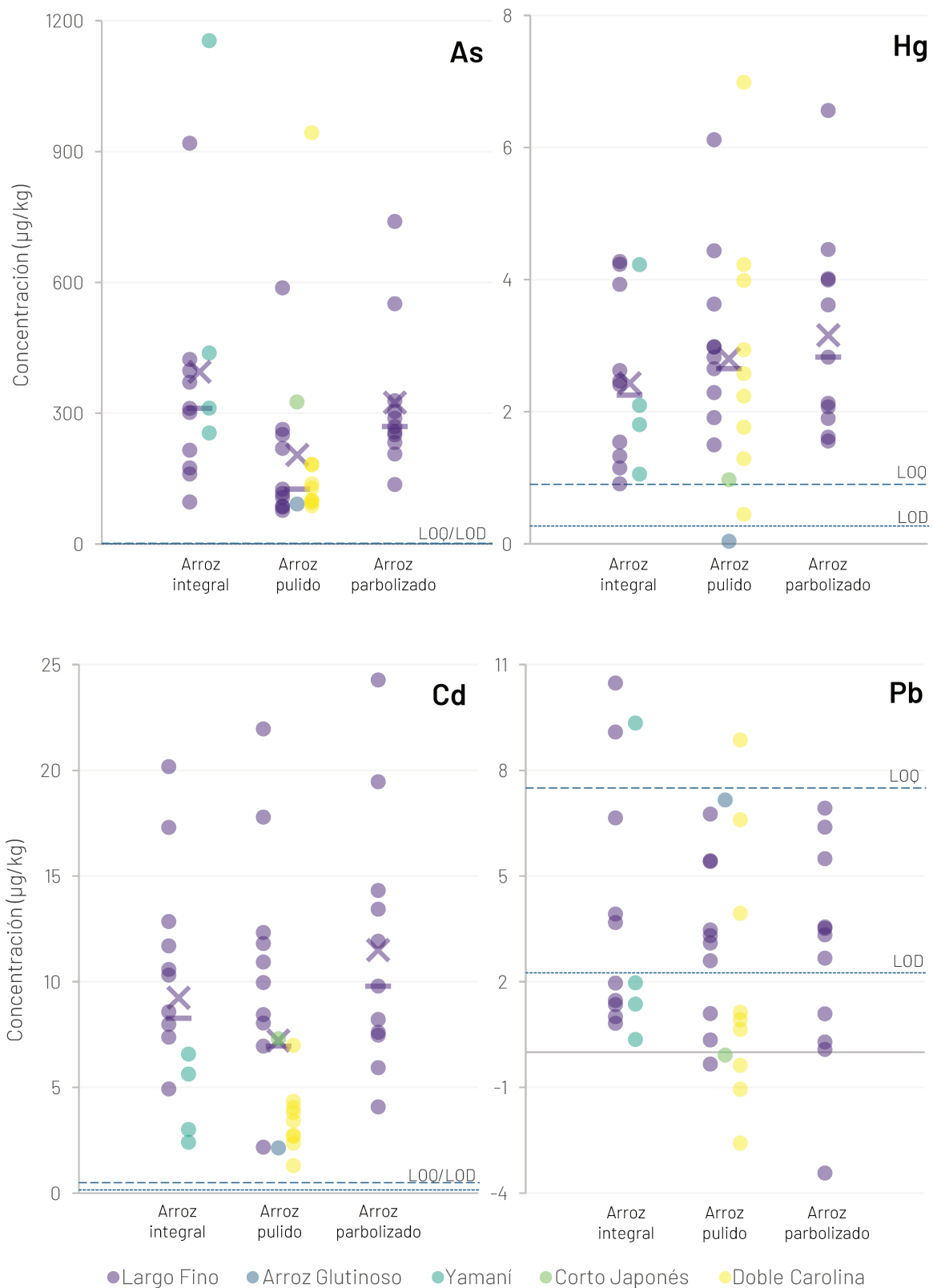


Figura 3.16. Resultados del análisis de las muestras de arroz. Las líneas cortadas y punteadas representan los LOQs y LODs, respectivamente. Las cruces representan las medias aritméticas y las barras horizontales las medianas. Estas fueron calculadas por tipo, sin discriminar por variedad.

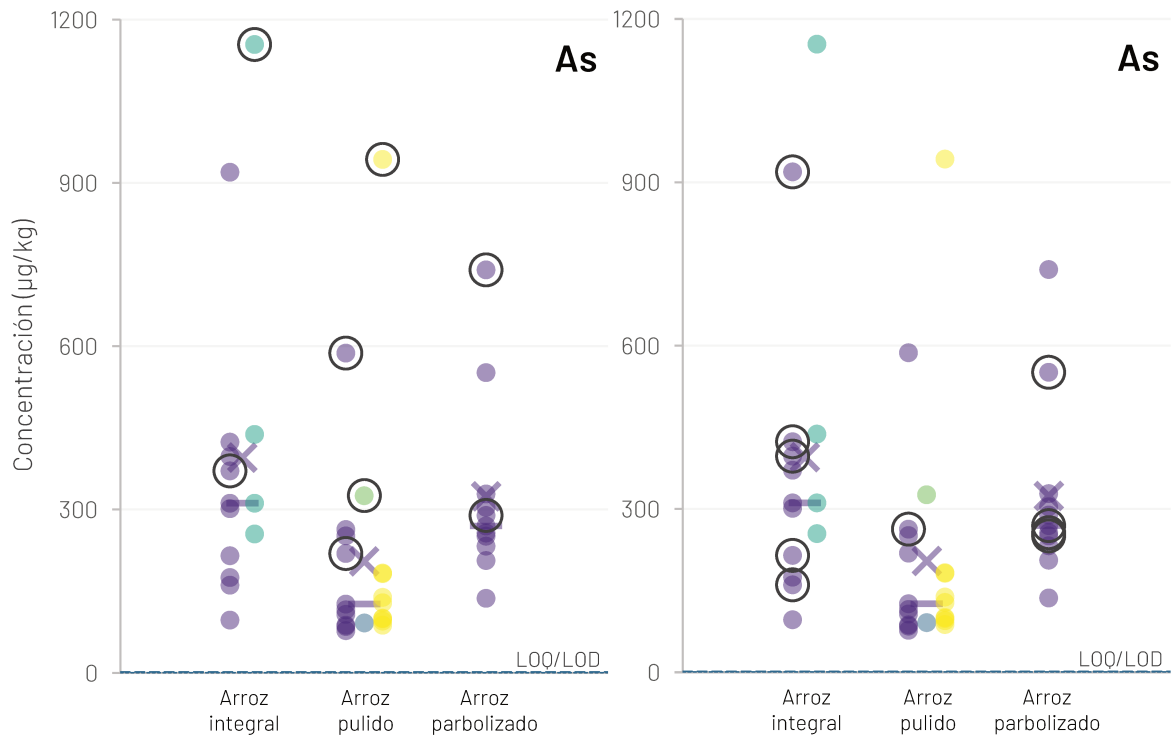


Figura 3.17. Resultados de As en arroz con las muestras de dos marcas discriminadas

Analizando estos resultados elevados, se vio que la mayoría de estos pertenecían a arroces de la misma marca. En la Figura 3.17 se presentan los mismos datos que en la Figura 3.16, pero señalando esta marca en particular. Puede verse que 4 de los 6 valores que podrían considerarse atípicos son de la misma marca. A su vez, los 3 valores de esta marca que no serían atípicos presentaron concentraciones relativamente altas. Por otra parte, los otros dos valores elevados que restan también pertenecieron a una misma marca, sin embargo, las demás muestras de esta parecen tener concentraciones más homogéneamente distribuidas. Vale la pena mencionar que el análisis por marcas comerciales puede llegar a estar sesgado ya que de varias marcas solo se dispone de menos de 3 muestras.

3.5.1.1. Pb

Muy pocas muestras de arroz presentaron concentraciones cuantificables de Pb. Muchas muestras fueron menores al LOD, e incluso se observan valores negativos debido a la imposibilidad de diferenciar la señal del ruido de fondo. No se observan valores que se desvíen de la tendencia como sí se observó con las muestras de harina. Las muestras cuantificables tampoco tuvieron en común ninguna cualidad,

como podría ser la marca o la variedad de arroz. Debido a la elevada incertidumbre en los valores de concentración por debajo del LOD/LOQ, no es posible hacer más inferencias sobre estos datos.

3.5.1.2. Hg

En el caso del Hg, a diferencia de la harina, la mayoría de las muestras fueron cuantificables. En arroz pulido, se tuvo una muestra por debajo del LOQ y una por debajo del LOD. La muestra no detectable fue la única que se tenía de Arroz Glutinoso, mientras que la no cuantificable fue un arroz de variedad Doble Carolina. Para los cálculos, estos valores fueron tomados tal cual, ya que se consideró que era la medida que menos sesgaría la estimación de los parámetros poblacionales. De todas maneras, su proporción es pequeña respecto de las muestras totales.

Los distintos tipos de arroz no parecen tener diferencias muy marcadas en el contenido de Hg. Tampoco parecen haber diferencias entre las variedades. Si bien casi todas las muestras tuvieron cantidades de Hg cuantificables, estas son menores que los valores esporádicamente altos encontrados en harinas leudantes.

Entre las muestras de Doble Carolina y Yamaní se encuentra un valor en cada caso que es más alto que los demás. Se trata de las mismas muestras de estas variedades que presentaron valores atípicos para As, las cuales a su vez provenían de una misma marca comercial.

3.5.1.3. Cd

Para el Cd se observa claramente una diferencia entre variedades. Dentro del grupo de los pulidos, los de variedad Doble Carolina parecen tener concentraciones menores que los Largo Fino, mientras que en los integrales los de variedad Yamaní (a pesar de la poca cantidad de muestras) parecen tener menos Cd que los Largo Fino. Por otro lado, teniendo en cuenta solo los de variedad Largo Fino, no parece haber una diferencia sustancial entre los tipos de arroz. En general, las concentraciones halladas se encuentran en el mismo orden que en las muestras de harina.

Nuevamente, los dos valores más elevados en las muestras de arroz parbolizado y uno de los dos valores más elevados en el arroz integral correspondieron a la marca

comercial que arrojó valores elevados de As. A su vez, el valor más alto entre los Doble Carolina fue la misma muestra que presentó valores altos de As y Hg.

3.5.1.4. Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico sobre los resultados de As, Cd y Hg en las muestras de arroz. En este caso se tuvieron dos variables categóricas para agrupar los datos: la variedad (Largo Fino, Doble Carolina o Yamaní) y el tipo de arroz (integral, pulido o parbolizado). Sobre las variedades Corto Japonés y Arroz Glutinoso no se realizaron pruebas estadísticas ya que solo se disponía de una muestra de cada una.

Tabla 3.22. Tests de Shapiro-Wilks y Levene para la comparación de muestras de arroz según variedad.

Elemento	Variedad	Shapiro-Wilks (normalidad)	Levene (homocedasticidad)
		Valor p	Valor p
As	LF vs. DC	4,872 E-06	0,8288
	LF vs. Y	0,0055	0,4410
Cd	LF vs. DC	0,0547	0,04701
	LF vs. Y	0,5005	0,3230
Hg	LF vs. DC	0,1462	0,3794
	LF vs. Y	0,0726	0,7436

Dado que de la variedad Doble Carolina solo se disponía de arroces pulidos y de la variedad Yamaní solo se disponía de arroces integrales, en primer lugar, se testeó si estas variedades presentaban diferencias estadísticamente significativas con la variedad Largo Fino de cada tipo y para cada elemento. Para ello, primero se verificaron los supuestos de ANOVA, y se aplicó una transformación si era necesario. En la Tabla 3.22 se muestran los resultados de las pruebas de normalidad y homocedasticidad. En el caso del As, para ambas comparaciones fue necesario aplicar transformaciones, mientras con el Cd fue necesario hacerlo en la comparación de los Largo Fino con los Doble Carolina. Con el Hg, en el test de Shapiro-Wilks de la comparación LF vs. Y, se obtiene un valor p próximo al nivel de significancia. Sin embargo, se comprobó que los resultados de la comparación posterior son equivalentes con transformación o sin ella, por lo que se informan los resultados sin transformación.

Tabla 3.23. Tests de Shapiro-Wilks y Levene para la comparación de muestras de arroz según variedad con transformaciones.

Elemento	Variedad	Shapiro-Wilks (normalidad)	Levene (homocedasticidad)
		Valor p	Valor p
As Transf: 1/x	LF vs. DC	0,4863	0,4562
	LF vs. Y	0,0832	0,4557
Cd Transf: $x^{1/2}$	LF vs. DC	0,2941	0,1635

En la Tabla 3.23 se indican las transformaciones utilizadas en los casos que fueron necesarias y los resultados de los tests de verificación de supuestos.

A continuación, para la comparación se usaron test t. En la Tabla 3.24 se resumen los resultados de estas pruebas. Como fue previsto por el análisis visual de los datos, el Cd presentó diferencias estadísticamente significativas según la variedad de arroz. En ambos casos la variedad Largo Fino tiene mayores concentraciones de Cd. Por su parte, As y Hg no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre variedades.

Tabla 3.24. Tests t entre las variedades de muestras de arroz usando las transformaciones mencionadas en la Tabla 3.23

Elemento	Pulido (Largo Fino vs. Doble Carolina)	Integral (Largo Fino vs. Yamani)
	Valor p	Valor p
As	0,9769	0,3599
Cd	6,34 E-04	2,58 E-03
Hg	0,8076	0,8212

Una vez comparadas las variedades, se procedió a comparar las concentraciones entre los tipos de arroz. Para ello, en se agruparon los datos de As y Hg de las distintas variedades ya que, como fue mostrado, estas no presentaron diferencias significativas. En el caso del Cd, se compararon solamente los datos de la variedad Largo Fino entre los diferentes tipos de arroz.

Al igual que con las muestras de harina, en primer lugar se verificó la normalidad y heterocedasticidad, y en caso de que fuera necesario se aplicaron transformaciones. Los resultados de estas pruebas se muestran en la Tabla 3.25, donde puede

verse que nuevamente en el caso del As no se cumple el supuesto de normalidad. Aplicando una transformación $1/x^{1/2}$ se logra tener una distribución normal de los residuos y se mantiene la homocedasticidad. El valor p del test de Shapiro-Wilks para el Hg se encuentra al límite del nivel de significancia usado. Sin embargo, se compararon los resultados que se obtienen de ANOVA aplicando o no una transformación a estos datos y se verificó que se llegaba a las mismas conclusiones.

Tabla 3.25. Tests de Shapiro-Wilks y Levene para la comparación de muestras de arroz según tipo.

Elemento	Shapiro-Wilks (normalidad)	Levene (homocedasticidad)
	Valor p	Valor p
As	9,53 E-08	0,5336
As Transf: $1/x^{1/2}$	0,8127	0,1154
Cd	0,0870	0,7594
Hg	0,0677	0,7944

Tabla 3.26. Resultados de ANOVA y test de Tukey-Kramer para As, Cd y Hg en arroz.

Elemento	ANOVA	Contraste	Tukey-Kramer
	Valor p		Valor p
As (Todas las variedades)	5,34 E-04	Parbolizado - Integral	0,9850
		Pulido - Integral	1,60 E-03
		Pulido - Parbolizado	5,80 E-03
Cd (Solo variedad Largo Fino)	0,981	Parbolizado - Integral	-
		Pulido - Integral	-
		Pulido - Parbolizado	-
Hg (Todas las variedades)	0,522	Parbolizado - Integral	-
		Pulido - Integral	-
		Pulido - Parbolizado	-

Aplicando ANOVA a estos datos se obtuvieron los resultados de la Tabla 3.26. En esta tabla se incluyen también los resultados del análisis post hoc. Solo As presentó diferencias significativas entre los tipos de arroz. A su vez, las diferencias de contenido de As entre pulidos e integrales y pulidos y parbolizados fueron estadísticamente significativas. Como se vio en el análisis presentado en la Sección 3.5.3.1, los

arroz pulidos tienden a tener menos As que los demás. Vale la pena mencionar que en el caso del Cd si se incluían en el ANOVA las muestras de la variedad Doble Carolina, el valor p resultaba ser de 0,07. Este es muy próximo al nivel de significancia usado, pero las diferencias observadas en realidad se deben a la variedad y no al tipo de arroz. Al haber solo muestras de arroz pulido de la variedad Doble Carolina, y al tener esta variedad menor contenido de Cd, el análisis por tipo de arroz llevaría a la conclusión errónea de que los arroces pulidos tienen menos Cd.

3.5.1.5. Correlaciones

Al igual que con las muestras de harina, se estudió si existían correlaciones entre los elementos cuantificables. Sin embargo, en este caso el análisis es bastante más complejo ya que se tienen dos variables categóricas para agrupar las muestras (tipo de arroz y variedad), y el número de elementos cuantificables es 3 en lugar de 2. Esto da un total de 21 correlaciones posibles. A continuación se describirán solamente los casos que parecen presentar una tendencia en los datos y en los que se observaron correlaciones significativas ($p < 0.05$).

En primer lugar, intentando correlacionar los datos sin discriminar las muestras por variedad o tipo, solo se observó una correlación entre el As y el Hg, con un $p = 0,0065$, pero con un $R^2 = 0,1563$ y un $R^2_{ajustado} = 0,1372$. Entre el As y el Hg también se encontraron correlaciones para los arroces yamaní ($p = 0,0166$; $R^2 = 0,9670$ y $R^2_{ajustado} = 0,9506$) y los parbolizados ($p = 0,0484$; $R^2 = 0,3664$ y $R^2_{ajustado} = 0,2961$). Sin embargo, como puede verse en la Figura 3.18, en el caso del arroz Yamaní la correlación puede estar condicionada por el bajo número de muestras, mientras que en los arroces parbolizados si no estuviese la muestra que tiene la mayor concentración de Hg, la correlación no sería significativa ($p = 0,1751$). Por este motivo los resultados de estos análisis de correlación dividiendo las muestras según las variables categóricas deben ser tomados con cautela.

Continuando con el Hg, se observó una correlación con el Cd solo en los arroces Doble Carolina ($p = 0,0458$; $R^2 = 0,4565$ y $R^2_{ajustado} = 0,3789$). Sin embargo, nuevamente, si no estuviese el punto de mayor concentración de ambos elementos, el valor p sería de 0,786; con lo cual la correlación no sería significativa.

En cuanto a la correlación entre el As y el Cd, los arroces parbolizados presentaron un $p = 0,0272$, $R^2 = 0,4351$ y $R^2_{ajustado} = 0,3723$ y los arroces Doble Carolina $p = 0,00298$, $R^2 = 0,7386$ y $R^2_{ajustado} = 0,7013$. Nuevamente, si en los arroces parbolizados no estuviese presente el punto de mayor concentración, la correlación pierde significancia estadística ($p = 0,511$). En cambio, en los arroces Doble Carolina, a pesar de que hay un valor outlier en las concentraciones de As, esta correlación es significativa aun sin este valor. Más aun, un modelo logarítmico parece ajustar razonablemente bien estos datos ($p = 0,00035$, $R^2 = 0,8559$ y $R^2_{ajustado} = 0,8353$). Este se encuentra representado en la Figura 3.18 con línea cortada.

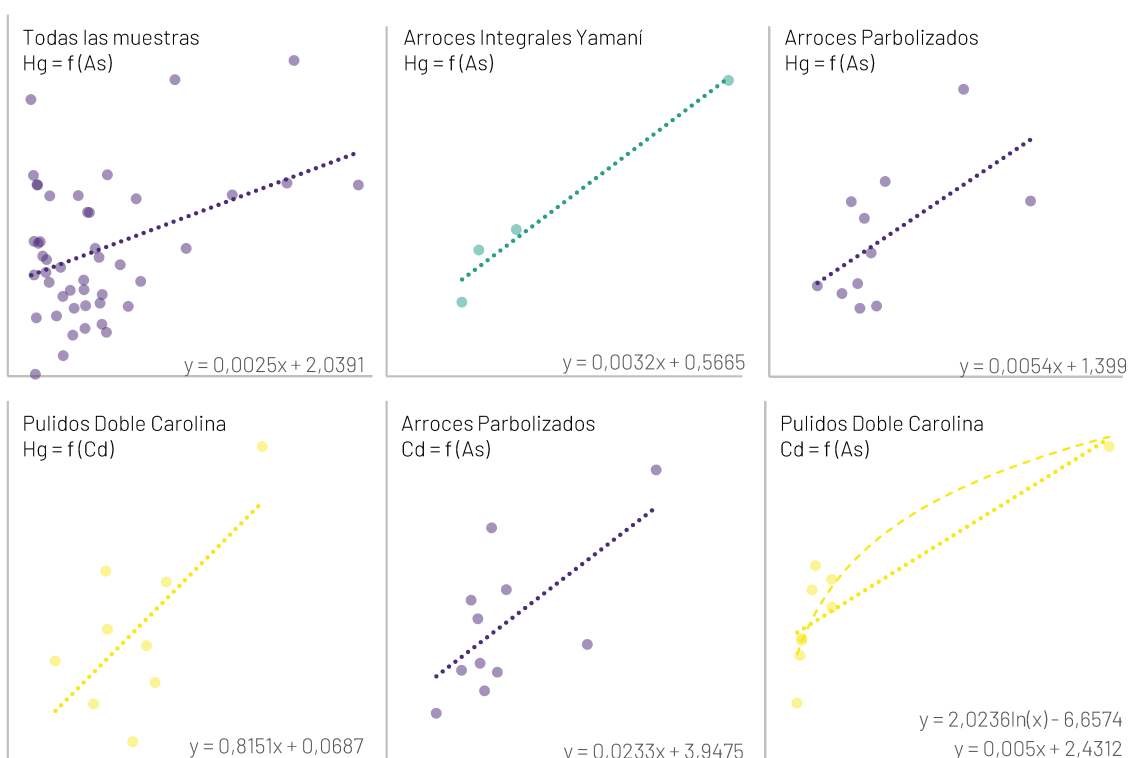


Figura 3.18. Correlaciones significativas encontradas en los datos de arroz

3.5.2. Muestras de trigo

Los resultados obtenidos para las muestras de trigo se presentan en la Figura 3.19. Puede verse que en general se obtuvieron concentraciones más altas que las que fueron observadas para las harinas (Figura 3.13). Es llamativo que las concentraciones fueron bastante más elevadas en los granos de trigo que en las harinas integrales, siendo que estas últimas consisten básicamente de granos de trigo pulverizados. Es posible que la diferencia radique en que antes de la molienda comercial a los

granos de trigo se les hace una limpieza, mientras que los granos de trigo analizados en este trabajo fueron molidos tal como fueron recibidos. Aun así, los niveles hallados no superan los valores de las legislaciones presentadas en la Sección 1.1.

3.5.2.1. As

Se puede ver claramente en la Figura 3.19 que el lugar de producción tiene un gran impacto en el contenido de As. Las muestras de Paraná alcanzaron concentraciones notablemente altas teniendo en cuenta las concentraciones observadas anteriormente para las harinas. Las muestras de las demás regiones presentaron menor contenido de As, aunque siempre por encima del LOQ. Por otro lado, el efecto del ciclo parece ser mucho menor.

3.5.2.2. Hg

Todas las muestras, excepto una, presentaron concentraciones no cuantificables de Hg, mientras que algunas otras se encontraron entre el LOD y el LOQ y muchas por debajo del LOD. No es posible realizar mayores análisis sobre estos resultados.

3.5.2.3. Cd

Los resultados de Cd también mostraron una fuerte dependencia del lugar de origen de las muestras. En este caso las mayores concentraciones se observan en las muestras de Marcos Juárez, mientras que las de Reconquista fueron las de menor concentración. Las muestras de Marcos Juárez a su vez parecen tener una influencia según el ciclo, mientras que las de las demás regiones no. Nuevamente, la mayoría de las muestras presentaron concentraciones más elevadas que las harinas integrales analizadas anteriormente, a excepción de las de Reconquista que presentaron valores similares.

3.5.2.4. Pb

En el caso del Pb también se observaron concentraciones más altas que las vistas anteriormente en el caso de las harinas y el arroz, donde la mayoría de las muestras fueron no cuantificables. En el caso de este elemento, nuevamente parece que las muestras de Marcos Juárez tienen concentraciones más elevadas que las demás regiones, aunque la diferencia no es tan marcada como en los casos anteriores. El ciclo no parece tener una influencia clara en el caso de este elemento.

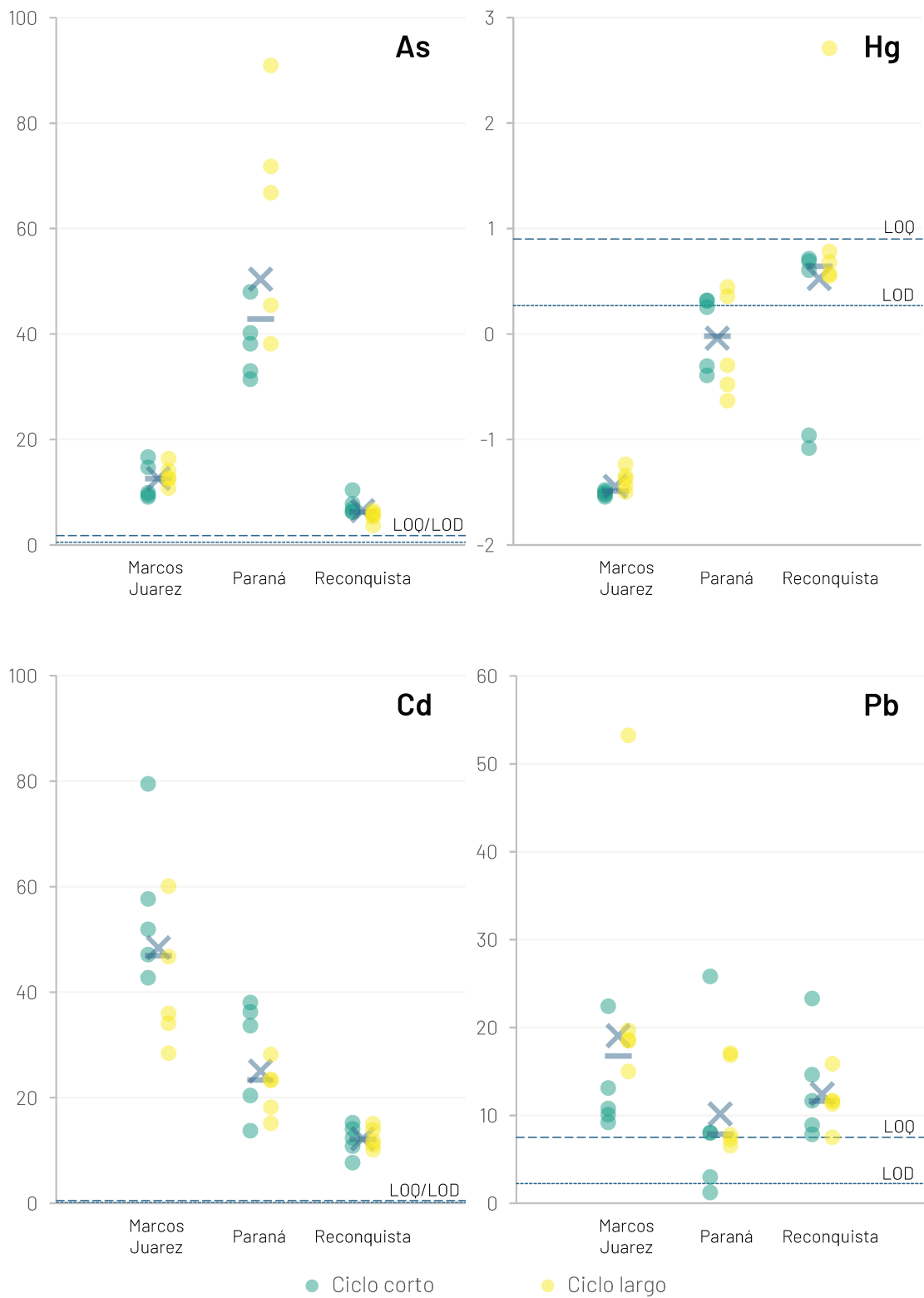


Figura 3.19. Resultados del análisis de las muestras de trigo. Las líneas cortadas y punteadas representan los LOQs y LODs, respectivamente. Las cruces representan las medias aritméticas y las barras horizontales las medianas.

3.5.2.1. Análisis estadístico

Como fue mencionado en la Sección 3.5.1, las muestras de trigo forman un diseño balanceado y los resultados fueron analizados por ANOVA de dos vías. En este análisis se estudió la significancia estadística de las variables Lugar, Ciclo y un término de interacción entre ellas para cada elemento. Se estudiaron los elementos que fueron cuantificables en la gran mayoría de las muestras, es decir As, Cd y Pb.

Primeramente se verificaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad como fue hecho también en secciones anteriores y se evaluó la necesidad de utilizar transformaciones. En la Tabla 3.27 se presentan los resultados de estos tests para los datos originales además de los datos de As y Pb transformados, donde fue necesario aplicar transformaciones.

Tabla 3.27. Tests de Shapiro-Wilks y Levene para las muestras de trigo

Elemento	Shapiro-Wilks (normalidad)	Levene (homocedasticidad)
	Valor p	Valor p
As	9,07 E-05	0,0019
As Transf: log	0,9114	0,7015
Cd	0,1572	0,2930
Pb	1,51 E-04	0,8473
Pb Transf: log	0,1178	0,2746

Una vez verificados los supuestos, se realizaron los análisis de varianza y pruebas post-hoc correspondientes. En la Tabla 3.28 se encuentran los resultados de los ANOVA multifactoriales realizados. Como fue evidente en la Figura 3.19, las mayores variaciones se dan según el lugar de producción. Esta variable resultó estadísticamente significativa, en mayor o menor medida, para los tres elementos estudiados. El valor p de la variable Ciclo solamente fue ligeramente menor a 0,05 en el caso del Cd. En As y Pb esta variable no fue significativa. Sin embargo, en el caso del As se observa que la interacción entre el ciclo y el lugar es significativa.

