

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIRIQUÍ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS CON ÉNFASIS EN
INOCUIDAD ALIMENTARIA**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
MÁSTER EN CIENCIAS QUÍMICAS CON ÉNFASIS EN INOCUIDAD
ALIMENTARIA**

**DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE METALES Y
METALOIDES PESADOS EN ARROZ PROCESADO EN LA
PROVINCIA DE CHIRIQUÍ**

**PRESENTADO POR
ALBERTINA MONTENEGRO NÚÑEZ**

DAVID, MAYO DE 2019

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer en primera instancia al **Dr. José Luis Gómez Ariza** y al personal del **Laboratorio Medioambiental de la Universidad de Huelva**, quienes proporcionaron los materiales, equipos, así como todo el conocimiento para que los análisis pudieran ser efectuados.

A mis asesores, profesores: **Marco Tulio Guillén, Rosa Elena Caballero y Víctor Jiménez**, pilares fundamentales para desarrollar la investigación; quienes con su orientación y experiencia hicieron posible culminar con esta etapa.

A la Dra. **Ariadna Batista**, coordinadora de la Maestría en Ciencias Químicas con Énfasis en Inocuidad Alimentaria, por sus múltiples diligencias para que el programa finaliza y por sus orientaciones a lo largo del mismo.

A los profesores del programa de la MCQIA, por los conocimientos recibidos durante la formación académica.

A la profesora Hilda Pittí, por su apoyo en diferentes etapas de la tesis.

A mis compañeros de maestría, por ser parte de este caminar durante estos años. Gracias por las vivencias, conocimientos y momentos compartidos. En especial a mi amiga Giselle, con quien compartí las más difíciles pruebas durante estos estudios y a quien agradezco su confianza, apoyo y motivación.

A mis familiares, porque en los momentos difíciles pude contar con ese pilar necesario para salir adelante.

A mi amiga, la profesora Elba de González, quien como otro familiar me brindó apoyo, consejos y por transmitirme la confianza necesaria para poder seguir adelante.

Pero mi mayor agradecimiento quiero manifestarlo a mi hija **Alanis**, por su tolerancia, por ser mi motivo de superación. Por el tiempo que le resté para dedicarlo al estudio. Gracias por cada sábado que soportaste en el aula de clases.

Pero sobre todo quiero agradecer a **Dios**, por mantenerme con salud y permitirme poder culminar esta etapa de mi formación académica, por dar la fortaleza necesaria para no claudicar.

Tabla de Contenidos

HOJA DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL EXAMINADOR.....	i
AGRADECIMIENTO.....	ii
DEDICATORIA.....	iv
ÍNDICE DE CUADROS.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
INTRODUCCIÓN.....	6
RESUMEN.....	8
1. ASPECTOS GENERALES.....	10
1.1. Antecedentes del Problema.....	10
1.2. Situación Actual en Panamá.....	14
1.2.1. Producción e importación de arroz en Panamá.....	14
1.2.1.1. Producción de arroz a nivel internacional y nacional.....	14
1.2.2. Importación de arroz en Panamá.....	17
1.2.3. Planteamiento del Problema.....	18
1.3. Hipótesis.....	19
1.4. Objetivos.....	20
1.4.1. Objetivo General.....	20
1.4.2. Objetivos Específicos.....	20
1.5. Justificación.....	20
1.6. Delimitación, Alcance o Cobertura.....	21
1.7. Limitaciones.....	21
2. MARCO TEÓRICO.....	24
2.1. Características del arroz.....	24
2.2. Propiedades fisicoquímicas y origen de los elementos estudiados.....	25
2.2.1. Arsénico.....	25
2.2.2. Cadmio.....	26
2.2.3. Cobre.....	27
2.2.4. Cromo.....	28
2.2.5. Plomo.....	30
2.3. Aspectos toxicológicos de los elementos estudiados.....	31

2.3.1. Arsénico	32
2.3.2. Cadmio	35
2.3.3. Cobre	39
2.3.4. Cromo	42
2.3.5. Plomo	44
2.4. Mecanismo de transporte de metales en las plantas de arroz	47
2.4.1. Transporte de arsénico	49
2.4.1.1. Transporte de As en los nodos de arroz	51
2.4.2. Transporte de cadmio	51
2.4.2.1. Admisión por raíces	53
2.4.2.2. Carga de xilema y translocación de raíz a brote	53
2.4.2.3. Transporte de floema hacia los granos	54
2.4.3. Transporte de cobre	56
2.4.4. Transporte de cromo	57
2.4.5. Transporte de plomo	59
2.4.5.1. Captación de plomo por las plantas	59
2.4.5.2. Acumulación de plomo en las plantas	60
2.5. Valores máximos permitidos de metales pesados en arroz	61
2.6. Análisis de metales pesados	62
2.6.1. Determinación de la concentración total de metales pesados	62
2.6.1.1. Preparación de la muestra y extracción	62
2.6.1.2. Principio del ICP-MS	63
2.6.1.3. Detección, identificación y cuantificación	64
2.6.1.4. Control de calidad	66
2.6.2. Especiación de arsénico	67
2.6.2.1. Conceptos previos	67
2.6.2.2. Preparación de la muestra	68
2.6.2.3. Extracción	69
2.6.2.4. Detección y cuantificación	72
3. ASPECTOS METODOLÓGICOS	76
3.1. Tipo de investigación	76
3.1.1. Definición	76

3.2. Sujetos o fuentes de información	76
3.3. Definición conceptual, instrumental y operacional de las variables.....	76
3.4. Población y muestra	78
3.4.1. Muestreo	78
3.5. Métodos e instrumentos de investigación.....	79
3.5.1. Entrevistas	79
3.5.2. Trabajo experimental	80
3.5.2.1. Materiales, reactivos e instrumentación	80
3.5.2.2. Determinación de la concentración de metales pesados y arsénico	80
3.5.2.3. Detección, identificación y cuantificación.....	81
3.5.2.4. Control de calidad	82
3.5.2.5. Especiación	83
3.6. Tratamiento de la información	84
4. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS	86
4.1. Análisis de metales y metaloides pesados.....	86
4.1.1. Análisis estadístico y comparación con parámetros toxicológicos	86
4.1.2. Precisión y exactitud del método.....	95
4.1.3. Comparación por procedencia	97
4.1.4. Análisis de Componentes Principales	100
4.2. Especiación de arsénico.....	106
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	112
5.1. Conclusiones.....	112
5.2. Recomendaciones.....	113
6. BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS	115
6.1. Bibliografía	115
6.2. Anexos	128
6.2.1. Anexo 1: Especificaciones del material de referencia.....	128
6.1.2. Anexo 2: Curva de calibración para la especiación de arsénico.....	130

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Importación de arroz en Panamá por año.....	18
Cuadro 2: Distribución de los Molinos de arroz en la.....	21
Cuadro 3: Características de las diferentes clases de arroz en Panamá.....	24
Cuadro 4: Ingesta Semanal Tolerable Provisional (ISTP) para metales pesados..	62
Cuadro 5: Definición conceptual, operacional e instrumental.....	77
Cuadro 6: Condiciones operacionales para el plasma acoplado inductivamente con detector masa.....	81
Cuadro 7 Condiciones operacionales para el sistema HPLC-ICP-MS.....	83
Cuadro 8: Parámetros estadísticos de los metales analizados para el arroz nacional.....	86
Cuadro 9: Parámetros estadísticos de los metales analizados para el arroz importado.....	86
Cuadro 10: Concentración de metales pesados por molino y fecha.....	91
Cuadro 11: Resultados para el material de referencia IRMM-804.....	96
Cuadro 12: Valores máximos y mínimos por metal para el arroz importado.....	98
Cuadro 13: Valores máximos y mínimos por metal para el arroz nacional.....	98
Cuadro 14: Valores promedios por procedencia y metal.....	98
Cuadro 15: Prueba de Wilcoxon para arsénico, cromo y cobre.....	99
Cuadro 16: Prueba de Wilcoxon para cadmio y plomo.....	99
Cuadro 17: Valores propios de las distribuciones.....	101
Cuadro 18: Matriz de correlaciones para los elementos analizados.....	102
Cuadro 19: Valores de los coeficientes factoriales obtenidos como resultado de la rotación Varimax.....	104
Cuadro 20: Especiación de arsénico por molino, fecha y procedencia.....	108
Cuadro 21: Comparación de contenido de especies As (III) y As (V) por procedencia.....	109

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Países con mayor producción de arroz para el 2017.....	15
Figura 2: Gráfico de la producción de arroz en Panamá de 2010 a 2016.....	16
Figura 3: Distribución de la producción de arroz por provincia durante el 2016...	17
Figura 4: Índices de bioacumulación (IBA) de diversos elementos traza en plantas verdes y hongos.....	48
Figuras 5 y 6: Histogramas para el As, Arroz nacional e Histograma para el As, arroz importado.....	88
Figuras 7 y 8: Histogramas para el Cr, arroz nacional e Histograma para el Cr, arroz importado.....	88
Figuras 9 y 10: Histogramas para el Cu, arroz nacional e Histograma para el Cu, arroz importado.....	88
Figuras 11 y 12: Histograma para el Cd, arroz nacional e Histograma para el Cd, arroz importado.....	89
Figuras 13 y 14: Histogramas para el Pb, arroz nacional e Histograma para el Pb, arroz importado.....	89
Figura 15: Relación entre los factores F1 y F2 obtenidos del Análisis de Componentes Principales después de la rotación Varimax (B).....	103
Figura 16: Análisis de Componentes Principales por procedencia.....	105
Figura 17: Cromatograma obtenido para el patrón de 25 ppb.....	107
Figura 18: Cromatograma obtenido para la muestra 26.....	107
Figura 19: Curva de calibración para el As III.....	130
Figura 20: Curva de calibración para el DMA.....	130
Figura 21: Curva de calibración para el MM.....	131
Figura 22: Curva de calibración para el As V.....	131

INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental constituye uno de los problemas más críticos a resolver por la humanidad; la presencia de agentes físicos, químicos y/o biológicos en el agua, aire y suelo continúa incrementándose proporcionalmente con el aumento de la población humana. Esto ha ocasionado que muchos de los alimentos que consumimos se encuentren contaminados provocando las enfermedades transmitidas por alimentos.

Las enfermedades provocadas por alimentos contaminados constituyen un importante problema sanitario, quizás el más difundido en mundo actual. Para octubre de 2016, la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2016) estimaba que cada año enferman en el mundo unos 600 millones de personas (aproximadamente 1 de cada 10 habitantes), por ingerir alimentos contaminados y que 420 000 mueren por esta misma causa.

Las enfermedades transmitidas por los alimentos son generalmente de carácter infeccioso o tóxico y son causadas en forma intencional o inadvertidamente durante las etapas de producción, elaboración, almacenamiento, distribución y consumo, por bacterias, virus, parásitos o sustancias químicas que penetran en el organismo a través del agua o los alimentos contaminados, los cuales pueden ocasionar daños a los organismos que los consumen.

Un tipo de contaminante químico lo constituyen los metales pesados, los cuales no se degradan ni química ni biológicamente, por lo que tienden a acumularse y pueden ser absorbidos por las plantas y así incorporarse a la cadena trófica a través de los alimentos.

Es por lo que estas sustancias han sido objeto de investigación desde hace varias décadas en diversos países como un compromiso de salud pública. Se ha estudiado, por ejemplo, las causas de la acumulación de estas sustancias y las consecuencias a los consumidores.

Por lo anterior señalado, se ha propuesto realizar una primera investigación que tiene como objetivo fundamental documentar la concentración de metales y metaloides pesados en arroz procesado en la provincia de Chiriquí, empleando la técnica de análisis más recomendada por sus características analíticas: Plasma Acoplado Inductivamente con detector masa.

Los primeros capítulos documentan los antecedentes de la investigación, señalando los diferentes estudios relacionados con los hallazgos a nivel mundial en relación con los metales pesados en arroz. Posteriormente se presentan las propiedades toxicológicas de los metales pesados y del arsénico, así como las características del cultivo de arroz en Panamá. Finalmente se sustentan los aspectos metodológicos de la investigación y se presentan y analizan los resultados obtenidos, para culminar con las conclusiones y recomendaciones

RESUMEN

El arroz, *Oryza sativa*, uno de los principales alimentos en el nivel mundial, es considerado como fuente importante de elementos esenciales. Sin embargo, también puede presentar contaminación por metales pesados. En Panamá, la dieta se fundamenta principalmente en la ingesta de arroz, reportándose en el 2016 un consumo anual de 64,1 kilogramos de arroz por habitante y no se evidencian estudios que determinen la posible presencia de metales pesados en este cereal, sustancias a las cuales se le han atribuido un sinnúmero de trastornos y enfermedades al ser humano. Por lo anterior, se realizó la investigación a fin de determinar los niveles de concentración de metales y metaloides pesados en el arroz procesado en la provincia de Chiriquí, mediante Plasma Acoplado Inductivamente con Detector de Masa. Los resultados obtenidos con el material de referencia IRMM-804 indican que los análisis deben adecuarse para que cumplan con criterios de precisión y exactitud. De los elementos analizados (As, Cd, Cr, Cu y Pb), sólo el 7,5% de las muestras excedieron los límites máximos permitidos para el plomo. En el caso del cobre, se encontraron valores que oscilan entre 1639 y 2657 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ en arroces importados y nacionales, respectivamente. Además, se obtuvo diferencia en el contenido de arsénico, cobre y cadmio al comparar las medianas de los arroces importados y nacionales. Adicionalmente, se encontró que las especies predominantes de arsénico son las inorgánicas para todos los arroces. Se concluye que es necesario continuar documentando la determinación del contenido de metales pesados y especies en alimentos de consumo masivo, a fin de garantizar la inocuidad de los alimentos consumidos por la población panameña.

CAPÍTULO 1
ASPECTOS GENERALES

1. ASPECTOS GENERALES

1.1. Antecedentes del Problema

El término de metal pesado refiere a cualquier elemento químico metálico que tenga una relativa alta densidad y sea tóxico o venenoso en concentraciones incluso muy bajas. Ejemplos de metales pesados o algunos metaloides, incluyen al mercurio (Hg), cadmio (Cd), arsénico (As), cromo (Cr), talio (Tl), y plomo (Pb), entre otros (Lucho, Álvarez, Beltrán, Prieto, & Poggi, 2005).

Los metales son quizás las sustancias tóxicas más antiguas que haya conocido el ser humano. La toxicidad de algunos de ellos, tal como plomo y arsénico ha sido conocida y documentada desde hace muchos años, a diferencia de otros metales como al cadmio y talio cuya toxicidad ha sido reconocida más recientemente. La habilidad de algunos animales silvestres para acumular y concentrar metales pesados tales como, el cadmio, incrementan el riesgo de toxicidad sobre la cadena alimentaria, siendo la dieta una de las principales vías de exposición a metales (Nava & Méndez, 2011).

Estos elementos tóxicos están presentes de forma natural en los suelos, pero en los últimos años las actividades antropogénicas y la deposición de residuos tóxicos de todo tipo ha contribuido a su acumulación.

Metales y metaloides como el Pb, Hg, Cd, Se, Cr y As son muy dañinos para la salud humana y para la mayoría de los organismos vivos. Son elementos no degradables, ni química ni biológicamente, por lo que terminan acumulándose en los suelos y otras matrices ambientales como aire y agua. Si además se filtran a las aguas subterráneas, su control se hace muy difícil y acaban entrando en la cadena alimentaria sea a través del agua de consumo o a través de los cultivos en suelos agrícolas contaminados, suponiendo un riesgo potencial para la salud (Llugany, Tolrà, Poschnrieder, & Barceló, 2007).

Los metales pesados son peligrosos porque tienden a bioacumularse en diferentes cultivos. La bioacumulación significa un aumento en la concentración de un producto químico en un organismo vivo en un cierto plazo de tiempo, comparada a la concentración de dicho producto químico en el ambiente (Méndez *et al.*, 2009). En un pequeño grado se pueden incorporar a organismos vivos (plantas y animales) por los alimentos, por medio del agua y el aire como medios de translocación y dependiendo de su movilidad en dichos medios (Delince *et al.*, 2015 & Lucho-Constantino *et al.*, 2005).