Tabla 3.28. Resultados de ANOVA para As, Cd y Pb en muestras de trigo.

Elemento	Factor	ANOVA
		Valor p
As Transf: log	Ciclo	0,3240
	Lugar	3,04 E-15
	Interacción Ciclo-Lugar	0,0052
Cd	Ciclo	0,0486
	Lugar	2,81 E-08
	Interacción Ciclo-Lugar	0,2123
Pb Transf: log	Ciclo	0,119
	Lugar	0,027
	Interacción Ciclo-Lugar	0,382

A continuación se analizaron los contrastes de la variable Lugar. La variable Ciclo solo posee dos niveles, por lo que no es necesario aplicarle este mismo análisis. Los resultados se encuentran en la Tabla 3.29. En el caso del As y el Cd, los tres sitios fueron claramente distinguibles entre sí. En cambio, para el Pb solo Paraná y Marcos Juárez fueron estadísticamente diferentes.

Tabla 3.29. Resultados del test de Tukey-Kramer para la variable Lugar en las muestras de trigo

Elemento	Contraste	Tukey-Kramer
		Valor p
As Transf: log	Paraná - Marcos Juárez	1,59 E-11
	Reconquista - Marcos Juárez	5,19 E-06
	Paraná - Reconquista	2,33 E-14
Cd	Paraná - Marcos Juárez	2,44 E-05
	Reconquista - Marcos Juárez	1,96 E-08
	Paraná - Reconquista	0,0135
Pb Transf: log	Paraná - Marcos Juárez	0,0209
	Reconquista - Marcos Juárez	0,4204
	Paraná - Reconquista	0,2579

3.5.2.2. Correlaciones

Se estudió la presencia de correlaciones entre las concentraciones de Pb, Cd y As en las muestras, sin embargo, no se evidenció ninguna correlación significativa. En la Figura 3.20 se presentan los gráficos de dispersión obtenidos.

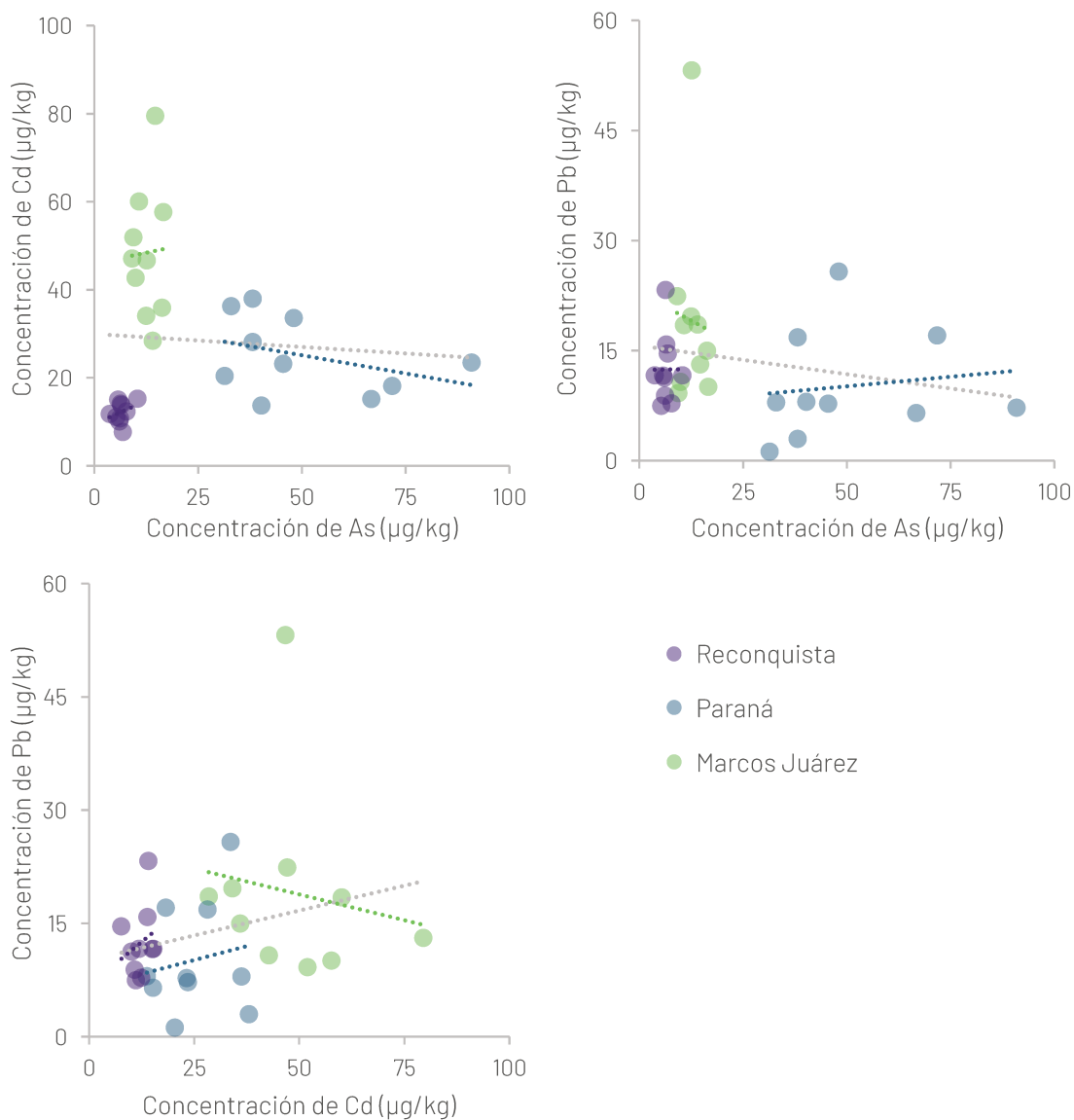


Figura 3.20. Gráficos de dispersión obtenidos con los datos de las muestras de trigo

Capítulo 4

Especiación

4. Especiación

En este capítulo se describe el desarrollo, validación y aplicación del método empleado para el análisis de especiación de As en las muestras estudiadas. Se enfatizó el estudio de la preparación de muestra y la posterior separación cromatográfica.

Durante el desarrollo de esta parte del trabajo hubo inconvenientes técnicos con el equipo, por lo que algunos ensayos no pudieron ser llevados a cabo. Se completó la optimización y validación del método para muestras de arroz, pero no se alcanzó a validar para muestras de harina y trigo. A su vez, se alcanzó a analizar todas las muestras de arroz excepto dos arroces parbolizados y se analizaron de forma preliminar algunas harinas.

4.1. Extracción

4.1.1. Optimización multivariada

Como fue mencionado en la Sección 1.3.2 se han reportado diversas estrategias de extracción. Entre ellas, las extracciones en medio ácido parecen ser las más eficientes, y particularmente el HNO_3 parece ser el más conveniente. Similarmente a lo que ocurre con la determinación de metales totales, el HNO_3 no introduce nuevas interferencias espectrales, no causa obstrucciones en los conos del instrumento y es de fácil purificación por destilación subboiling.

Para el estudio de la eficiencia de extracción se hizo énfasis en la temperatura y en la concentración de ácido utilizado. Se tomó como base un método de extracción reportado en bibliografía el cual tiene una elevada eficiencia y no ocasiona interconversión de especies [47,48]. Sin embargo, este método emplea una concentración de HNO_3 de 0,28 mol/L, la cual se observó que puede interferir con la posterior separación cromatográfica ocasionando corrimientos de los tiempos de retención.

Si bien las extracciones pueden ser realizadas en sistemas relativamente sencillos, como bloques de calentamiento [48], se decidió utilizar el horno microondas para aprovechar la capacidad del sistema cerrado de calentar la mezcla extractante por encima de su punto de ebullición.

4.1.1.1. Diseño experimental

Se realizó un diseño experimental del tipo factorial 2x2 al cual se le agregó un punto central que fue replicado 4 veces para realizar una optimización multivariable de las condiciones. El objetivo de la optimización fue obtener la máxima eficiencia de extracción con la mínima concentración de ácido posible. Se consideraron dos factores: la concentración del HNO_3 y la temperatura. Para la concentración del HNO_3 se establecieron como niveles bajo y alto concentraciones de 0,07 mol/L y 0,28 mol/L, respectivamente. Para la temperatura como nivel bajo se utilizó 100 °C y como nivel alto 150 °C. Con estos niveles el punto central queda definido con una concentración de HNO_3 de 0,175 mol/L y una temperatura de 125 °C. En la Figura 4.1 se resume gráficamente la distribución de las experiencias. El diseño fue llevado a cabo 4 veces con 4 muestras de arroz diferentes, por lo que para el análisis estadístico se incluyó a su vez la variable "muestra" (arroz 1, arroz 2, arroz 3, o arroz 4) como variable categórica.

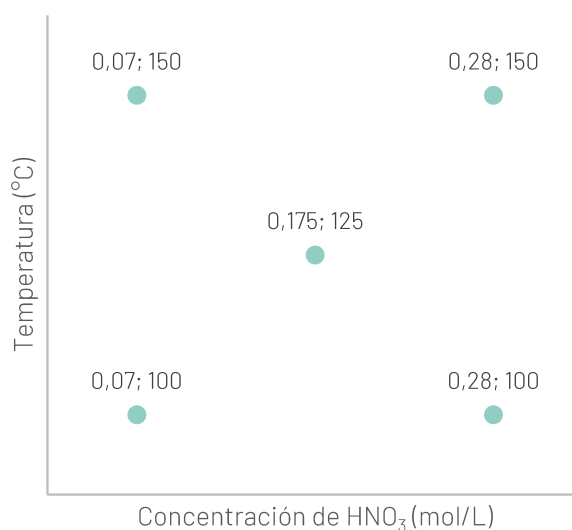


Figura 4.1. Experiencias llevadas a cabo para la optimización de la extracción.

Para llevar a cabo cada extracción se pesó 1 g de muestra en recipiente de microondas y se le adicionó 10 ml de la solución de HNO_3 correspondiente. La mezcla fue ligeramente agitada antes de ser cerrada y colocada en el horno microondas. Se aplicó un programa de calentamiento con una rampa de 10 minutos hasta la temperatura deseada y un mantenimiento de esta durante 30 minutos adicionales. Una vez

frío, el contenido del recipiente es transferido a tubo de centrifuga de 15 ml y centrifugado a 2000 rpm durante 5 minutos. Si el extracto no es analizado inmediatamente, es transferido a otro tubo para separarlo del sólido y es almacenado a 4 °C por no más de 24 h.

Los sobrenadantes obtenidos de las distintas extracciones fueron diluidos tomando 1 ml y llevándolos a 25 ml con HNO₃ 0,7 mol/L y luego el contenido de As total (tAs) fue medido por ICP-MS con las condiciones descritas en la Sección 3.1. La dilución fue llevada a cabo para reducir la posible interferencia de C disuelto en las soluciones de extracción. La ausencia de esta interferencia fue comprobada analizando diluciones de extractos fortificados con As.

Se calculó la eficiencia de extracción comparando la concentración de As total presente en el sobrenadante luego de cada extracción con el contenido de As de cada arroz, el cual fue determinado previamente como fue descrito en el Capítulo 3. Aplicando el factor de dilución correspondiente y haciendo la relación entre estas concentraciones se calculó la eficiencia de extracción porcentual para cada extracción.

4.1.1.2. Resultados

No se observaron grandes diferencias en las eficiencias de extracción con las distintas condiciones ensayadas. Además de las variables principales, se evaluó la significancia estadística de un término de interacción entre la temperatura y la concentración de HNO₃. En la Tabla 4.1 se presenta la tabla ANOVA de los resultados.

Puede verse que ninguna de las variables resultó estadísticamente significativa. Se intentó ajustar modelos con un menor número de variables para verificar si alguna

Tabla 4.1. Tabla ANOVA para la optimización de la extracción

Variable	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Valor F	Valor p
Conc. HNO ₃	1	37,81	37,810	1,4828	0,2347
Temperatura	1	1,60	1,605	0,0629	0,8040
Muestra	3	31,61	10,538	0,4133	0,7449
Conc. HNO ₃ : Temp (interacción)	1	6,41	6,414	0,2516	0,6204
Residuales	25	637,46	25,498		

de ellas se volvía significativa, pero no fue el caso. Puede concluirse entonces que la eficiencia de extracción no varía significativamente en los rangos estudiados. Estas eficiencias a su vez fueron consideradas adecuadas. En la Figura 4.2 se presentan las eficiencias de extracción obtenidas en función de la temperatura y la concentración de HNO_3 . Como puede verse, no existen grandes diferencias en la eficiencia entre los distintos tratamientos, tal como fue concluido del análisis estadístico presentado en la Tabla 4.1.

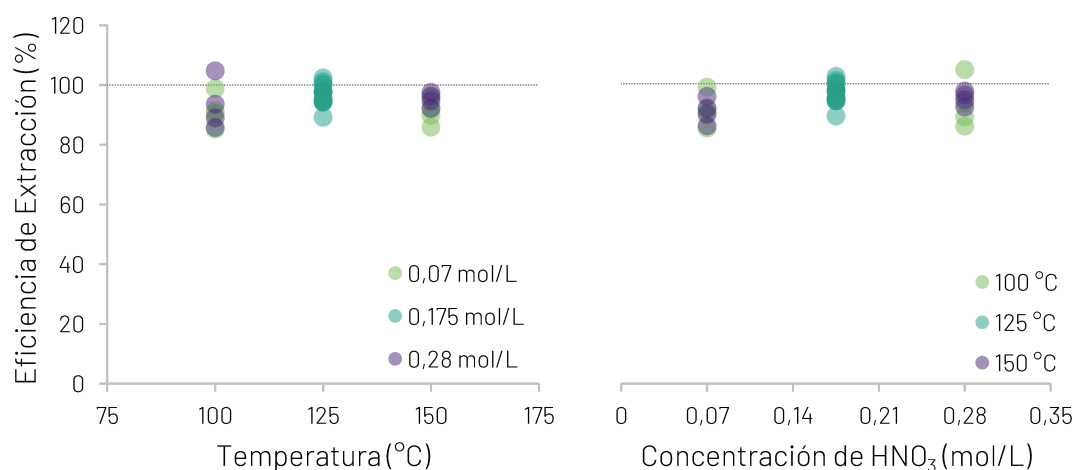


Figura 4.2. Representación gráfica de los resultados obtenidos de la optimización multivariada de la extracción.

Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió tomar como óptimas una temperatura de 125 °C y una concentración de HNO_3 de 0,14 mol/L. Si bien podrían haberse seleccionado temperaturas y concentraciones más bajas, se observó que con las condiciones más suaves (0,07 mol/L y 100 °C) los extractos resultaban más viscosos y difíciles de centrifugar. Esto a su vez dificulta la posterior filtración previa a la inyección en el HPLC. Al mismo tiempo se aprovechó la robustez que ofrecen las condiciones del punto central frente a pequeños cambios en la temperatura o concentración del ácido. Finalmente, se verificó que en estas condiciones no hay interconversión de especies analizando muestras fortificadas, por lo que el uso de condiciones extracción más suaves no sería necesario en este caso.

4.1.2. Optimización del tiempo de extracción

4.1.2.1. Estudio univariado

Con las condiciones óptimas halladas en la sección anterior, se evaluó si era posible reducir el tiempo de extracción a valores menores que 30 minutos. Para ello, se tomó una muestra de arroz integral (que se consideró que podía ser la matriz con mayores dificultades para la extracción) y se le realizaron extracciones por triplicado manteniendo la temperatura de 125 °C durante 5, 15 y 30 minutos. Los extractos obtenidos fueron centrifugados y, dado que la dilución de 1 ml en 25 ml aplicada en la Sección 4.1.1 no presentó efecto de matriz, se evaluó el uso de una dilución menor, tomando 2 ml y llevándolos a 10 ml con HNO₃ 0,7 mol/L. Se prepararon adicionalmente de la misma manera 3 soluciones (una por cada tiempo de extracción) a las cuales se les adicionó una concentración nominal de 10 µg/L de As. A todas estas soluciones se les cuantificó el contenido de As total y también el contenido de C. Las soluciones fortificadas fueron utilizadas para evaluar la presencia de efecto de matriz al medir As total sobre el extracto, el cual puede contener una gran cantidad de C disuelto.

4.1.2.2. Resultados

En primer lugar, en la Tabla 4.2 se presentan los resultados obtenidos para la medición del contenido de C. Estas concentraciones refieren a la dilución final que se realizó, es decir, no tienen factores de dilución aplicados. Como puede verse, el contenido de C en esta dilución es elevado y esta vez sí resultó en un efecto de matriz que fue observado con las muestras adicionadas. La tendencia observada para la recuperación puede deberse a la combinación de dos factores. Por un lado, el elevado contenido de C presente en todas las soluciones eleva marcadamente la señal

Tabla 4.2. Concentración de C y recuperación de As adicionado en los extractos analizados para la optimización del tiempo de extracción

Tiempo (minutos)	Concentración de C (media ± sd) (mg/L)	Recuperación de As adicionado (%)
5	6879 ± 368	180
15	7182 ± 150	175
30	7825 ± 396	171

del As, dando recuperaciones mayores al 100%. Pero, por otra parte, con los tiempos de extracción más altos aumentó el contenido de materia disuelta, por lo que se puede dar una supresión de la señal.

Debido a este fuerte efecto de matriz, a los resultados obtenidos se les aplicó un factor para corregir el mismo. Cabe mencionar que, si bien el análisis directo de los extractos resulta en efecto de matriz, esto posteriormente no fue observado en el método HPLC debido a la separación cromatográfica. Esto se expone en la Sección 4.5.3.

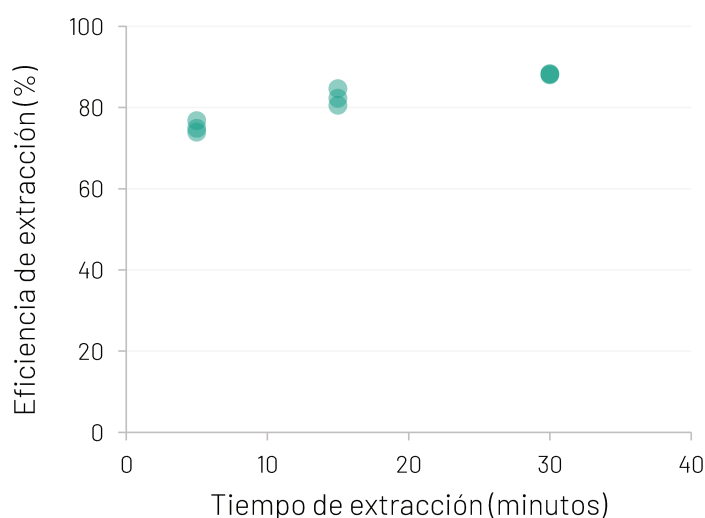


Figura 4.3. Eficiencias de extracción obtenidas a diferentes tiempos.

En la Figura 4.3 se presentan las eficiencias de extracción obtenidas, corregidas por recuperación. Se observan mayores eficiencias con los tiempos de extracción más largos. A su vez, la precisión también parece ser mejor con la extracción de 30 minutos, sin embargo, este resultado puede no ser concluyente debido a que el número de réplicas es bajo para comparar estadísticamente desviaciones estándar. Por estos motivos se decidió continuar con la extracción de 30 minutos.

Si bien la eficiencia de extracción parece aumentar con el tiempo, tiempos mayores no fueron evaluados ya que se consideraron poco prácticos. En estos ensayos se alcanzaron eficiencias de extracción del 90%, las cuales fueron consideradas adecuadas. Luego de la validación del método usando esta extracción, durante el análisis de muestras se obtuvo una eficiencia de extracción promedio del 92% para los arroces integrales y globalmente para todos los tipos de arroz del 94%.

4.2. Estudio de la separación cromatográfica

Como fue mencionado en la Sección 1.3.3, las especies As(III), As(V), DMA y MMA son ácidos débiles, por lo que pueden separarse fácilmente a pH neutro o ligeramente alcalino por mecanismos de intercambio aniónico. Los pKa de estas especies se presentan en la Tabla 4.3. La columna cromatográfica más utilizada para esta separación es la Hamilton PRP-X100, la cual está compuesta por un soporte de poliestireno divinilbenceno (PS-DVB) funcionalizado con grupos amonio cuaternarios.

Tabla 4.3. pKa de las especies de As más comunes en cereales

Especie	pKa 1	pKa 2	pKa 3	Referencia
Ácido arsenioso	9,2	12,1	12,7	[16]
Ácido arsénico	2,3	6,8	11,6	[16]
Ácido monometilarsónico	4,1	8,7	-	[16]
Ácido dimetilarsínico	6,2	-	-	[16]

En cuanto a fases móviles, una alternativa para llevar a cabo esta separación son los dicarboxilatos. Estos tienen las ventajas de la facilidad con la que pueden ser descompuestos en el plasma y su excelente poder de elución. Por esta razón, se decidió estudiar la performance cromatográfica de estos eluyentes para esta separación. En esta sección se describirá el estudio de estos eluyentes para la separación de las cuatro especies de As de interés en medio acuoso neutro. Al final de esta sección se describirán también los resultados obtenidos en medio ácido. Estos resultados han sido publicados recientemente [121]. En anexos se encuentra una copia de este artículo.

Los dicarboxilatos estudiados fueron oxalato, malonato, succinato, glutarato, adipato, tartronato, malato, tartrato y ftalato. Estos pueden clasificarse en tres grupos según su estructura: ácidos dicarboxílicos lineales (LDA), ácidos dicarboxílicos lineales hidroxilados (LDA-OH) y ácidos dicarboxílicos aromáticos. En la Figura 4.4 se muestra la estructura de cada uno de los ácidos y en la Tabla 4.4 se muestran sus pKa.

De estos dicarboxilatos, los primeros cinco (oxalato, malonato, succinato, glutarato, adipato) pertenecen a la serie de los ácidos dicarboxílicos lineales. Estos fueron seleccionados para estudiar el efecto del largo de la cadena alifática en la separación. Un incremento en la longitud de la cadena alifática también incrementa la hidrofobicidad de la molécula, lo cual puede afectar su interacción con la fase estacionaria. El tartronato, malato y tartrato son análogos hidroxí-sustituidos del malonato y el succinato, lo cual altera sustancialmente la hidrofobicidad de la molécula y su interacción con la fase estacionaria. Finalmente, el ftalato presenta un anillo aromático, lo cual lo hace completamente distinto de los demás eluyentes estudiados.

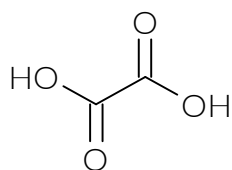
Tabla 4.4. pKa de los ácidos dicarboxílicos estudiados

Compuesto	pKa 1	pKa 2	Referencia
Ácido oxálico	1,25	3,81	[122]
Ácido malónico	2,85	5,70	[122]
Ácido succínico	4,21	5,64	[122]
Ácido glutárico	4,34	5,22	[123]
Ácido adípico	4,43	5,41	[124]
Ácido tartrónico	2,38	4,76	[125]
Ácido málico	3,40	5,11	[122]
Ácido tartárico	2,98	4,34	[122]
Ácido ftálico	2,94	5,43	[122]

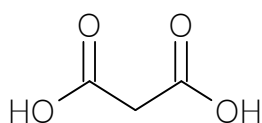
4.2.1. Condiciones experimentales

Las separaciones cromatográficas fueron llevadas a cabo bajo condiciones isocráticas con cada fase móvil a una concentración de 10 mmol/L, pH $8,33 \pm 0,03$, a temperatura ambiente y un caudal de 1 ml/min. Para la preparación de las fases móviles se pesó una cantidad adecuada del ácido correspondiente y se llevó a un poco menos del volumen final con agua ultrapura. Una vez que el ácido se disolvió completamente, se ajustó el pH con pHmetro, adicionando NH_4OH 10% (v/v). En el caso de los ácidos poco solubles como el adípico, la adición de NH_4OH comenzó antes de la disolución total. La forma desprotonada del ácido es generalmente mucho más soluble que el ácido en su forma neutra. Finalmente se lleva a volumen final con agua y se filtra a través de filtros de nylon de 0,45 μm .

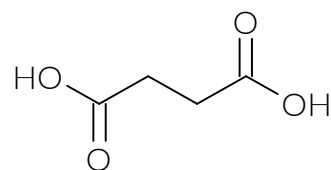
Ácidos Dicarboxílicos Lineales (LDA)



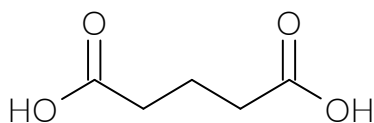
Ácido oxálico



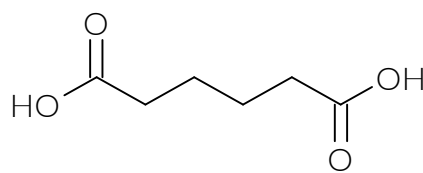
Ácido malónico



Ácido succínico

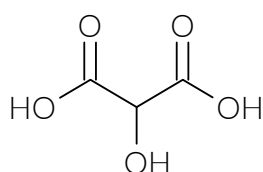


Ácido glutárico

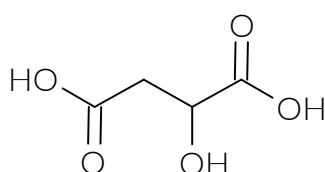


Ácido adípico

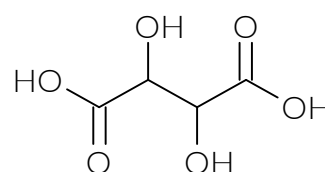
Ácidos Dicarboxílicos Lineales Hidroxi-sustituídos (LDA-OH)



Ácido tartrónico

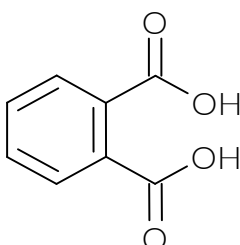


Ácido málico



Ácido tartárico

Ácidos Dicarboxílicos Aromáticos (LDA-OH)



Ácido ftálico

Figura 4.4. Ácidos dicarboxílicos estudiados como eluyentes.

Al pH de 8,33 todos los ácidos dicarboxílicos estudiados se encuentran totalmente desprotonados con una carga de -2, lo cual simplifica el análisis de los resultados obtenidos. A su vez, a este pH una pequeña fracción del As(III) se encuentra desprotonado (pKa 9,2), lo cual permite algo de interacción con la fase estacionaria. Por último, durante este trabajo se vio que este pH elevado era útil para neutralizar el medio ácido proveniente de los extractos de muestras. La fase estacionaria es un intercambiador aniónico fuerte, por lo que su carga es independiente del pH. Antes de las pruebas, la columna fue equilibrada con fase móvil por al menos 30 minutos a un caudal de 1 ml/min (lo cual corresponde a aproximadamente 15 volúmenes de columna).

Se utilizaron estándares multiespecie de 10 µg/L de As(III), DMA y As(V) y 4 µg/L de MMA preparados en medio de agua ultrapura y en HNO₃ 0,14 mol/L. El MMA fue adicionado al estándar multiespecie a una menor concentración para asegurar suficiente resolución del pico de DMA bajo las condiciones estudiadas. De este estándar multiespecie se inyectaron 100 µL por corrida cromatográfica. Se monitoreó la señal del isótopo ⁷⁵As con un tiempo de integración de 1 s con las condiciones de instrumentales mencionadas en el capítulo anterior.

4.2.2. Factores cromatográficos

Los factores cromatográficos estudiados fueron el factor de retención (k), la eficiencia, representada por el número de platos teóricos (N), y el factor de asimetría (A_s). El cálculo de estos factores está basado en las recomendaciones de la IUPAC [126]. En la Figura 4.5 se muestra un pico cromatográfico ideal y una representación gráfica de distintas magnitudes utilizadas en los cálculos. Los cálculos correspondientes serán descritos en las secciones siguientes.

4.2.2.1. Factor de retención

El factor de retención (k) es calculado como la relación entre el tiempo de retención ajustado (t'_R) y el tiempo muerto (t_M), donde t_M es el tiempo requerido para eluir un componente que no es retenido por la fase estacionaria y t'_R es la diferencia entre el tiempo de retención del analito (t_R) y t_M:

$$k = \frac{t'_R}{t_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

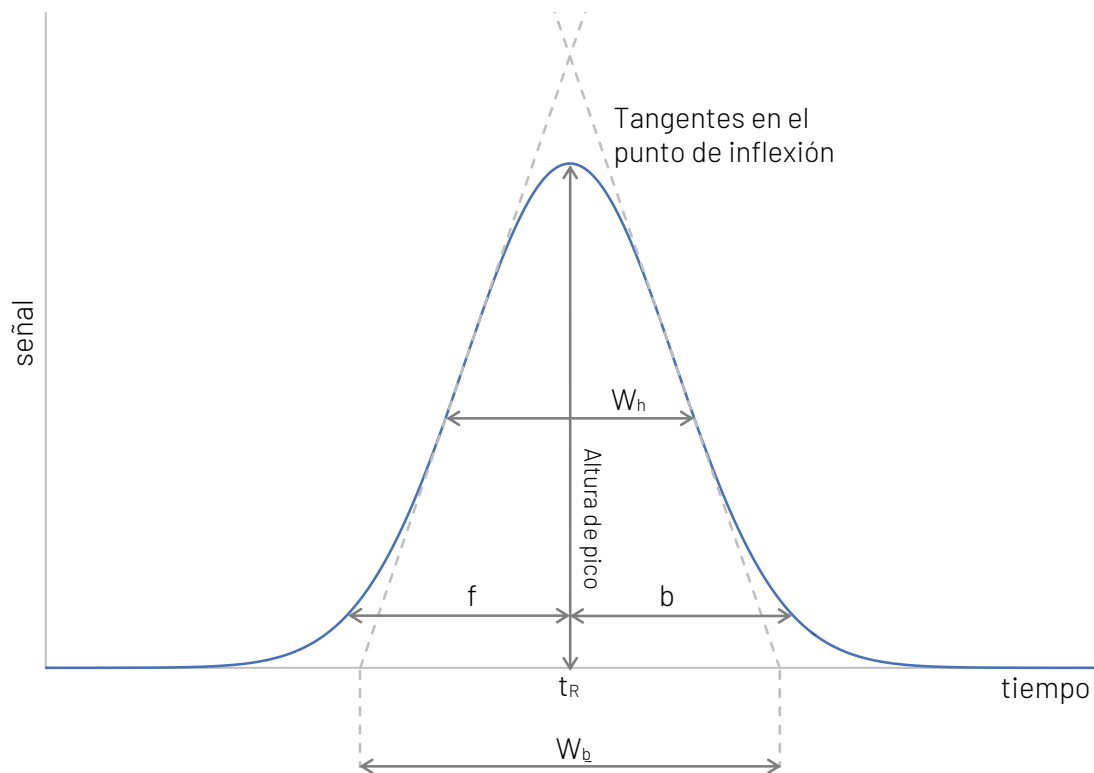


Figura 4.5. Pico cromatográfico gaussiano y las distintas magnitudes utilizadas en los cálculos.