Dentro de las plantas donde se bioacumulan metales pesados se encuentra el arroz, el cereal más importante para el consumo humano y el alimento básico para más de la mitad de la población mundial, lo que puede resultar un peligro potencial para el consumidor causando un profundo impacto en la población (Delince *et al.*, 2015).

Es por lo que, desde hace varias décadas se han venido realizando diversas investigaciones asociadas a la acumulación de metales y metaloides en arroz.

Así, por ejemplo, OMS ha destinado esfuerzos para mitigar los daños asociados a intoxicación por arsénico producto del consumo de arroz, ya que este metaloide se presenta en mayor concentración cuando se compara con otros alimentos vegetales. Adicionalmente, en este grano se pueden presentar concentraciones de As total y As inorgánico muy superiores a la de los niveles máximos permitidos en normativas reconocidas internacionalmente (Meharg *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2008 & Laparra *et al.*, 2005). De hecho, Laparra *et al.*, (2005), señalan que la contaminación de arroz por arsénico se considera como un desastre en el Sudeste de Asia.

En Sri Lanka se han realizado estudios para estudiar la contaminación de arroz debido a algunos metaloides y metales pesados tóxicos como el arsénico y cadmio Kariyawasam *et al.*, (2016), señalan de varios casos de enfermedades humanas, relacionadas con estas especies.

Se reporta la enfermedad renal crónica de etiología desconocida (CKDu), caracterizada por el mal funcionamiento y la malformación de los órganos debido a la toxicidad de metales, por lo cual el estudio de los valores nutricionales y contenidos de metales pesados es un tema importante.

Además, en Bangladesh se ha encontrado que el arroz puede contribuir con alrededor del 95% de arsénico, con respecto a las ingestas dietéticas de arsénico de las muestras de alimentos. Algunos estudios han concluido además que los bebés y los jóvenes generalmente tienen una mayor exposición al arsénico a través del arroz en base a su masa corporal, en comparación con los adultos (Meharg *et al.*, 2008; en Bhattachrya, 2012).

La contaminación por arsénico ha sido ampliamente documentada. Se ha encontrado que las especies arsenicales que pueden estar presentes en el arroz son el ácido dimetil arsénico (DMA), el ácido monometil arsénico (MMA); el arseniato y el arsenito, evidenciándose que la concentración de estas especies varía considerablemente dependiendo del país de origen (Torres, 2011).

En España se ha encontrado que el MMA aparece en bajas concentraciones, no detectándose en la mayoría de los arroces analizados, sin embargo, las concentraciones de As inorgánico en arroz son elevadas (Torres, 2011); similar comportamiento se ha encontrado en países como Brasil, Argentina y en otros de Asia (Bundschuh *et al.*, 2012). En contraste, en los Estados Unidos se ha encontrado que los niveles superiores corresponden al DMA y al arsenito (Zavala *et al.*, 2008).

Torres (2011) y Bundschuh *et al.*, (2012) señalan que en el nivel global se han descrito zonas en la que la población está sometida a una exposición crónica a elevadas concentraciones de As inorgánico, siendo los países más afectados Argentina, Chile, China, Bangladesh e India. También Laparra *et al.*, (2005) reportan valores de arsénico en arroz en intervalos de 0,29 a 0,41 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ en muestras comercializadas en Valencia, España.

Aunado a lo anterior, Faria *et al.*, (2011), indican que existe una gran preocupación sobre la contaminación de Cd en la cadena alimentaria ya que este metal pesado alcanza concentraciones considerablemente mayores en los cultivos que los otros metales y metaloides pesados: As, Cu, Cr, Hg, Ni, Pb y Zn.

Generalmente, la contaminación debido al cadmio en el arroz se presenta en áreas irrigadas por aguas residuales de minas. La contaminación con cadmio en campos de arroz también puede resultar de la aplicación de fertilizantes de fosfato ricos en Cd. En Asia, los sistemas de cultivo de arroz irrigados proporcionan granos de arroz como alimento para unos 2 000 000 de personas, lo que representa una ingesta diaria de 20-40 µg de Cd, lo cual ha conducido a mineralización ósea (conocida como osteomalacia), en la población expuesta (Sebastian & Prasad, 2014).

Por ejemplo, en Japón, Uruguchi & Fujiwara (2012), detallan una importante fuente de cadmio proveniente del consumo derivado de la contaminación y acumulación en los suelos empleados para el cultivo, provocando problemas agrícolas más graves.

También existen problemas de toxicidad por cadmio en poblaciones de países como China y Tailandia. De hecho, se ha documentado que las concentraciones de Cd en arroces japoneses han sido constantemente más altas en comparación con las de otros países, no obstante, los valores son muy inferiores al límite establecido por la Comisión del Codex Alimentarius (0,4 mg.kg⁻¹).

También se ha indicado que, en Estados Unidos, el aumento del consumo de arroz y otros cereales contribuye al reciente aumento de la ingesta de Cd en la dieta (Egan *et al.*, 2007, en Uruguchi & Fujiwara, 2012). Igualmente, en algunas zonas de China y Tailandia, se informó sobre producción de arroz altamente contaminado con Cd, asociado posiblemente con disfunciones renales entre las poblaciones (Arroyo *et al.*, 2013).

Otro ejemplo de la contaminación de metales pesados en alimentos es el reportado por Li *et al.*, (2010), los cuales señalan que el monometilmercurio (MeHg) es considerada la forma más tóxica del mercurio a causa de su biomagnificación en la cadena alimentaria y su efecto neurotóxico. Los autores señalan que el cultivo de arroz en Guizhou, China en las zonas mineras abandonadas presentaron valores de esta especie mercúrica entre 1,6 a 174 mg.kg⁻¹, lo que confirma que el arroz es una importante vía de exposición MeHg en esta región.

Asociado a lo anterior, en Río Grande, Brasil, un estudio sobre la concentración de metales como: plomo, cromo y cadmio en granos de arroz vendidos en establecimientos comerciales se encontraban dentro de los límites permitidos por la legislación de ese país (Lima, Hoehne & Meurer, 2015).

En forma similar, en el municipio de Paulina, Brasil, se evaluó la capacidad de translocación de metales pesados del suelo para los granos de soja y arroz, encontrándose que los niveles de cadmio y cobre en el grano contenían niveles adecuados para ambos cultivos.

Adicionalmente, el estudio concluyó que las plantas de arroz restringen la transferencia de Cd, Pb y Cu del suelo al grano, lo que no ocurre con Mn y Zn (Silva, Vitti, & Trevizam, 2007).

1.2. Situación Actual en Panamá

1.2.1. Producción e importación de arroz en Panamá

1.2.1.1. Producción de arroz a nivel internacional y nacional

Según lo documentado por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO), la producción mundial de arroz en 2016 totalizó 751,9 millones de toneladas, 1,6 % por encima de lo reportado en el 2015 (FAO, 2017).

Para ese año, la mayor producción, se concentró en el continente asiático, y como se evidencia en la figura 1, China (209 503 037 de toneladas), India (158 756 871

de toneladas) e Indonesia (77 297 509 de toneladas), proporcionan más de la mitad del arroz mundial. Por su parte, en América, Brasil es el primer productor (FAO, 2017).

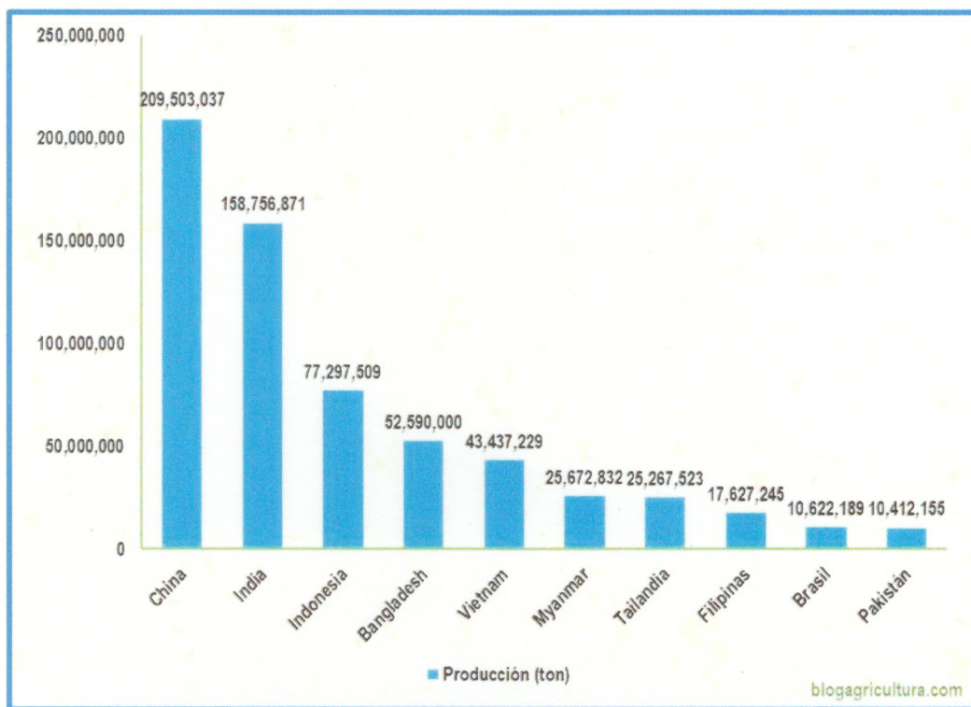


Figura 1: Países con mayor producción de arroz para el 2017.
Tomado de: FAO, 2017.

En el caso de la producción de arroz en Panamá, la figura 2 presenta el comportamiento del rubro en los últimos 6 años, donde se observa una reducción del 5% en la producción de arroz a nivel nacional en los periodos 2012-2013 y 2014-2015, originado principalmente por las condiciones climáticas que afectaron las áreas en los dos ciclos de cultivo (primera y segunda siembra) y adicionalmente por la merma en los campos de cultivo originados e incertidumbre en la compra por parte de los molinos (Ministerio de Desarrollo Agropecuario, 2017).

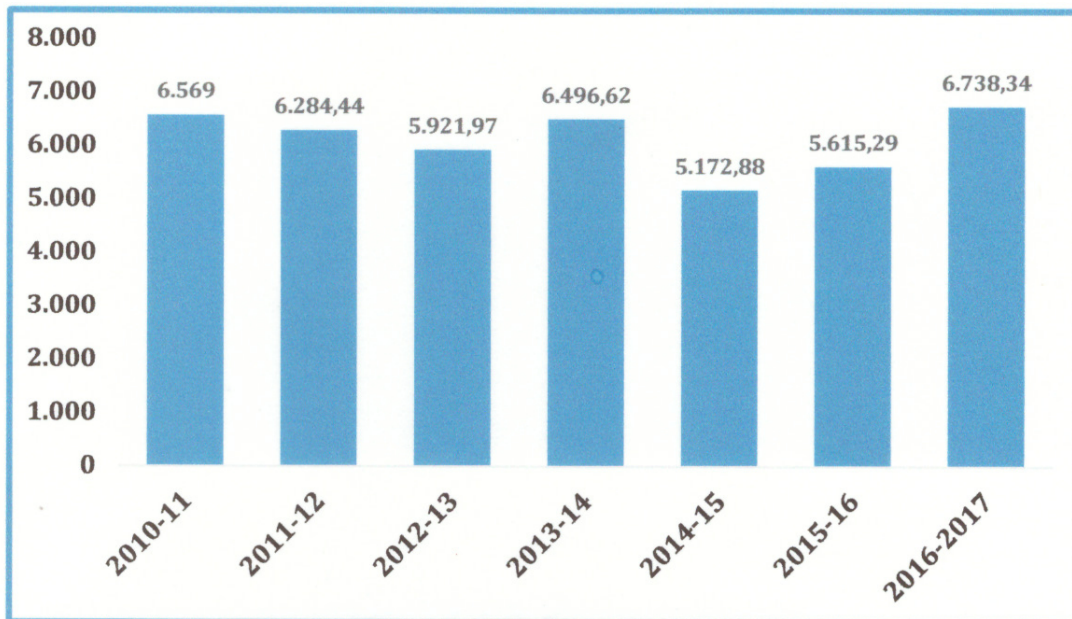


Figura 2: Gráfico de la producción de arroz en Panamá de 2010 a 2016.
Tomado de: Ministerio de Desarrollo Agropecuario (MIDA), 2017.

Para el ciclo agrícola 2016-2017, el comportamiento fue diferente: la producción de arroz aumentó un 22 %, con más de 6,9 millones de quintales de arroz obtenidos en 66 000 de hectáreas cultivadas, según lo informado por el Ministerio de Desarrollo Agropecuario de Panamá (MIDA, 2017).

La distribución de la producción de arroz para este ciclo se muestra en la figura 3, donde se aprecia que, para este año, la provincia de Chiriquí continuó siendo la principal productora de arroz del país con 1 727 489 de quintales, cerca de un tercio de la producción nacional.

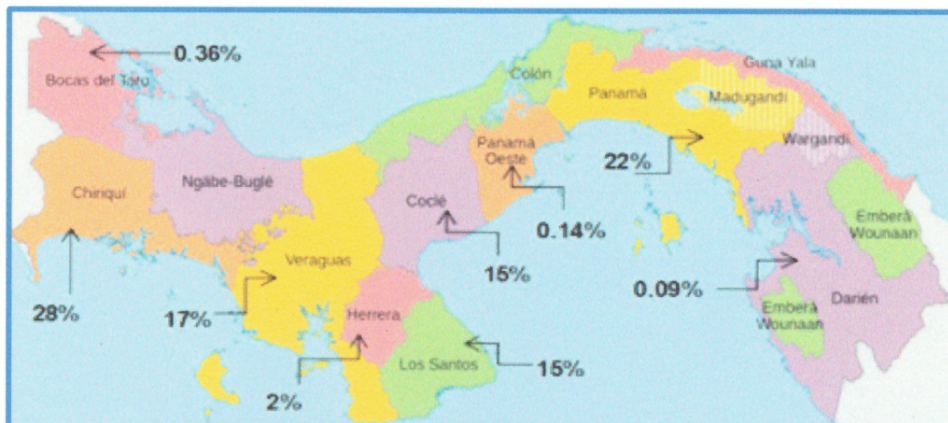


Figura 3: Distribución de la producción de arroz por provincia durante el 2016
Tomado de: MIDA, 2017

1.2.2. Importación de arroz en Panamá

El consumo de arroz en Panamá (64,1 Kg/habitante para el 2016), está por encima del promedio latinoamericano. Cerca de 1 700 agricultores cultivan entre 65 000 a 70 000 hectáreas por año (MIDA, 2017 & IICA, 2009). En consecuencia, tal como lo señala el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA, 2009), su producción tiene una gran importancia a nivel social, político, económico y sobre todo, en lo relacionado con la seguridad alimentaria del país.

En principio, la producción nacional debería suplir las necesidades del consumo doméstico de arroz. Sin embargo, enfermedades (especialmente la de un ácaro que afectó la producción a partir de 2004), alternativas de cultivos de mayor margen, oportunidades en el sector servicios, entre otros, ha reducido la superficie sembrada y por consiguiente, la producción total. Debido a estas razones, se hizo necesario aprobar la importación de contingentes extraordinarios para cubrir los déficits (MIDA, 2017).

Con la adhesión de la República de Panamá a la Organización Mundial del Comercio, (OMC) por medio de la Ley N° 23 del 15 de julio de 1997, el país se integra de lleno al proceso de la globalización económica (IICA, 2009).

El cultivo de arroz y el marco para sus relaciones comerciales afines se ejecutan de acuerdo con este régimen desde la entrada de Panamá a la OMC. El abastecimiento de arroz a la población se suple con la producción local y el faltante mediante importaciones amparadas en contingentes ordinarios y, cuando la necesidad lo impone, por medio de contingentes extraordinarios (IICA, 2009).