El factor de retención k es una medida del tiempo que el componente de la muestra reside en la fase estacionaria respecto al tiempo que reside en la fase móvil [126]. El tiempo muerto fue determinado como el tiempo de retención de la arsenobetaina, que no es retenida por intercambio aniónico y que fue determinada anteriormente en el análisis de muestras de pescado [127].

4.2.2.2. Factor de asimetría

El factor de asimetría (A_s) es una forma de cuantificar la desviación de la forma real del pico de la forma ideal gaussiana [126]. Se han propuesto diferentes maneras de cuantificar la asimetría de un pico, sin embargo, IUPAC recomienda calcular A_s como el ancho del pico ($f+b$) dividido dos veces el ancho del frente del pico (f), medido a un 10% de la altura del pico:

$$A_s = \frac{f + b}{2f}$$

En un pico perfectamente simétrico, como el de la Figura 4.5, f y b son iguales, por lo que A_s es 1. Un pico donde $f > b$ resulta en $A_s < 1$, y se dice que el pico presenta

“fronting”. En cambio, un pico donde $f < b$ resulta en $A_s > 1$ y el pico presenta “tailing”. El tailing es mucho más común que el fronting.

Las desviaciones del pico gaussiano ideal generalmente se deben a interacciones secundarias del analito con la fase estacionaria, distintas a la interacción en la que se basa la separación. Por ejemplo, en intercambio iónico se pueden presentar de forma secundaria interacciones de tipo fase reversa o interacciones hidrofílicas. En HPLC-ICP-MS, además de las interacciones secundarias, el gran volumen muerto de la cámara de spray puede aumentar significativamente la asimetría y el ancho de pico [128]. En este trabajo se utilizó siempre el mismo nebulizador y cámara de spray, por lo que las diferencias observadas son solamente debidas a los eluyentes.

4.2.2.3. Número de platos teóricos

El número de platos teóricos (N) es una cantidad indicativa de la eficiencia de la columna para una dada separación [126]. La fórmula para el cálculo de N toma distintas expresiones dependiendo de la altura en la que se mide el ancho del pico. En este trabajo se utilizó la expresión que mide el ancho del pico a la mitad de la altura de este:

$$N = 5,545 \left(\frac{t_R}{W_h} \right)^2$$

El uso de N como una medida de la eficiencia cromatográfica implica que los picos son gaussianos y, por lo tanto, simétricos. Como será visto en las secciones siguientes, los picos obtenidos no cumplen estrictamente esta condición. Sin embargo, picos perfectamente simétricos y gaussianos son raramente obtenidos en cromatografía líquida. A pesar de no cumplir esta condición, los resultados obtenidos del cálculo de N reflejan correctamente las tendencias observadas comparando visualmente los cromatogramas obtenidos. Teniendo en cuenta esto, se decidió utilizar de todas maneras N como un indicador de la eficiencia de la separación.

4.2.3. Cálculos semiempíricos

Se realizaron algunos cálculos semiempíricos para comparar las polarizabilidades y los mapas de potencial electrostático de los dicarboxilatos y las especies de As es-

tudiadas. Todos los cálculos fueron llevados a cabo en Gabedit 2.5.1 [129] con MO-PAC2016 [130] usando el Hamiltoniano PM7 [131]. Las optimizaciones fueron llevadas a cabo usando el modelo COSMO de solvatación implícita para agua ($\epsilon = 78.39$). Los mapas de potenciales electrostáticos fueron creados con Jmol [132].

4.2.4. Resultados

Marcadas diferencias fueron obtenidas con las distintas fases móviles estudiadas. Primeramente, se presentarán los resultados obtenidos para la separación con el estándar preparado en agua ultrapura y al final se comentará sobre los resultados obtenidos con medio ácido.

La Figura 4.6 presenta los cromatogramas obtenidos con cada dicarboxilato. Para el ftalato, se inyectaron estándares de las especies individuales ya que de lo contrario no se obtenía resolución suficiente. Los resultados de los factores cromatográficos calculados son discutidos en las siguientes secciones.

4.2.4.1. Factor de retención

Como se puede observar en la Figura 4.7, las mayores diferencias en términos de k fueron presentadas por el As(V), que es el analito más retenido. Cabe señalar que con las condiciones utilizadas en este trabajo ($\text{pH} = 8,33$), y teniendo en cuenta los pK_a presentados en la Tabla 4.3, el As(III) se presenta mayoritariamente en su forma neutra. Según la ecuación de Henderson-Hasselbalch, aproximadamente sólo el 12 % del ácido arsenioso se disocia a un pH de 8,33; por lo que esta especie no es fuertemente retenida por intercambio aniónico. A pesar de esto, se produce cierta retención, haciendo que este analito eluya cerca del tiempo muerto, pero no en el mismo.

En cuanto a la serie de los LDA, k disminuye con la longitud de la cadena alifática, desde el malonato hasta el adipato. Varias hipótesis podrían explicar este fenómeno: (a) la longitud de la cadena de carbonos permite que el anión interactúe con más de un intercambiador aniónico al mismo tiempo, (b) la flexibilidad de las cadenas más largas permite la interacción de las dos cargas del anión con un único intercambiador, (c) esta misma flexibilidad podría facilitar el desplazamiento del dicarboxilato de un sitio activo a otro, y (d) la hidrofobicidad de la cadena alifática

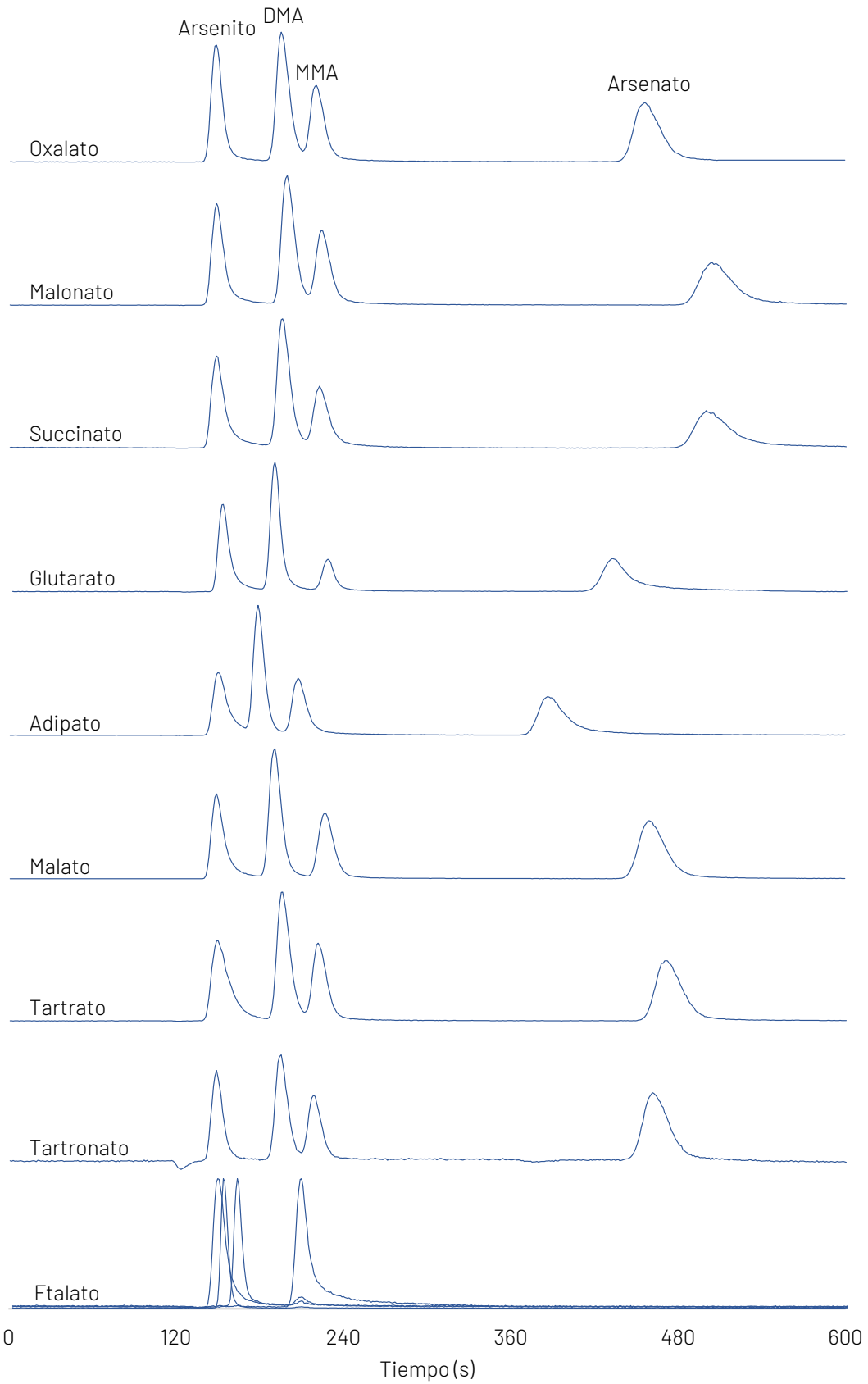


Figura 4.6. Cromatogramas obtenidos con los distintos dicarboxilatos. Las intensidades fueron normalizadas al pico más alto en cada cromatograma.

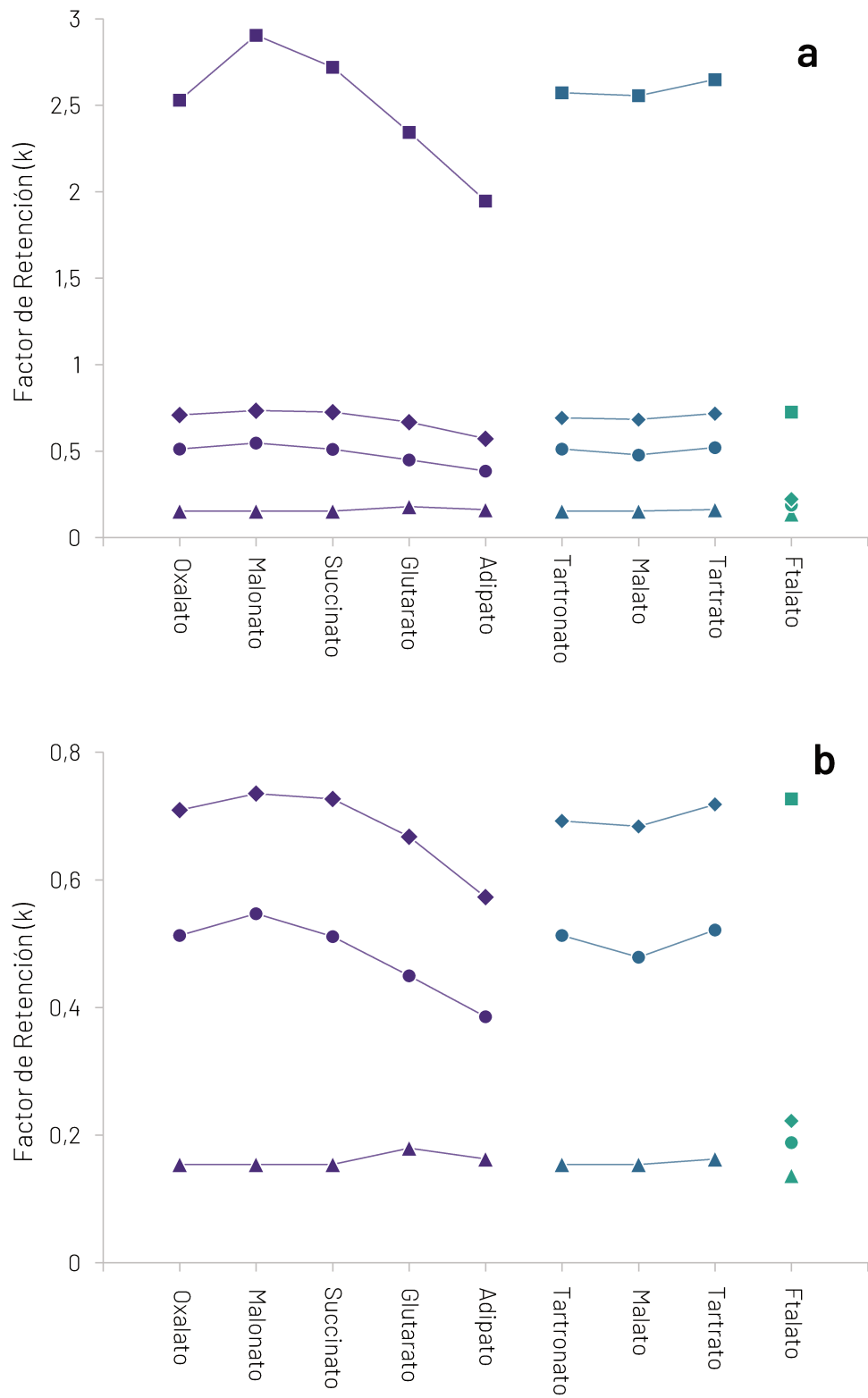


Figura 4.7. (a) Factores de retención para arsenito (triángulos), DMA (círculos), MMA (rombos) y arsenato (cuadrados) con las diferentes fases móviles. (b) Ampliación de la zona de arsenito, DMA y MMA

reduce la repulsión generada por el soporte polimérico al anión, permitiendo un mayor acercamiento y una interacción más fuerte. El comportamiento de fase reversa de esta fase estacionaria ha sido reportado en la literatura, indicando que aproximadamente solo uno de cada 7 grupos fenilo del soporte polimérico está funcionalizado [133]. Además, se ha demostrado que esta fase estacionaria es capaz de separar analitos mediante mecanismos puramente de fase reversa [133]. Por otro lado, el oxalato presenta un k mucho menor al esperado en función de la tendencia mostrada por el resto de los LDA. Esto se debe probablemente al pequeño tamaño de este anión, lo cual hace que tenga una mayor densidad de carga y, en consecuencia, un mayor poder de elución. Esta mayor densidad de carga se puede ver claramente en la Figura 4.8, donde se ilustran los mapas de potencial electrostático obtenidos de los cálculos semiempíricos.

Los LDA-OH presentaron un comportamiento particular. El tartronato y el malato presentaron valores de k más bajos que sus contrapartes no sustituidas (es decir, tartronato frente a malonato y malato frente a succinato), mientras que el tartrato presentó valores ligeramente más bajos que el succinato para arseniato y MMA, y ligeramente más altos para arsenito y DMA. Observando los mapas de potencial electrostático presentados en la Figura 4.8, se puede observar que el efecto inductivo aceptor del grupo hidroxilo deslocaliza parte de la carga negativa de los carboxilatos, resultando en una menor densidad de carga sobre el anión. Este efecto debería reducir el poder de elución del anión, sin embargo, esto no se observa en la mayoría de los casos. Es posible que el mayor poder eluyente de los ácidos sustituidos se deba a su mayor polarizabilidad en relación con sus homólogos no sustituidos. Como puede verse en la Tabla 4.5, los resultados de los cálculos de polarizabilidad indican un incremento en esta propiedad para los ácidos sustituidos. No obstante, la mayoría de los valores de k obtenidos en esta separación son relativamente pequeños, al igual que las diferencias observadas, lo que complica la interpretación de los resultados obtenidos. Para una mejor comprensión del efecto de los sustituyentes -OH, sería interesante en futuros estudios analizar el efecto de los sustituyentes -OH en la separación con análogos sustituidos de glutarato y adipato.

La separación realizada con ftalato presentó los valores de k más bajos. Para caracterizar cada uno de los analitos, se tuvieron que inyectar estándares de las especies

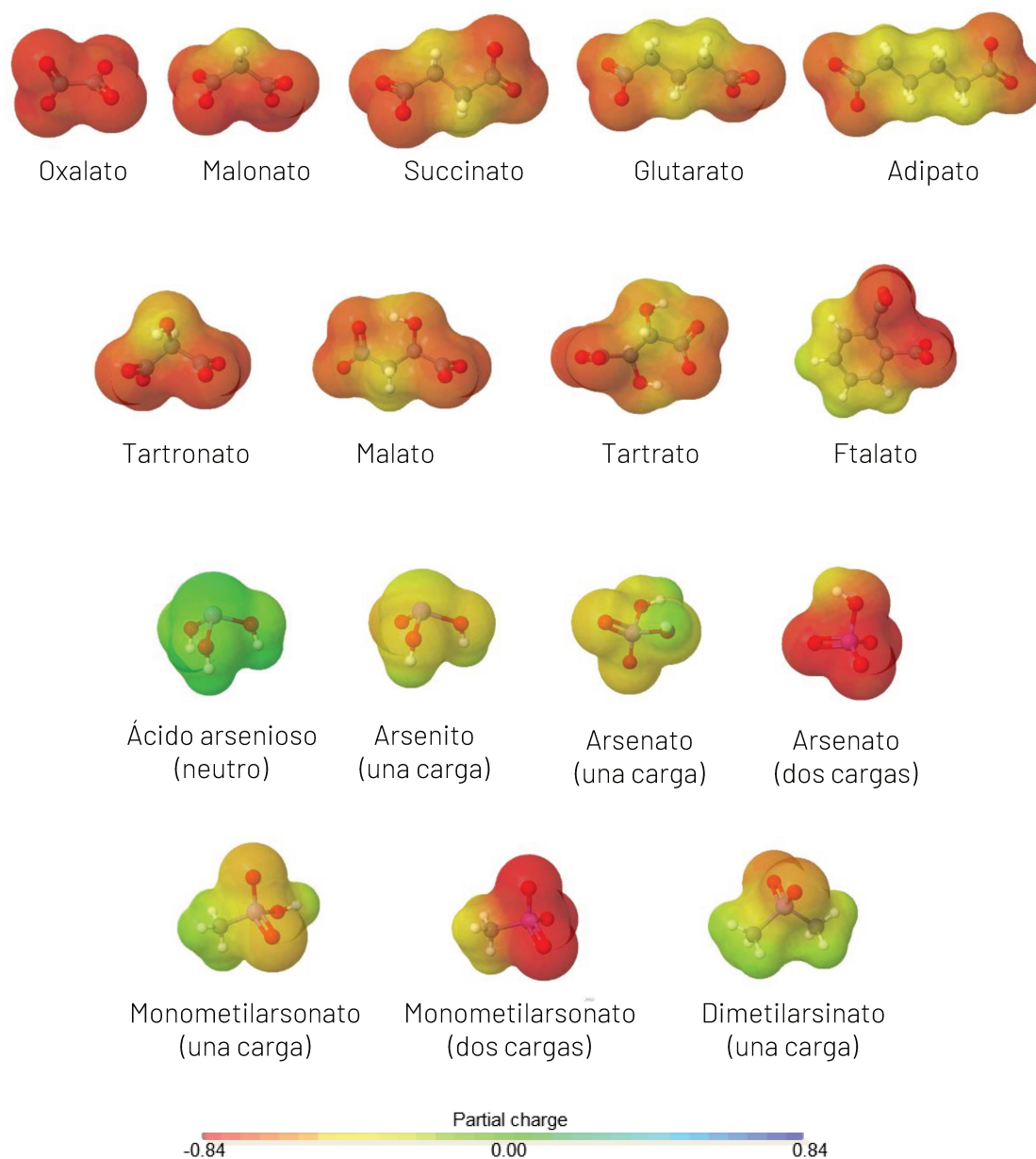


Figura 4.8. Mapas de potencial electrostático de los dicarboxilatos y las especies de As presentes a pH 8,33.

individuales en lugar del estándar multiespecie, ya que el As(III), DMA y MMA coeluyen como un único pico distorsionado. La inyección de las especies individualmente dio como resultado picos cromatográficos con el mismo orden de elución observado con el resto de los dicarboxilatos (arsenito, DMA, MMA, arsenato). La presencia del grupo aromático cambia notablemente la forma en que interactúa con los analitos y la fase estacionaria. El anillo aromático del ftalato puede interactuar con los anillos aromáticos del PS-DVB a través de interacciones π - π e interacciones hidrofóbicas. Esto aumenta marcadamente la afinidad de este compuesto por la fase

Tabla 4.5. Polarizabilidades de los dicarboxilatos y las especies de As a pH 8,33

Compuesto	Carga	Polarizabilidad (\AA^3)
Oxalato	-2	6,108
Malonato	-2	7,832
Succinato	-2	9,747
Glutarato	-2	11,661
Adipato	-2	13,565
Tartronato	-2	8,610
Malato	-2	10,421
Tartrato	-2	11,262
Ftalato	-2	17,060
Ácido arsenioso	0	5,073
Arsenito	-1	5,337
Dimetilarsinato	-1	8,667
Monometilarsonato	-1	7,368
Monometilarsonato	-2	7,129
Arsenato	-1	6,245
Arsenato	-2	5,934

estacionaria. Por otra parte, al estar los dos carboxilatos en posición orto, las cargas negativas están muy próximas entre sí, generando una alta densidad de carga, como se puede observar en la Figura 4.8. Además, como se indica en la Tabla 4.5, el ftalato también presenta la mayor polarizabilidad de todos los aniones estudiados. La combinación de todos estos factores da como resultado factores de retención excepcionalmente bajos.

4.2.4.2. Factor de Asimetría

Los resultados obtenidos para los factores de asimetría se presentan en la Figura 4.9. Cabe aclarar que no se estudió la asimetría de los picos de MMA. El uso de una menor concentración de MMA en el patrón multiespecie provocó que en varios cromatogramas el pico de MMA no se resolviera lo suficiente del pico del DMA para calcular su ancho al 10% de la altura del pico. La concentración más baja de esta especie en el estándar fue necesaria para garantizar una resolución suficiente del pico de DMA en las condiciones utilizadas, el cual fue considerado de mayor interés.

A pesar de esto, se espera que el comportamiento de MMA en términos de asimetría se encuentre entre el de especies inorgánicas no metiladas y el DMA.

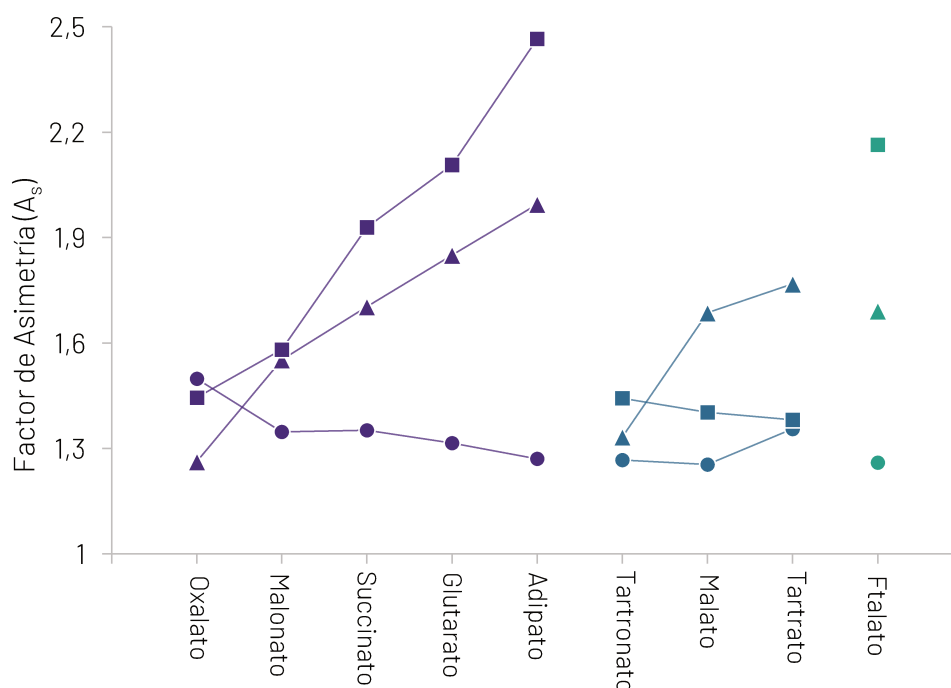


Figura 4.9. Factores de asimetría para arsenito (triángulos), DMA (círculos) y arsenato (cuadrados) con las diferentes fases móviles.

Con respecto a la serie de los LDA, se puede observar que, para las especies inorgánicas arsenito y arsenato, la asimetría del pico aumenta con la longitud de la cadena carbonada. Esto se debe al aumento de las interacciones hidrofóbicas secundarias que tienen los LDA de cadena larga con el soporte polimérico. En contraste, DMA, una especie menos hidrofílica que las especies inorgánicas, mostró una ligera disminución en la asimetría con la longitud de la cadena de carbono de los LDA. Esto sugiere que DMA puede presentar interacciones secundarias de fase reversa con la fase estacionaria. Los LDA de cadena larga presentan mayores interacciones de fase reversa con el soporte polimérico, por lo que compiten de manera más eficiente con el DMA por estos sitios, dando como resultado una menor asimetría.

En el caso de los LDA-OH, es evidente para el arsenato que la presencia de los grupos -OH reduce la hidrofobicidad de la cadena carbonada de la molécula, limitando las interacciones hidrofóbicas y resultando en una asimetría similar a la del oxalato. Por su parte, el arsenito presentó un comportamiento peculiar. El tartronato resultó

en menos asimetría que el malonato, similar a lo que se observó con el arsenato. Sin embargo, el malato presentó la misma asimetría que el succinato y el tartrato una asimetría aún mayor que el succinato. Se ha descrito la formación de un complejo arsenito-tartrato, similar al complejo Sb(III)-tartrato [134]. La formación de este complejo podría explicar la mayor asimetría obtenida con el tartrato, ya que modificaría la forma en que interactúa con la fase estacionaria. No se ha informado de la formación de un complejo similar con el malato, sin embargo, es posible que las diferencias con el arsenato en términos de asimetría también se deban al hecho de que el arsenito a pH 8,33 se encuentra principalmente en su forma neutra, el ácido arsenioso, que tiene una interacción diferente con la fase estacionaria. DMA mostró factores de asimetría relativamente bajos con los LDA-OH, que al ser más hidrofílicos que sus análogos no sustituidos podrían haber dado como resultado picos más asimétricos. Es posible que la mayor polarizabilidad de los aniones sustituidos haya compensado su hidrofilia en la interacción con el DMA. Evidentemente, el comportamiento de los LDA-OH no es tan sencillo como el de los LDA.

El ftalato presentó una marcada asimetría para las especies inorgánicas, mientras que la de DMA fue relativamente baja. Las especies inorgánicas presentan mayormente interacciones de intercambio aniónico e hidrofílicas, a diferencia del DMA y el anión ftalato que también presentan interacciones secundarias con el PS-DVB. Esto da como resultado factores de asimetría similares a los de los LDA más largas, a pesar de que el ftalato tiene una alta densidad de carga.

4.2.4.3. Número de platos teóricos

En la Figura 4.10 se puede observar que la elección del dicarboxilato a utilizar tiene un marcado impacto en la eficiencia cromatográfica. Para los LDA, se observa una disminución en la eficiencia cromatográfica con la longitud de la cadena alifática para arsenito, MMA y especialmente para arsenato. Se puede observar como la eficiencia del arsenato se reduce casi 4 veces al pasar de oxalato a adipato. El malonato se desvía ligeramente de la tendencia establecida por los otros LDA para el arsenato, sin embargo, esta desviación no se observa para las otras especies. La razón de este comportamiento no es clara. Por el contrario, el DMA presentó un ligero aumento de eficiencia con la longitud de la cadena carbonada. Esto está en línea

con lo que se discutió anteriormente sobre la interacción hidrofóbica del DMA y los LDA de cadena larga con el soporte polimérico.

Nuevamente, la interpretación de los resultados obtenidos con los dicarboxilatos sustituidos con hidroxilo no es sencilla. Para el arsenito y el arsenato, los LDA-OH presentaron mayor eficiencia, excepto en el caso del arsenito con el tartrato, que como se mencionó en el apartado anterior, forma un complejo con esta especie. El MMA también presentó mayores eficiencias que con los dicarboxilatos no sustituidos, excepto en este caso para el malato, que presentó una eficiencia similar a la del succinato. Finalmente, el DMA presentó mejores eficiencias con tartronato y malato, pero una ligera disminución con tartrato. Aunque estas diferencias en eficiencia entre dicarboxilatos sustituidos y no sustituidos son observables, no son tan marcadas como las del arsenato.

Finalmente, el ftalato mostró una eficiencia relativamente alta para la mayoría de las especies, con la excepción del arsenito. La alta polarizabilidad y densidad de carga son posiblemente la causa de la alta eficiencia para el arsenato, mientras que el carácter no polar del anillo aromático da como resultado una alta eficiencia para

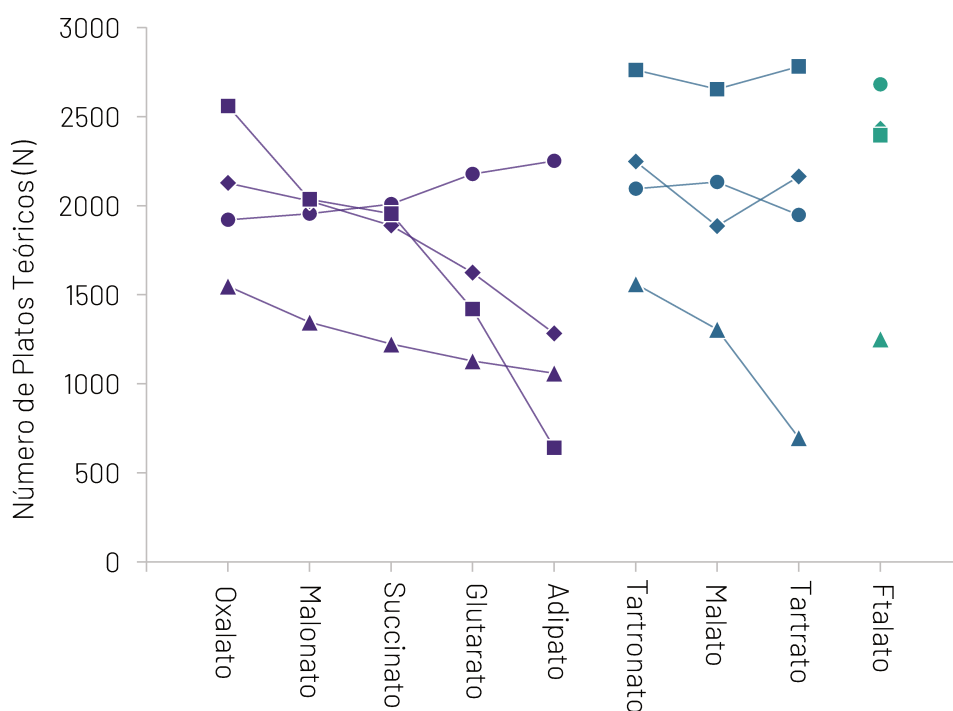


Figura 4.10. Número de platos teóricos para arsenito (triángulos), DMA (círculos), MMA (rombos) y arsenato (cuadrados) con las diferentes fases móviles.

el DMA. El MMA, al ser una especie que puede considerarse intermedia entre estas otras dos, presentó un resultado similar al del arsenato. Por otro lado, el arsenito presentó eficiencias similares a los LDA de cadena media, y en general esta especie mostró eficiencias bajas para todos los aniones estudiados. Esto se debe principalmente al hecho de que, al pH estudiado, un porcentaje muy bajo del arsenito disuelto está realmente ionizado, estando la mayor parte presente como ácido arsenioso.

4.2.4.4. Efecto del agregado de metanol a la fase móvil

Como fue mencionado anteriormente, la presencia de C en el plasma puede aumentar la respuesta de varios elementos, entre ellos uno de los más afectados es el As. Esto puede constituir una interferencia o puede ser aprovechado como una ventaja para aumentar la sensibilidad.

Se evaluó el efecto del agregado de un 1% (v/v) de metanol a la fase móvil. Para ello se corrió un estándar multiespecie de 20 µg/L con y sin agregado de metanol en la fase móvil. Este ensayo se hizo en paralelo con ensayos de elución gradiente con succinato y oxalato, los cromatogramas obtenidos corresponden a la separación con un gradiente de succinato. Estos resultados se muestran en la Figura 4.11, y como puede verse, se obtiene un marcado ascenso de la señal sin afectar la separación cromatográfica.

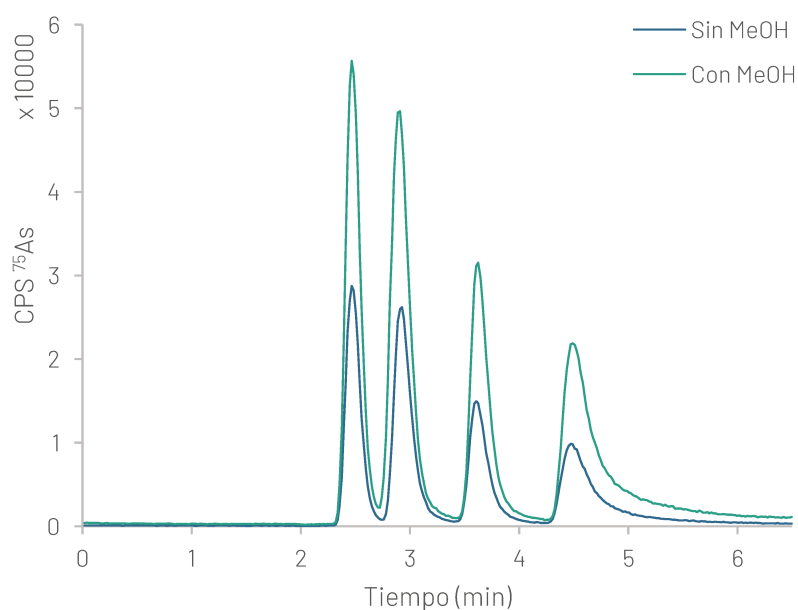


Figura 4.11. Influencia de la adición de metanol a la fase móvil sobre la sensibilidad del As

4.2.4.5. Ensayos con inyecciones en medio ácido

La discusión presentada en las secciones anteriores corresponde a los resultados obtenidos con el estándar preparado en agua ultrapura. Dado que las extracciones de las muestras se realizan en medio ácido, se evaluó también la performance de la separación al inyectar un estándar en medio HNO_3 0,14 mol/L, como es el de los extractos.

Un problema que se encontró con estas experiencias fue que los cromatogramas de inyecciones sucesivas no siempre son reproducibles, como puede verse en la Figura 4.12. También se observó que con algunos eluyentes el pico del As(V) se dividía en dos o se distorsionaba. Estos inconvenientes hacen imposible obtener valores confiables de los factores cromatográficos estudiados. Se calcularon los factores para algunos casos y se observaron tendencias similares a las observadas con el estándar preparado en agua, pero no resultó posible llevar a cabo un análisis exhaustivo de todos los dicarboxilatos como fue hecho con el estándar neutro.

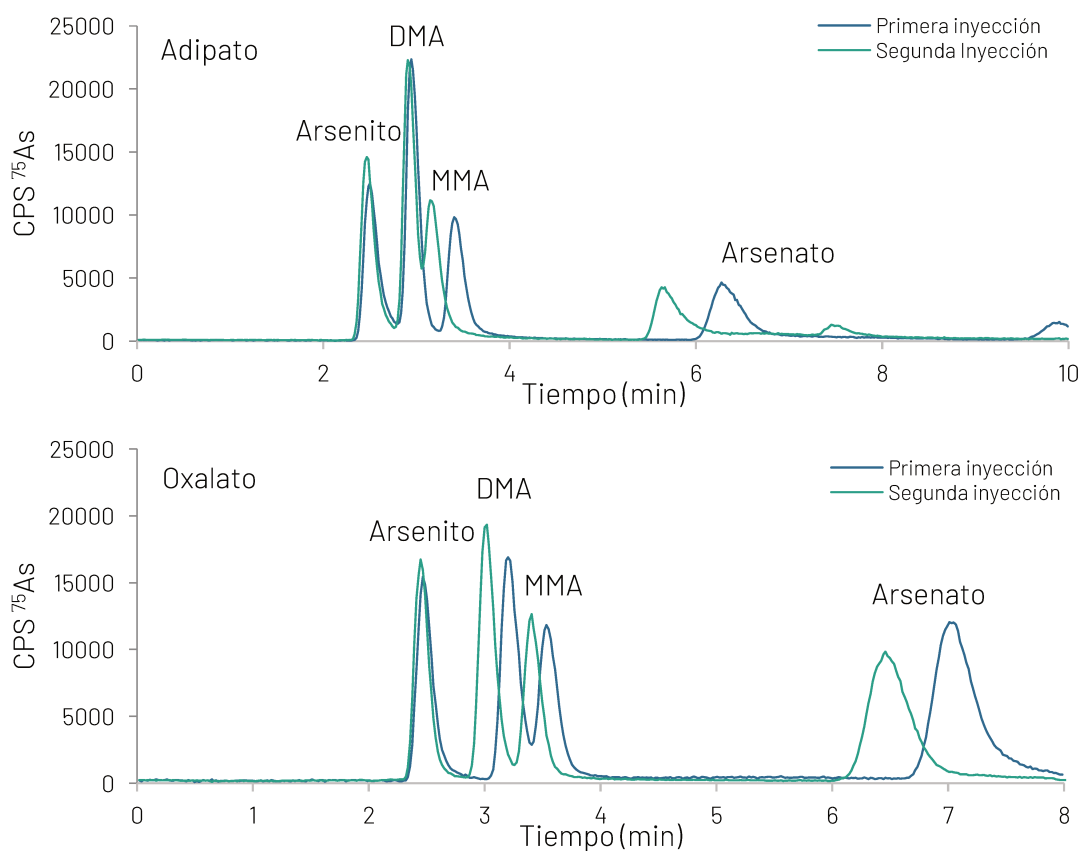


Figura 4.12. Cromatogramas obtenidos con inyecciones sucesivas del estándar preparado en HNO_3 0,14 mol/L

Debido a que la separación en medio ácido era de especial interés, se evaluó si el uso de un gradiente de elución con mayores concentraciones permitiría solucionar estos inconvenientes. La elución con un gradiente también tendría la ventaja de que permitiría reducir el tiempo de corrida y mejorar la forma del pico del As(V), que es fuertemente retenido. Se seleccionó el oxalato para optimizar un gradiente ya que se consideró que fue el que presentó la mejor performance, además de que se descompone fácilmente en el plasma.

La optimización fue llevada a cabo por prueba y error, configurando un programa de gradiente, observando el cromatograma obtenido y ajustando los tiempos y concentraciones de eluyente para obtener una correcta resolución de todos los picos. La concentración de oxalato fue variada entre 5 y 40 mmol/L. Cuando se alcanzó una separación adecuada, se inyectaron sucesivamente estándares de distintas concentraciones para obtener una curva de calibrado y verificar la estabilidad de los tiempos de retención.

Tabla 4.6. Gradiente de elución optimizado con oxalato a pH 8,33

Tiempo (min)	Concentración de oxalato (mmol/L)
0,00	5
1,50	5
2,00	40
4,00	40
4,01	5
6,50	5

En la Tabla 4.6 se presenta el gradiente optimizado y en la Figura 4.13 se presentan los cromatogramas obtenidos de la inyección consecutiva de estándares acidificados. Se incluye también en la Figura 4.13 el gradiente de elución desplazado en el eje x teniendo en cuenta el tiempo muerto. Como puede verse, se obtiene una excelente repetitividad en los tiempos de retención con el gradiente optimizado.

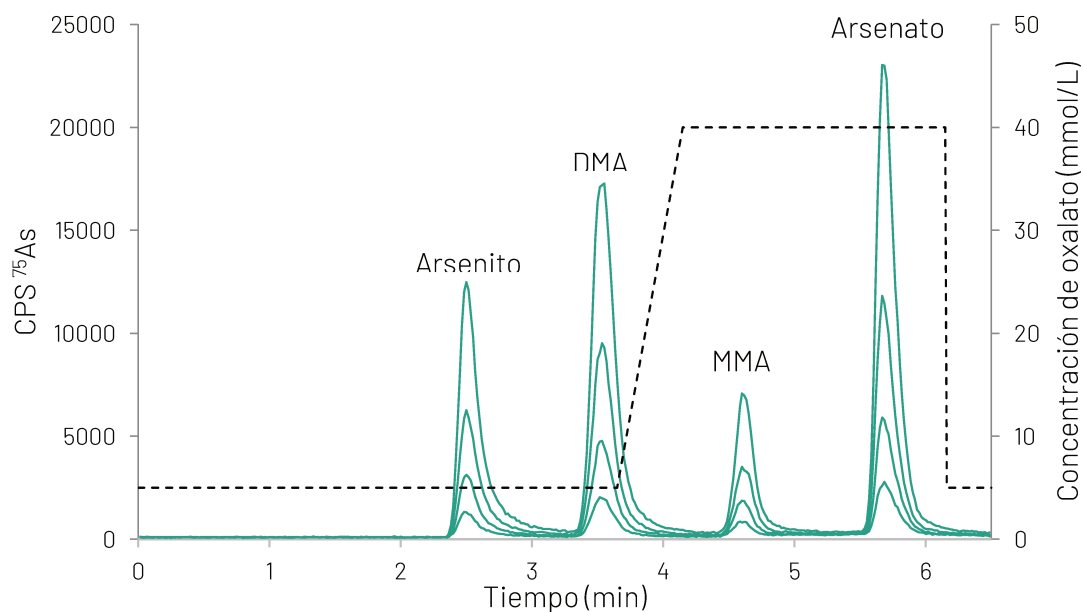


Figura 4.13. Cromatogramas obtenidos sucesivamente con estándares multiespecie preparado en medio de HNO_3 0,14 mol/L y el gradiente optimizado.

En la Figura 4.14 se comparan los cromatogramas obtenidos con elución gradiente y la segunda inyección de la elución isocrática para el estándar acidificado. Puede verse que el uso de gradiente resulta también en una mejor resolución entre los primeros tres picos y una elución más rápida del As(V). A su vez, se obtiene un pico más esbelto para el As(V).

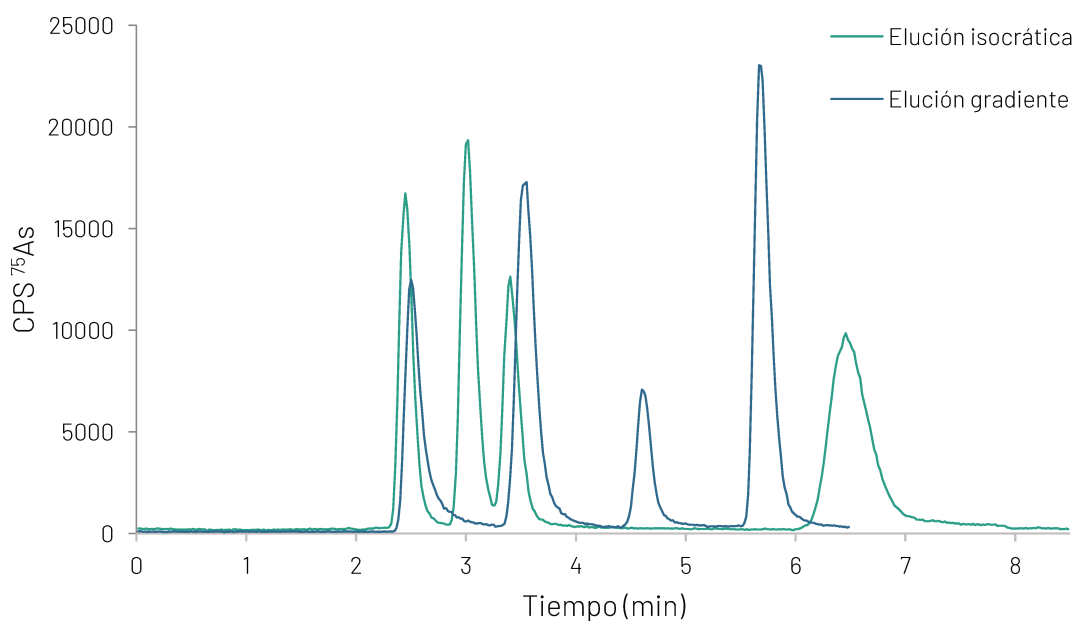


Figura 4.14. Comparación de la separación obtenida con elución gradiente e isocrática para el estándar acidificado.

En la Tabla 4.7 se comparan los factores cromatográficos calculados para los cromatogramas de la Figura 4.14. Puede verse que los factores de asimetría aumentaron con el gradiente y el número de platos teóricos para el arsenito se redujo ligeramente. Sin embargo, estos últimos aumentaron marcadamente para el As(V) y el MMA. Si bien la performance para el As(III) fue ligeramente perjudicada, las ventajas antes mencionadas de la elución gradiente justifican ampliamente su uso.

Tabla 4.7. Factores cromatográficos obtenidos con elución gradiente e isocrática para el estándar acidificado

Elución	Especie	k	A _s	N
Isocrática	As(III)	0,137	1,28	1703
	DMA	0,397	1,38	2161
	MMA	0,581	1,20	2568
	As(V)	2,000	1,35	1502
Gradiente	As(III)	0,162	1,94	1404
	DMA	0,642	1,33	2138
	MMA	1,137	1,43	4691
	As(V)	1,637	1,54	7317

4.2.4.6. Influencia del Cl y el C presente en el extracto

Con la separación por gradiente optimizada en la sección anterior, se evaluó si el carbono y el cloro presente en los extractos podrían llegar a presentar interferencias. Como ya fue mencionado, el Cl puede formar la especie $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$ que se solapa isobáricamente con el ^{75}As , mientras que el C puede favorecer la ionización del As en el plasma. Durante la corrida cromatográfica las concentraciones de C y Cl que ingresan al plasma no son constantes. Los compuestos orgánicos e inorgánicos no iónicos o catiónicos eluyen en el tiempo muerto, mientras que los aniónicos presentan una cierta retención. Esto afecta tanto al C como al Cl. Por este motivo, en primer lugar se observó a qué tiempos de retención se obtienen las mayores señales para ^{35}Cl y ^{13}C con extractos de muestras. Para ello se inyectó un extracto de una muestra de arroz y uno de una muestra de harina leudante y se registró la señal a m/z 13 y 75, correspondientes a ^{13}C y ^{75}As , respectivamente. Los cromatogramas resultantes se muestran en la Figura 4.15. Como puede verse, hay un pico de C que

eluye en el tiempo muerto de la columna, antes del pico del As(III). Este pico probablemente se deba a moléculas neutras generadas durante la extracción, como monosacáridos y oligosacáridos producto de la hidrólisis del almidón, entre otras. Esto no supone una interferencia ya que no coeluyen con ninguna especie de As. Al final del cromatograma también se observa un pequeño aumento en la línea de base del ^{13}C debido al gradiente de elución utilizado. Esto tampoco interfiere con el análisis, ya que se repite en todas las muestras y estándares.

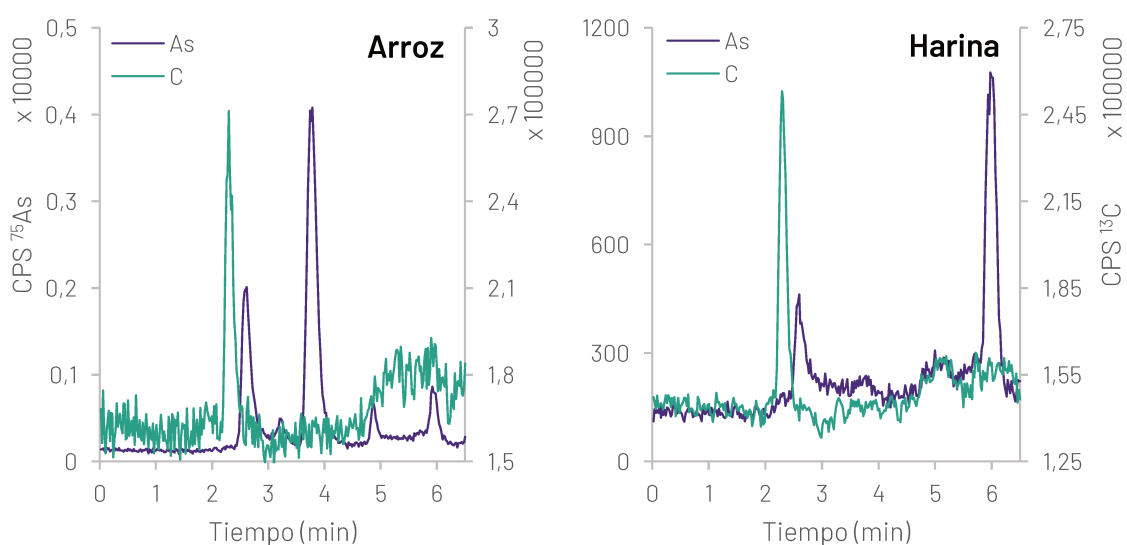


Figura 4.15. Cromatogramas obtenidos para muestras de arroz y harina registrando las señales a m/z 13 y 75

En cuanto a la interferencia del Cl, se registró la señal a m/z 35 (^{35}Cl) de la muestra de harina leudante (que se espera que tengan las mayores concentraciones de Cl) junto con las de ^{75}As y ^{13}C . Los cromatogramas obtenidos se presentan en la Figura 4.16. Allí puede verse que existe un pico de ^{35}Cl (probablemente cloruro) que coeluye parcialmente con el As(V). Esto podría suponer una interferencia si este Cl es capaz de formar $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$. Para verificar esto, con un estándar multiespecie de As conteniendo 1 mg/L de Cl^- preparado a partir de HCl se buscó una condición en la cual el As(V) y el Cl^- no coeluyan. Se encontró que con un estándar no acidificado corrido con oxalato 10 mmol/L, pH 8,33, de manera isocrática, los picos de As(V) y Cl^- no coelúan. El cromatograma obtenido bajo estas condiciones también se presenta en la Figura 4.16. Como puede verse en la ampliación de la línea de base, el Cl^- no

generó una señal en el cromatograma del As, es decir que 1 mg/L de Cl no presentaría interferencias sobre el As. La muestra de harina dio una señal de Cl de aproximadamente la mitad que el estándar de 1 mg/L, y a su vez cuando se obtuvieron cromatogramas de ^{35}Cl para otras matrices se obtuvieron señales aún más bajas, por lo que no se espera que la presencia de Cl en los extractos suponga una interferencia.

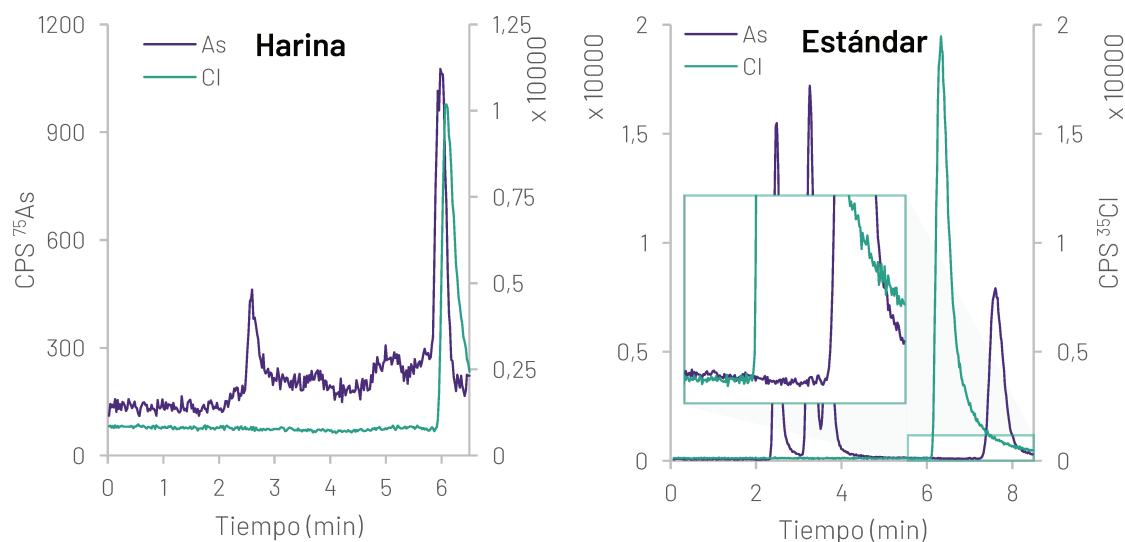


Figura 4.16. Cromatogramas obtenidos para una muestra de harina leudante y un estándar de As y Cl registrando las señales a m/z 35 y 75

4.2.4.7. Conclusiones

Observando las tendencias presentadas por los LDA, es claro que los aniones de cadena más corta son más ventajosos. Solo DMA mostró una pequeña mejora en el rendimiento con LDA más largos. Los LDA más cortos también tienen la ventaja de que se descomponen fácilmente en el plasma, evitando la formación de depósitos carbonosos, incluso después de largos tiempos de medida. Para los dicarboxilatos más cortos de esta serie, es decir, oxalato y malonato, se puede observar que el oxalato presenta mejores eficiencias y menores asimetrías para las especies inorgánicas. Por el contrario, el malonato da como resultado menos asimetría para el DMA, pero sacrifica el rendimiento para las especies inorgánicas.

De los eluyentes estudiados, los dicarboxilatos sustituidos con hidroxí dieron buenos resultados para la mayoría de las especies. Sin embargo, el malato y el tartrato mostraron altos factores de asimetría para el arsenito, y especialmente el tartrato resultó en una eficiencia muy baja para esta especie. Aunque el tartronato mostró

excelentes resultados en todos los factores cromatográficos estudiados, es un compuesto poco común y mucho más costoso que el resto de los dicarboxilatos. Además, mostró una línea base marcadamente alta de aproximadamente 5000 CPS, mientras que se obtuvieron líneas base de menos de 100 CPS con los otros eluyentes. Esto dio como resultado un mayor ruido, lo que es perjudicial para el límite de detección. El reactivo utilizado fue el de mayor pureza disponible comercialmente, sin embargo, probablemente no sea lo suficientemente puro para aplicaciones analíticas.

En cuanto al ftalato, su alto poder de elución permitiría utilizarlo en cantidades muy pequeñas, lo que sería beneficioso para reducir el riesgo de depósitos de C en los conos, sobre todo teniendo en cuenta que este anión tiene una mayor proporción de C que los demás. Sin embargo, el uso de una baja concentración limita la capacidad buffer de la fase móvil, la cual es especialmente importante si se inyectan muestras a un pH muy distinto al de la fase móvil. Por otro lado, aunque presentó una alta eficiencia para la mayoría de las especies, los factores de asimetría para las especies inorgánicas fueron bastante altos, especialmente para el arsenato.

Considerando la discusión de los párrafos anteriores, la elección de una fase móvil como óptima en este caso dependerá de qué especies se consideren prioritarias. Sin embargo, puede considerarse al oxalato como una buena solución de compromiso, ya que presentó un muy buen desempeño para todas las especies, se descompone fácilmente en el plasma y se puede obtener comercialmente con una alta pureza. Además, se obtuvo un buen poder eluyente, similar al del fosfato, pero con la ventaja de la facilidad de descomposición en el plasma, como el carbonato. También, con el uso de un gradiente de elución, se pudo lograr una excelente estabilidad en los tiempos de retención, incluso inyectando soluciones en medio ácido.

La presencia de C en los extractos no resultó en una interferencia ya que este eluyó mayormente como un pico en el tiempo muerto, separado de los analitos. A su vez, la adición de 1% (v/v) de metanol a la fase móvil para aumentar la sensibilidad del As puede en cierta forma amortiguar la diferencia en el contenido de C entre muestras

y estándares. Finalmente, se demostró que los niveles de CI presentes en los extractos no resultarían en interferencias en la determinación, a pesar de coeluir parcialmente con el arsenato.

4.3. Corrección con ISTD

Tal como ocurre con la determinación del contenido total, en el análisis de especiación puede aplicarse la corrección por estándar interno y hay distintas formas de hacerlo.

Una forma es incluir en las muestras y los estándares una misma concentración de una especie que no esté presente en las muestras y corregir la señal según la variación en el área del pico de esta especie entre distintas inyecciones. Esto pocas veces es aplicable debido a la necesidad de disponer de un estándar de una especie que no esté en la muestra, siendo que la disponibilidad de estándares para especiación es bastante limitada.

Otra forma es inyectar, a través de un sistema de inyección en flujo poscolumna, una especie del elemento en un tiempo de retención donde no eluyan otras especies, por ejemplo, en el tiempo muerto. Esto tiene la ventaja de que pueden usarse especies presentes en la muestra, ya que se puede seleccionar el tiempo al que aparece el ISTD programando la inyección. Sin embargo, es necesario disponer de equipamiento adicional acoplado al equipo para llevar a cabo esta inyección poscolumna.

Finalmente, otra opción denominada "corrección punto a punto", que fue la usada en este trabajo, consiste en ingresar al plasma de manera constante una concentración de un elemento diferente al que se está especiando y usarlo como ISTD (por ejemplo, Ge para el As). Para aplicar este método es necesario registrar la señal a dos m/z diferentes. Esto puede suponer un problema, ya que la cromatografía es una técnica resuelta en el tiempo y los ICP-MS basados en cuadrupolo no son detectores simultáneos, sino secuenciales. Es decir que en el tiempo que se está registrando ^{72}Ge no se está registrando ^{75}As y viceversa, y el cuadrupolo debe estar cambiando de masa constantemente. Esto, sin embargo, ya no supone un gran problema en equipos modernos que permiten operar rápidamente con tiempos de residencia (*dwell time*) muy cortos.

De manera similar a lo descrito en la Sección 3.1.1, a través de una unión T se combinó el eluido de la columna con una solución que contiene Ge, el cual fue usado para corregir la señal del As. Se registró la señal a m/z 75 (^{75}As) con un tiempo de integración de 1 s y a m/z 72 (^{72}Ge) con un tiempo de integración de 0,1 s. Finalmente, se utiliza como señal analítica la relación entre las CPS del As y las del Ge. Esta relación es usada para construir los cromatogramas, los cuales ya estarán corregidos por ISTD. Este método, al corregir punto por punto, no solo contempla la deriva instrumental entre un cromatograma y otro (como sería el caso de los métodos basados en un pico de ISTD), sino que también podría compensar diferencias de sensibilidad que se den solo para determinados rangos de tiempo dentro del cromatograma, como podría ser la coelución con especies químicas que supriman o aumenten la señal del analito. Esto obviamente depende de que el ISTD se comporte de igual manera que el analito, o al menos lo más similarmente posible.