Como se muestra en el cuadro 1, a partir de 2005 se inició la importación de arroz, la cual varió mucho de año en año debido a las condiciones variantes de cosecha (enfermedades, principalmente). Esta situación, como manifiesta Sáenz (2014), encierra un potencial de oportunidad de mayor producción compitiendo para sustituir las importaciones con arroz panameño.

Cuadro 1: Importación de arroz en Panamá por año (2005-2012)

Año	Importación (ton métricas)
2005	66 063
2006	43 674
2007	73 328
2008	96 535
2009	17 417
2010	103 624
2011	57 193
2012	46 279

Adaptado de Sáenz, 2014.

Además, según datos reportados por el Ministerio de Desarrollo Agropecuario, para el 2016 se importó un total de 1 300 000 quintales de arroz en nuestro país.

1.2.3. Planteamiento del Problema

Debido a que la absorción de metales pesados por las plantas es generalmente el primer paso del ingreso de éstos en la cadena alimentaria, este tema en nuestro

país es importante al igual que en otros países en vías de desarrollo en donde este grano representa hasta el 70% de su principal fuente de energía diaria.

A pesar que el arroz representa el alimento principal en la dieta del panameño, que se ha incrementado la importación de arroz de otros países y que existe la posibilidad de contaminación de metales y metaloides pesados que ocasionan efectos adversos a la salud, no se encuentran evidencias de estudios realizados en Panamá con relación a la determinación de los niveles de concentración de estas sustancias en el arroz consumido por la población. Por consiguiente, es imperante realizar estos análisis debido a lo indicado y a que el arroz consumido en nuestro país es una mezcla del arroz nacional e importado.

Lo anterior señalado nos conduce a plantear como pregunta:

¿Cuáles son las concentraciones de metales y metaloides pesados (As, Cu, Cr, Cd y Pb), en muestras de arroz procesadas en la provincia de Chiriquí por tipo de arroz?

1.3. Hipótesis

H₀= Las muestras de arroz procesadas en la provincia de Chiriquí no contienen metales y metaloides pesados en cantidades superiores a las permitidas por la OMS y la Unión Europea.

H₁= Las muestras de arroz procesadas en la provincia de Chiriquí contienen metales y metaloides pesados en cantidades superiores a las permitidas por la OMS y la Unión Europea.

H₀= Los arroces importados y nacionales, procesadas en la provincia de Chiriquí no presentan diferencia estadísticamente significativa en contenido de metales y metaloides pesados.

H₁= Los arroces importados y nacionales, procesadas en la provincia de Chiriquí difieren estadísticamente en contenido de metales y metaloides pesados.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo General

Determinar los niveles de concentración de metaloides y metales pesados (As, Cr, Cu, Cd y Pb) en el arroz procesado en la provincia de Chiriquí.

1.4.2. Objetivos Específicos

- Establecer una estrategia de muestreo del arroz procesado en la provincia de Chiriquí.
- Cuantificar los niveles de concentración de metales y metaloides pesados (As, Cr, Cu, Cd y Pb), en muestras de arroz procesadas en la provincia de Chiriquí, empleando ICP-MS.
- Determinar los niveles de concentración del arsénico inorgánico (As^{3+} y As^{5+}) y orgánico (MMA y DMA) en el arroz procesado en la provincia de Chiriquí, empleando la técnica de especiación HPLC-ICP-MS.
- Comparar los valores obtenidos en los análisis, con las normativas establecidas por la Organización Mundial de la Salud y la Unión Europea y según procedencia.

1.5. Justificación

La contaminación por metales pesados sigue siendo el objetivo de numerosos estudios ambientales y en temas de seguridad alimentaria, atrae la atención en todo el mundo. Esto se atribuye a la falta de biodegradabilidad y la persistencia de los metales pesados en los suelos. El arroz al igual que otros alimentos representa una importante fuente de toxicidad en la población mundial, ya que sustancias químicas nocivas pueden ser incorporadas de manera intencional o inadvertidamente durante las etapas de producción, elaboración, almacenamiento, distribución y posterior consumo. Por ello este cereal ha sido objeto de interés científico en los últimos años, pues es alarmante las concentraciones de metales pesados presentes reportadas en múltiples investigaciones internacionales.

En este sentido, esta investigación pretende encontrar los primeros datos de la concentración de metales pesados en el arroz procesado en la provincia de Chiriquí, toda vez que la Política Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT), de Panamá y el Plan Nacional para el período 2015-2019 establece como prioridad fomentar la investigación de los sistemas de producción actuales, con miras a garantizar entre otros aspectos la seguridad alimentaria.

1.6. Delimitación, Alcance o Cobertura

La investigación se realizó en la provincia de Chiriquí, con 6 de los 7 molinos en producción, los cuales se localizan en los distritos de Alanje, David y Remedios, según lo detallado en el cuadro 2.

Cuadro 2: Distribución de los Molinos de arroz en la provincia de Chiriquí en el 2016

Distrito	Molino
Alanje	Molino Ábrego
	Molino Don Clemente
David	Molino Lezcano
	Procesadora de Granos Chiricanos
	Agrosilos S. A.
Remedios	La Hermosa S. A.

La etapa de muestreo en los molinos se dio entre los meses de octubre-diciembre de 2016 como se describe en apartados posteriores.

1.7. Limitaciones

Las principales limitaciones para la realización de la investigación fueron las siguientes:

- Panamá solamente cuenta con un laboratorio certificado equipado con ICP-MS, siendo esta única opción no accesible para realizar los análisis requeridos para esta investigación, debido a los altos costos en los análisis, razón por la

cual se requería realizar los análisis en el exterior, aprovechando el convenio Universidad Autónoma de Chiriquí- Universidad de Huelva.

- No todos los elementos analizados mediante ICP-MS mostraron veracidad analítica para el material de referencia, por lo que únicamente se reportaron los resultados para los 5 elementos antes señalados.
- Se trabajó con el material de referencia existente en el laboratorio donde se efectuaron las mediciones, a pesar que las concentraciones del mismo resultaron diferentes a la de las muestras de arroz analizadas.
- Únicamente se realizó la especiación del arsénico debido a que para los demás elementos no se contaba con los reactivos requeridos para la especiación.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Características del arroz

El arroz es una planta monocotiledónea que pertenece a la familia de las Gramíneas, a la sub-familia de las Panicoideas y a la tribu Oryzae. El nombre científico es *Oryza sativa*. Es una gramínea domesticada con un periodo vegetativo de 130 a 150 días de vida. Constituye la base principal de alimentos a nivel de 15 países asiáticos y latinoamericanos, siendo el arroz pilado el más consumido.

El arroz pilado o endospermo es aquel al cual se le han retirado la cáscara y cutícula y se han desprendido los embriones, es de color blanco perlado o cristalino. Este grano puede clasificarse de acuerdo con la calidad del mismo, así por ejemplo en nuestro país la norma de la Comisión Panameña de Normas Industriales y Técnicas (COPANIT) 75-2002, establece tres clases de arroz: especial, de primera y de segunda (Ministerio de Comercio e Industrias, 2002). Las características de cada clase se muestran a continuación en el cuadro 3.

Cuadro 3: Características de las diferentes clases de arroz en Panamá

Clases	Índices de molinería (límites en %)			Defectos de calidad (límites máximos en %)				Semillas objetables y granos en cáscara en 100 g
	Total de quebrados	Granos quebrados	Arrocillo	Total de granos dañados	Granos rojos	Granos amarillos	Granos yesosos	
Especial (1)	5.5	5	0.5	0.5	0.5	1	3	2 u
Primera	30	25	5	2	1	5	5	4 u
Segunda	45	30	15	5	5	100	100	8 u

(1) Para el arroz especial sólo se aceptan arroces de grano largo y extralargo.

Los granos dañados incluyen daños por hongos, por calor (no amarillos), por insectos, por roedores, por humedad o por cualquier otro daño que haya alterado la apariencia normal del grano.

u= unidades.

Tomado de: Ministerio de Comercio e Industrias (2002).

El arroz pilado representa, además, aproximadamente entre el 68 y 71% del peso original del arroz en cáscara. Es un cereal formado por múltiples componentes: carbohidratos, proteínas, grasas, fibra y minerales. Los carbohidratos son los

componentes mayoritarios del arroz, constituyendo un 77% en peso, siendo predominante el almidón. Contiene además un pequeño porcentaje de celulosa, hemicelulosa y lignina. Entre las proteínas, podría señalarse la albúmina y globulina, con un promedio entre 7-9%. Otros componentes, como las grasas y el agua pueden suponer un 2 y 12%, respectivamente; mientras que los minerales (fósforo y potasio), vitaminas (B1, B2 y niacina), compuestos fenólicos y tocoferoles con funciones antioxidantes se encuentran presentes (Torres, 2011).

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), el arroz proporciona el 20% del suministro de energía alimentaria del mundo (FAO, 2004).

Este cereal, sin embargo, contiene también elementos traza tóxicos entre los cuales As, Pb y Cd han sido los más estudiados (Torres, 2011). Por lo cual, en las últimas décadas ha habido especial interés en realizar investigaciones sobre el contenido de estos metales en los alimentos comercializados; encontrándose por ejemplo que las concentraciones de As total en el arroz superaban las reportadas en otros productos de origen vegetal (Zhu *et al.*, 2008).

2.2. Propiedades fisicoquímicas y origen de los elementos estudiados

2.2.1. Arsénico

El arsénico es un elemento del grupo VA, con número atómico 33 y como señala la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR) (2007), ha sido clasificado químicamente como un metaloide, con propiedades tanto de metal como de elemento no metálico; sin embargo, se le refiere frecuentemente como un metal. El arsénico elemental (llamado también arsénico metálico) es un material sólido de color gris acero.

Este metaloide es un elemento ubicuo, encontrado en el medio ambiente. Comúnmente se presenta en los estados pentavalentes (As^{+5}) y trivalente (As^{+3}) (Banu *et al.*, 2001). Dentro de sus características puede señalarse que es insípido,

inoloro e inodoro, ocupa el lugar 20 en abundancia en la corteza terrestre, el 14 en el agua de mar y el 12 en el cuerpo humano (Mandal & Suzuki 2002).

Al ser el arsénico un elemento ampliamente distribuido, generalmente se encuentra combinado con otros elementos como por ejemplo oxígeno, cloro y azufre. El arsénico combinado con estos elementos se conoce como arsénico inorgánico. El arsénico combinado con carbono e hidrógeno se conoce como arsénico orgánico (ATSDR, 2007).

El arsénico ocurre naturalmente en más de 200 formas minerales diferentes, de las cuales alrededor del 60% son arseniatos, 20% son sulfuros y sulfosales, y el 20% restante son arseniuros, arsenitos, óxidos, silicatos y arsénico elemental.

La fuente de arsénico es principalmente de origen litológico, pero las actividades antropogénicas como la minería, la quema de combustibles fósiles y el uso de pesticidas también causan contaminación por arsénico (Bhattacharya, 2012). Esta sustancia tóxica y puede contaminar: suelo, agua, aire y plantas, es decir, todos los compartimentos del ecosistema y el medio ambiente, y en última instancia afecta la salud y el bienestar de humanos (Bundschuh *et al.*, 2012).

2.2.2. Cadmio

Es un metal pesado, blanco o blanco azulado, que forma parte del grupo IIB de la tabla periódica y relativamente abundante (Sebastian & Prasad, 2014 & Nava & Méndez, 2011).

El cadmio es un elemento no esencial y todos sus compuestos son considerados altamente tóxicos para el ser humano (Sebastian & Prasad, 2014; Nava & Méndez, 2011 & Oliveira *et al.*, 2005).

Este elemento, con número atómico 48, se encuentra en tres estados de oxidación: Cu^0 , Cd^{+1} y Cd^{+2} , y como señalan Nava & Méndez (2011), la forma iónica del cadmio

(Cd²⁺) esta usualmente combinada con formas de óxido (CdO₂), cloruro (CdCl₂) o en forma de sulfuros (CdS).

Este aspecto es señalado también por García & Cruz (2012), los cuales señalan que, por lo general, el cadmio es un elemento raro en la litosfera, y de hecho no se encuentra en el ambiente como un metal puro, es más abundante en la naturaleza en forma de óxidos complejos, sulfuros y carbonatos, en minerales de zinc principalmente, así como también con plomo y cobre.

La presencia de este metal en la atmósfera puede deberse a vías naturales y antropogénicas. Estas últimas incluyen emisiones industriales; así como, la aplicación de fertilizantes y aguas negras en sembradíos (Nava & Méndez, 2011).

Sobre la contaminación antropogénica, Nordberg *et al.*, (2001) indican que dicho metal se acumula en el ambiente como resultado de las actividades industriales que involucran la fabricación de baterías níquel-cadmio, la quema de combustibles fósiles, la generación de polvos por el proceso de fabricación de cemento y fertilizantes fosfatados, así como también en pigmentos empleados para crear tintes, pinturas, plásticos y cerámica.

2.2.3. Cobre

El cobre es el primer elemento del Grupo IB de la tabla periódica, con número atómico 29 y muestra cuatro estados de oxidación: Cu⁰, Cu⁺¹, Cu⁺² y Cu⁺³ y en conjunto con la plata y el oro, se clasifica como un metal noble y, como ellos, se puede encontrar en la naturaleza en la forma elemental. De hecho, es un metal rojizo que se encuentra naturalmente en las rocas, el suelo, el agua, los sedimentos y, en niveles bajos, en el aire. Este metal es un oligoelemento esencial tanto en humanos como en animales y plantas. Como metal de transición, es un cofactor de muchas enzimas redox.

Durante siglos, debido a sus propiedades físicas y químicas, el hombre lo ha utilizado para producir aleaciones de cobre, incluidos latón y bronce, convirtiéndose en uno de los metales más importantes (Tirado *et al.*, 2015). Estas propiedades incluyen su alta conductividad térmica, alta conductividad eléctrica, maleabilidad, baja corrosión, capacidad de aleación y apariencia agradable (Jolly & Edelstein, 1987 en ATSDR, 2004 & WHO, 2011).

El cobre se utiliza para hacer alambrado eléctrico, tuberías, válvulas, accesorios, monedas, utensilios de cocina y materiales de construcción. Está presente en municiones, aleaciones (bronce) y revestimientos. Los compuestos de cobre se emplean como fungicidas, plaguicidas, insecticidas y conservantes de la madera y en la galvanoplastia, la fabricación de colorantes azoicos, el grabado, la litografía, la refinación de petróleo y la pirotecnia. Además, los compuestos de cobre se pueden agregar a los fertilizantes y alimentos para animales como un nutriente para apoyar el crecimiento de plantas y animales (WHO, 2011 & ATSDR, 2004).

La exposición de los seres humanos al cobre se debe principalmente al consumo de alimentos y agua potable, la ingesta de cobre en relación con los alimentos y el agua dependerá de la ubicación geográfica (Tirado, González, Martínez, Wilches, & Celedón, 2015).

2.2.4. Cromo

El cromo es un elemento sólido, gris, inodoro, con un brillo metálico, duro y quebradizo. Pertenece al grupo VI B de la tabla periódica, con número atómico 24 y tiene un peso atómico de 51,9961 uma (Achmad & Auerkari, 2017, Miloc & Jiménez, 2014 & Cuberos, Rodríguez & Prieto, 2009).

El cromo se encuentra en tres estados de oxidación: Cr^0 , Cr^{+3} y Cr^{+6} . De estos tres, en solución se presentan en dos formas comunes, Cr^{+3} relativamente más seguro y Cr^{+6} más tóxico, y particularmente este último no es biocompatible con el ser

humano (Achmad & Auerkari, 2017, Miloc & Jiménez, 2010, Cuberos, Rodríguez & Prieto, 2009 & Guertin, 2004). Al respecto, Cuberos, Rodríguez & Prieto (2009), señalan que el cromo es un oligoelemento presente en el organismo en forma trivalente, indispensable en el metabolismo de la glucosa, colesterol, ácidos grasos e, involucrado en otros múltiples procesos biológicos (Cuberos, Rodríguez & Prieto, 2009).