4.4. Método para el análisis de especiación de As

En esta sección se describe el método finalmente adoptado para el análisis de especiación de As en las muestras estudiadas.

4.4.1. Procedimiento

4.4.1.1. Tratamiento de muestra

Si la muestra consiste en granos enteros, como en el caso del trigo y el arroz, se debe realizar previamente una homogenización de esta por molienda. Se pesa 1 g de la muestra homogeneizada en recipiente de microondas y se adicionan 10 ml de HNO_3 0,14 mol/L. Se cierra el recipiente y se coloca en horno microondas donde se le aplica un calentamiento con una rampa de temperatura de 10 minutos hasta 125 °C, manteniendo esta temperatura durante 30 minutos adicionales.

Una vez que el recipiente de microondas se encuentra a una temperatura menor a 60 °C, se lo abre, se trasvasa el contenido a tubo graduado de 15 ml y se centrifuga a al menos 2000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante es filtrado a través filtros jeringa de PVDF de 0,45 μm o 0,22 μm , descartando la primera alícuota filtrada. El filtrado se colecta en viales de HPLC de propileno y ya puede ser inyectado en el

equipo. Con viales de vidrio se observaron picos intensos de As(V), a pesar de distintos intentos de descontaminarlos. Si no se analiza inmediatamente, el sobrenadante puede ser transferido a otro tubo y almacenarse por no más de 24 horas a 4 °C. Ocasionalmente, luego de este almacenamiento se observa un precipitado blanco, posiblemente producto de la retrogradación del almidón. En este caso se repite la centrifugación y se analiza el sobrenadante. Con cada set de muestras tratadas se debe procesar al menos un blanco de reactivos para corrección por blanco y una muestra fortificada para verificar la recuperación.

4.4.1.2. Separación cromatográfica

Para la separación se utiliza una columna Hamilton PRP-X100 (250x2.1 mm, 10 µm) y una precolumna Hamilton PRP-X100 (20x2.1 mm, 10 µm). Se preparan dos soluciones de fase móvil:

- A. Metanol 1% (v/v)
- B. Oxalato de amonio 40 mmol/L, pH 8,33, en metanol 1% (v/v)

Puede partirse de oxalato de amonio o de ácido oxálico, se disuelve la masa correspondiente en un volumen de agua ultrapura próximo al volumen final y se ajusta el pH con NH₄OH. El metanol se adiciona antes de llevar a volumen. Ambas fases móviles son filtradas a través de filtros de nylon de 0,45 µm.

Para la separación se utiliza un caudal de 1 ml/min y el gradiente presentado en la Tabla 4.8. Se inyecta un volumen de 25 µl. Entre inyecciones se realiza un lavado automático de la aguja con isopropanol 10% (v/v). La salida de la columna es conectada a una pieza T donde se combina con la solución de ISTD y luego ingresa directamente al nebulizador del ICP-MS.

4.4.1.3. Medida instrumental

Se enciende el instrumento y se sigue la secuencia de encendido recomendada por el fabricante, incluyendo un precalentamiento, sintonización y optimización automática de los parámetros de las lentes, tomando como referencia los parámetros establecidos en la Tabla 3.1. En este caso, previamente se debe ajustar la velocidad de la bomba peristáltica de manera que el caudal de la solución de sintonización se asemeje al caudal proveniente del HPLC.

Tabla 4.8. Programa de gradiente de elución

Tiempo (min)	Concentración de oxalato (mmol/L)	Fase móvil A (%)	Fase móvil B (%)
0,00	5	87,5	12,5
1,50	5	87,5	12,5
2,00	40	0	100
4,00	40	0	100
4,01	5	87,5	12,5
6,50	5	87,5	12,5

Una vez sintonizado el instrumento, se seleccionan para monitoreo las m/z 72 (ISTD) y 75 (analito), con tiempos de integración de 0,1 s y 1 s, respectivamente. Como señal analítica se utiliza la relación entre las CPS obtenidas para las m/z 75 y 72. Los picos cromatográficos son detectados automáticamente por el software, pero debe confirmarse la correcta integración de cada uno de ellos y ser corregida manualmente si fuese necesario.

Se corren, en orden creciente de concentración, estándares multiespecie con concentraciones de 0; 1; 5; 10 y 20 $\mu\text{g/L}$ preparados en medio de HNO_3 0,14 mol/L. Se construyen las curvas de calibrado aplicando una regresión con una ponderación $1/y$.

Una vez completadas las curvas de calibrado se inyectan las muestras. Las concentraciones obtenidas son corregidas por blanco y finalmente se las afecta por el factor de dilución, que involucra los 10 ml de extracto y la masa exacta pesada para la extracción.

4.5. Validación HPLC-ICP-MS

4.5.1. Linealidad

Para evaluar la linealidad se prepararon estándares multiespecie de 0; 1; 5; 10 y 20 $\mu\text{g/L}$ por triplicado y fueron analizados por el método propuesto.

Las áreas resultantes luego de la corrección punto a punto por ISTD fueron usadas para la construcción de curvas de calibrado con ponderaciones $1/y$ para cada especie. A través de un análisis de la varianza se calculó el valor p asociado a la falta de ajuste. En la siguiente tabla se presentan los valores p obtenidos para cada especie.

Tabla 4.9. Valores p obtenidos para la prueba de falta de ajuste

Especie	Valor p para la falta de ajuste
As(III)	0,6621
DMA	0,1032
MMA	0,1852
As(V)	0,4655

Todos los valores p obtenidos son mayores que 0,05, por lo que un modelo lineal no presenta carencia de ajuste para un nivel de confianza del 95%.

4.5.2. Límites de detección y cuantificación

Para la estimación del LOD y el LOQ se contó con una muestra de arroz con un contenido muy bajo de As. Esta muestra presentó picos cromatográficos para las especies As(III), DMA y As(V), por lo que fue utilizada para la estimación de los límites de estas especies. Dado que esta muestra no presentó pico cromatográfico de MMA, se decidió utilizar otra muestra para la estimación de los límites de esta especie. No se emplearon blancos de reactivo para la estimación de estos límites ya que se consideró que la integración de la línea de base (es decir, cuando no hay pico cromatográfico) no representaría correctamente la variabilidad en la extracción y en la integración de un pico de baja concentración.

Se realizaron 7 réplicas independientes de ambas muestras antes mencionadas, se calcularon sus concentraciones y desviaciones estándar, y estas últimas fueron multiplicadas por 3 y 10 para el cálculo del LOD y el LOQ, respectivamente. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.10.

Tabla 4.10. Límites de detección y cuantificación

Especie	En solución		Final en muestra	
	LOD(μg/L)	LOQ(μg/L)	LOD(μg/kg)	LOQ(μg/kg)
As(III)	0,134	0,447	1,34	4,47
DMA	0,021	0,069	0,21	0,69
MMA	0,048	0,160	0,48	1,60
As(V)	0,130	0,434	1,30	4,34

Estos límites se pueden considerar adecuados para la determinación de especies de As a nivel de ultratrazas y para el control de iAs en arroces comerciales según los límites actualmente establecidos mencionados en la Sección 1.1.

4.5.3. Efecto de matriz

Para evaluar la posible existencia de efecto de matriz se compararon las pendientes de dos curvas de calibrado para cada especie de As. Una de ellas construida con estándares externos (en HNO₃ 0,14 mol/L) y la otra por adición estándar, preparada sobre extractos de una muestra de arroz. Las curvas de calibrado se realizaron con 5 niveles de concentración: 0; 1; 5; 10 y 20 µg/L. Se utilizó una corrección punto a punto con el ISTD ⁷²Ge y a todas las curvas de calibrado se les aplicó una ponderación de 1/y. En la Tabla 4.11 se presentan las pendientes obtenidas con cada curva de calibrado y la relación porcentual entre ellas.

Tabla 4.11. Estudio de efecto de matriz. Comparación de pendientes.

	Pendiente		Relación %
	Externa (1/(µg/L))	Adición estándar (1/(µg/L))	
As(III)	1,038E+04	1,029E+04	99
DMA	1,251E+04	1,257E+04	101
MMA	1,332E+04	1,290E+04	97
As(V)	1,248E+04	1,281E+04	103

Los efectos de matriz obtenidos son pequeños (<3%), lo cual no justifica agregar al método la complejidad de la calibración por adición estándar o matrix-matching. De esta manera se concluye que el método no tiene efectos de matriz significativos.

4.5.4. Veracidad

Una de las dificultades en el análisis de especiación es la poca disponibilidad de medios para el aseguramiento de la veracidad del método. Por un lado, la oferta de materiales de referencia certificados para el contenido de especies químicas es muy limitado. Los CRMs disponibles generalmente poseen certificación solo para algunas especies (DMA, AsB, MeHg⁺) o suma de ellas (iAs) y la disponibilidad de matrices es limitada. Por otra parte, los ensayos interlaboratorio son escasos, limitándose generalmente a los casos que presentan límites legales (como el iAs en arroz). La

situación es aún más compleja para el caso de las especies que no se encuentran disponibles comercialmente como estándares certificados o sustancias puras (como es el caso de los arsenoazúcares, entre muchos otros), lo cual limita la aplicabilidad de ensayos de recuperación.

Para la presente validación se contó con un CRM con concentraciones certificadas de DMA y iAs, se participó de dos ensayos interlaboratorio para iAs y se realizaron ensayos de recuperación de las cuatro especies de arsénico estudiadas.

4.5.4.1. Ensayos de Recuperación

Para los ensayos de recuperación, una vez pesadas las muestras en los recipientes de microondas, fueron adicionadas con los estándares de las especies estudiadas, de manera de obtener concentraciones finales de 2; 10 y 20 µg/L, las cuales se corresponden a concentraciones de 20; 100 y 200 µg/kg. Los ensayos de recuperación reportados son sobre muestras de arroz. Nuevamente se adoptaron los criterios de aceptación de AOAC para la evaluación de las recuperaciones obtenidas [114].

Los resultados de estos ensayos se presentan en la Tabla 4.12, donde se muestra la recuperación promedio, su desviación estándar y el criterio de aceptación adoptado para cada caso. Como puede verse, todas las recuperaciones obtenidas fueron adecuadas según los criterios de aceptación adoptados.

Tabla 4.12. Recuperaciones porcentuales promedio ± desviación estándar para el análisis de especiación de muestras de arroz

Conc. adic. (µg/L)	Conc. equiv. (µg/kg)	As(III)	DMA	MMA	As(V)	Criterio de aceptación
2	20	104,8 ± 13,6	94,2 ± 5,9	95,0 ± 5,0	101,6 ± 7,9	60-115
10	100	102,1 ± 13,1	90,4 ± 6,5	93,6 ± 5,2	95,6 ± 5,9	80-110
20	200	97,1 ± 3,3	91,8 ± 7,1	94,1 ± 4,0	90,5 ± 6,3	80-110

4.5.4.2. Ensayos Interlaboratorio

Como fue mencionado en el capítulo de metales totales, se participó de dos ensayos interlaboratorio que incluían la determinación de iAs en una muestra de arroz integral y una de arroz pulido. Ambas muestras fueron analizadas por triplicado y la concentración de iAs se obtuvo como la suma de las concentraciones obtenidas de

As(III) y As(V). Los resultados del análisis se evaluaron mediante el cálculo del parámetro z , como fue mencionado en la Sección 3.4.4.2. En la Tabla 4.13 se muestran los resultados obtenidos del análisis, como así también los valores asignados (x_a) y la desviación estándar de proficiencia (σ_p).

Tabla 4.13. Resultados del análisis y estadísticos informados en los interlaboratorios

	Analito	Concentración asignada ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	σ_p ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Concentración hallada ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Valor z promedio
Interlaboratorio 07324 (Arroz Pulido)	iAs	254	50,0	253,5 249,2 247,7	-0,078
Interlaboratorio 07314 (Arroz Integral)	iAs	189	38,8	200,3 196,7 201,9	0,274

Como puede verse, las concentraciones halladas son muy próximas a las asignadas. Los valores z obtenidos se encuentran dentro del rango $-2 < z < 2$, por lo que son considerados satisfactorios.

4.5.4.3. Análisis de Material de Referencia Certificado

Como se mencionó anteriormente, el material de referencia ERM®-BC211 utilizado en este trabajo posee certificadas las concentraciones de tAs, iAs y DMA. En la Tabla 4.14 se presentan los valores informados en el certificado, los cuales fueron usados para las pruebas estadísticas. El CRM fue analizado por triplicado por el método HPLC-ICP-MS y los resultados se presentan en la Tabla 4.15. El contenido de iAs fue calculado como la suma de las concentraciones de As (III) y As (V).

Tabla 4.14. Valores informados en el certificado del CRM

Parámetro	Valor	
	DMA	iAs
Valor certificado ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	119	124
Incertidumbre ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	13	11
Media ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	118,867	123,759
Desviación estándar ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	14,235	12,838
n	48	78

Tabla 4.15. Resultados del análisis del CRM

N	Concentración hallada ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
	DMA	iAs
1	103,9	124,0
2	110,7	130,6
3	107,0	123,8
Media	107,2	125,6
Desviación estándar	3,41	4,42

Para la comparación estadística de los valores obtenidos con los certificados, en primer lugar, se realizó un test-F para efectuar la comparación de la varianza informada en el certificado del CRM con la obtenida de las mediciones realizadas en el laboratorio. Con este test no se observó una diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas ($p = 0,27$ y $p = 0,18$ para iAs y DMA, respectivamente), por lo que se llevaron a cabo tests-t con varianzas pooled para la comparación de medias. Estos tests arrojaron como resultado diferencias estadísticamente no significativas entre las medias informadas en el certificado y las halladas en el laboratorio ($p = 0,81$ y $p = 0,17$ para iAs y DMA, respectivamente), por lo que este ensayo no evidenció un sesgo significativo en el método para estos analitos.

Teniendo en cuenta lo expuesto en estas últimas secciones, puede concluirse que el método no tiene un sesgo significativo, confirmándose su veracidad.

4.5.5. Precisión

Para el estudio de precisión se realizó una experiencia similar a la llevada a cabo para el método de metales totales.

Se realizaron determinaciones por duplicado en seis días diferentes ($n = 12$) y a los resultados obtenidos se les realizó un análisis de varianza de un factor. Luego se procedió al cálculo de la desviación estándar relativa porcentual para la repetibilidad ($\%RSD_r$) y la reproducibilidad intermedia ($\%RSD_I$) como fue descrito en la Sección 3.4.5. Los resultados individuales de las determinaciones se presentan en la Tabla 4.16, mientras que en la Tabla 4.17 se presentan los resultados de los cálculos estadísticos.

Tabla 4.16. Resultados individuales de las réplicas analizadas para el estudio de precisión

Serie	Concentración ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			
	As (III)	DMA	MMA	As (V)
1	52,04	90,80	5,06	22,50
	51,90	90,82	4,26	20,72
2	39,36	93,48	6,02	20,40
	47,27	104,62	5,72	20,58
3	49,37	103,43	6,04	15,16
	50,68	107,14	6,26	15,27
4	55,67	106,45	4,59	18,90
	55,65	108,19	4,71	19,31
5	54,02	101,71	5,30	18,15
	51,17	99,10	4,87	18,00
6	58,22	114,46	4,58	19,78
	58,45	119,32	4,56	20,94

Tabla 4.17. Resultados de los cálculos de precisión

Parámetro	As (III)	DMA	MMA	As (V)
Promedio ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	51,98	103,29	5,16	19,14
s_r ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	2,458	3,779	0,285	0,628
s_p ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	4,859	8,386	0,654	2,236
s_i ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	5,446	9,198	0,713	2,323
%RSD _r	4,7	3,7	5,5	3,3
%RSD _i	10,5	8,9	13,8	12,1

Como fue mencionado en el capítulo anterior, AOAC recomienda distintos criterios de aceptación para la repetibilidad en función de la concentración del analito. Para niveles de $1 \mu\text{g}/\text{kg}$, $10 \mu\text{g}/\text{kg}$, $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ y $1000 \mu\text{g}/\text{kg}$ se han establecido valores máximos de %RSD_r de 30%, 21%, 15% y 11%, respectivamente. Puede verse que los %RSD_r se encuentran todos por debajo incluso del valor más estricto de 11%. En cuanto a los %RSD_i, como fue mencionado en el capítulo anterior, no hay valores de referencia establecidos. Sin embargo, todos los valores se encontraron por debajo

del 15% establecido para la repetibilidad a nivel de 10 µg/kg. El As(III) y el DMA también se encontraron por debajo del valor de 11% establecido para un nivel de 100 µg/kg. Teniendo en cuenta que la reproducibilidad intermedia abarca una mayor variabilidad en las condiciones de medida que la repetibilidad, estos valores son considerados satisfactorios.

4.5.6. Conclusiones del proceso de validación

Como fue expuesto en las secciones anteriores, el método evaluado arrojó resultados satisfactorios en todos los parámetros estudiados en el proceso de validación. Puede concluirse entonces que el método se encuentra validado para muestras de arroz y que puede ser aplicado al análisis de las mismas.

4.6. Análisis de muestras

El método validado fue usado para el análisis de las muestras de arroz mencionadas en la Sección 2.3. Originalmente se planteó llevar a cabo el análisis de especiación tanto para las muestras de arroz, como para las de trigo y harina. Sin embargo, debido a desperfectos técnicos del instrumento, no se pudo continuar con los análisis de las demás matrices. A su vez, no se alcanzaron a analizar 2 de las muestras de arroz parbolizado.

Nuevamente, se analizaron los resultados en función del tipo y variedad de arroz. Los resultados se presentan en las subsecciones siguientes primeramente de manera general y luego con un análisis estadístico detallado. Este último se restringirá a los casos donde las concentraciones se hayan encontrado por encima del límite de cuantificación. Respecto a este análisis estadístico, se tuvieron las mismas consideraciones que las mencionadas en la Sección 3.5.1.

4.6.1. Muestras de arroz

Como fue mencionado en Introducción, durante el análisis de muestras de arroz se detectaron en prácticamente todas ellas la presencia de picos cromatográficos que no coincidían en tiempo de retención con los estándares. En la Figura 4.17 se presenta el cromatograma de una muestra de arroz integral superpuesto con el de un estándar multiespecie de 5 µg/L. Pueden observarse 3 picos de especies desconocidas, denominadas Unk1, Unk2 y Unk3. En general, Unk2 estuvo presente en todas

las muestras y con picos de mayor tamaño que Unk1 y Unk3. Estas últimas no fueron observadas en todas las muestras.

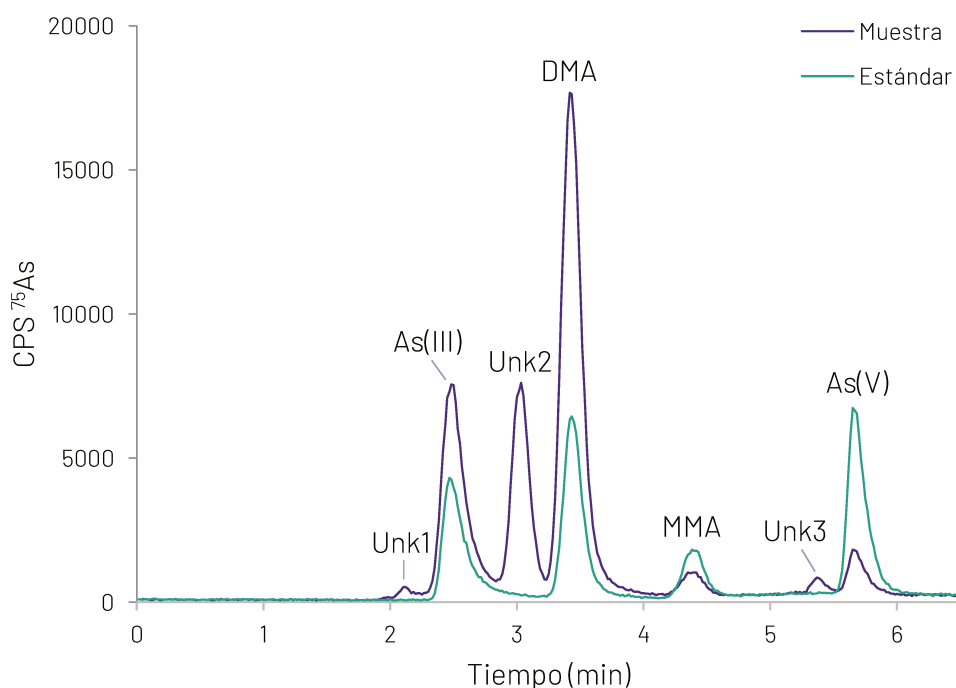


Figura 4.17. Cromatograma de una muestra de arroz integral con especies desconocidas y un estándar multiespecie de 5 µg/L.

Una de las ventajas de ICP-MS es que permite lo que se conoce como Calibración Independiente del Compuesto (*Compound Independent Calibration, CIC*) [135]. Esta se basa en que el sistema responde de igual manera a un determinado elemento independientemente del compuesto que esté formando y permite estimar la concentración de una especie calibrando el sistema con otra distinta. Esto tiene algunas limitaciones. Por ejemplo, si es usado en cromatografía con elución gradiente y el compuesto de referencia y el cuantificado por CIC eluyen a tiempos muy distintos, el gradiente puede modificar sustancialmente el medio en el que ingresan al equipo. Podrían darse cambios en las propiedades de la solución que afectan a la nebulización o diferencias en la ionización debido a distintas concentraciones de C en el plasma, entre otras. A pesar de esto, CIC es una alternativa muy útil para estimar la concentración de especies de las cuales no se dispone de estándar o no se conoce su identidad. CIC fue usado en este trabajo para estimar las concentraciones de las especies desconocidas encontradas en las muestras de arroz. Para cuantificar las especies Unk1, Unk2 y Unk3, se usaron las curvas de calibrado de As(III), DMA y As(V),

respectivamente, ya que eran las especies que más cercanamente eluían en cada caso. En cuanto a los límites de detección y cuantificación para estas especies, solo la especie Unk2 se encontró presente en una de las muestras usada para la estimación de estos límites. Por lo tanto, para Unk2 se dispone de una estimación certera del LOD y el LOQ, pero para Unk1 y Unk3 no. Para estos últimos dos casos, se decidió adoptar los límites de los compuestos usados para CIC, es decir, As(III) y As(V). En cuanto a Unk2, se obtuvo un LOD de 0,67 µg/kg y un LOQ de 2,2 µg/kg.

En la Figura 4.18 se representan las concentraciones obtenidas para As(III), DMA, MMA y As(V) en las muestras analizadas junto con sus límites de detección y cuantificación, y la media y mediana por tipo de arroz. A su vez, en la Figura 4.19 se muestran de manera similar los resultados obtenidos para las especies desconocidas y el iAs, calculado como la suma del As(III) y el As(V).

4.6.1.1. Especies inorgánicas

En general, las concentraciones halladas de As(V) fueron menores que las de As(III). Todas las muestras presentaron concentraciones de As(III) cuantificables, mientras que muchas muestras de arroz pulido presentaron concentraciones de As(V) por debajo del límite de cuantificación. A pesar de esto, todas estas muestras tuvieron concentraciones detectables de As(V).

En cuanto al As(III), las muestras de arroz pulido parecen tener menores concentraciones de esta especie, especialmente las de variedad Doble Carolina que parecen tener niveles ligeramente menores que los Largo Fino, salvo por un valor elevado entre los Doble Carolina. Una de las muestras de arroz parbolizado presentó una concentración relativamente alta de As(III). En esta muestra también se había hallado una de las mayores concentraciones de As total (551 µg/kg). Entre los arroces Yamaní y Largo Fino no parecen haber diferencias notables.

Respecto al As(V), hay una diferencia clara entre los tipos de arroz, donde la mayoría de los pulidos se encuentran entre el LOD y el LOQ, mientras que los integrales y parbolizados fueron todos cuantificables, excepto uno. En cuanto a variedades, los integrales Largo Fino presentaron algunos valores extremos más elevados que los Yamaní, pero no parece haber una diferencia obvia entre ellos. Respecto a las variedades de los pulidos tampoco parece ser obvia una diferencia, además de que la

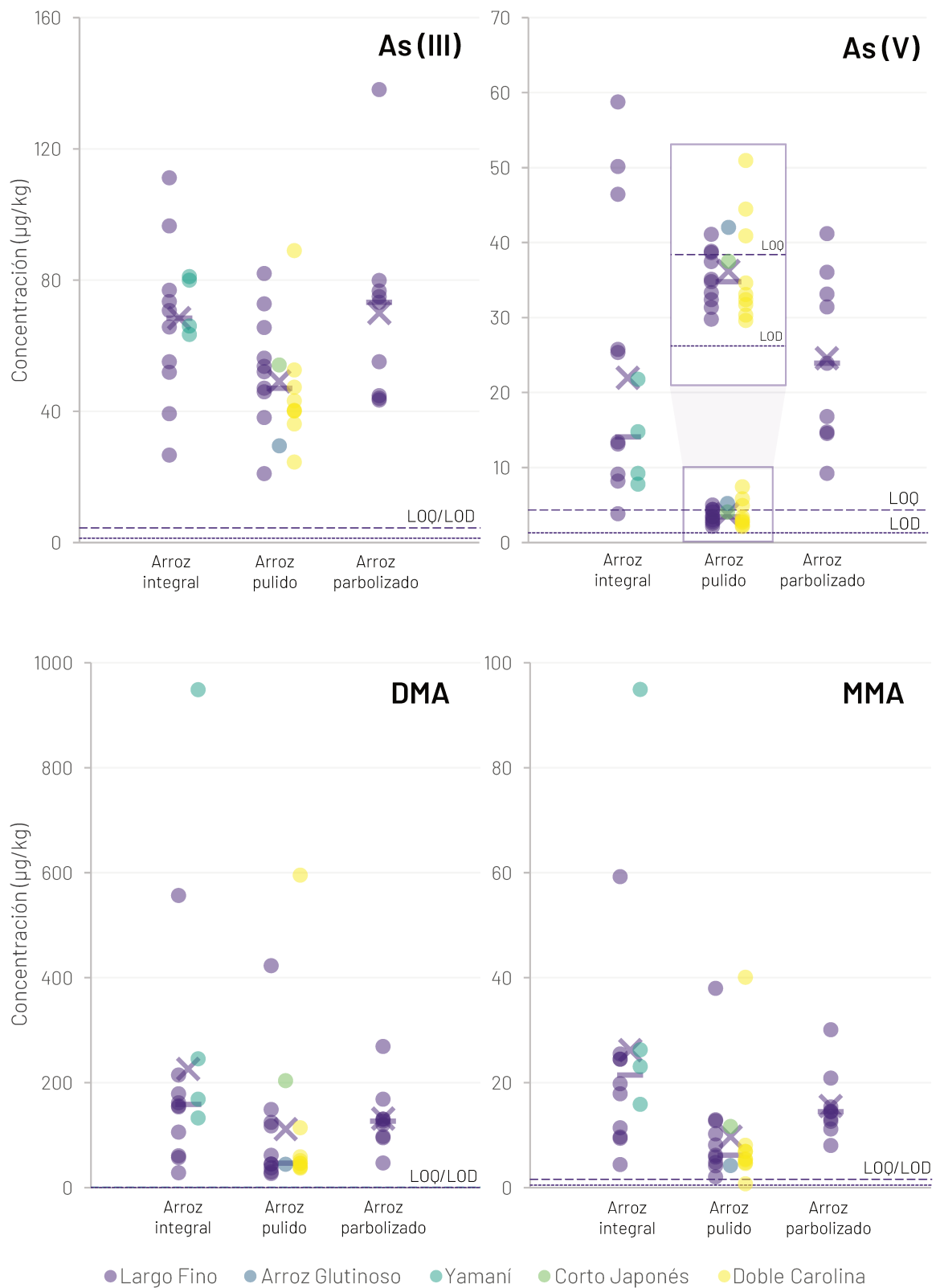


Figura 4.18. Resultados del análisis de especiación de las muestras de arroz. Las líneas cortadas y punteadas representan los LOQs y LODs, respectivamente. Las cruces representan las medias aritméticas y las barras horizontales las medianas. Estas fueron calculadas por tipo, sin discriminar por variedad.

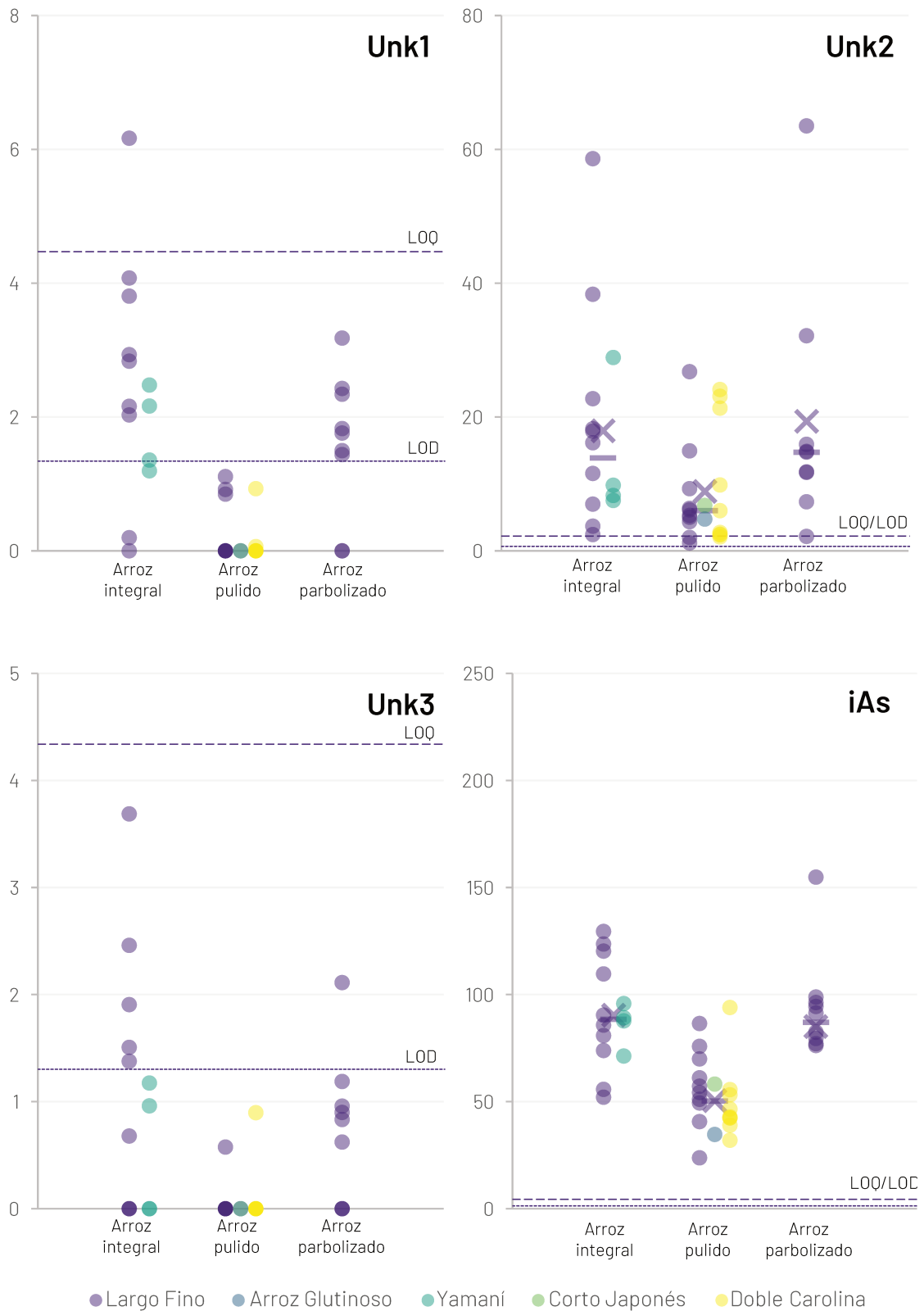


Figura 4.19. Concentraciones halladas para las especies desconocidas y iAs. Las líneas cortadas y punteadas representan los LOQs y LODs, respectivamente. Las cruces representan las medias aritméticas y las barras horizontales las medianas. Estas fueron calculadas por tipo, sin discriminar por variedad.

mayoría de las muestras están por debajo del LOQ, por lo que un análisis de estos valores no es confiable.

Con el iAs se observan resultados similares a los anteriores. Los arroces pulidos claramente presentan una menor concentración de iAs que los integrales y parbolizados. Respecto a las variedades, no parece haber una diferencia clara entre ellas. Ninguna de las muestras superó los límites legales mencionados en la Sección 1.1 sobre arroz destinado al consumo de adultos. Sí se observaron cinco muestras con contenidos de iAs mayores a 100 µg/kg, que es el límite establecido para arroz destinados a la producción de alimento para lactantes y niños de corta edad. Cuatro de estas cinco fueron arroces integrales y la última fue un arroz parbolizado. A pesar de que solo 5 muestras superaron el valor de 100 µg/kg, como puede verse claramente en la Figura 4.19, otras muestras también estuvieron muy próximas a este valor. Por ejemplo, entre 90 µg/kg y 100 µg/kg se encuentran otras siete muestras: cuatro arroces parbolizados, dos integrales y un pulido.

4.6.1.2. Especies orgánicas

Los resultados para las especies orgánicas de As (DMA y MMA) presentaron varios valores atípicamente altos. DMA pudo ser cuantificado en todas las muestras, mientras que el MMA solamente en una muestra se encontró por debajo del LOQ. Nuevamente, los arroces pulidos parecen tener menores concentraciones que los demás, aunque también se encuentran entre ellos valores atípicamente altos. Entre las variedades Largo Fino y Doble Carolina no parece haber una diferencia evidente. A su vez los Yamaní presentaron concentraciones similares a los Largo Fino, salvo por un valor atípicamente alto. La distribución de los datos es muy similar para ambas especies, aunque de MMA se observan concentraciones un orden de magnitud menores que de DMA. Esto se debe a que, como será mostrado posteriormente, estas especies están correlacionadas.

4.6.1.3. Especies desconocidas

Como fue mencionado anteriormente, se detectaron 3 picos cromatográficos cuyos tiempos de retención no coincidían con los de los estándares disponibles. De estas especies, denominadas Unk1, Unk2 y Unk3, Unk2 fue detectada en todas las mues-

tras, mientras que Unk1 y Unk3 solamente en muestras de arroces integral y parbo-
lizados. Estas últimas especies se observaron en concentraciones muy bajas, al-
canzando como máximo concentraciones de 6,2 µg/kg y 3,7 µg/kg para Unk1 y Unk3,
respectivamente. En cambio, Unk2 se encontró en concentraciones comparables al
MMA, llegando hasta 63,5 µg/kg. Esta especie también se presentó en menores con-
centraciones en los arroces pulidos, como las demás especies.

En la Sección 4.7 se describen los estudios que se llevaron a cabo sobre la identidad
de Unk2.

4.6.1.4. Análisis estadístico

Se llevó a cabo un análisis estadístico análogo al presentado en el capítulo anterior,
donde en primer lugar se compararon para cada analito las variedades de arroz y
luego los tipos de arroz. Por simplicidad se omitirán las tablas de los test de norma-
lidad y homocedasticidad. Estas fueron verificadas en cada caso, y en la mayoría de
los casos fue necesario aplicar transformaciones.

Tabla 4.18. Test t entre las variedades de muestras de arroz

Especie	Pulido (Largo Fino vs. Doble Carolina)	Especie	Integral (Largo Fino vs. Yamani)
	Valor p		Valor p
As(III) (Transf: log)	0,3822	As(III) (Transf: no)	0,5368
Unk2 (Transf: log)	0,7606	Unk2 (Transf: log)	0,7301
DMA (Transf: 1/x)	0,9482	DMA (Transf: log)	0,1880
MMA (Transf: log)	0,5049	MMA (Transf: log)	0,2190
As(V) (Transf: no)	0,6735	As(V) (Transf: no)	0,1114
iAs (Transf: log)	0,4131	iAs (Transf: no)	0,5575

En la Tabla 4.18 se presentan los resultados de los test t aplicados para comparar las
variedades de arroz respecto a su contenido de distintas especies de arsénico. Nin-
guna de las especies mostró diferencias significativas en su concentración res-
pecto a la variedad de arroz analizada. Por este motivo, para comparar los diferentes

tipos de arroz se ignoraron las variedades y los datos de distintas variedades dentro de un mismo tipo de arroz fueron considerados en conjunto.

Se procedió de manera similar para el análisis de los distintos tipos de arroz, verificando en primer lugar la homocedasticidad y la normalidad de los datos. En el caso de la serie de datos de iAs, la presencia de un valor atípico entre los arroces parbolizados hizo que no se pueda obtener normalidad ni homocedasticidad con ninguna de las transformaciones evaluadas. Se evaluó el análisis estadístico con y sin este valor, y en ambos casos se obtuvieron las mismas conclusiones. Finalmente este valor no fue incluido para no violar los supuestos de normalidad y heterocedasticidad. Por otro lado, en la serie de datos de As(V) un gran número de muestras de arroz pulido dieron valores menores al LOQ, pero no así los arroces integrales y parbolizados. Se decidió entonces solamente comparar para esta especie los arroces integrales y los parbolizados. Consecuentemente, debido a que son solo dos series de datos las que se están comparando, el ANOVA se reduce a un test t.

Los resultados obtenidos del análisis se muestran en la Tabla 4.19. En todos los casos se ven diferencias significativas según el tipo de arroz (ANOVA). En general, se observa que casi siempre es diferenciable el arroz pulido del arroz integral, pero no el integral del parbolizado, como fue visto con el análisis gráfico de los datos. En el caso del As(V), el iAs y el MMA también resultó significativa la diferencia entre el pulido y el parbolizado, mientras que en el resto de las comparaciones pulido-parbolizado la diferencia estuvo muy próxima al nivel de significancia adoptado (0,05). En el caso de Unk2, ANOVA fue significativo pero los contrastes del análisis post hoc no alcanzaron a serlo, aunque los contrastes del arroz pulido se encuentran cerca del nivel de significancia.

Se evaluaron también los datos con métodos no paramétricos como el test de Kruskal-Wallis y el test de Conover. En general, los resultados fueron análogos a los presentados en la Tabla 4.19. Como diferencia, se puede mencionar que el test de Kruskal-Wallis no fue significativo para Unk2 ($p = 0,05103$), mientras que sí lo fue por ANOVA ($p = 0,0382$). De todas maneras, estos dos valores son muy próximos y solo cambia la conclusión debido a que el nivel de significancia fue establecido a 0,05.

Tabla 4.19. Resultados de ANOVA y test de Tukey-Kramer para el análisis de especiación de distintos tipos de arroz.

Especie	ANOVA	Contraste	Tukey-Kramer
	Valor p		Valor p
As(III) (Transf: log)	0,0242	Parbolizado - Integral	0,9980
		Pulido - Integral	0,0440
		Pulido - Parbolizado	0,0783
Unk2 (Transf: log)	0,0382	Parbolizado - Integral	0,9908
		Pulido - Integral	0,0703
		Pulido - Parbolizado	0,0982
DMA (Transf: $1/x^{1/2}$)	8,32 E-03	Parbolizado - Integral	0,9356
		Pulido - Integral	0,0112
		Pulido - Parbolizado	0,0696
MMA (Transf: log)	8,67 E-04	Parbolizado - Integral	0,6288
		Pulido - Integral	8,48 E-04
		Pulido - Parbolizado	0,0449
As(V) (Transf: log) Test t	-	Parbolizado - Integral	0,2957
		Pulido - Integral	-
		Pulido - Parbolizado	-
iAs (Transf: no)	3,09 E-06	Parbolizado - Integral	0,9150
		Pulido - Integral	7,80 E-06
		Pulido - Parbolizado	4,67 E-04

4.6.1.5. Correlaciones

En cuanto a correlaciones, debido número de especies y tipos de arroz, se obtiene un gran número de posibles correlaciones. Todas las posibles correlaciones se encuentran resumidas en la Figura 4.20. En esta Figura se representan todos los datos, sin discriminar si estuvieron por encima del LOD o del LOQ. En la parte inferior de la matriz se muestran los gráficos de dispersión de cada par de especies, con los tipos de arroz codificados por color. Por otro lado, en la parte superior se presentan los valores obtenidos para cada correlación (r de Pearson) por tipo de arroz y la global (especificada como "Corr"), junto con un código que especifica su significancia estadística (***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; ∴: $p < 0,1$).



Figura 4.20. Correlaciones entre las concentraciones de las distintas especies, As total y As inorgánico. En la diagonal inferior se encuentran los gráficos de dispersión, mientras que en la diagonal superior está el r de Pearson y la significancia estadística

***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; : $p < 0,1$

Se observan algunas correlaciones muy claras, como la del DMA y el MMA, y la de estas con el As total. La mayoría de las especies están correlacionadas en cierta medida con el contenido de As total, aunque no todas tan claramente como el DMA y el MMA. En el caso del iAs se da una correlación clara hasta los 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de As total, y luego el contenido de iAs es menor al esperado según esta tendencia. El iAs y el As(III) aparecen correlacionados ya que el iAs es calculado como la suma del As(V) y el As(III), y este último se encuentra en mayores concentraciones que el As(V). También se observa una cierta correlación entre las especies desconocidas, aunque estos resultados deben ser tomados con precaución ya que Unk1 y Unk3 tienen un gran número de muestras no detectables y/o no cuantificables. A diferencia de DMA y MMA, As(III) y As(V) no presentan una correlación entre ellos.

Es interesante ver también el porcentaje de una determinada especie o grupo de especies respecto del As total. En la Figura 4.21 se presenta la proporción porcentual de iAs y de DMA en función del As total. Como puede verse, la proporción de iAs disminuye mientras que la de DMA aumenta con el As total. Si bien la concentración de ambas especies está correlacionada positivamente con el As total, el DMA aumenta más rápidamente que el iAs a medida que aumenta el As total. Esto hace que el DMA sea la especie dominante en los arroces de mayor contenido de As, mientras que la proporción de iAs disminuye, a pesar de que su concentración aumente.

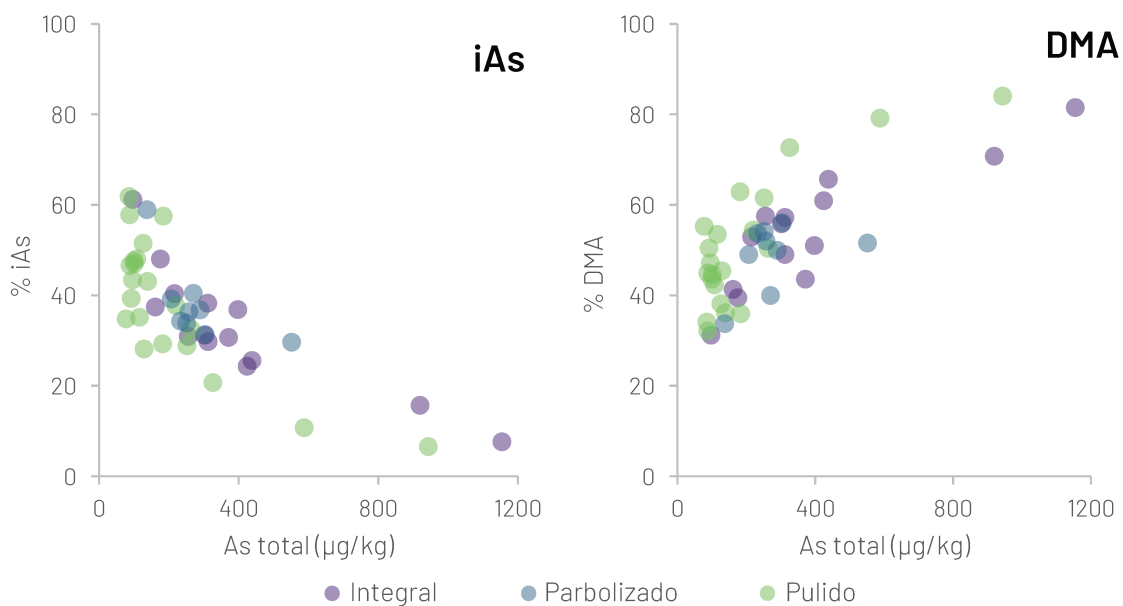


Figura 4.21. Relaciones entre el contenido de As total y las proporciones porcentuales de iAs y DMA para las distintas muestras de arroz.

Para otras especies no se observan tendencias tan claras y parecen ser más independientes del contenido de As total. Por ejemplo, la proporción de MMA de la mayoría de las muestras se encontró entre 4% y 9%, sin una tendencia clara. Para Unk2 la mayoría de las muestras se encontraron en una proporción menor al 7%, pero algunas muestras presentaron valores de entre 10% y 20%.

4.6.2. Muestras de harina

Como fue mencionado anteriormente, el método para el análisis de especiación no pudo ser aplicado al análisis de las muestras de harina y trigo debido a dificultades técnicas con el instrumento. Sin embargo, antes de esto se lograron hacer algunos análisis preliminares con este tipo de muestras, por lo que se discutirán brevemente los resultados cualitativos de estos ensayos.

En la Figura 4.22 se incluyen los cromatogramas de algunas de las muestras de harina que fueron analizadas aplicando el método validado para arroz. Se observa una clara predominancia de las especies inorgánicas As(III) y As(V), aunque también se observaron pequeños picos de DMA en algunas muestras. MMA no fue detectado en ninguna de ellas. En las muestras de harina leudante se observó una predominancia del As(V) en la especiación. En los demás tipos de harina se observaron señales aproximadamente equivalentes para As(III) y As(V). Como fue mencionado en la Sección 3.5.2, las harinas leudantes presentaron concentraciones más elevadas de As total que las demás. También se mencionó que el origen de esto podía ser la presencia de As y otros elementos en los aditivos usados para la elaboración de las mismas. Las diferencias en la especiación también podrían sugerir lo mismo, ya que la predominancia de As(V) solo fue observada en las harinas leudantes.

Por otro lado, en la parte superior de la Figura 4.22 se encuentra el cromatograma de la muestra de harina integral que había presentado una elevada concentración de As total, y que había sido procesada en un molino que también procesaba arroz. Pueden verse picos bien definidos de As(III) y As(V), además de un pico de DMA.

La predominancia de las especies inorgánicas y la diferencia del perfil de especiación entre harinas leudantes y convencionales amerita continuar con los estudios

de especiación de estas muestras en el futuro. A su vez también es de interés continuar con el análisis de especiación de las muestras de trigo, que mostraron concentraciones marcadamente diferentes según la región de producción. Estas diferencias podrían reflejarse también en el perfil de especiación.

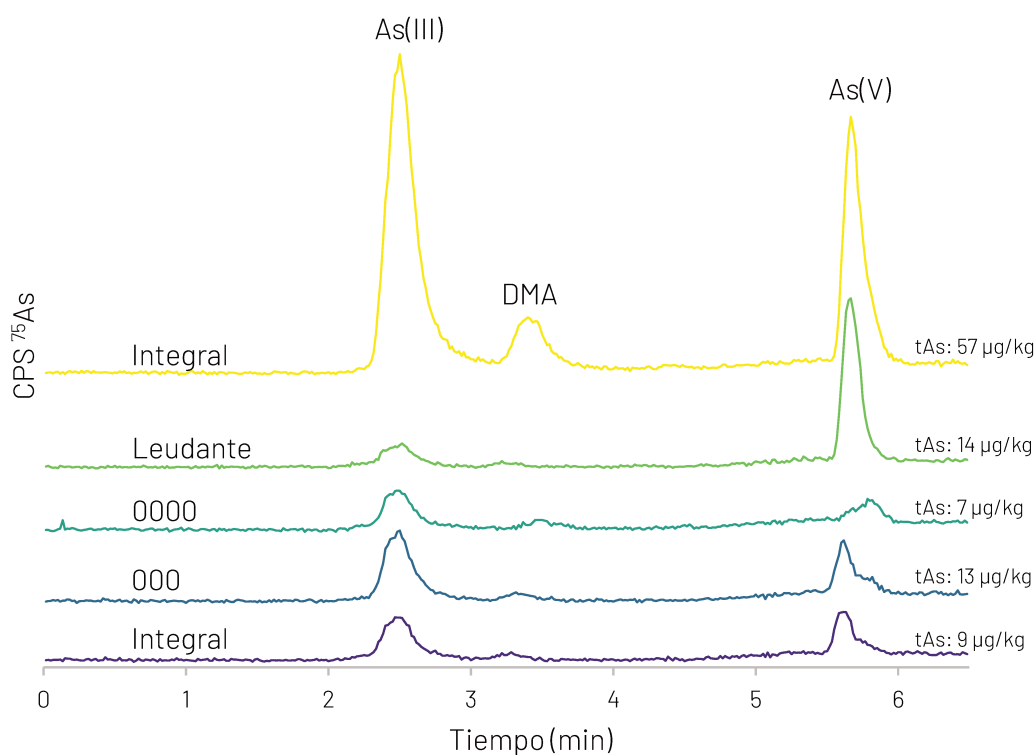


Figura 4.22. Cromatogramas obtenidos del análisis de distintos tipos de harina. A la derecha del cromatograma se incluye el contenido de As total determinado anteriormente para estas muestras.

4.7. Estudios sobre la identidad de Unk2

Durante el análisis de las muestras de arroz, como ya ha sido expuesto, se encontraron 3 picos correspondientes a especies desconocidas. Uno de ellos, el de la especie denominada Unk2, se encontró en concentraciones relativamente altas, eluyendo entre el As(III) y el DMA. Por este motivo se decidieron llevar a cabo distintas experiencias para obtener información sobre la estructura de esta especie.

4.7.1. Oxidación con H₂O₂

Como fue mencionado en la introducción, es conocida la existencia de los análogos trivalentes del DMA y el MMA [18] y también de especies con átomos de azufre en

lugar de oxígeno (tioladas) [41,43]. Estas especies son generalmente inestables y son oxidadas por el H_2O_2 [136,137], lo cual resulta útil para probar su presencia.

En la Figura 4.23 se presentan dos cromatogramas correspondientes a dos extractos de una misma muestra de arroz. Uno de ellos fue realizado como fue descrito en la Sección 4.4.1.1, y el otro de manera similar, pero adicionando un 1% (v/v) de H_2O_2 a la solución extractante. Puede verse en la figura que el As(III) fue oxidado completamente a As(V), pero el pico de la especie desconocida está presente en ambos cromatogramas. Esta experiencia indica Unk2 no parece ser simplemente un análogo trivalente o tiolado de las otras especies, ya que debería haberse transformado durante la extracción con H_2O_2 .

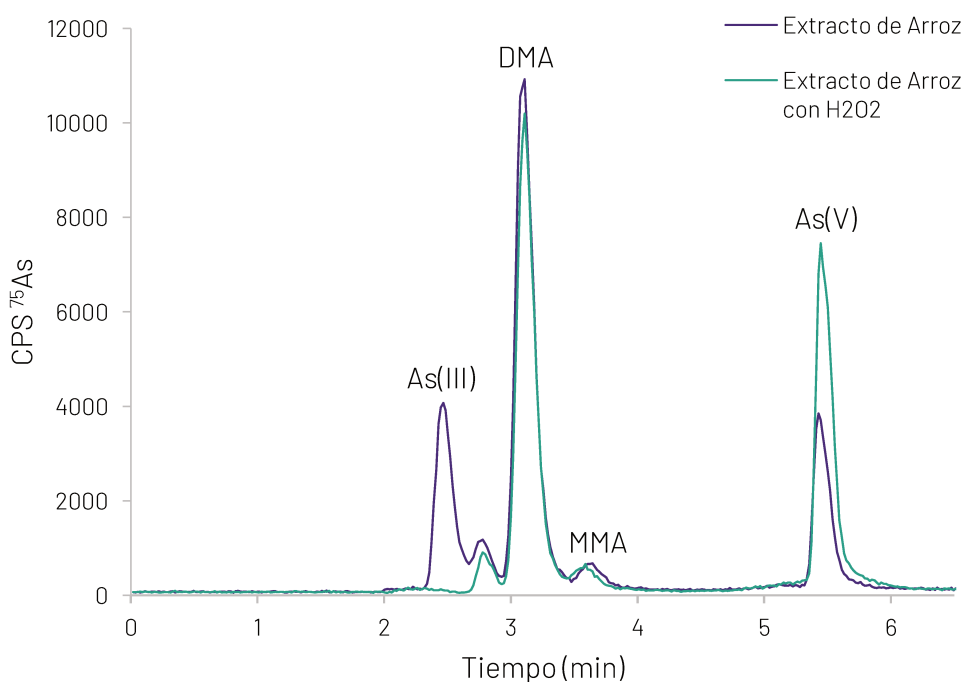


Figura 4.23. Cromatogramas de extracciones de una muestra de arroz con y sin H_2O_2 en el extractante

4.7.2. Comparación con extractos de algas marinas

Otro grupo de compuestos que puede formar el As son los arsenoazúcares. Estos suelen estar presentes en organismos marinos, especialmente en algas y moluscos [138,139]. Los cuatro arsenoazúcares más frecuentes son los que se encuentran representados en la Figura 1.1, aunque se ha identificado una gran variedad de ellos [139,140]. Según la bibliografía, bajo condiciones de intercambio aniónico algunas

de estas especies en ocasiones eluyen en tiempos de retención que son similares a los de Unk2, particularmente el comúnmente llamado arsenoazúcar fosfato [140,141]. Aún no se dispone de estándares comerciales de estas especies, pero se conoce qué arsenoazúcares se encuentran comúnmente en determinadas algas. Por ejemplo, en el alga Wakame (*Undaria pinnatifida*), se ha reportado que se encuentran concentraciones elevadas de varios arsenoazúcares, incluido el arsenoazúcar fosfato [142].

Se decidió entonces analizar una muestra de esta alga para comparar los tiempos de retención de los picos de los arsenoazúcares con los de Unk2, particularmente el del arsenoazúcar fosfato. El objetivo de este ensayo no fue obtener una extracción cuantitativa, si no obtener estas especies en solución para comparar su elución con Unk2.

Se adquirió una muestra comercial de alga wakame y se sometió a dos procedimientos de extracción. Para ambas extracciones se pesó 1 g de alga pulverizada y se agregaron 10 ml de extractante. En un caso se utilizó la extracción del método desarrollado (Sección 4.4.1.1), y en el otro caso se hizo una extracción con agua utilizando la misma rampa de temperatura. Se llevó a cabo esta extracción con agua ya que los arsenoazúcares pueden degradarse bajo condiciones de extracción ácida dando lugar a interconversiones entre ellos [139]. En paralelo se realizó la extracción de una muestra de arroz siguiendo el método validado. Debido al alto contenido de As de las algas, estos extractos fueron diluidos antes de ser inyectados. Se realizó una dilución de 1 en 25 para el extracto acuoso y 1 en 50 para el extracto ácido, llevando en ambos casos a volumen con HNO_3 0,14 mol/L de manera de tener el mismo comportamiento cromatográfico que la muestra de arroz. Los cromatogramas resultantes de este análisis se muestran en la Figura 4.24. En estos cromatogramas se ve que los extractos de alga no presentaron un pico que coincida con el de la especie Unk2. En el extracto con agua se ve claramente un pico que eluye después del DMA. En función de los tiempos de retención presentados en bibliografía, este muy probablemente sea el arsenoazúcar fosfato, que suele eluir ligeramente antes o después del DMA [140,142]. En el extracto ácido se ve una disminución de este pico y un aumento del DMA y las especies no retenidas, probablemente debido a hidrólisis. También se ve una disminución del pico de As(V). Es posible que exista una especie en la

muestra de alga que coeluya con el As(V) y se hidrolice en medio ácido, o bien que el As(V) sufra una reducción con la matriz durante la extracción.

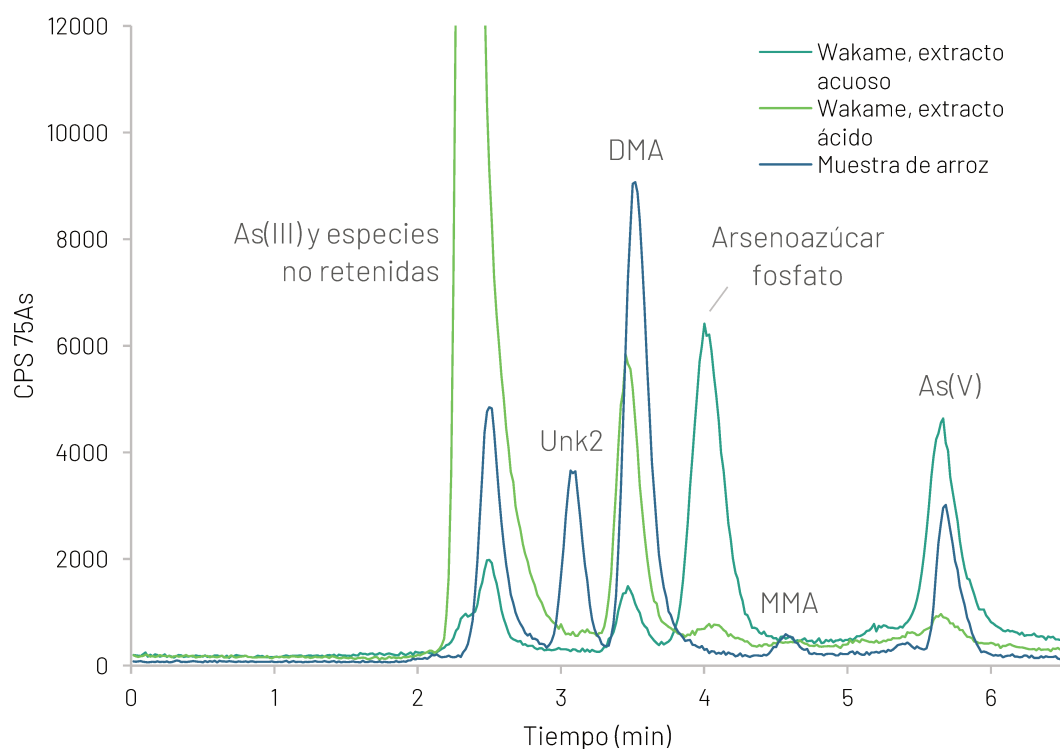


Figura 4.24. Cromatogramas obtenidos con una muestra de alga Wakame conteniendo arsenoazúcares y una muestra de arroz conteniendo Unk2.

Con este ensayo se pudo comprobar que la especie Unk2 no se trata de ninguno de los arsenoazúcares presentes en el alga wakame (arsenoazúcares fosfato, glicerol y sulfonato [142]). Tampoco es probable que se trate de otros arsenoazúcares, ya que estos tienen tiempos de retención mucho mayores que Unk2, o no son retenidos por intercambio aniónico [140].