Debido a su resistencia a la corrosión, el cromo (0), también denominado cromo metálico, se usa en la fabricación de acero, mientras que el cromo (Cr^{+3}) y (Cr^{+6}) se utilizan en el cromado, en colorantes y pigmentos, en curtido del cuero y en la preservación de la madera y, en cantidades pequeñas, en barrenas para la extracción de petróleo, inhibidores de corrosión, en la industria textil y en el tóner para copadoras (Miloc & Jiménez, 2014, Molina, Aguilar & Cordovez, 2010 & Cuberos, Rodríguez & Prieto, 2009).

El cromo hexavalente (Cr^{+6}) y el cromo (Cr^0) son formas producidas normalmente por procesos industriales, mientras que las formas trivalentes predominan en organismos vivos. El cromo trivalente (Cr^{+3}) es un elemento residual necesario para mantener un buen estado de salud, ya que ayuda al cuerpo a utilizar el azúcar, la grasa y las proteínas (Miloc & Jiménez, 2014, Molina, Aguilar & Cordovez, 2010 & Cuberos, Rodríguez & Prieto, 2009).

El cromo, como lo señalan ATSDR (2012) & Molina *et al.*, (2010), es un elemento natural que se encuentra en rocas, animales, plantas y suelo, donde existe en combinación con otros elementos para formar diversos compuestos. El cromo se puede encontrar en el aire, el suelo y el agua después de la liberación de las industrias que usan este mineral. También se puede liberar al medio ambiente por la quema de gas natural, petróleo o carbón.

2.2.5. Plomo

El plomo es un elemento natural que se encuentra en el grupo IV A de la tabla periódica, con número atómico 82, es de color gris-azulado y se encuentra usualmente combinado con dos o más elementos para formar compuestos de plomo (Arroyo *et al.*, 2013; Nava & Méndez, 2011). Sus propiedades incluyen: un bajo punto de fusión, alta densidad, facilidad de fundición, baja resistencia, maleabilidad, facilidad de fabricación, resistencia a los ácidos, y resistencia a la corrosión (Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, 2010 & Abadin *et al.*, 2007).

Ferrer (2013) & Abadin *et al.*, (2007), indican que, por sus propiedades, ha sido clasificado como un metal pesado, blando y muy difundido en la corteza terrestre. Se encuentra en la naturaleza como mezcla de 3 isótopos (^{206}Pb , ^{207}Pb y ^{208}Pb). Su forma más abundante es el sulfuro de plomo (PbS), formando las menas de galena. Con frecuencia está asociado a otros metales, como plata, cobre, cinc, hierro y antimonio. Forma compuestos orgánicos con número de oxidación +2 y +3, como acetatos, tetraetilos y tetrametilos e inorgánicos, como nitratos, arseniatos, carbonatos, cloruros, óxidos y silicatos.

Por su bajo punto de fusión fue uno de los primeros metales empleados por el hombre y su intoxicación crónica, el saturnismo (definida como la acumulación de plomo en el organismo humano), se conoce desde la antigüedad. La principal fuente ambiental de plomo fue la gasolina, adicionalmente la exposición al plomo en medio industrial se produce en actividades de minería, fundiciones, fabricación y empleo de pinturas, baterías, tuberías, plaguicidas, envases con soldaduras de plomo, vajillas y cerámicas; actividades que también ocasionan su presencia como contaminante en el ambiente (Londoño, Londoño & Muñoz, 2016, Ferrer, 2013, Abadin *et al.*, 2007 & National Institutes of Health, 2005).

En este sentido, Arroyo *et al.*, (2013), infieren que el plomo es uno de los metales ubicuo mejor conocido por los humanos, es detectable en prácticamente todas las matrices ambientales y los sistemas biológicos.

Señalan además que la principal vía de exposición para la población general es por la ingesta de alimentos y a través del aire por inhalación. Al respecto, Méndez *et al.*, (2009) señalan que su presencia en el ambiente se debe principalmente a las actividades antropogénicas como la industria, la minería y la fundición. En los suelos contaminados con plomo se suele encontrar también cadmio y zinc por afinidad geoquímica entre sus propiedades y características metálicas algo similar a lo que ocurre para la triada de Fe-Ni-Co.

2.3. Aspectos toxicológicos de los elementos estudiados

Los elementos metálicos y metaloides son componentes intrínsecos del ambiente. En general constituyen una clase importante de sustancias tóxicas que se encuentran en numerosas circunstancias laborales y ambientales. El impacto de estos agentes tóxicos en la salud humana es actualmente un área de gran interés debido a la ubicuidad de la exposición. Su uso creciente en la industria y en nuestra vida cotidiana, ha suscitado que los problemas derivados de la contaminación por metales tóxicos del medio ambiente hayan asumido dimensiones serias (Reyes *et al.*, 2016).

Diversos estudios han evidenciado que en general, la toxicidad de los metales y metaloides para los sistemas fisiológicos de los mamíferos se debe a la reactividad química de los iones con las proteínas estructurales celulares, las enzimas y el sistema de membrana. Mahurpawar (2015), indica que los órganos más susceptibles a toxicidades metálicas específicas son generalmente aquellos órganos que acumulan las concentraciones más altas del metal *in vivo*. Esto a menudo depende de la ruta de exposición y del compuesto químico del metal, es decir, su estado de oxidación, volatilidad, solubilidad en los lípidos, concentración, tipo de metal o metaloide, entre otros.

2.3.1. Arsénico

Se ha determinado que la toxicidad del arsénico depende al igual que la de otros elementos, del tipo de matriz donde se encuentra, la especie química presente, estado de oxidación, reactividad, solubilidad, capacidad para formar complejos organometálicos e interacción con factores individuales. Repetto & Cameán (1995), señalan además que en estudios *in vitro* se pone de manifiesto la influencia del pH gastrointestinal en la bioaccesibilidad del arsénico, está entre un 10 y un 30% más soluble al pH gástrico que al intestinal, debido a que la solubilidad de los metales aumenta con la acidez.

En relación con los estados de oxidación, se ha encontrado que el As^{+3} es relativamente más tóxico que el As^{+5} (Banu *et al.*, 2001). Baba (2014), señalan además que las especies inorgánicas son aparentemente más tóxicas que las especies orgánicas.

Las especies solubles de As inorgánico se absorben rápidamente en el tracto gastrointestinal del ser humano y de la mayoría de los animales de laboratorio, y puesto que se absorbe la mayor parte del As ingerido, los contenidos de As en orina serán buenos indicadores de su absorción por vía oral (Repetto & Cameán, 1995).

El arsénico es uno de los elementos más tóxicos conocidos por el hombre (Baba *et al.*, 2014 & Brinkel, Khan, & Kraemer, 2009). A su vez, Bhattacharya *et al.*, (2012) indican que el arsénico es un metaloide de gran preocupación ambiental debido a su toxicidad.

La Agencia Internacional de Investigación del Cáncer, (IARC) incluye al arsénico inorgánico en el grupo de compuestos carcinogénicos para el ser humano (Tsuda *et al.*, 1992, en Repetto & Cameán, 1995). Por su parte, la OMS a partir de los contenidos de As inorgánico del agua potable, establece una ingesta semanal tolerable provisional de $15 \mu\text{g} \cdot \text{semana}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ peso corporal (WHO, 1989; en Repetto, & Cameán, 1995).

El mecanismo de acción tóxica para los compuestos arsenicales trivalentes establece que éstos reaccionan con moléculas que contienen tiol tales como glutatión y cisteína, lo cual inhibe por ejemplo la piruvato deshidrogenasa, y conduce a una disminución de la producción de ATP y a un agotamiento en la producción de hidratos de carbono producidos en la gluconeogénesis (Delnomdedieu *et al.*, 1994 & Scott *et al.*, 1993; en Hughes, 2002).

El arsénico puede interferir con las funciones enzimáticas esenciales y los eventos transcripcionales en las células, lo que en última instancia conduce a una gran cantidad de efectos multisistémicos no cancerosos que podrían afectar el organismo. Por ejemplo, el estrés oxidativo inducido por compuestos arsenicales trivalentes metilados (monometil arsénico III) inhiben la glutatión (GSH) reductasa (Duker *et al.*, 2005) y la tioredoxina reductasa (Lin *et al.*, 1999) lo cual puede alterar el estado redox celular y eventualmente conducir a la citotoxicidad.

También la depleción de tioredoxina afecta la expresión génica debido a que modula la actividad de unión del ADN de algunos factores transcripcionales (Matthews *et al.*, 1992; Arrigo, 1999; Powis *et al.*, 2000, en Duker *et al.*, 2005).

Por otro lado, (Hughes, 2002) indican que el arseniato al tener una estructura y propiedades químicas similares a la del fosfato, puede reemplazarlo en el cuerpo. Los autores señalan que por ejemplo el arsénico:

- Puede llevar al reemplazo de fósforo en el hueso a largo plazo.
- Reacciona *in vitro* con glucosa y gluconato para formar glucosa-6-arseniato y 6-arsenogluconato, respectivamente. Estos compuestos se parecen a glucosa-6- fosfato y 6-fosfogluconato, respectivamente. Glucosa-6-arseniato es un sustrato para la glucosa-6- fosfato deshidrogenasa y puede inhibir la hexoquinasa, al igual que la glucosa-6-fosfato.
- El arseniato también puede reemplazar el fosfato en la bomba de sodio y el sistema de transporte de intercambio aniónico del glóbulo rojo humano.

También se ha documentado que debido a la hidrólisis que fácilmente presenta el arseniato en la célula, impide la posterior transferencia de fosfato a difosfato de adenosina (ADP) para formar trifosfato de adenosina, llevando al consecutivo agotamiento de energía de la célula (Winship, 1984).

Además, Duker *et al.*, (2005) indican que el arsénico disminuye el proceso de reparación del ADN y, por lo tanto, aumenta la susceptibilidad al cáncer y las enfermedades no relacionadas con el cáncer.

Se ha documentado que la ingesta de este metaloide podría causar cánceres de vejiga urinaria, pulmón y piel, así como también se le relaciona con cáncer de riñón, hígado y próstata (OMS, 2009; Ng, Wang & Shraim, 2003)

La toxicidad aguda del arsénico incluye molestias gastrointestinales, vómitos, diarrea, sangre en la orina, anuria, shock, convulsiones, coma y muerte (Hughes, 2002).

Por otro lado, sus efectos tóxicos asociados a la exposición crónica son: lesiones en la piel (melanosis, despigmentación, hiperqueratosis y neoplasias malignas), hepatomegalia, cirrosis, alteraciones en el metabolismo hemo, encefalopatía, retrasos en el desarrollo, enfermedades cardiovasculares, degeneración de los túbulos renales, necrosis cortical y diabetes (Klein *et al.*, 2006 & Laparra, *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 2003 & Hughes, 2002).

En el caso de las lesiones dérmicas Duker, Carranza, & Hale (2005) señalan que las mismas se ocasionan debido a que la piel localiza y almacena arsénico debido a su alto contenido de queratina, que contiene varios grupos sulfhidrilo a los que se puede unir As^{+3} y puede ser la razón de su sensibilidad al efecto tóxico del arsénico.

Además, explicaron que dentro de los efectos tóxicos crónicos se incluye la hipertensión, la cual estaba relacionada con la ingestión de arsénico a largo plazo, así como con la enfermedad cerebrovascular, es decir, infección cerebral

(Mahurpawar, 2015 & Duker *et al.*, 2005). Otros efectos crónicos incluyen depresión hematopoyética, anhidremia (debido a la pérdida de líquido de la sangre hacia el tejido y el tracto gastrointestinal), daño hepático caracterizado por ictericia, cirrosis portal y ascitis, alteración sensorial y neuritis periférica, anorexia y pérdida de peso (Webb, 1966 en Duker *et al.*, 2005).

En este mismo sentido, la exposición crónica al arsénico causa también un trastorno vascular periférico único llamado 'enfermedad del pie negro', el envenenamiento agudo con arsénico causa 'neuropatía periférica' conocida comúnmente como 'muerte' y también varios tipos de cáncer en humanos (Banu *et al.*, 2001). Se ha evidenciado además que el arsénico es un potente disruptor endocrino y puede a concentraciones muy bajas alterar los procesos de señalización celular mediada por hormonas (Kaltreider *et al.*, 2001, en Bhattacharya *et al.*, 2012). Del mismo modo, se informó que el As^{+3} induce daño en el ADN en los linfocitos humanos (Baba *et al.*, 2014 & Banu, 2001).

Brinkel, Khan, & Kraemer (2009), señalan además que, aunque las manifestaciones más comunes entre los pacientes con arsenicosis son las lesiones cutáneas, también este elemento se ha asociado con daños psicológicos y pudiendo afectar la salud mental.

2.3.2. Cadmio

El cadmio y sus compuestos están clasificados por el Centro Internacional de Investigaciones sobre Cáncer, (IARC) como Grupo 1, carcinógeno para humanos. Ha sido relacionado con cáncer renal, de pulmón y próstata (Mahurpawar, 2015 & Oliveira, Barrocas, Do Couto & Moreira 2005).

Se ha evidenciado que las intoxicaciones que afectan a la población general ocasionadas por el cadmio, salvo situaciones de accidentes o contaminaciones masivas (por ejemplo de alimentos), suelen ser de carácter crónico; sin embargo, en la población ocupacional es frecuente encontrar intoxicaciones agudas y

crónicas muy características (García & Cruz, 2012). Por su parte, Oliveira, Barrocas, Do Couto & Moreira (2005) señalan que la principal fuente de contaminación de cadmio (exceptuando a los fumadores) en el ser humano lo constituye la alimentación.

Estos autores señalan además que la clínica de las intoxicaciones por cadmio es variable y sus efectos en la salud son como los de cualquier sustancia peligrosa y dependen de la dosis, la duración y el tipo de exposición, la presencia de otras sustancias químicas, así como de las características y los hábitos de la persona.

El cadmio, es absorbido por las células de la mucosa en el lumen intestinal y en la membrana lateral de los enterocitos para pasar a la circulación sanguínea. Cuando la concentración de este metal es baja, la mayor parte queda retenida mayormente en la mucosa intestinal, principalmente unida a la metalotioneína (MT), y es eliminada. Por el contrario, si la dosis oral de cadmio es elevada se almacena en el hígado y los riñones. Sólo en estos dos órganos se acumula entre 40 y 80% del cadmio presente en el organismo (García & Cruz, 2012).

Una vez absorbido, el tóxico se transporta por la sangre, ligado de modo principal a células hemáticas y albúmina. Llega en primera instancia al hígado, para ser redistribuido lentamente de ahí a los riñones en forma de complejo de cadmio-metalotioneína (Cd-MT). Al ser dicha proteína muy afin con el cadmio, la acción tóxica de este metal se debe a su afinidad por radicales de los grupos sulfhidrilo, hidroxilo, carboxilo, fosfatil, cisteinil e histidil y a su actividad competitiva con otras especies funcionalmente esenciales como zinc, cobre, hierro y calcio que se encuentran dentro de la célula (García & Cruz, 2012 & Bernard 2008).

Nava & Méndez (2011), señalan que: *“Específicamente esto ocurre debido a que el cadmio es capaz de mimetizar a estos cationes bivalentes en el sitio de unión de proteínas transportadoras y/o canales que transportan estos metales; ocasionando que el Cd^{+2} pueda formar un complejo coordinado covalente con ciertas biomoléculas que contienen grupos sulfhidrilo tales como el glutatión o cisteína.*

Asimismo, una de las principales entradas del cadmio a la célula está dada por los canales de calcio, debido a que el Cd^{2+} tiene radio iónico similar a calcio”.