4.7.3. Análisis por HPLC-ESI-MS/MS

A diferencia de ICP-MS, la ionización por electrospray acoplada a espectrometría de masa permite obtener información estructural del analito a través de la m/z del ion molecular y del análisis de sus fragmentaciones. Como fue mencionado en la Sección 1.4, durante el desarrollo de esta tesis fue publicado un reporte de una nueva especie de As en muestras de arroz de Estados Unidos [97]. Esta especie presenta un comportamiento cromatográfico similar a Unk2 y resistencia a la descomposición por H_2O_2 . Esta especie, denominada ácido dimetilarsonildimetilarsínico

(DMADMA) y cuya estructura se encuentra en la Figura 4.25, fue caracterizada por espectrometría de masa de alta resolución, la cual permite determinar exactamente la fórmula molecular de los iones generados. Esta técnica, sumada al análisis de productos de reacciones de tiolación y metilación llevadas a cabo por los autores, les permitió elucidar la estructura del compuesto presentada en la Figura 4.25.

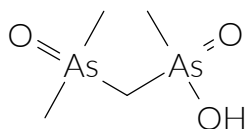


Figura 4.25. Estructura del ácido dimetilarsonildimetilarsínico

Teniendo los datos de la masa de esta especie y las fragmentaciones reportadas, se decidió llevar a cabo estudios por HPLC-ESI-MS/MS para evaluar si Unk2 se trata del mismo compuesto.

4.7.3.1. Preconcentración y clean-up

Debido a la relativamente baja concentración de Unk2 frente a otros componentes de la matriz, se llevó a cabo una preconcentración y clean-up por extracción en fase sólida (SPE) con resinas de intercambio aniónico. El objetivo de esta etapa no fue obtener una recuperación cuantitativa, si no obtener una solución con una mayor concentración de la especie desconocida y una menor concentración de otros compuestos presentes en el extracto.

Las resinas utilizadas fueron Resintech SBG1P-OH-ID, que son resinas esféricas basadas en un gel de poliestireno funcionalizado con grupos amonio cuaternario, un diámetro de partícula de entre 297 μm y 1190 μm . Estas se encuentran inicialmente en modo OH^- y cuentan con un indicador ácido-base incorporado en la resina que vira de azul a amarillo al desplazarse los OH^- . Durante este trabajo se observó que las resinas en modo OH^- tienen una tendencia a adsorber CO_2 del aire, por lo que antes de ser usadas fueron regeneradas con NaOH 1 mol/L y luego enjuagadas con agua ultrapura hasta que el pH del eluido no variaba.

Para la llevar a cabo la SPE se colocaron 20 g de resina húmeda regenerada en una columna cromatográfica de vidrio con un diámetro interno de 1,5 cm. A continuación, se cargaron 50 ml de extracto de la muestra con mayor contenido de Unk2

(63 µg/kg), el cual fue previamente centrifugado, ajustado a pH = 9 con NH₄OH y filtrado con papel de filtro. El pH fue ajustado para asegurar que las especies de As se encuentren desprotonadas y sean retenidas por la resina. Luego se pasaron 30 ml de NH₄OH 0,5% (v/v) para eluir los compuestos no retenidos de la columna. Por último, se eluyen los compuestos retenidos con una solución de HNO₃ 0,14 mol/L. Esta solución neutraliza las especies retenidas que tengan carácter básico, liberándolas del intercambiador aniónico. De esta última elución se colectaron 20 alícuotas de 5 ml. A estas alícuotas se les midió el pH y por ensayos realizados previamente con esta resina, ya se sabía que la mayor parte del As eluye en las primeras alícuotas con pH = 1, por lo que estas fueron las utilizadas para los análisis posteriores. Estas alícuotas fueron llevadas a pH entre 8 y 9 (ya que al parecer esta especie es más estable en pH básico [97]) y fueron congeladas a hasta su análisis luego de no más de 7 días.

4.7.3.2. Análisis instrumental

Con las alícuotas obtenidas de la SPE se realizaron diversas pruebas por HPLC-ESI-MS/MS. Estas experiencias fueron llevadas a cabo durante una estadía de una semana en el Departamento de Química del Litoral, perteneciente al Centro Universitario Regional (CENUR) Litoral Norte de la Universidad de la República, en Paysandú, Uruguay.

Una de las principales dificultades encontradas es que la publicación que reporta el descubrimiento de esta especie no especifica las condiciones instrumentales utilizadas en el espectrómetro de masa. Por este motivo se tuvieron que hacer varias pruebas preliminares con distintas condiciones en el MS.

En primer lugar, se usó oxalato de amonio 5 mmol/L; pH = 8,3; metanol 3% (v/v); 1 ml/min; de forma isocrática como eluyente para reproducir las condiciones usadas en HPLC-ICP-MS. Se usó un volumen de inyección de 50 µL. La especie Unk2 eluye en un tiempo de retención donde el gradiente aun no comenzó, por lo que en principio este no sería necesario. Se aumentó también la cantidad de metanol, ya que las fases móviles con mayor porcentaje de solvente orgánico volátil favorecen la sensibilidad en ESI-MS. Se hicieron ensayos para optimizar el Declustering Potential (DP) del MS buscando el ion molecular del DMADMA a una m/z = 259 en modo SIM. Sin

embargo, luego de algunas corridas cromatográficas ocurrió una obstrucción en el MS, probablemente debido al oxalato de la fase móvil. ESI es una fuente de ionización muy suave, por lo que es posible que la fuente no tenga la energía suficiente para descomponer el oxalato.

Se decidió no continuar con los ensayos con oxalato y se utilizó una fase móvil y condiciones más comúnmente usadas en las medidas de rutina del instrumento. En particular se usó formiato de amonio 5 mmol/L; pH = 6,5; metanol 10% (v/v); a un caudal de 0,6 ml/min. Estas condiciones de elución claramente son más débiles que las anteriormente usadas, por lo que los tiempos de retención serán mucho mayores. Por un lado, el formiato de amonio posee una única carga y es más débil como eluyente que el oxalato, y por otro lado se utilizó un caudal más bajo. Sin embargo, esto fue necesario para prevenir nuevas obstrucciones.

Debido a que no se conocía exactamente el comportamiento cromatográfico bajo estas condiciones, se decidió buscar en primer lugar el ion molecular del DMA ($m/z = 139$), ya que es esperable que la especie Unk2 eluya en un tiempo cercano al DMA. En modo SIM se encontró un pico de $m/z = 139$ después de los 30 minutos, el cual fue confirmado que se trataba de DMA al fortificar el extracto y observar un aumento en el área del pico. A continuación, se buscó simultáneamente también el ion molecular del DMADMA a $m/z = 259$ y se observó un pico que coelúa con el DMA. Se hicieron tres corridas consecutivas con distintos valores de DP: 40, 70 y 100 V. En la Figura 4.26 se muestran los cromatogramas obtenidos. Los cromatogramas correspondientes a $m/z = 139$ fueron desplazados verticalmente para facilitar la visualización. A $m/z = 259$ se observan dos picos en los cromatogramas, uno que coeluye con el DMA y uno cerca del comienzo del cromatograma. El pico al comienzo del cromatograma, cercano al tiempo muerto, probablemente resulte de la fragmentación de algún componente de la matriz, ya que su intensidad aumenta con el DP. El pico que coeluye con el DMA en cambio se observa con un DP óptimo de entre 40 y 70 V, disminuyendo su intensidad con 100 V. Se observa una inestabilidad con los tiempos de retención con inyecciones sucesivas, sin embargo el tiempo de retención luego se estabilizó en 31 minutos.

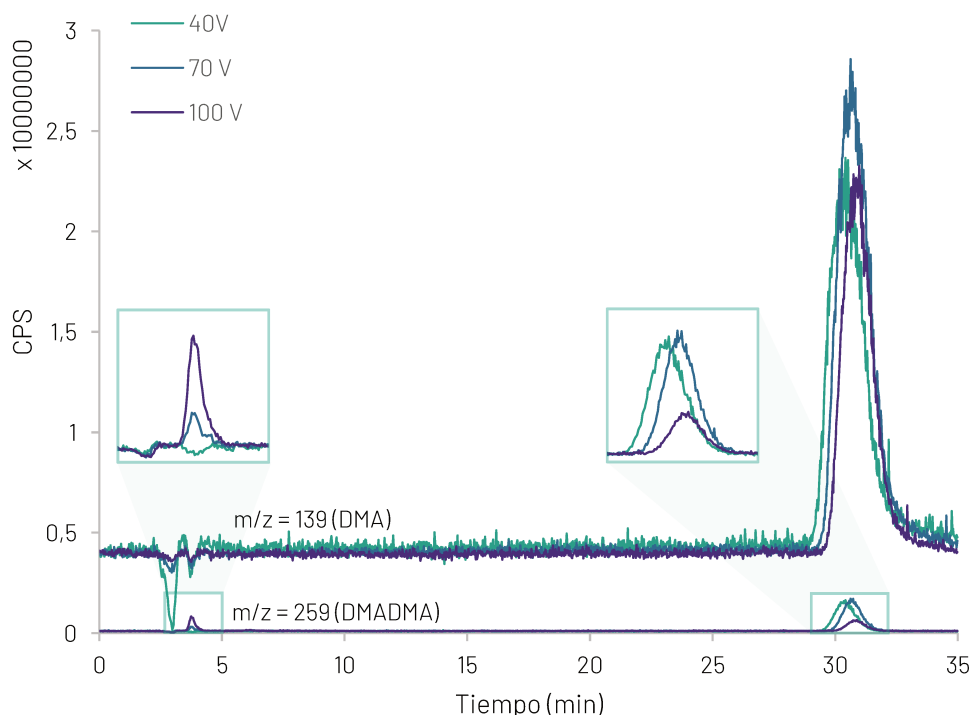
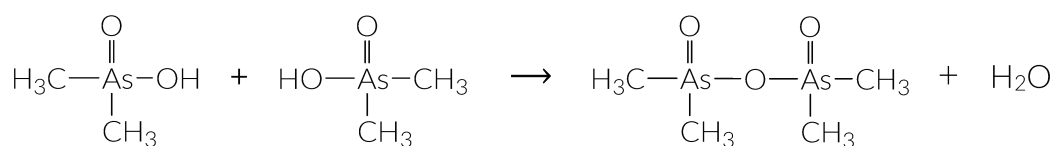


Figura 4.26. Cromatogramas obtenidos a distintos DP monitoreando las m/z 139 y 259

Utilizando un DP de 70 V se buscaron los fragmentos producidos por este pico de m/z = 259 con distintas energías de colisión (30, 45 y 60 eV). En la Figura 4.27 se muestran los espectros MS/MS obtenidos. La mayoría de las señales observadas han sido reportadas para el DMADMA, sin embargo, aparecen como señales predominantes las m/z 147 y 177, las cuales no están presentes en el espectro de bibliografía [97]. Tomando como base la estructura del DMADMA se intentó asignar estructuras que correspondan a estas m/z, pero sin éxito. Otro inconveniente que se encontró es que, teniendo en cuenta la coelución con el DMA, no se puede descartar que la señal a m/z = 259 corresponda en realidad a un producto de condensación del DMA formado en la fuente según la siguiente reacción:



PM = 137,9662 u.m.a.
[M+H]⁺ = 138,9740 u.m.a.

PM = 257,9218 u.m.a.
[M+H]⁺ = 258,9297 u.m.a.

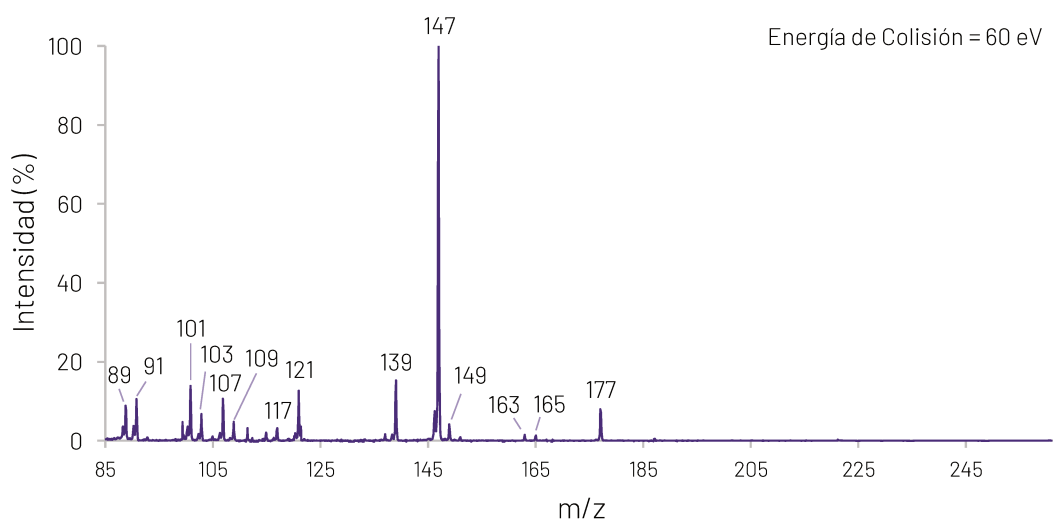
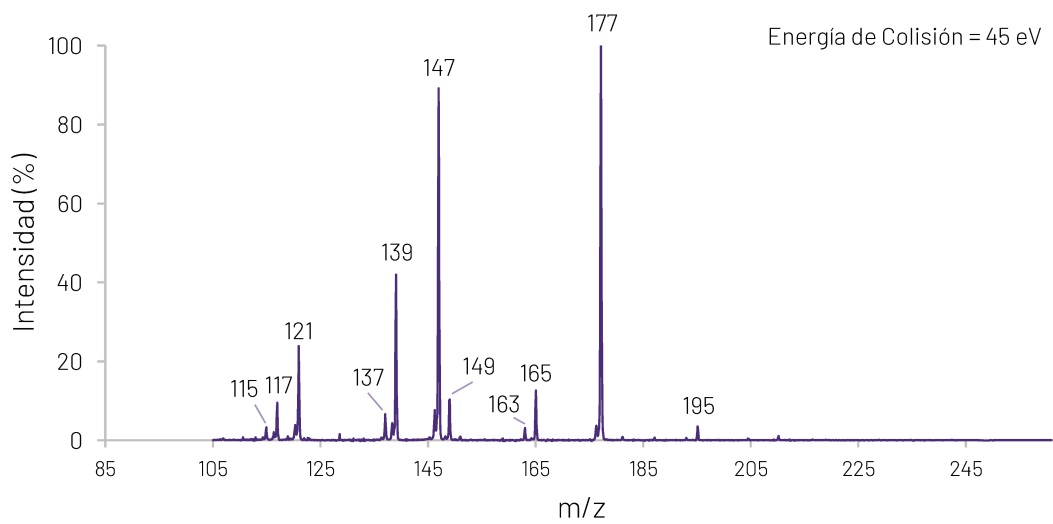
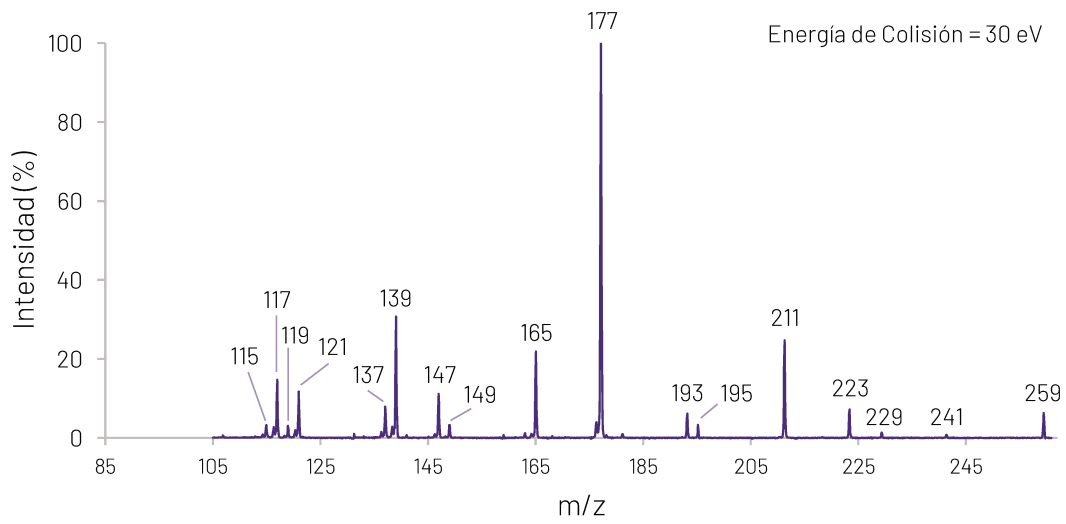


Figura 4.27. Fragmentos obtenidos del ion precursor a m/z = 259

En trabajos donde se estudió DMA por MS se observaron señales de $m/z = 259$ al usar estándares puros de esta especie, lo que confirma que esta reacción puede ocurrir [143-146]. Al ser isómeros similares y al contar con espectros de baja resolución, partiendo de la estructura de este producto de condensación es posible que se obtengan fragmentos similares a los del DMADMA, por lo que en principio esto no permite discernir entre estas dos especies. A partir del producto de condensación tampoco se pudieron explicar los iones de m/z 177 y 147.

Con estos resultados aun no es posible confirmar que Unk2 efectivamente se trate de DMADMA. Más pruebas serían necesarias para esta confirmación, y particularmente valioso sería el análisis por espectrometría de masa de alta resolución, que permitiría asignar de forma unívoca la fórmula molecular de las señales del espectro de masa.

Capítulo 5

Conclusiones

5. Conclusiones

Esta tesis presenta el desarrollo de dos métodos analíticos: uno para la determinación de Pb, Cd, As y Hg a niveles ultratrazas y otro para la especiación de As, ambos aplicados a muestras de cereales. El estudio riguroso de los puntos críticos que con frecuencia afectan las medidas analíticas a niveles ultratrazas, tales como blanco analítico, efecto de memoria y efecto de interferencias, permite dimensionar la dificultad para establecer métodos que garanticen la calidad analítica de la medida.

La optimización de los tratamientos de muestra y de los tiempos de medición, llevada a cabo de manera exhaustiva a los fines de lograr, principalmente, maximizar la vida útil de un equipo de elevado costo de mantenimiento y operativo como es el ICP-MS, fue alcanzada sin sacrificar performance analítica.

En cuanto a la determinación del contenido total de elementos químicos, a las ventajas de utilizar un sistema cerrado asistido por microondas para realizar la digestión, como son los bajos valores de blanco, buena reproducibilidad y rapidez operativa, se sumaron los estudios con relación a la presencia de C residual. Las pruebas realizadas permitieron concluir que el método puede aplicarse sin posteriores inconvenientes por interferencias de C disuelto.

También se determinó que bajo las condiciones utilizadas el Cl presente naturalmente en las muestras no provocaría interferencias sobre la determinación de As, como podría esperarse por la formación de ArCl^+ . Además, se estudió el efecto de memoria para el Hg, y el mismo pudo ser minimizado con una secuencia de lavado con HCl y HNO_3 y manteniendo las concentraciones de los estándares por debajo de los $2 \mu\text{g/L}$.

El método fue validado, obteniéndose excelentes cifras de mérito, y fue aplicado al análisis de muestras de arroz y harina de mercado y a muestras de trigo producidas en distintas regiones. Con los resultados obtenidos se aplicaron pruebas estadísticas y se observaron diferencias significativas en algunos casos según variedad, tipo o lugar de producción. En el caso de las muestras de arroz, se observaron niveles cuantificables de As, Cd y Hg en la mayoría de las muestras, mientras que en trigo y harina solo As y Cd se hallaron en niveles cuantificables en todas las muestras. El As

se encontró en niveles bastante más altos en el arroz (desde 77 $\mu\text{g}/\text{kg}$ hasta 1154 $\mu\text{g}/\text{kg}$) que en la harina (hasta 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, excepto un valor atípico de 57 $\mu\text{g}/\text{kg}$), mientras que el Cd se presentó en niveles similares en ambos tipos de muestra (alrededor de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$). El Hg fue cuantificable en muchas muestras de arroz, aunque en niveles de aproximadamente 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Respecto a las muestras de trigo se observaron grandes variaciones según el sitio de producción, mostrando las muestras de Paraná un mayor contenido de As y las de Marcos Juárez un mayor contenido de Cd.

Por otro lado, se desarrolló un método para el análisis de especiación de As en las muestras antes mencionadas. Se optimizó la extracción, encontrándose como óptimo el uso de HNO_3 0,14 mol/L a una temperatura de 125 °C durante 30 minutos en horno microondas. Con estas condiciones se obtuvieron eficiencias de extracción promedio del 94% sin evidencia de interconversión de especies. También se estudió en detalle la separación cromatográfica, proponiéndose el uso de dicarboxilatos como eluyentes. Se pudo analizar también cómo la estructura de estos influye en la performance cromatográfica de las distintas especies de As estudiadas. Los mejores resultados fueron obtenidos con oxalato de amonio como eluyente, y realizando un gradiente de elución desde 5 mmol/L hasta 40 mmol/L se logró una muy buena separación cromatográfica en 6,5 minutos para las cuatro especies de As estudiadas. Esta separación a su vez se mostró sumamente robusta en los tiempos de retención frente a inyecciones de extractos ácidos.

Este método fue validado para las muestras de arroz. En estas muestras pudieron observarse diferencias en el patrón de especiación según el tipo de arroz estudiado, siendo particularmente distinto el de los arroces pulidos. Durante el análisis de estas muestras, se encontraron 3 picos cromatográficos correspondientes a especies desconocidas. Se realizaron diversas pruebas con el objetivo de obtener más información sobre la estructura de la especie desconocida que se encontró en mayor concentración. Más ensayos son necesarios para confirmar su identidad, pero se confirmó que no se trata de un análogo tiolado o trivalente de las especies más comunes, ni tampoco alguno de los arsenozúcares más conocidos. En cuanto a las muestras de harina, se observó una predominancia de las especies inorgánicas As(III) y As(V).

Finalmente, es meritorio mencionar que ante la situación actual de revisión de los valores de ingestas tolerables para Pb y As inorgánico por parte de JECFA, ambos métodos cuentan con la potencialidad de poder ser utilizados ante escenarios regulatorios más estrictos para estos elementos en arroz y trigo.

Referencias

Referencias

- [1] World Health Organization, 10 chemicals of public health concern, WHO Newsletter (2023). <https://www.who.int/news-room/photo-story/photo-story-detail/10-chemicals-of-public-health-concern> (accessed January 26, 2023).
- [2] United States, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Toxicological profile for lead, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2020. <https://doi.org/10.15620/cdc:95222>.
- [3] United States, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Toxicological profile for cadmium, United States, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA: U.S., 2012. <https://wwwn.cdc.gov/TSP/ToxProfiles/ToxProfiles.aspx?id=48&tid=15>.
- [4] United States, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Toxicological profile for arsenic, United States, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2007. <https://doi.org/10.15620/cdc:11481>.
- [5] United States, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Toxicological Profile for Mercury (Draft for Public Comment), 2022. <https://wwwn.cdc.gov/TSP/ToxProfiles/ToxProfiles.aspx?id=115&tid=24>.
- [6] International Agency for Research on Cancer, ed., Arsenic, metals, fibres, and dusts. A review of human carcinogens, International agency for research on cancer, Lyon, 2012.
- [7] International Agency for Research on Cancer, ed., Inorganic and organic lead compounds, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 2006.
- [8] International Agency for Research on Cancer, ed., Beryllium, cadmium, mercury and exposures in the glass manufacturing industry, World Health Organization, Geneva, 1993.
- [9] J. Duffus, Glossary for chemists of terms used in toxicology (IUPAC Recommendations 1993), Pure and Applied Chemistry 65 (1993) 2003-2122. <https://doi.org/10.1351/pac199365092003>.
- [10] J.L. Herrman, M. Younes, Background to the ADI/TDI/PTWI, Regulatory Toxicology and Pharmacology 30(1999)S109-S113. <https://doi.org/10.1006/rtph.1999.1335>.
- [11] I. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Meeting (72nd : 2010 : Rome, World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Evaluation of certain contaminants in food: seventy-second [72nd] report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, (2011) 105.
- [12] S. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Meeting (73rd : 2010 : Geneva, World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Evaluation of certain food additives and contaminants: seventy-third [73rd] report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, (2011). <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44515> (accessed January 26, 2023).
- [13] I. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Meeting (67th : 2006 : Rome, World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Evaluation of certain food additives and contaminants : sixty-seventh report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Sixty-Seventh Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (2007) 94.
- [14] European Food Safety Authority (EFSA), Cadmium dietary exposure in the European population, EFSA Journal (2012). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2551>.
- [15] M. Sigrist, N. Hilbe, L. Brusa, D. Campagnoli, H. Beldoménico, Total arsenic in selected food samples from Argentina: Estimation of their contribution to inorganic arsenic dietary intake, Food Chemistry 210 (2016) 96-101. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.072>.

- [16] V.K. Sharma, M. Sohn, Aquatic arsenic: Toxicity, speciation, transformations, and remediation, *Environment International* 35 (2009) 743-759. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.01.005>.
- [17] M. Styblo, L.M. Del Razo, L. Vega, D.R. Germolec, E.L. LeCluyse, G.A. Hamilton, W. Reed, C. Wang, W.R. Cullen, D.J. Thomas, Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells, *Archives of Toxicology* 74 (2000) 289-299. <https://doi.org/10.1007/s002040000134>.
- [18] M. Styblo, A. Venkatratnam, R.C. Fry, D.J. Thomas, Origins, fate, and actions of methylated trivalent metabolites of inorganic arsenic: progress and prospects, *Arch Toxicol* 95 (2021) 1547-1572. <https://doi.org/10.1007/s00204-021-03028-w>.
- [19] C. Luvonga, C.A. Rimmer, L.L. Yu, S.B. Lee, Organoarsenicals in Seafood: Occurrence, Dietary Exposure, Toxicity, and Risk Assessment Considerations - A Review, *J. Agric. Food Chem.* 68 (2020) 943-960. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07532>.
- [20] J. Feldmann, E.M. Krupp, Critical review or scientific opinion paper: Arsenosugars— a class of benign arsenic species or justification for developing partly speciated arsenic fractionation in foodstuffs?, *Anal Bioanal Chem* 399 (2011) 1735-1741. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4303-6>.
- [21] M. Amde, Y. Yin, D. Zhang, J. Liu, Methods and recent advances in speciation analysis of mercury chemical species in environmental samples: a review, *Chemical Speciation & Bioavailability* 28 (2016) 51-65. <https://doi.org/10.1080/09542299.2016.1164019>.
- [22] T.W. Clarkson, L. Magos, The Toxicology of Mercury and Its Chemical Compounds, *Critical Reviews in Toxicology* 36 (2006) 609-662. <https://doi.org/10.1080/10408440600845619>.
- [23] G. Nordberg, B.A. Fowler, M. Nordberg, eds., *Handbook on the toxicology of metals*, Fourth edition, Elsevier, Academic Press, Amsterdam Boston Heidelberg London, 2015.
- [24] D.M. Templeton, F. Ariese, R. Cornelis, L.-G. Danielsson, H. Muntau, H.P. van Leeuwen, R. Lobinski, Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000), *Pure and Applied Chemistry* 72 (2000) 1453-1470. <https://doi.org/10.1351/pac200072081453>.
- [25] E. Bulska, A. Rusczyńska, Analytical Techniques for Trace Element Determination, *Physical Sciences Reviews* 2 (2017). <https://doi.org/10.1515/psr-2017-8002>.
- [26] J.S. Becker, Trace and ultratrace analysis in liquids by atomic spectrometry, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 24 (2005) 243-254. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.12.003>.
- [27] S. Bakirdere, F. Aydin, E.G. Bakirdere, S. Titretir, İ. Akdeniz, I. Aydin, E. Yildirim, Y. Arslan, From mg/kg to pg/kg Levels: A Story of Trace Element Determination: A Review, *Applied Spectroscopy Reviews* 46 (2011) 38-66. <https://doi.org/10.1080/05704928.2010.520179>.
- [28] R.J.C. Brown, M.J.T. Milton, Analytical techniques for trace element analysis: an overview, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 24 (2005) 266-274. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.11.010>.
- [29] H.E. Taylor, *Inductively coupled plasma-mass spectrometry: practices and techniques*, Academic Press, San Diego, 2001.
- [30] Z. Mester, R. Sturgeon, eds., *Sample preparation for trace element analysis*, 1st ed, Elsevier, Amsterdam ; Boston, 2003.
- [31] É.M.M. Flores, *Microwave-assisted sample preparation for trace element determination*, Elsevier, Amsterdam, 2014.
- [32] M.H. Gonzalez, G.B. Souza, R.V. Oliveira, L.A. Forato, J.A. Nóbrega, A.R.A. Nogueira, Microwave-assisted digestion procedures for biological samples with diluted nitric