En relación con el mecanismo de toxicidad, Nava & Méndez (2011), señalan que el cadmio interfiere en el metabolismo intracelular del ion calcio, ocasionando su liberación de las mitocondrias y el retículo endoplásmico, interfiriendo con vías de señalización dependientes de calcio, señales de transducción entre células, ocasionando además daño a las membranas, bloqueo de canales dependientes de voltaje y bloqueo de la liberación de neurotransmisores.

En el caso del daño renal inducido por dicho metal, consiste en un aumento de la excreción urinaria de microproteínas (peso molecular <40 kilodaltons). Entre estas proteínas: transferrina, β_2 -microglobulina, proteína de unión al retinol y α_1 -microglobulina han sido los más frecuentes y son un reflejo de la capacidad de reabsorción tubular disminuida (Bernard, 2008).

Los efectos tóxicos del cadmio se manifiestan también en los huesos, los cuales junto con los riñones constituyen los órganos más afectados, debido a que interactúa con grupos sulfhidrilo de las proteínas, generando radicales libres. Entre los daños que produce en estos órganos podemos citar osteomalacia y necrosis del tejido renal (García & Cruz, 2012). Un estudio reciente, demostró que existe una correlación entre la densidad mineral ósea y una disfunción renal causada por el cadmio (Chen *et al.*, 2011, en Arroyo *et al.*; 2013).

Además, García & Cruz (2012), aportan que en la enfermedad itai-itai se han comprobado lesiones renales, osteomalacia y grados variables de osteoporosis. Estas lesiones ocasionan dolores de intensidad diversa, y pequeños traumatismos pueden producir fracturas en varias partes del esqueleto. El mecanismo por el cual se originan éstas no es del todo claro, pero se supone que se deben a trastornos del metabolismo de calcio, fósforo y vitamina D, generados en las lesiones renales, junto con una baja ingestión de calcio y proteínas.

Sumado a lo anterior, otro de los mecanismos de toxicidad ampliamente reportado por el cadmio es el incremento de lipoperoxidación (LPO) y generación de radicales libres en cerebro y otros órganos. Este se da por medio del aumento de radicales libres: radical superóxido, el radical hidroxilo y radicales del óxido nítrico (Arroyo *et al.*; 2013 & Nava & Méndez 2012).

El cadmio reemplaza al hierro o cobre en diferentes proteínas, por lo que estos iones al quedar libres ingresan al ciclo de Haber Weiss catalizando la reacción de Fenton causando un incremento en el estrés oxidativo. Estos efectos tratan de ser detenidos por mecanismos de defensa antioxidante en el cerebro y otros órganos; sin embargo, diversos reportes han mostrado que la actividad de los sistemas antioxidantes glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) disminuyen en presencia de cadmio (Arroyo *et al.*; 2013 & Nava & Méndez 2012).

Nava & Méndez (2012) reportan que el cadmio puede inducir apoptosis a través de la vía mitocondrial, ya que existe una disminución en los niveles intracelulares de ATP en neuronas corticales en cultivo expuestas a altas concentraciones de cadmio, debido al incremento de LPO e incremento en los niveles de calcio, esto produce un desajuste en el funcionamiento mitocondrial, provocando un cambio en el potencial de membrana de la mitocondria; al ocurrir este cambio en el potencial se produce la apertura del poro de transición mitocondrial liberando citocromo C al citoplasma y a su vez activando la caspasa-9 vía la unión de Apaf-1, por lo tanto induciendo a la caspasa-8 efectora llevando a la célula a un proceso de apoptosis.

También el cadmio afecta al sistema nervioso central en niños debido principalmente a que el desarrollo de la barrera hematoencefálica aún no alcanza su madurez, permitiendo que el cadmio pase a través de ella con más facilidad y ocasionando cambios neuropatológicos tales como: edema cerebral, picnosis (condensación de cromatina en el núcleo celular), hemorragias, y necrosis en corteza parietal, cerebelo, putamen y núcleo caudado (Nava & Méndez, 2012 & Arroyo *et al.*, 2013).

Dentro de los efectos crónicos a la salud, se ha encontrado que este metal afecta principalmente los pulmones, ocasionando bronquitis con daño progresivo alveolar, fibrosis secundaria y enfisema (García & Cruz, 2012 & Méndez, 2009). Incluso, con mucha frecuencia se aprecian efectos pulmonares, en particular cáncer de pulmón, en las poblaciones ocupacionalmente expuestas.

En el riñón produce disfunción renal tubular (García & Cruz, 2012), proteinuria e insuficiencia renal crónica, mientras en el corazón conduce a arterosclerosis aórtica y coronaria, incremento en colesterol y ácidos grasos (Nava & Méndez, 2011).

Estos efectos crónicos son señalados también por Oliveira, *et al.*, (2005), los cuales señalan que el cadmio es un tóxico acumulativo, que afecta riñones, el metabolismo óseo y el tracto reproductivo, además de ser cancerígeno y disruptor endocrino. El riñón es el órgano crítico en los seres humanos y otros mamíferos expuestos durante largos períodos a pequeñas cantidades relativas de cadmio que podría presentarse en alimentos. A largo plazo la exposición al cadmio conduce a cambios morfológicos severos en el riñón. La toxicidad del cadmio se reduce o neutraliza por aumento en el ingreso de zinc, cobre y selenio.

Se han observado además otros efectos, como: anemia, alteraciones hepáticas y cambios en el metabolismo de los minerales. Además, existen riesgos potenciales que pueden ocurrir algún tiempo después de la exposición al cadmio y duran meses o años, como el riesgo de cáncer y en la salud reproductiva. Otras alteraciones pulmonares asociadas al cadmio son el enfisema, la bronquitis obstructiva crónica y la fibrosis pulmonar (García & Cruz, 2012).

2.3.3. Cobre

Es parte integral de numerosas enzimas, el cobre es un elemento traza esencial (ATSDR, 2004). Por ende, su toxicidad debe ser explicada desde los aspectos de deficiencia y exceso. La intoxicación se produce fundamentalmente por inhalación

de polvos y "humos" de cobre, es decir: las intoxicaciones por ingesta son raras, dado que produce vómitos (Ramos *et al.*, 2003). En este sentido, Tirado *et al.*, (2015) & Ward (2003), señalan que la toxicidad ocasionada por este elemento se atribuye a la ingesta accidental.

Las pérdidas e incrementos excesivos del cobre han revestido gran importancia en la salud humana. En relación con su deficiencia, ha sido asociado con producción alterada de energía, anomalías en el metabolismo de la glucosa y el colesterol, incremento de iones de hierro, alteración estructural y fisiológica de la circulación sanguínea, afecciones cardíacas y alteraciones a nivel de las células del sistema inmune, alteraciones óseas en los niños con bajo peso al nacer, existencia de mutaciones a nivel de las proteínas de unión al cobre puede favorecer el desarrollo de diabetes y daño neurológico (Tirado *et al.*, 2015).

Aunque es un micronutriente esencial para el hombre, el cobre es tóxico a concentraciones elevadas. Ramos *et al.*, (2003) señalan que el ser humano al igual que otros mamíferos asimilan el 30% del cobre contenido en los alimentos por vía estomacal, del cual aproximadamente del 5% es realmente reabsorbido y el resto se elimina nuevamente por vía biliar.

El cobre se acumula en el hígado, en el cerebro y en los riñones (ATSDR, 2004 & Ramos, 2003). Diversos estudios han documentado que existe relación entre este metal, el cáncer y la enfermedad de Wilson la cual se caracteriza por el exceso de acumulación de cobre en el hígado, cerebro, riñones y corneas presentándose anomalías en dichos órganos. Los pacientes que padecen esta enfermedad no pueden excretar el cobre causando una sobrecarga en la bilis.

Se sabe además que la sensibilidad a la toxicidad del cobre depende altamente de la especie. Sin embargo, Ramos (2003) señala que la toxicidad de esta sustancia se basa en el enlace de los iones de cobre libres a ciertas proteínas, lo que afecta sus funciones fisiológicas. Además, se ha documentado que una sobrecarga de este

metal conduce fácilmente a reacciones redox tipo Fenton, lo que resulta en daño celular oxidativo y muerte celular (Bost *et al.*, 2016).

En el caso de las enfermedades cardiovasculares, se ha informado que una elevada concentración de cobre en suero es un factor de riesgo independiente para la enfermedad cardiovascular tanto en el control de casos como en grandes estudios poblacionales prospectivos. Los mecanismos subyacentes a estas relaciones son confusos, extrapolados de estudios con animales y se ha sugerido un efecto sinérgico entre la prooxidación del cobre y el bajo nivel de selenio el cual es un antioxidante que conduce a la aterogénesis a través de un desequilibrio de los sistemas de defensa contra los radicales libres (Bost *et al.*, 2016).

También, existen varios trastornos genéticos que afectan la utilización del cobre. Las anomalías genéticas asociadas con el síndrome de Menkes (un trastorno por deficiencia) y la enfermedad de Wilson (un trastorno de toxicidad) se han identificado como defectos en las ATPasas tipo p (US NRC, 2000, en WHO, 2011).

En el síndrome de Menkes hay una mínima absorción de cobre en los intestinos, lo que conduce a un estado de deficiencia que es independiente del consumo de cobre y suele producir la muerte durante la primera infancia (desde el nacimiento hasta los 8 años). Los niños que padecen el síndrome de Menkes, un trastorno relacionado con el cromosoma X. Esta absorción deficiente ocurre porque la ATPasa de tipo p responsable del transporte seroso insuficiente del cobre desde las células de la mucosa intestinal y el transporte a través de la barrera hematoencefálica es defectuosa. Un niño con síndrome de Menkes sufre de una profunda deficiencia de cobre, a pesar del cobre dietético adecuado (WHO, 2011).

Por otro lado, en la enfermedad de Wilson es un trastorno autosómico recesivo que conduce a la toxicidad del cobre. La enfermedad de Wilson afecta el transporte intracelular hepático de cobre y su subsecuente inclusión en ceruloplasmina y bilis. Una ATPasa tipo p se ve afectada. Debido a que el cobre no se incorpora a la ceruloplasmina, su distribución sistémica normal se ve afectada y el cobre se

acumula en el hígado, el cerebro y los ojos (Harris & Gitlin, 1996, en WHO, 2011 & ATSDR, 2004).

La ingesta excesiva de cobre también induce toxicidad indirectamente al interactuar con otros nutrientes; por ejemplo, el consumo excesivo de cobre produce anemia al interferir con el transporte y / o metabolismo del hierro (Krupanidhi, Sreekumar, & Sanjeevi, 2008 & Ward, 2003).

Por otro lado, se ha documentado que la toxicidad aguda debido al cobre se asocia con malestar gastrointestinal agudo después de la ingestión única o repetida de agua potable que contiene niveles elevados de cobre (generalmente por encima de 3-6 mg.L⁻¹) se caracterizan por náuseas, vómitos e irritación estomacal; los síntomas se resuelven cuando se cambia la fuente de agua potable (WHO, 2011 & Krupanidhi *et al.*, 2008).

2.3.4. Cromo

El cromo se encuentra en concentraciones bajas en el ambiente, las cuales no representa ningún riesgo toxicológico. En forma de Cr⁺³ es un nutriente esencial y es relativamente no tóxico para hombre. Sin embargo, el Cr⁺⁶ es un peligro para la salud de los humanos, mayoritariamente para la gente que trabaja en la industria del acero y textil (ATSDR, 2012 & Méndez *et al.*, 2009).

Sobre esto, se ha documentado además que la toxicidad se debe a los derivados Cr⁺⁶ que, contrario a los Cr⁺³ penetran en el organismo por cualquier vía con mayor facilidad. De hecho, el Cr⁺⁶ es considerado carcinógeno del grupo I por la International Agency for Research on Cancer (IARC) & WHO. Entre otras, la acción tóxica se produce por: acción cáustica directa, sensibilización cutánea, citotoxicidad e inflamación de neumocitos, interacción con biomoléculas, el Cr⁺⁶ induce alteración de cromátidas hermanas, aberraciones cromosómicas y reacciones cruzadas en la cadena de ADN (ATSDR, 2012 & Cuberos, Rodríguez & Prieto, 2009).

Se ha determinado que la absorción del Cr^{+3} es menor que la del Cr^{+6} . El Cr^{+3} no atraviesa las membranas celulares, uniéndose directamente a la transferrina. El Cr^{+6} es rápidamente tomado por los eritrocitos e integrado a otras células por el sistema transportador de sulfatos (Cuberos *et al.*, 2009).

Este proceso de transporte es explicado también por Shekhawat *et al.*, (2016) & ATSDR (2012), los cuales indican que el Cr^{+6} ingresa a la célula a través de un canal aniónico no específico mediante difusión facilitada. Detallan además que una vez en el interior de la célula, ocurre la reducción intracelularmente a nivel de las mitocondrias y el núcleo de Cr^{+6} a Cr^{+3} , lo cual da como resultado la generación de radicales libres, que pueden formar complejos con dianas intracelulares.

Esta reducción se da por medio de reductores intracelulares como el ácido ascórbico, el glutatión, flavo enzimas y riboflavinas. La reducción intracelular genera intermediarios reactivos como Cr^{+5} , Cr^{+4} y Cr^{+3} , así como radicales libres hidroxilo y oxígeno. Estas formas reactivas del cromo son susceptibles de alterar el ADN (Cuberos *et al.*, 2009).

Los efectos sobre la salud de los compuestos de cromo pueden variar con la ruta de exposición, con ciertos efectos específicos para el portal de entrada. En humanos, la ingesta presenta efectos como úlceras bucales, indigestión, necrosis tubular aguda, vómitos, dolor abdominal, insuficiencia renal e incluso la muerte (Shekhawat, Chatterjee, & Joshi, 2016, ATSDR, 2012 & Méndez *et al.*, 2009).

Milic & Jiménez (2014), señalan que la reducción intracelular del cromo hexavalente provoca la generación de especies de cromo de vida corta y alta reactividad, que son responsables de la acción irritativa, genotóxica y de la inducción de la peroxidación lipídica. La peroxidación lipídica produce el daño oxidativo a los lípidos mediado por especies oxidantes reactivas, en este caso el cromo. En contraste, el cromo trivalente interacciona con gran variedad de compuestos biológicos como el glutatión para su detoxificación, sustancias de bajo peso molecular (pirofosfato, metionina, serina y leucina), metaloproteínas

plasmáticas, diferentes enzimas y nucleótidos, lo que produce un estrés oxidativo de la respiración celular.

También se ha documentado que el cromo puede ocasionar cáncer. ATSRD (2012), informó un aumento en la incidencia de cáncer de hígado, pulmón y riñón y de órganos urogenitales en residentes que viven en un área de Grecia con niveles elevados de Cr^{+6} en el agua potable.

2.3.5. Plomo

El plomo afecta todos los órganos y sistemas. Actúa como antagonista de las acciones del calcio y se relaciona con proteínas que poseen los grupos sulfhidrónicos, amina, fosfato y carboxilo (Poma, 2008). En el ser humano, el plomo (Pb) puede tener una amplia variedad de efectos biológicos según el nivel y la duración de la exposición, así como también se ha observado que en general, el ser humano que se está desarrollando es más sensible que el adulto.

Ferrer (2013) & Nava & Méndez (2011), señalan que el plomo ejerce sus efectos a través de su unión con grupos sulfhidrónicos de proteínas, por competición con el calcio, inhibición de enzimas asociadas a membranas y alteración en el metabolismo de la vitamina D; la calmodulina es una proteína importante para la regulación intracelular del calcio, y su funcionamiento es alterado por el plomo, inhibe la síntesis y por consecuencia la actividad de la sintasa del óxido nítrico (SON) que en sus isoformas I y III son dependientes de calcio.

También se ha documentado que el plomo se almacena principalmente en la mitocondria produciendo daños en su metabolismo energético, induciendo la producción de radicales libres, inhibiendo la captura del calcio mitocondrial a la vez que favorece su liberación; este desarreglo en la actividad de la mitocondria lleva a una apertura del poro mitocondrial con subsecuente liberación del citocromo C y posible activación de caspasas 9 y 3 favoreciendo la presencia de apoptosis (Nava- & Méndez, 2011).