- acid: Identification of reaction products, *Talanta* 79 (2009) 396–401. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.04.001>.
- [33] M.M. Daniel, J.D. Batchelor, C.B. Rhoades, B.T. Jones, The Effect of Digestion Temperature on Matrix Decomposition Using a High Pressure Asher, *Atomic Spectroscopy* 19(1998)6.
- [34] B. Sadee, M.E. Foulkes, S.J. Hill, Coupled techniques for arsenic speciation in food and drinking water: a review, *J. Anal. At. Spectrom.* 30 (2015) 102–118. <https://doi.org/10.1039/C4JA00269E>.
- [35] S. Foster, W. Maher, F. Krikowa, S. Apte, A microwave-assisted sequential extraction of water and dilute acid soluble arsenic species from marine plant and animal tissues, *Talanta* 71(2007)537–549. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.04.027>.
- [36] D.T. Heitkemper, N.P. Vela, K.R. Stewart, C.S. Westphal, Determination of total and speciated arsenic in rice by ion chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 16 (2001) 299–306. <https://doi.org/10.1039/b007241i>.
- [37] E. Sanz, R. Muñoz-Olivas, C. Cámara, A rapid and novel alternative to conventional sample treatment for arsenic speciation in rice using enzymatic ultrasonic probe, *Analytica Chimica Acta* 535 (2005) 227–235. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.12.021>.
- [38] T. Narukawa, K. Inagaki, T. Kuroiwa, K. Chiba, The extraction and speciation of arsenic in rice flour by HPLC-ICP-MS, *Talanta* 77 (2008) 427–432. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.07.005>.
- [39] I. Pizarro, M. Gómez, M.A. Palacios, C. Cámara, Evaluation of stability of arsenic species in rice, *Anal Bioanal Chem* 376 (2003) 102–109. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-1870-9>.
- [40] H. Qu, T.K. Mudalige, S.W. Linder, Arsenic Speciation in Rice by Capillary Electrophoresis/Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Enzyme-Assisted Water-Phase Microwave Digestion, *J. Agric. Food Chem.* 63 (2015) 3153–3160. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00446>.
- [41] J. Dai, Z. Tang, A.-X. Gao, B. Planer-Friedrich, P.M. Kopittke, F.-J. Zhao, P. Wang, Widespread Occurrence of the Highly Toxic Dimethylated Monothioarsenate (DMMTA) in Rice Globally, *Environ. Sci. Technol.* 56 (2022) 3575–3586. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c08394>.
- [42] B.A. Sadee, M.E. Foulkes, S.J. Hill, An evaluation of extraction techniques for arsenic in staple diets (fish and rice) utilising both classical and enzymatic extraction methods, *Food Additives & Contaminants: Part A* 33 (2016) 433–441. <https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1132479>.
- [43] A.H. Ackerman, P.A. Creed, A.N. Parks, M.W. Fricke, C.A. Schwegel, J.T. Creed, D.T. Heitkemper, N.P. Vela, Comparison of a Chemical and Enzymatic Extraction of Arsenic from Rice and an Assessment of the Arsenic Absorption from Contaminated Water by Cooked Rice, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 5241–5246. <https://doi.org/10.1021/es048150n>.
- [44] A.E. Colina Blanco, C.F. Kerl, B. Planer-Friedrich, Detection of Thioarsenates in Rice Grains and Rice Products, *J. Agric. Food Chem.* 69 (2021) 2287–2294. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c06853>.
- [45] J.L. Guzmán Mar, L. Hinojosa Reyes, G.M. Mizanur Rahman, H.M.S. Kingston, Simultaneous Extraction of Arsenic and Selenium Species From Rice Products by Microwave-Assisted Enzymatic Extraction and Analysis by Ion Chromatography-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 3005–3013. <https://doi.org/10.1021/jf803598k>.
- [46] V. Dufailly, M. Nicolas, R. Janique-Payot, E. Poitevin, Validation of a Method for Arsenic Speciation in Food by Ion Chromatography-Inductively Coupled Plasma/Mass

- Spectrometry After Ultrasonic-Assisted Enzymatic Extraction, *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 94 (2011) 947–958. <https://doi.org/10.1093/jaoac/94.3.947>.
- [47] J.-H. Huang, P. Fecher, G. Ilgen, K.-N. Hu, J. Yang, Speciation of arsenite and arsenate in rice grain – Verification of nitric acid based extraction method and mass sample survey, *Food Chemistry* 130 (2012) 453–459. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.059>.
- [48] J.-H. Huang, G. Ilgen, P. Fecher, Quantitative chemical extraction for arsenic speciation in rice grains, *J. Anal. At. Spectrom.* 25 (2010) 800. <https://doi.org/10.1039/c002306j>.
- [49] M. Welna, A. Szymczycha-Madeja, P. Pohl, Comparison of strategies for sample preparation prior to spectrometric measurements for determination and speciation of arsenic in rice, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 65 (2015) 122–136. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.11.007>.
- [50] A.A. Ammann, Arsenic Speciation Analysis by Ion Chromatography – A Critical Review of Principles and Applications, *AJAC* 02 (2011) 27–45. <https://doi.org/10.4236/ajac.2011.21004>.
- [51] M.-L. Chen, L.-Y. Ma, X.-W. Chen, New procedures for arsenic speciation: A review, *Talanta* 125 (2014) 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.02.037>.
- [52] M.S. Reid, K.S. Hoy, J.R.M. Schofield, J.S. Uppal, Y. Lin, X. Lu, H. Peng, X.C. Le, Arsenic speciation analysis: A review with an emphasis on chromatographic separations, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 123 (2020) 115770. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115770>.
- [53] L.S. Milstein, A. Essader, E.D. Pellizzari, R.A. Fernando, O. Akinbo, Selection of a suitable mobile phase for the speciation of four arsenic compounds in drinking water samples using ion-exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry, *Environment International* 28 (2002) 277–283. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(02\)00035-1](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(02)00035-1).
- [54] M. Grotti, A. Terol, J.L. Todolí, Speciation analysis by small-bore HPLC coupled to ICP-MS, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 61 (2014) 92–106. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.06.009>.
- [55] I. Komorowicz, D. Barańkiewicz, Arsenic and its speciation in water samples by high performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry—Last decade review, *Talanta* 84 (2011) 247–261. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.10.065>.
- [56] G. Raber, N. Stock, P. Hanel, M. Murko, J. Navratilova, K.A. Francesconi, An improved HPLC-ICPMS method for determining inorganic arsenic in food: Application to rice, wheat and tuna fish, *Food Chemistry* 134 (2012) 524–532. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.113>.
- [57] M.M. Nearing, I. Koch, K.J. Reimer, Complementary arsenic speciation methods: A review, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 99 (2014) 150–162. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2014.07.001>.
- [58] K.A. Francesconi, J.S. Edmonds, R.V. Stick, Synthesis, NMR spectra and chromatographic properties of five trimethylarsonioribosides, *Appl. Organomet. Chem.* 8 (1994) 517–523. <https://doi.org/10.1002/aoc.590080604>.
- [59] S.M. Webb, J.-F. Gaillard, L.Q. Ma, C. Tu, XAS Speciation of Arsenic in a Hyper-Accumulating Fern, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 754–760. <https://doi.org/10.1021/es0258475>.
- [60] P.G. Smith, I. Koch, R.A. Gordon, D.F. Mandoli, B.D. Chapman, K.J. Reimer, X-ray Absorption Near-Edge Structure Analysis of Arsenic Species for Application to Biological Environmental Samples, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 248–254. <https://doi.org/10.1021/es049358b>.

- [61] E. Suess, A.C. Scheinost, B.C. Bostick, B.J. Merkel, D. Wallschlaeger, B. Planer-Friedrich, Discrimination of Thioarsenites and Thioarsenates by X-ray Absorption Spectroscopy, *Anal. Chem.* 81(2009) 8318–8326. <https://doi.org/10.1021/ac901094b>.
- [62] H. Chassaigne, Elemental speciation analysis in biochemistry by electrospray mass spectrometry, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 19 (2000) 300–313. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(99\)00217-4](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(99)00217-4).
- [63] V.A.T. Reis, A.C. Duarte, Analytical methodologies for arsenic speciation in macroalgae: A critical review, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 102 (2018) 170–184. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.02.003>.
- [64] J. Feldmann, What can the different current-detection methods offer for element speciation?, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 24 (2005) 228–242. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.11.011>.
- [65] R.B. Cole, ed., *Electrospray and MALDI mass spectrometry: fundamentals, instrumentation, practicalities and biological applications*, 2. ed, Wiley, Hoboken, NJ, 2010.
- [66] L. Sleno, D.A. Volmer, Ion activation methods for tandem mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 39(2004) 1091–1112. <https://doi.org/10.1002/jms.703>.
- [67] A. Steckel, G. Schlosser, *An Organic Chemist's Guide to Electrospray Mass Spectrometric Structure Elucidation*, *Molecules* 24(2019) 611. <https://doi.org/10.3390/molecules24030611>.
- [68] L. Jorhem, C. Åstrand, B. Sundström, M. Baxter, P. Stokes, J. Lewis, K.P. Grawé, Elements in rice from the Swedish market: 1. Cadmium, lead and arsenic (total and inorganic), *Food Additives & Contaminants: Part A* 25 (2008) 284–292. <https://doi.org/10.1080/02652030701474219>.
- [69] A. Ruttens, K. Cheyns, A.C. Blanpain, L. De Temmerman, N. Waegeneers, Arsenic speciation in food in Belgium. Part 2: Cereals and cereal products, *Food and Chemical Toxicology* 118(2018) 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.04.040>.
- [70] T. Mu, T. Wu, T. Zhou, Z. Li, Y. Ouyang, J. Jiang, D. Zhu, J. Hou, Z. Wang, Y. Luo, P. Christie, L. Wu, Geographical variation in arsenic, cadmium, and lead of soils and rice in the major rice producing regions of China, *Science of The Total Environment* 677(2019) 373–381. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.337>.
- [71] L. Li, H. Feng, J. Wei, Toxic element (As and Hg) content and health risk assessment of commercially available rice for residents in Beijing based on their dietary consumption, *Environ Sci Pollut Res* 27 (2020) 13205–13214. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07790-9>.
- [72] B.L. Batista, V.C. De Oliveira Souza, F.G. Da Silva, F. Barbosa, Jr, Survey of 13 trace elements of toxic and nutritional significance in rice from Brazil and exposure assessment, *Food Additives and Contaminants: Part B* 3 (2010) 253–262. <https://doi.org/10.1080/19393210.2010.516024>.
- [73] P. Brizio, A. Benedetto, S. Squadrone, A. Curcio, M. Pellegrino, M. Ferrero, M.C. Abete, Heavy metals and essential elements in Italian cereals, *Food Additives & Contaminants: Part B* 9(2016) 261–267. <https://doi.org/10.1080/19393210.2016.1209572>.
- [74] S. Nookabkaew, N. Rangkadilok, C. Mahidol, G. Promsuk, J. Satayavivad, Determination of Arsenic Species in Rice from Thailand and Other Asian Countries Using Simple Extraction and HPLC-ICP-MS Analysis, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 6991–6998. <https://doi.org/10.1021/jf4014873>.
- [75] F.-J. Zhao, Y.-G. Zhu, A.A. Meharg, Methylated Arsenic Species in Rice: Geographical Variation, Origin, and Uptake Mechanisms, *Environ. Sci. Technol.* 47 (2013) 3957–3966. <https://doi.org/10.1021/es304295n>.
- [76] Y.J. Zavala, R. Gerads, H. Gürleyük, J.M. Duxbury, Arsenic in Rice: II. Arsenic Speciation in USA Grain and Implications for Human Health, *Environ. Sci. Technol.* 42(2008) 3861–3866. <https://doi.org/10.1021/es702748q>.

- [77] D.T. Heitkemper, K.M. Kubachka, P.R. Halpin, M.N. Allen, N.V. Shockey, Survey of total arsenic and arsenic speciation in US-produced rice as a reference point for evaluating change and future trends, *Food Additives and Contaminants: Part B* 2 (2009) 112–120. <https://doi.org/10.1080/02652030903148298>.
- [78] S.S. Farias, A. Londonio, C. Quintero, R. Befani, M. Soro, P. Smichowski, On-line speciation and quantification of four arsenical species in rice samples collected in Argentina using a HPLC–HG–AFS coupling, *Microchemical Journal* 120 (2015) 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2014.12.010>.
- [79] J. Schlotthauer, L. Brusa, C. Liberman, M. Durand, A. Livore, M. Sigrist, Determination of inorganic arsenic in Argentinean rice by selective HGAAS: Analytical performance for paddy, brown and polished rice, *Journal of Food Composition and Analysis* 91(2020)103506. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103506>.
- [80] J.M. Oteiza, P.A. Barril, C.E. Quintero, M. Savio, R. Befani, A.F. Cirelli, N.S. Echegaray, C. Murad, A. Buedo, Arsenic in Argentinean polished rice: Situation overview and regulatory framework, *Food Control* 109 (2020) 106909. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106909>.
- [81] A.A. Meharg, P.N. Williams, E. Adomako, Y.Y. Lawgali, C. Deacon, A. Villada, R.C.J. Cambell, G. Sun, Y.-G. Zhu, J. Feldmann, A. Raab, F.-J. Zhao, R. Islam, S. Hossain, J. Yanai, Geographical Variation in Total and Inorganic Arsenic Content of Polished (White) Rice, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 1612–1617. <https://doi.org/10.1021/es802612a>.
- [82] T. Sarwar, S. Khan, S. Muhammad, S. Amin, Arsenic speciation, mechanisms, and factors affecting rice uptake and potential human health risk: A systematic review, *Environmental Technology & Innovation* 22 (2021) 101392. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101392>.
- [83] M. Carey, C. Meharg, P. Williams, E. Marwa, X. Jiujin, J.G. Farias, P.M.C.S. De Silva, A. Signes-Pastor, Y. Lu, F.T. Nicoloso, L. Savage, K. Campbell, C. Elliott, E. Adomako, A.J. Green, E. Moreno-Jiménez, Á.A. Carbonell-Barrachina, E.A. Triwardhani, F.I. Pandiangan, P.I. Haris, Y.F. Lawgali, A. Sommella, M. Pigna, C. Brabet, D. Montet, K. Njira, M.J. Watts, A.A. Meharg, Global Sourcing of Low-Inorganic Arsenic Rice Grain, *Expo Health* 12 (2020) 711–719. <https://doi.org/10.1007/s12403-019-00330-y>.
- [84] P.N. Williams, A.H. Price, A. Raab, S.A. Hossain, J. Feldmann, A.A. Meharg, Variation in Arsenic Speciation and Concentration in Paddy Rice Related to Dietary Exposure, *Environ. Sci. Technol.* 39(2005)5531–5540. <https://doi.org/10.1021/es0502324>.
- [85] R. Jedrzejczak, Determination of total mercury in foods of plant origin in Poland by cold vapour atomic absorption spectrometry, *Food Additives and Contaminants* 19 (2002) 996–1002. <https://doi.org/10.1080/02652030210151912>.
- [86] R. Jędrzejczak, W. Ręczajska, Lead and cadmium content in wheat grain from different regions of Poland and risk analysis, *Journal of Water and Land Development* (2022) 192–199. <https://doi.org/10.24425/jwld.2022.142321>.
- [87] K. Cai, Y. Yu, M. Zhang, K. Kim, Concentration, Source, and Total Health Risks of Cadmium in Multiple Media in Densely Populated Areas, China, *IJERPH* 16 (2019) 2269. <https://doi.org/10.3390/ijerph16132269>.
- [88] F. Cubadda, S. Ciardullo, M. D'Amato, A. Raggi, F. Aureli, M. Carcea, Arsenic Contamination of the Environment–Food Chain: A Survey on Wheat as a Test Plant To Investigate Phytoavailable Arsenic in Italian Agricultural Soils and as a Source of Inorganic Arsenic in the Diet, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 10176–10183. <https://doi.org/10.1021/jf102084p>.
- [89] M. D'Amato, F. Aureli, S. Ciardullo, A. Raggi, F. Cubadda, 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(2011)207–213. <https://doi.org/10.1039/C0JA00125B>.

- [90] H. Rasheed, P. Kay, R. Slack, Y.Y. Gong, Arsenic species in wheat, raw and cooked rice: Exposure and associated health implications, *Science of The Total Environment* 634 (2018) 366–373. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.339>.
- [91] F.-J. Zhao, J.L. Stroud, T. Eagling, S.J. Dunham, S.P. McGrath, P.R. Shewry, Accumulation, Distribution, and Speciation of Arsenic in Wheat Grain, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 5464–5468. <https://doi.org/10.1021/es100765g>.
- [92] A. Londonio, E. Morzán, P. Smichowski, Determination of toxic and potentially toxic elements in rice and rice-based products by inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Food Chemistry* 284 (2019) 149–154. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.104>.
- [93] G.M.A. Bermudez, R. Jasan, R. Plá, M.L. Pignata, Heavy metal and trace element concentrations in wheat grains: Assessment of potential non-carcinogenic health hazard through their consumption, *Journal of Hazardous Materials* 193 (2011) 264–271. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.07.058>.
- [94] R.S. Lavado, Concentration of potentially toxic elements in field crops grown near and far from cities of the Pampas (Argentina), *Journal of Environmental Management* 80 (2006) 116–119. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2005.09.003>.
- [95] D. Wiersma, B.J. Van Goor, N.G. Van der Veen, Cadmium, lead, mercury and arsenic concentrations in crops and corresponding soils in the Netherlands, *J. Agric. Food Chem.* 34 (1986) 1067–1074. <https://doi.org/10.1021/jf00072a033>.
- [96] H.R. Hansen, A. Raab, A.H. Price, G. Duan, Y. Zhu, G.J. Norton, J. Feldmann, A.A. Meharg, Identification of tetramethylarsonium in rice grains with elevated arsenic content, *J. Environ. Monit.* 13 (2011) 32–34. <https://doi.org/10.1039/C0EM00460J>.
- [97] A. Raab, K. Kubachka, M. Strohmaier, M. Preihs, J. Feldmann, New arsenic compound identified in rice grain: dimethylarsonyldimethylarsinic acid, *Environ. Chem.* (2022). <https://doi.org/10.1071/EN22063>.
- [98] I. Mancini, G. Guella, M. Frostin, E. Hnawia, D. Laurent, C. Debitus, F. Pietra, On the First Polyarsenic Organic Compound from Nature: Arsenicin A from the New Caledonian Marine Sponge *Echinochalina bargibanti*, *Chem. Eur. J.* 12 (2006) 8989–8994. <https://doi.org/10.1002/chem.200600783>.
- [99] P. Tähtinen, G. Guella, G. Saielli, C. Debitus, E. Hnawia, I. Mancini, New Sulfur-Containing Polyarsenicals from the New Caledonian Sponge *Echinochalina bargibanti*, *Marine Drugs* 16 (2018) 382. <https://doi.org/10.3390/md16100382>.
- [100] R.C. Richter, J.A. Nóbrega, C. Pirola, *Think blank: clean chemistry tools for atomic spectroscopy*, 1st edition, Milestone Press, Sorisole, 2016.
- [101] X.-K. Zhu, J. Benefield, T.B. Coplen, Z. Gao, N.E. Holden, Variation of lead isotopic composition and atomic weight in terrestrial materials (IUPAC Technical Report), *Pure and Applied Chemistry* 93 (2021) 155–166. <https://doi.org/10.1515/pac-2018-0916>.
- [102] U.S. Food and Drug Administration, Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometric Determination of Arsenic, Cadmium, Chromium, Lead, Mercury, and Other Elements in Food Using Microwave Assisted Digestion, Version 1.2, in: *FDA Elemental Analysis Manual*, 2020. <http://www.fda.gov/EAM> (accessed January 26, 2023).
- [103] T.W. May, R.H. Wiedmeyer, A table of polyatomic interferences in ICP-MS, *Atomic Spectroscopy* 19 (1998) 150–155.
- [104] C. Støving, H. Jensen, B. Gammelgaard, S. Stürup, Development and validation of an ICP-OES method for quantitation of elemental impurities in tablets according to coming US pharmacopeia chapters, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 84 (2013) 209–214. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.06.007>.
- [105] D.R. Jones, J.M. Jarrett, D.S. Tevis, M. Franklin, N.J. Mullinix, K.L. Wallon, C. Derrick Quarles, K.L. Caldwell, R.L. Jones, Analysis of whole human blood for Pb, Cd, Hg, Se, and Mn by ICP-DRC-MS for biomonitoring and acute exposures, *Talanta* 162 (2017) 114–122. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.09.060>.

- [106] X. Zhu, S.D. Alexandratos, Determination of trace levels of mercury in aqueous solutions by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry: Elimination of the 'memory effect,' *Microchemical Journal* 86 (2007) 37-41. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2006.09.004>.
- [107] M. Wang, W. Feng, J. Shi, F. Zhang, B. Wang, M. Zhu, B. Li, Y. Zhao, Z. Chai, Development of a mild mercaptoethanol extraction method for determination of mercury species in biological samples by HPLC-ICP-MS, *Talanta* 71 (2007) 2034-2039. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.09.012>.
- [108] M. Riisom, B. Gammelgaard, I.H. Lambert, S. Stürup, Development and validation of an ICP-MS method for quantification of total carbon and platinum in cell samples and comparison of open-vessel and microwave-assisted acid digestion methods, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 158 (2018) 144-150. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.05.038>.
- [109] G. Grindlay, J. Mora, M. de Loos-Vollebregt, F. Vanhaecke, A systematic study on the influence of carbon on the behavior of hard-to-ionize elements in inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 86 (2013) 42-49. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2013.05.002>.
- [110] M. Pettine, B. Casentini, D. Mastroianni, S. Capri, Dissolved inorganic carbon effect in the determination of arsenic and chromium in mineral waters by inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta* 599 (2007) 191-198. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.08.016>.
- [111] B. Magnusson, U. Örnemark, eds., *Eurachem Guide: The fitness for purpose of analytical methods - a laboratory guide to method validation and related topics*, 2nd ed, Eurachem, Teddington, 2014.
- [112] D.C. Harris, C.A. Lucy, *Quantitative chemical analysis*, Ninth edition, W.H. Freeman & Company, New York, 2016.
- [113] Joint Committee for Guides in Metrology, *Vocabulario Internacional de Metrología: Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados*, 3rd ed., 2012.
- [114] G.W. Latimer, AOAC International, eds., *Official methods of analysis of AOAC International*, 20th Edition, AOAC International, Gaithersburg, Md, 2016.
- [115] M. Thompson, Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing, *Analyst* 125 (2000) 385-386. <https://doi.org/10.1039/b000282h>.
- [116] S.E. Maxwell, H.D. Delaney, K. Kelley, *Designing experiments and analyzing data: a model comparison perspective*, Third edition, Routledge, New York London, 2018.
- [117] Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, Código Alimentario Argentino, n.d. https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/capitulo_ix_harinasactualiz_2022-08.pdf.
- [118] MERCOSUR/GMC/Res. N° 34/10. Reglamento técnico MERCOSUR sobre aditivos alimentarios autorizados para ser utilizados según las buenas prácticas de fabricación (BPF) (derogación de la Res. GMC N° 86/96), n.d. <https://normas.mercosur.int/public/normativas/1840>.
- [119] D. Giordano, M. Blandino, Arsenic, lead and cadmium distribution in the pearled fractions of different winter wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.), *Journal of Cereal Science* 80 (2018) 94-101. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.02.002>.
- [120] B. Yan, M.-P. Isaure, S. Mounicou, H. Castillo-Michel, W. De Nolf, C. Nguyen, J.-Y. Cornu, Cadmium distribution in mature durum wheat grains using dissection, laser ablation-ICP-MS and synchrotron techniques, *Environmental Pollution* 260 (2020) 113987. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.113987>.
- [121] J. Schlotthauer, C. Simonetto, L. Brusa, M. Sigrist, Performance of Dicarboxylates for the Separation of Arsenic Species by Anion Exchange Chromatography, *Chromatographia* 86 (2023) 201-211. <https://doi.org/10.1007/s10337-023-04245-4>.

- [122] W.M. Haynes, W.M. Haynes, D.R. Lide, T.J. Bruno, CRC handbook of chemistry and physics: a ready-reference book of chemical and physical data., 2017. <https://public.ebookcentral.proquest.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=4711508> (accessed February 26, 2022).
- [123] M. Windholz, ed., The Merck index: an encyclopedia of chemicals and drugs, 9th ed, Merck, Rahway, N.J, 1976.
- [124] W.M. Haynes, CRC handbook of chemistry and physics, 2014. <https://www.taylor-francis.com/books/e/9781482208689> (accessed February 27, 2022).
- [125] Pedersen, K. J., The dissociation constants of dihydroxytartaric and tartronic acids, *Acta Chemica Scandinavica* 9(1955)1634–1639.
- [126] T.A. Maryutina, E.Yu. Savonina, P.S. Fedotov, R.M. Smith, H. Siren, D.B. Hibbert, Terminology of separation methods (IUPAC Recommendations 2017), *Pure and Applied Chemistry* 90 (2018) 181–231. <https://doi.org/10.1515/pac-2017-0111>.
- [127] E. Avigliano, J. Schlotthauer, B.M. De Carvalho, M. Sigrist, A.V. Volpedo, Inter- and intra-stock bioaccumulation of anionic arsenic species in an endangered catfish from South American estuaries: Risk assessment through consumption, *Journal of Food Composition and Analysis* 87 (2020) 103404. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103404>.
- [128] B. Klencsár, C. Sánchez, L. Balcaen, J. Todolí, F. Lynen, F. Vanhaecke, Comparative evaluation of ICP sample introduction systems to be used in the metabolite profiling of chlorine-containing pharmaceuticals via HPLC-ICP-MS, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 153 (2018) 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.02.031>.
- [129] A.-R. Allouche, Gabedit-A graphical user interface for computational chemistry softwares, *J. Comput. Chem.* 32 (2011) 174–182. <https://doi.org/10.1002/jcc.21600>.
- [130] Stewart, J. J. P, MOPAC2016, (n.d.). [HTTP://OpenMOPAC.net/](http://OpenMOPAC.net/).
- [131] J.J.P. Stewart, Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters, *J Mol Model* 19 (2013) 1–32. <https://doi.org/10.1007/s00894-012-1667-x>.
- [132] Jmol: an open-source Java viewer for chemical structures in 3D, (n.d.). <http://www.jmol.org/>.
- [133] D.P. Lee, A New Anion Exchange Phase for Ion Chromatography, *Journal of Chromatographic Science* 22 (1984) 5.
- [134] D. Marcovich, R.E. Tapscott, Carbon-13 NMR studies on arsenic(III) and antimony(III) dihydroxydicarboxylate complexes, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 5712–5717. <https://doi.org/10.1021/ja00538a002>.
- [135] D. Pröfrock, A. Prange, Inductively Coupled Plasma–Mass Spectrometry (ICP-MS) for Quantitative Analysis in Environmental and Life Sciences: A Review of Challenges, Solutions, and Trends, *Appl Spectrosc* 66(2012)843–868. <https://doi.org/10.1366/12-06681>.
- [136] E. Schmeisser, R. Raml, K.A. Francesconi, D. Kuehnelt, A.-L. Lindberg, C. Sörös, W. Goessler, Thio arsenosugars identified as natural constituents of mussels by liquid chromatography-mass spectrometry, *Chem. Commun.* (2004) 1824–1825. <https://doi.org/10.1039/B406917J>.
- [137] S.K.V. Yathavakilla, M. Fricke, P.A. Creed, D.T. Heitkemper, N.V. Shockey, C. Schwegel, J.A. Caruso, J.T. Creed, Arsenic Speciation and Identification of Monomethylarsonous Acid and Monomethylthioarsonic Acid in a Complex Matrix, *Anal. Chem.* 80 (2008) 775–782. <https://doi.org/10.1021/ac0714462>.
- [138] S. McSheehy, J. Szpunar, R. Lobinski, V. Haldys, J. Tortajada, J.S. Edmonds, Characterization of Arsenic Species in Kidney of the Clam *Tridacna d. erasa* by Multidimensional Liquid Chromatography-ICPMS and Electrospray Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 74 (2002) 2370–2378. <https://doi.org/10.1021/ac011136y>.

- [139] C. Niegel, F.-M. Matysik, Analytical methods for the determination of arsenosugars— A review of recent trends and developments, *Analytica Chimica Acta* 657 (2010) 83–99. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.10.041>.
- [140] V. Nischwitz, S.A. Pergantis, Liquid Chromatography Online with Selected Reaction Monitoring Electrospray Mass Spectrometry for the Determination of Organoarsenic Species in Crude Extracts of Marine Reference Materials, *Anal. Chem.* 77(2005)5551–5563. <https://doi.org/10.1021/ac050445b>.
- [141] M. Van Hulle, C. Zhang, X. Zhang, R. Cornelis, Arsenic speciation in Chinese seaweeds using HPLC-ICP-MS and HPLC-ES-MS, *Analyst* 127 (2002) 634–640. <https://doi.org/10.1039/b110940e>.
- [142] C. Garcia-Sartal, S. Taebunpakul, E. Stokes, M. del C. Barciela-Alonso, P. Bermejo-Barrera, H. Goenaga-Infante, Two-dimensional HPLC coupled to ICP-MS and electrospray ionisation (ESI)-MS/MS for investigating the bioavailability in vitro of arsenic species from edible seaweed, *Anal Bioanal Chem* 402 (2012) 3359–3369. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5483-4>.
- [143] Y. Inoue, Y. Date, T. Sakai, N. Shimizu, K. Yoshida, H. Chen, K. Kuroda, G. Endo, Identification and Quantification by LC-MS and LC-ICP MS of Arsenic Species in Urine of Rats Chronically Exposed to Dimethylarsinic Acid (DMAA), *Applied Organometallic Chemistry* 13 (1999) 81–88. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0739\(199902\)13:2%3C81::AID-AOC802%3E3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0739(199902)13:2%3C81::AID-AOC802%3E3.0.CO;2-B).
- [144] H.R. Hansen, A. Raab, M. Jaspars, B.F. Milne, J. Feldmann, 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(2004)1086–1091. <https://doi.org/10.1021/tx049978q>.
- [145] S. Jeong, H. Lee, Y.-T. Kim, H.-O. Yoon, Development of a simultaneous analytical method to determine arsenic speciation using HPLC-ICP-MS: Arsenate, arsenite, monomethylarsonic acid, dimethylarsinic acid, dimethyldithioarsinic acid, and dimethylmonothioarsinic acid, *Microchemical Journal* 134 (2017) 295–300. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.06.011>.
- [146] M.H. Florêncio, M.F. Duarte, A.M.M. De Bettencourt, M.L. Gomes, L.F. Vilas Boas, Electrospray Mass Spectra of Arsenic Compounds, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 11 (1997) 469–473. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(199703\)11:5<469::AID-RCM831>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(199703)11:5<469::AID-RCM831>3.0.CO;2-7).

Anexo