Por otro lado, las alteraciones del desarrollo psicomotor en los niños, relacionadas con exposiciones a bajas dosis de plomo, están condicionadas por la mayor permeabilidad al tóxico de los capilares inmaduros junto a las mencionadas alteraciones en la neurotransmisión, de mayor impacto en fases de desarrollo de la organización del SNC. Específicamente, diversos sistemas de neurotransmisión afectados por el plomo son los regulados por la acetilcolina, dopamina, norepinefrina, GABA y glutamato (Ferrer, 2013).

Este mecanismo de neurotoxicidad es explicado también por Méndez & Nava (2011), quienes señalan que entre los principales mecanismos de acción de la neurotoxicidad de plomo se encuentra el incremento en la peroxidación de lípidos y una disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes en animales expuestos a diferentes concentraciones de plomo.

Los efectos neurotóxicos son complejos, en los últimos años se ha reportado que el plomo interfiere con receptores acoplados a segundos mensajeros como la proteína cinasa C, adicionalmente interfiere con la liberación de neurotransmisores tales como acetilcolina, dopamina, noradrenalina y GABA.

Se ha demostrado que los órganos más sensibles al daño por la toxicidad en exposiciones agudas del plomo son SNC en desarrollo y maduro, sistema hematológico y cardiovascular; mientras que en las exposiciones crónicas el plomo afecta los sistemas gastrointestinal, renal, neuromuscular y hematopoyético (Tirado *et al.*, 2015 & Méndez & Nava, 2011). Una vez que el plomo ha sido absorbido puede acumularse en huesos, dientes, hígado, pulmón, riñón, cerebro y bazo; así mismo, es capaz de atravesar la barrera hemato encéfalica y placenta (Méndez *et al.*, 2009 & Poma, 2008).

El plomo tiene efectos en muchos procesos bioquímicos; en particular, se han estudiado mucho los relacionados a la síntesis del hemo en adultos y niños, encontrándose que la presencia de plomo disminuye la síntesis de hemoglobina que conduce a anemia microcítica, hipocromía (Méndez *et al.*, 2009 & Poma, 2008). Al

respecto, Poma (2008) detalla que el plomo puede causar dos tipos de anemia. Una exposición severa aguda se asocia con anemia hemolítica. En casos de exposición crónica, el plomo produce anemia, porque interfiere con la síntesis del núcleo heme y disminuye el promedio de vida de los eritrocitos.

Este metal provoca en los tubos proximales del riñón lesiones que se caracterizan por aminoaciduria generalizada, hipofosfatemia con hiperfosfaturia relativa y glucosuria. Además, este elemento afecta la función reproductora masculina que limitan la morfología y el número de los espermatozoides. En cuanto a la función reproductora femenina, se han atribuido al plomo algunos efectos adversos en el embarazo (Méndez *et al.*, 2009 & Poma, 2008).

Poma (2008), señala además que las exposiciones continuas o repetidas a plomo pueden conducir a nefropatía crónica (nefritis intersticial), que es generalmente irreversible. En este mismo sentido, Poma (2008) indica que la exposición al plomo también puede causar hipertensión arterial de origen renal e hiperuricemia con síntomas de gota.

Además, Tirado *et al.*, (2015) & Poma (2008), documentan daños en el sistema nervioso, entre los cuales se puede señalar que, en el sistema nervioso periférico, el plomo provoca neuropatía periférica de predominio motor en los músculos de las extremidades, compresión nerviosa, a su vez esto ocasiona isquemia, necrosis; degeneración axonal, desmielinización segmentaria y retarda la conducción nerviosa motora.

A nivel del SNC puede tener efectos perjudiciales y permanentes en la función cerebral, que incluyen reducción en la inteligencia, problemas de conducta y disminución del rendimiento escolar; además, provoca inhibición de los canales de calcio, con la subsecuente disminución en la concentración intracelular, lo que altera la actividad neuronal y la secreción de neurotransmisores.

2.4. Mecanismo de transporte de metales en las plantas de arroz

Los metales pesados se encuentran generalmente como componentes naturales de la corteza terrestre, en forma de minerales, sales u otros compuestos. Estos elementos no pueden ser degradados o destruidos fácilmente de forma natural o biológica ya que no tienen funciones metabólicas específicas para los seres vivos (Méndez *et al.*, 2009).

Los metales pesados son peligrosos porque tienden a bioacumularse en diferentes cultivos. La bioacumulación significa un aumento en la concentración de un producto químico en un organismo vivo en un cierto plazo de tiempo, comparada a la concentración de dicho producto químico en el ambiente (Angelova *et al.*, 2004).

Cuando el contenido de metales pesados en el suelo alcanza niveles que rebasan los límites máximos permitidos causan efectos inmediatos como inhibición del crecimiento normal y el desarrollo de las plantas, y un disturbio funcional en otros componentes del ambiente, así como la disminución de las poblaciones microbianas del suelo, el término que se usa o se emplea es “polución de suelos” (Méndez *et al.*, 2009).

En general, los metales pesados incorporados al suelo pueden seguir cuatro diferentes vías: la primera, quedar retenidos en el suelo, ya sea disueltos en la fase acuosa del suelo u ocupando sitios de intercambio; segunda, específicamente adsorbidos sobre constituyentes inorgánicos del suelo; tercera, asociados con la materia orgánica del suelo y la cuarta, precipitados como sólidos puros o mixtos.

Por otra parte, pueden ser absorbidos por las plantas y así incorporarse a las cadenas tróficas; pueden pasar a la atmósfera por volatilización y pueden ser movilizados a las aguas superficiales o subterráneas (García & Dorronsoro, 2005).

Aun cuando el transporte y acumulación de metales pesados en la planta depende de múltiples factores, investigaciones de Kabata en el 2000 presentan un esquema de clasificación de diferentes grados de bioacumulación de metales en planta

verdes y hongos, pudiéndose observar en la figura 4 que de los metales incluidos en esta investigación el cadmio y cobre presentan mayor bioacumulación (de intenso a mediano), mientras que el arsénico y plomo tienen un índice de bioacumulación de medio a ligero y el cromo ligero (Méndez *et al.*, 2009).

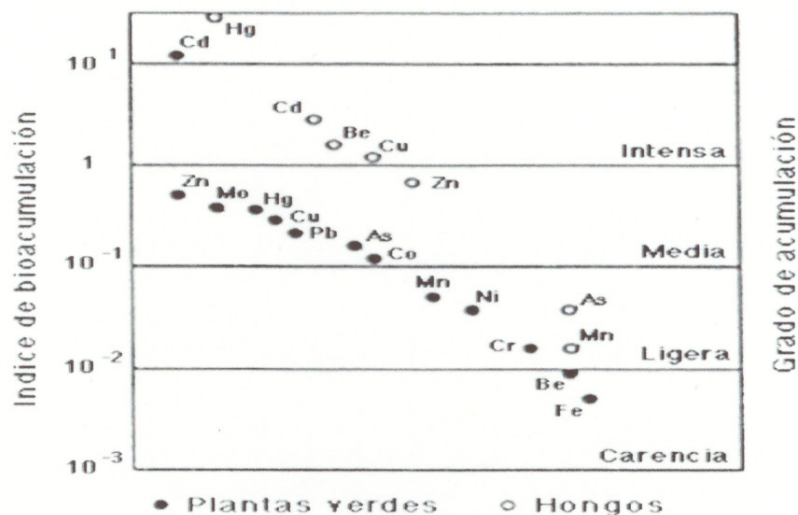


Figura 4: Índices de bioacumulación (IBA) de diversos elementos traza en plantas verdes y hongos. El IBA fue calculado como la relación de elementos traza contenidos en plantas y hongos, respecto a la concentración en los suelos. Tomado de Méndez *et al.*, 2009.

Los metales pesados muestran una elevada tendencia a bioacumularse y a biomagnificarse a través de su paso por los distintos eslabones de las cadenas tróficas (Delgadillo & González, 2011).

Los mecanismos de tolerancia varían entre las distintas especies de plantas y están determinados por el tipo de metal, eficiencia de absorción, traslocación y secuestro. Las fases del proceso por el cual las plantas incorporan y acumulan metales pesados son las descritas por Navarro, Aguilar, & López (2007), y son:

Fase I: Que implica el transporte de los metales pesados al interior de la planta y, después, al interior de la célula. Aquí, la raíz constituye el tejido de entrada principal de los metales, los cuales llegan por difusión en el medio, mediante flujo masivo o

por intercambio catiónico. La raíz posee cargas negativas en sus células, debido a la presencia de grupos carboxilo, que interaccionan con las positivas de los metales pesados, creando un equilibrio dinámico que facilita la entrada hacia el interior celular, ya sea por vía apoplástica o simplástica.

Fase II: Una vez dentro de la planta, las especies metálicas son secuestradas o acomplejadas mediante la unión a ligandos específicos, dentro de los cuales se pueden señalar: ácidos orgánicos (ácidos cítrico, oxálico y málico), algunos aminoácidos (histidina y cisteína) y dos clases de péptidos: fitoquelatinas y metalotioneínas.

Las fitoquelatinas son ligandos de alta afinidad que tienen como sustrato al glutatión. Están constituidas básicamente por 3 aminoácidos: ácido glutámico, cisteína y glicina, unidos por enlaces peptídicos. Las metalotioneínas a su vez, son polipéptidos de unos 70-75 aminoácidos con un alto contenido en cisteína, aminoácido capaz de formar complejos con cationes mediante el grupo sulfidrido. Tienen una marcada afinidad por las formas iónicas de zinc, cadmio, mercurio y cobre.

Fase III: Que implica la compartimentalización y detoxificación, proceso por el cual, el complejo ligando-metal queda retenido en la vacuola.

2.4.1. Transporte de arsénico

En condiciones aeróbicas, en el arroz, el As V es la especie predominante y debido a la similitud química con el fosfato, As (V) es absorbido por los transportadores de fosfato, incluido OsPht1 y OsPT8 (Chen *et al.*, 2017 & Wang, Zhang, Mao, Xu, & Zhao, 2016). Después de la captura, As (V) puede reducirse rápidamente a As (III) en células vegetales por el transportador HAC1 (alto contenido de arsénico) arseniato reductasas (Shi *et al.*, 2016 & Tripathi *et al.*, 2007).

Por el contrario, el arsenito es la especie predominante de arsénico en el suelo en condiciones anaeróbicas. Estudios recientes han demostrado que, en las plantas de arroz, el arsenito se absorbe a altas tasas de afluencia que sigue la cinética de Michaelis-Menten (Abedin, Feldmann & Meharg 2002).

En el arroz, la absorción de arsénico comparte la misma ruta que la absorción de silicio. El arroz es un fuerte acumulador de silicio que puede permitir la absorción eficiente y la translocación de arsenito en los brotes. La aquaporina Lsi1 (proteína), que es responsable de la entrada de silicio (como ácido silícico) en las células de la raíz, es permeable al arsenito (Ma *et al.*, 2008). La razón detrás de esto es la similitud entre el tamaño y la química de coordinación del ácido silícico y el arsenito. También se ha encontrado que el transportador de flujo de Si Lsi2 media el eflujo As^{+3} (Chen *et al.*, 2017 & Ma *et al.*, 2008).

Tanto Lsi1 como Lsi2 se localizan en la membrana plasmática de las células exodermales y endodérmicas de las raíces. La proteína Lsi1 se localiza en el lado distal de la célula, mientras que Lsi2 en el lado proximal. Por lo tanto, la función concertada de estos dos produce un flujo efectivo de silicio y As (III) a través de la endodermis y hacia el xilema para su translocación (Ma *et al.*, 2008). Estos resultados indican que Lsi2 desempeña un papel más crítico que Lsi1 en el transporte de As hacia el grano de arroz (Chen *et al.*, 2017 & Ma *et al.*, 2008).

Además, Chen *et al.*, (2017) & Wu *et al.*, (2012) explican que en contraste con los transportadores de As (III), el hierro juega un papel importante en el secuestro de arsénico y reducir la absorción de arsénico en el arroz. La placa de hierro se forma en las raíces del arroz por oxidación de Fe^{+2} a Fe^{+3} , principalmente debido al movimiento radial del oxígeno desde el aerénquima al suelo y las actividades microbianas. Como resultado de la adsorción y/o coprecipitación, la placa de hierro puede secuestrar arsénico en las raíces de arroz, jugando un papel importante en la reducción de la absorción y acumulación de este metaloide, lo que puede reducir la toxicidad del mismo.

2.4.1.1. Transporte de As en los nodos de arroz

Los nodos de arroz son centros importantes para controlar su distribución elemental y se ha informado que, con concentraciones de arsénico mucho más altas en entrenudos y hojas, los nódulos de arroz son el lugar más crucial para el almacenamiento de arsénico, y sirven como un filtro que restringe la transferencia a los brotes y granos de arroz (Chen, Qin, Zhu, Lorenzo, & Rosen, 2013 & Wu *et al.*, 2012).

Estos autores señalan además que, durante la etapa reproductiva, el transportador OsABCC1 se expresa en los tejidos vasculares como el nodo superior I y limita el transporte de los granos al secuestro de arsénico en las células del floema. Además, Lsi2 también muestra expresión de alto nivel en el nodo I donde Lsi2 mejora la distribución de Si en la panícula de arroz, pero desafortunadamente también ayuda al transporte de As^{+3} a los granos de arroz.

2.4.2. Transporte de cadmio

Se han documentado tres procesos de transporte con mayor probabilidad de mediar la acumulación de cadmio en los brotes y, posteriormente, en las semillas: (i) captación por raíces, (ii) translocación mediada por carga de xilema a brotes, y (iii) una mayor translocación a las semillas a través del floema (Fujimaki *et al.*, 2010 & Uraguchi *et al.*, 2009).

La absorción de cadmio en las raíces se ha considerado un proceso clave en la acumulación general de cadmio de la planta; la absorción activa de cadmio en las raíces se ha demostrado en varias plantas. Los enfoques moleculares indican que los transportadores de metales esenciales como Zn^{+2} y Fe^{+2} pueden mediar en la absorción de cadmio en las raíces. Se ha demostrado que la carga y el transporte de xilema pero no la absorción por las raíces es uno de los pasos que controlan la velocidad para la acumulación de cadmio en el grano de las plantas gramíneas (Chang, Yang, & Chao, 2018 & Uraguchi *et al.*, 2009).

Por otro lado, en el cuello de la panícula, el floema es la principal ruta de transporte de cadmio hacia los granos (Tanaka *et al.*, 2007). En la savia del floema, este metal se une a una proteína desconocida de 13 kDa y compuestos tioles. Se encontró que después de 7 h de tratamiento con cadmio, el mismo se deposita preferentemente en panículas en lugar de en láminas foliares. Lo cual sugiere que los nodos son el tejido importante para redirigir el transporte de cadmio desde las raíces, probablemente transfiriéndolo del xilema al floema.

Además del cadmio absorbido por las raíces, la removilización del cadmio en las láminas foliares también contribuye a la acumulación de este elemento en el grano. Y también, se ha propuesto que una cantidad sustancial de cadmio acumulado en las hojas antes de su partida se remueve y se transporta a los granos durante la etapa de maduración (Uraguchi & Fujiwara, 2012).

Recientemente, se han identificado varios transportadores de cadmio en el arroz. El cadmio se absorbe de los suelos a las raíces, proceso mediado por los transportadores: transportador de metales divalentes tipo 1 en *Oryza sativa* (OsIRT1) y la proteína natural de macrófagos asociada a resistencia de tipo 1 en *Oryza sativa* (OsNRAMP1).

Posteriormente, OsHMA3n (el alelo funcional de OsHMA3) juega un papel crítico en la compartimentación de cadmio en vacuolas en células de la raíz y por lo tanto regula negativamente la carga en el xilema de cadmio. OsHMA3a (el alelo no funcional de OsHMA3) no puede funcionar en la compartimentación de cadmio vacuolar en las raíces y que da como resultado una alta eficacia de la translocación de dicho metal de raíz a brote. También, OsLCT1 contribuye a la removilización de cadmio de las láminas foliares a través del floema y también es probable que desempeñe un papel en la transferencia intravascular de cadmio en los nódulos.

2.4.2.1. Admisión por raíces

Se ha documentado que, en suelos inundados, OsIRTs pueden ser inducidas por los niveles más bajos de hierro disponible y después que se inducía la liberación de OsIRTs del agua, se podía contribuir a la absorción de cadmio (Takahashi *et al.*, 2011).

Lee & An, (2009), indican que cuando se ha dado una sobreexpresión de OsIRT1, la acumulación de Cd en las raíces y los brotes se incrementa, lo cual sugiere que esta proteína transportadora de hierro transporta además cadmio. Estos autores concluyeron que OsIRT1 está potencialmente involucrado en la absorción de cadmio de la raíz, pero su contribución se ve afectada en gran medida por las condiciones ambientales del suelo.

En otro estudio similar, se encontró que, en el arroz, hay siete genes de Nramp, se los cuales el OsNramp1, un transportador de hierro, se ha establecido como un transportador de afluencia de cadmio en la membrana plasmática (Uraguchi & Fujiwara, 2012 & Takahashi *et al.*, 2011).

Estos autores concluyeron que es posible que OsNRAMP1 transmita cadmio al citoplasma en las capas internas de las raíces luego de la absorción de cadmio desde la rizosfera por OsIRT1, y participe en el control de la disponibilidad del metal para transportarlo en el xilema.

2.4.2.2. Carga de xilema y translocación de raíz a brote

La capacidad de translocación del cadmio al xilema mediada en los brotes se muestra como un determinante importante para la acumulación de cadmio en muchas plantas incluyendo arroz (Uraguchi & Fujiwara, 2012 & Uraguchi *et al.*, 2009). En este sentido, Uraguchi *et al.*, (2011), indican también que el principal determinante de la concentración de dicho metal en los tejidos de los brotes es la capacidad de translocar el cadmio de la raíz a través del xilema, en lugar de la absorción por las raíces. Los análisis de loci de rasgos cuantitativos (QTL) han

indicado varias regiones cromosómicas que controlan la acumulación de cadmio en los brotes de arroz; uno de estos loci regula la carga de cadmio en el xilema.

Investigaciones señalan que OsHMA3 actúa como transportador de cadmio, y que su localización es en la membrana vacuolar, por lo cual las funciones de OsHMA3 reducen la carga de cadmio en el xilema y su posterior acumulación en los granos (Uraguchi & Fujiwara, 2012).

Específicamente, se ha documentado que el gen OsHMA3 es el responsable de la baja acumulación de cadmio en arroz. El gen codifica un transportador perteneciente a la familia ATPasa tipo P1B. Se encontró que el transportador a bajas concentraciones de cadmio es funcional, pero a altas concentraciones de metal había perdido su función, probablemente debido a una única mutación de aminoácidos. Los resultados indicaron que OsHMA3 a bajas concentraciones de cadmio limita su translocación desde las raíces hasta los tejidos sobre el suelo secuestrando selectivamente cadmio en las vacuolas de la raíz (Ueno *et al.*, 2010).

Por otro lado, Nakanishi *et al.*, (2006) mostraron que las condiciones deficientes de hierro afectaron la distribución de cadmio en las plantas de arroz y que la expresión de OsIRT1 y OsIRT2, genes transportadores Fe^{2+} en el arroz, aumentaron la sensibilidad de cadmio, lo que sugiere que estos transportadores están involucrados en la translocación de cadmio en arroz (Fujimaki, *et al.*, 2010).

2.4.2.3. Transporte de floema hacia los granos

Los mecanismos por el cual se transporta el cadmio en el floema en plantas de arroz no han sido dilucidados, sin embargo, se ha encontrado en el floema casi el 100% de la deposición de cadmio en los granos (Tanaka *et al.*, 2007, en Uraguchi & Fujiwara, 2012).

Se sugiere la transferencia de cadmio de xilema a floema en los ganglios y el transporte de cadmio del floema a través de un cuello de panícula muestra una variación genotípica con la participación de transportadores en los nodos para el transporte de cadmio del floema en los granos (Uraguchi *et al.*, 2011 & Fujimaki *et al.*, 2010). Estos estudios indicaron la existencia de transportadores que median la translocación de cadmio en los granos y que la regulación de los transportadores puede alterar el nivel de deposición de este metal en los granos (Uraguchi *et al.*, 2011).

Uraguchi & Fujiwara, (2012) indicaron que una primera identificación de un transportador de cadmio en el floema de las plantas está dada por el transportador de cationes de baja afinidad (OsLCT1), en las láminas foliares el cual funciona en la remoción de cadmio por floema, y en el nodo I. En este sentido, OsLCT1 es probable que desempeñe un papel en la transferencia intravascular de cadmio desde grandes haces vasculares ampliados a haces vasculares difusos, que se conectan a la panícula.

También (Tanaka *et al.*, 2010, Fujimaki, *et al.*, 2010 & Uraguchi *et al.*, 2009) documentaron que el transporte de floema también se ha considerado un paso clave de la translocación de cadmio al grano, porque el transporte de xilema se dirige principalmente a los órganos de mayor transpiración, como las hojas, pero no a los sitios de mayor demanda de minerales, como los granos. Estos autores indican que se estimó entre un 91% a un 100% de cadmio en granos de arroz se deposita desde el floema.

Uraguchi *et al.*, (2009), señalaron que dado que es posible que el cadmio del xilema sea transportado directamente a los granos después de la transferencia de xilema-floema, puede causar una mayor acumulación de cadmio en los granos. De hecho, el análisis del trazador en la etapa de llenado de grano del arroz indicó que el cadmio cargado al xilema se transfirió al floema en los nodos y se transportó directamente a los granos a través del floema.

2.4.3. Transporte de cobre

Debido a que el cobre es esencial y tóxico dependiendo de la concentración, los organismos, incluidas las plantas, han desarrollado una red homeostática para controlar las concentraciones celulares de cobre. La homeostasis de este metal en las plantas depende del control de la absorción de raíz, translocación de raíz a brote, compartimentación y distribución / redistribución vacuolar de cobre a varios órganos (Huang *et al.*, 2016).

En las plantas, el cobre se absorbe principalmente en raíces por transportadores de cobre de alta afinidad de tipo CTR (COPT) como COPT1 en arroz. Deng, Yamaji, Xia, & Ma, (2013) indican además que las ATPasas funcionan en la homeostasis del cobre en arroz. Así por ejemplo se ha encontrado que AtHMA5 está involucrado en cargar dicho metal en el xilema para la translocación de raíz a brote y/o desintoxicación de cobre en raíces.

En contraste, los transportes AtMA6/PAA1 movilizan cobre a través de la envoltura de cloroplasto, mientras que en el tilacoide AtHMA8/PAA2 probablemente transporta cobre en la luz del tilacoide. AtHMA7/RAN1 ha sido propuesto para entregar cobre a los receptores de etileno (Huang *et al.*, 2016 & Williams & Mills, 2005).

En arroz, OsHMA5 ha sido demostrado que está involucrado en la carga de cobre al xilema para la translocación desde la raíz. La proteína transportadora de metal-nicotianamina (YSL16), es requerida para reciclar cobre de tejidos más viejos a los tejidos jóvenes en desarrollo, así como hacia granos. Se desconoce cuáles otros transportadores estén involucrados en el proceso de transporte de cobre (Huang *et al.*, 2016).

También se ha determinado que, en el tejido radicular, el cobre está casi por completo en forma de complejos; sin embargo, lo más probable es que el metal entre a las células de la raíz en formas disociadas. Sin embargo, el cobre tiene baja movilidad en relación con otros elementos en las plantas y la mayoría de este metal

parece permanecer en los tejidos de las raíces y las hojas hasta que envejecen; solo pequeñas cantidades pueden moverse a órganos jóvenes.

Otro aspecto importante que debe considerarse es que hay una tendencia a acumular cobre en los órganos reproductivos de las plantas; esto, sin embargo, difiere ampliamente entre las especies de plantas. Las mayores concentraciones de cobre se han encontrado en el embrión de granos de este cereal y en el recubrimiento de la semilla (Huang *et al.*, 2016).

2.4.4. Transporte de cromo

Los mecanismos moleculares precisos relacionados con la reacción de defensa contra la exposición al cromo, así como la translocación y la acumulación en el arroz siguen siendo poco conocidas (Sinha, Pakshirajan, & Chaturvedi, 2018, Stambulska, Bayliak, & Lushchak, 2018 & Kabir, 2016).

Se ha indicado que debido a que el cromo no es esencial para las plantas, éstas toman este elemento a través de diversos transportadores de elementos esenciales como hierro, sulfato y fosfato. Además, el impacto de la acumulación de dicho metal en la fisiología de las plantas depende de la especiación del metal responsable de su movilización, su posterior absorción, translocación y acumulación que da como resultado toxicidad (Huda, Swaraz, Reza, Haque, & Kabir, 2016, Kabir, 2016 & Hayat *et al.*, 2012). Huda *et al.*, (2016) señalaron que en arroz, la absorción de cromo en las plantas también está relacionada con la portador de azufre.

Aunado a lo anterior, se conoce que el estado de valencia del cromo es uno de los principales factores que incide sobre el transporte de este elemento dentro de la célula vegetal (Sinha, Pakshirajan, & Chaturvedi, 2018 & Stambulska *et al.*, 2018). Al respecto, Kabir, (2016) señala además que el Cr^{+6} se capta activamente, probablemente mediado por portadores como el sulfato o el hierro, mientras que el Cr^{+3} probablemente se absorba pasivamente a través del intercambio catiónico.

En el caso del hierro, se ha indicado que la reductasa de quelato férrico (FRO) y genes transportadores regulados por hierro (ZIP) juegan roles clave en la adquisición de cromo en las plantas (Kabir, 2016); mientras que la participación de transportadores de sulfato en la captación de Cr^{+6} son evidentes a partir de estudios recientes llevado a cabo en la inhibición del transporte de sulfato y asimilación vía utilizando inhibidores transgénicos, enzimáticos y metabólicos (Sinha, Pakshirajan, & Chaturvedi, 2018 & Stambulska, Bayliak, & Lushchak, 2018).

En el caso del Cr^{+3} Sinha, Pakshirajan, & Chaturvedi, (2018) explican que éste se une fuertemente al grupo carboxilo de aminoácidos en proteínas que forman complejos binucleares. Este proceso ocurre posterior a la reducción de Cr^{+6} a Cr^{+3} menos dañino en la superficie de la raíz de la planta, en donde participan constituyentes de células vegetales como NADPH, glutatión, varias pentosas, FADH_2 , ácido ascórbico, cianocobalamina, citocromo P-450 y la cadena respiratoria mitocondrial están involucrados en el proceso de reducción (Hayat *et al.*, 2012).

También es importante señalar que la localización de OsHMA3 a membranas vacuolares sugiere un papel para la proteína en la transferencia de iones de metales pesados a través de la membrana vacuolar, del citoplasma a la vacuola. Este proceso de inmovilización de cromo en la vacuola de las células de la raíz de la planta se sugiere como una razón principal para la acumulación excesiva de este metal en las raíces (Kabir, 2016).

Por último, un hecho importante en la distribución de cromo en los cultivos es la indicada por Hayat *et al.*, (2012), quienes señalan que la máxima cantidad de este contaminante se encuentra en las raíces y la mínima en los órganos vegetativos y reproductivos. La razón de la mayor acumulación en las raíces de las plantas podría deberse a que el cromo metal está inmovilizado en las vacuolas de las células de la raíz, lo que lo hace menos tóxico, lo que puede ser una respuesta de toxicidad natural de la planta.

2.4.5. Transporte de plomo

En algunas plantas el plomo es capaz de acumularse principalmente en las raíces siendo mínima su presencia en otras partes u órganos de los cultivos. De manera similar su disponibilidad para las plantas está en función del pH del suelo.

Sin embargo, el comportamiento del plomo en el suelo, en el contexto de las especies, la solubilidad, la movilidad, y la biodisponibilidad, está controlada por interacciones complejas gobernadas por muchos factores biogeoquímicos como el pH, las condiciones redox, la capacidad de intercambio catiónico, la mineralogía del suelo, condiciones biológicas y microbianas, cantidad de plomo presente, orgánico e inorgánico, niveles de ligandos, niveles de cationes en competencia, y especies de plantas involucradas. Dichos factores pueden actuar en combinación entre sí y pueden alterar el comportamiento del plomo presente, así como la velocidad de absorción de las plantas (Kumar, Smita, & Cumbal Flores, 2017 & Pourrut *et al.*, 2011).

El comportamiento del plomo en el suelo y la absorción de las plantas está controlado por su especiación y por el pH del suelo, el tamaño de partícula del suelo, la capacidad de intercambio catiónico, el área de la superficie de la raíz, la exudación de la raíz y el grado de transpiración micorrízica.

2.4.5.1. Captación de plomo por las plantas

Parte del plomo presente en la solución del suelo se adsorbe en las raíces y luego se une a grupos carboxilo de ácido urónico de mucílago o directamente a los polisacáridos de la superficie de la célula de rizoderma.

Sin embargo, la absorción de plomo no es uniforme a lo largo de las raíces de las plantas ya que se puede observar un gradiente de concentración de plomo desde el ápice de la raíz. De hecho, las mayores concentraciones de plomo se pueden encontrar en los ápices de las raíces, donde las células de la raíz son jóvenes y tienen paredes celulares delgadas que facilitan la absorción. Además, el área apical

es el área donde el pH rizodérmico es el más bajo, lo que aumenta la solubilidad del plomo en la solución del suelo.

A nivel molecular, el mecanismo por el cual el plomo entra en las raíces sigue siendo desconocido. Este elemento puede ingresar a las raíces a través de varias vías un de ellas particularmente a través de canales iónicos (Pourrut *et al.*, 2011 & Wang *et al.*, 2007). Recientemente Kumar, Smita, & Cumbal, (2017) indicaron que la absorción del plomo por las raíces ocurre a través de la vía apoplástica o a través de canales permeables al Ca^{2+} .

2.4.5.2. Acumulación de plomo en las plantas

Después de la absorción, el plomo se acumula principalmente en las células de la raíz, debido al bloqueo por las tiras de Casparian dentro de la endodermis, el secuestro en las vacuolas de células rizodermiales y corticales por la formación de complejos, inmovilización por pectinas con carga negativa dentro de la pared celular, acumulación en membranas plasmáticas, la unión de fitoquelatinas, glutatión y aminoácidos, precipitación de sales de plomo insolubles en espacios intercelulares y síntesis de osmolitos (Kumar *et al.*, 2017 & Pourrut *et al.*, 2011 & Arias *et al.*, 2010).

El transporte de metales desde las raíces de las plantas hasta los brotes requiere movimiento a través del xilema (Pourrut *et al.*, 2011) y este proceso de translocación de plomo a partes aéreas de plantas aumenta en presencia de quelantes orgánicos como ácido etilen diamino tetraacético (AEDT) (Barrutia *et al.*, 2010) o ciertas especies de microorganismos (Arias *et al.*, 2010).

También se ha documentado que el plomo se transloca a las áreas foliares a través del flujo vascular. Al pasar por el xilema, el plomo puede formar complejos con aminoácidos o ácidos orgánicos. Sin embargo, el plomo también puede transferirse en forma inorgánica, como lo es el cadmio (Pourrut *et al.*, 2011).

2.5. Valores máximos permitidos de metales pesados en arroz

A fin de comparar los valores de los metales pesados que se obtengan en la investigación y evaluar el riesgo asociado por la ingesta de arroz, se emplearán las normativas que se describen a continuación.

En el nivel nacional, la normativa para la concentración de metales pesados en arroz corresponde al Reglamento Técnico DGNTI-COPANIT 75-2002, el cual no establece los valores máximos permitidos de metales pesados en arroz (Ministerio de Comercio e Industrias, 2002). Esta norma se fundamenta en El Codex Alimentarius, la cual a su vez señala que: *“Los productos regulados por las disposiciones de esta Norma deberán estar exentos de metales pesados en cantidades que puedan representar un peligro para la salud humana”* (FAO/OMS, 2007).

Debido a que no se señalan valores máximos permitidos se emplearán los criterios del Comité Mixto FAO-OMS, el cual establece los siguientes valores máximos de metales pesados en arroz: Cadmio $0,4 \text{ mg.Kg}^{-1}$; plomo $0,2 \text{ mg.Kg}^{-1}$ (FAO-OMS, 2015).

En el caso del As se ha establecido un valor máximo de $0,2 \text{ mg.Kg}^{-1}$ de arroz pulido y de $0,35 \text{ mg.Kg}^{-1}$ de arroz descascarillado (arroz integral) siendo este último valor establecido el 27 de junio de 2016 como enmienda a la concentración de arsénico en arroz.

Por su parte, la Unión Europea contempla los siguientes valores máximos permitidos: Plomo $0,20 \text{ mg.Kg}^{-1}$, cadmio $0,10 \text{ mg.Kg}^{-1}$ y arsénico de $0,20 \text{ mg.Kg}^{-1}$ (Comisión Europea, 2017).

Sumado a lo anterior, se determina los valores de Ingesta Semanal Tolerable Provisional (ISTP), según datos presentados en el cuadro 4.

Cuadro 4: Ingesta Semanal Tolerable Provisional (ISTP) para metales pesados

No. DE CODIGO	CONTAMINANTE NOMBRE	ISTP
1.3	Arsénico	- ISTP: 15 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de peso corporal (JECFA, 1988) - No está clara la situación relativa al arsénico orgánico presente en los alimentos
1.6	Cadmio	- ISTP: 7 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de peso corporal (41ª reunión del JECFA)
1.11	Plomo	- Pueden plantearse problemas para la salud - ISTP: 25 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de peso corporal (JECFA, 1986) - Posibles problemas para la salud

Tomado de: Torres, 2011.

2.6. Análisis de metales pesados

2.6.1. Determinación de la concentración total de metales pesados

2.6.1.1. Preparación de la muestra y extracción

Se han ensayado diversas técnicas para la preparación de las muestras de arroz, ya que representa un punto crítico para el éxito del análisis, y se considera una importante fuente de error en el desarrollo del método analítico. En los estudios de Mataveli *et al.*, (2016), se investigaron diferentes procedimientos de preparación de muestras para verificar su capacidad en la cuantificación de las concentraciones totales de arsénico, cadmio y plomo por medio de ICP-MS.

Estos estudios concluyeron que todos los procedimientos: horno de mufla, digestión ácida calentando en bloque metálico o placa caliente y digestión ácida asistida por radiación de microondas, dieron buenos resultados, con recuperaciones que van desde 80.0 a 120.0%

McSheehy, Szpunar, Morabito & Quevauviller, (2003), concluyen que las técnicas modernas de extracción de metales pesados emplean extracción ácida asistida por microondas. Las microondas de baja energía facilitan la extracción, requiriendo además menor tiempo para el proceso. La energía del microondas penetra la muestra y la calienta en forma directa; ocasionando un cambio en el campo eléctrico del microondas.

Welna, Szymczycha, & Pohl (2015) señalan además que la digestión asistida por microondas es un proceso rápido que se completa de 0,5-1 hora ya que se realizan a temperaturas elevadas (90-250 °C). Esta extracción emplea como solventes una mezcla de HNO₃ concentrado y H₂O₂ (2:1) y para eliminar cualquier residuo sólido la muestra posterior a la extracción es sometida a centrifugación y filtración, la cual se realiza usando una membrana de fibra de vidrio (0,2µm o 0,45µm).

En relación con los extractantes, otra investigación explica que en la actualidad predomina la digestión en medio ácido en sistemas de horno microondas que usan mezclas de HNO₃-H₂O₂ y se prefiere para el tratamiento de muestras de arroz antes de las mediciones de las concentraciones totales (Ma, Wang, Tang, & Yang, 2016; Baba *et al.*, 2014 & Hymer & Caruso, 2004).

2.6.1.2. Principio del ICP-MS

La determinación de metales en muestras complejas requiere el acoplamiento de técnicas adecuadas de separación y detección. En la actualidad, se dispone de técnicas de detección robustas, fiables, de elevada precisión y sensibilidad, dentro de las cuales destaca el Plasma Acoplado Inductivamente con Detector Masa.

El principio en que se fundamenta el ICP-MS, es explicado por Franco, Gómez & García (2015); AOAC, (2015) & Jackson & Punshon (2015) y se detalla a continuación:

La instrumentación más ampliamente utilizada de ICP-MS presenta un cuadrupolo como analizador, en el cual la muestra líquida, introducida generalmente mediante nebulización neumática, se transforma en un aerosol en un sistema de nebulización.

Posteriormente, este aerosol es transportado por un flujo de gas (argón) al interior de un plasma de este mismo gas noble, generado en una antorcha de cuarzo mediante la aplicación de radiofrecuencias. Dicho plasma alcanza temperaturas entre 8000 y 10000 K, que permite que la muestra sea desolvatada, vaporizada,

atomizada e ionizada, formándose principalmente iones monoatómicos y monopositivos (aunque también pueden formarse iones con dobles cargas).

Estos iones formados pasan a través de una interfase de extracción, formada por dos conos metálicos (de níquel o platino) que se encuentra a vacío moderado (~1-2 torr), hasta alcanzar un sistema de lentes electrostáticas (zona de alto vacío) que enfoca el haz de iones hacia una celda de colisión/reacción para eliminar las posibles interferencias de matriz o espectrales que conlleva el uso de esta técnica. Una vez reducidas o eliminadas dichas interferencias el haz de iones procedentes de la celda es conducido al analizador, en este caso un cuadrupolo, que separa los iones en función de su relación m/z , hasta ser registrados por un detector.

La corriente de iones se transporta luego al filtro de masa cuadripolar, donde solo se pasan iones que tienen una relación de masa a carga deseada (m/z) en cualquier momento en el tiempo. Los iones que salen del filtro de masa son detectados por un detector de estado sólido y la señal es procesada por el sistema de manejo de datos.

2.6.1.3. Detección, identificación y cuantificación

Ammann (2007), señala que ICP-MS se emplea rutinariamente en diversos campos como la geoquímica, el medio ambiente y las ciencias, las industrias (alimentaria, química, semiconductora, nuclear), la ciencia forense y la arqueología. Después de la introducción del primer instrumento comercialmente disponible en 1983, la técnica ha mejorado continuamente, diseñándose instrumentos fiables y robustos con límites de detección muy bajos (ppt) y alta resolución espectral (10 000), con la capacidad de analizar multielementos con facilidad de cuantificación (Ammann, 2007).

El ICP-MS se ha convertido en la actualidad en una poderosa herramienta para el análisis elemental por sus excelentes características analíticas, como son: rapidez

en el análisis, elevada especificidad elemental e isotópica, amplio campo de aplicación (Franco, Gómez & García, 2015).

Se ha demostrado además que el uso del ICP-MS para este proceso, pues permite mejorar la especificidad y sensibilidad analítica, facilitando la separación de iones de acuerdo con la relación masa-carga. El ICP-MS presenta además la ventaja sobre otros métodos pues aumenta la sensibilidad y selectividad en análisis multielementales (McSheehy, *et al.*, 2003).

También se ha empleado esta técnica analítica en diferentes alimentos, empleando espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). Los resultados permitieron concluir que ICP-MS se ha convertido en un método instrumental valioso debido a su amplio rango dinámico y capacidad para análisis de elementos múltiples (Voica, Dehelean, & Kovacs, 2012).

Investigaciones de Voica *et al.*, (2012) concluyeron que este método asegura el límite de cuantificación requerido para las determinaciones cuantitativas de las concentraciones de estos elementos en los alimentos; con una buena linealidad ($0,998 \geq R \geq 0,9999$) para la mayoría de los elementos, por lo cual los autores recomiendan el método descrito para la determinación a nivel de traza y ultra traza.

Otras características señaladas por estos autores con relación a este sistema analítico es que permite obtener espectros de masas (m/z), simples, que se generan a expensas de múltiples fragmentaciones, permitiendo la detección y cuantificación hasta un 85% de todos los elementos con concentraciones no medibles por otras técnicas.

También se conoce que esta técnica analítica es versátil, robusta, de mayor sensibilidad (ppt) y capaz de proporcionar información precisa y confiable sobre concentraciones e identidad de especies (Franco, Gómez & García, 2015 & Ammann, 2007). Por otro lado, es una ventaja única y sobresaliente de ICP-MS utilizar estándares de elementos certificados, específicos y de bajo costo, lo que

permite un control cuantitativo de las pérdidas elementales, la descomposición de las especies o la contaminación en cada paso de un experimento (Ammann, 2007).

2.6.1.4. Control de calidad

Para realizar el control de calidad en la determinación de metales pesados se emplean materiales de referencia. CENMA (2006), indica que “un material de referencia (MR), es un material(es) o sustancia(s) que tiene(n) una (varias) propiedad(es) suficientemente bien establecidas que pueden ser utilizados en la calibración de instrumentos de laboratorio, comprobación de métodos de medida o para la asignación de valores a materiales”.

Así mismo, se tienen los materiales de referencia certificados (MRC) que serán *“aquellos materiales de referencia en los cuales, la(s) propiedad(es) se hallan certificadas por un procedimiento técnicamente validado, acompañadas por un certificado y que tienen trazabilidad e incertidumbre establecidas”* (CENMA, 2006).

La aplicación de métodos complejos de preparación de la muestra, los cuales suelen implicar diversas etapas analíticas, conlleva al aumento de errores analíticos. Por lo tanto, el control de calidad es un factor crítico en los análisis, por lo que el Programa de Medidas y Pruebas de la Unión Europea ha organizado varios proyectos para realizar estudios interlaboratorio y preparar materiales de referencia certificados (CRMs), haciendo especial hincapié en la identificación y eliminación de las fuentes de error que pueden afectar a este tipo de análisis (Gómez *et al.*, 2000).

También Welna Szymczycha & Pohl (2015), indican que el enfoque más confiable para demostrar la precisión del todo el método de análisis se basa en el análisis de materiales de referencia certificados (CRM) de diferentes harinas de arroz (blancas), dentro de las cuales se pueden destacar el IRM-804 del Centro Común de Investigación de la Comisión Europea-Instituto de Materiales de Referencia y Medida (JRC-IRMM), el cual fue empleado en esta investigación.

Se emplea el material de referencia para evaluar la precisión y exactitud según lo explicado en el apartado de metodología.

2.6.2. Especiación de arsénico

2.6.2.1. Conceptos previos

La determinación de arsénico total en una muestra es insuficiente, puesto que su toxicidad depende no solo de su nivel de concentración, sino también de la forma química bajo la que esté presente. Es por ello que las investigaciones en el campo de la Química Analítica se han centrado en las últimas décadas en el desarrollo de métodos analíticos para llevar a cabo la identificación y cuantificación de sus especies químicas, tanto para poder estimar su toxicidad como para comprender los procesos bioquímicos en los que están implicadas las distintas especies de arsénico (García, 2013).

En este mismo sentido, se ha indicado también que la caracterización completa de compuestos de arsénico es necesaria para comprender la ingesta, acumulación, transporte, almacenamiento, desintoxicación y activación de este elemento en el medio ambiente natural y en los sistemas vivos (Welna, Szymczycha, & Pohl, 2015 & Hymer & Caruso, 2004).

Esta caracterización comprende la determinación de arsénico total y la especiación, la cual es un proceso largo y que requiere de procedimientos adecuados, desde el muestreo hasta la determinación.

El término especiación en química analítica hace referencia a la *“determinación de los diferentes estados de oxidación de un elemento que prevalece en un determinado espécimen o para la identificación y cuantificación de compuestos biológicamente activos a los cuales el elemento está ligado”* (Burguera & Burguera, 1997).

2.6.2.2. Preparación de la muestra

La preparación adecuada de la muestra es un requisito previo esencial para una evaluación precisa de la exposición al arsénico proveniente de arroz contaminado, esto debido a que este alimento representa una matriz compleja. En primer lugar, se debe liberar el arsénico de la matriz después de la extracción de la muestra. En segundo lugar, dada la importancia toxicológica de las especies arsenicales, el procedimiento de extracción de las muestras debe preservar la especiación, es decir no debe haber interconversión de especies (Welna *et al.*, 2015; Zhao, Li, Xu, Luo & Ma, 2015 & Alava *et al.*, 2012).

Este aspecto también es señalado por Ma, Wang, Tang, & Yang, (2016) & Amaral, Nóbrega & Nogueira, 2013), los cuales señalan que, en los procedimientos de especiación, la preparación de muestras es uno de los pasos más crítico, donde pueden ocurrir problemas como: pérdidas durante el muestreo, contaminación, interconversión entre especies o incluso extracción ineficaz del analito.

También, se ha señalado que la preparación de muestra es la más crítica desde el punto de vista de las posibles fuentes de error del método analítico, pudiendo afectar tanto a la fiabilidad de los resultados obtenidos como al tiempo invertido en el mismo (García, 2013).

Welna *et al.*, (2015), indican que las muestras de arroz se pueden dividir en dos grupos: 1) recolectada en el campo (es decir, planta de arroz fresco con pajas y cáscaras con granos o granos solamente) extraída de plantaciones de arroz y, 2) comercializados, es decir, granos de arroz secados al aire de diferentes fuentes y tipos comercialmente disponibles en los mercados locales, importados o producidos localmente; dependiendo de las variedades de arroz, blanco, marrón, negro, rojo, amarillo, verde, sancochado, basmati, jazmín, risotto y arroz silvestre.

Estos autores indican que las muestras comerciales de arroz se pueden analizar sin ningún tipo de especial pretratamiento. Sin embargo, en la práctica, después de retirar las cáscaras, los granos de arroz se lavan inicialmente con agua y / o se

secan en un horno a 50-70 ° C durante 6-48 h, a 70-90 ° C durante la noche o hasta que se alcanza peso constante.

Posteriormente, las muestras se muelen manual o mecánicamente para homogenizar y luego son tamizados para seleccionar las fracciones apropiadas del tamaño de partícula. La temperatura de molienda debe permanecer por debajo de 40 ° C para mantener la estabilidad de la especie de arsénico durante el procesamiento (Welna *et al.*, 2015 & Hymer & Caruso, 2004).

Por último, las muestras en polvo se pueden almacenar a temperatura ambiente o dentro de un desecador, pero por lo general se mantienen en un refrigerador a 4-10 ° C o en un congelador a -4 ° C a -20 ° C (Welna *et al.*, 2015 & Pizarro *et al.*, 2003). El almacenamiento es considerado un factor clave debido a que se ha demostrado que la humedad favorece la actividad anaeróbica química o microbiológica que contribuye a las transformaciones entre As^{+3} , As^{+5} y MMA.

Las muestras de arroz también se pueden analizar sin pulverización o esmerilado. Sin embargo, esto puede conducir a resultados erróneos debido a la heterogeneidad en la distribución de arsénico a lo largo de los granos de arroz en un paquete. De hecho, Alava *et al.*, (2012), informaron que las muestras de arroz deben molerse finamente en polvo, ya que el tamaño de partícula juega un papel significativo en la posterior eficiencia de extracción de arsénico, llegándose a reportar inclusive disminuciones en del 75% cuando el arroz fue tratado como granos enteros en lugar de granos finamente molidos.

2.6.2.3. Extracción

Ma *et al.*, (2016) & Welna *et al.*, (2015) indican que la especiación de arsénico requiere de extracción en condiciones suaves para mantener la integridad de todas las especies arsenicales, debido a que la extracción cuantitativa de As^{+3} , se dificulta debido a que está fuertemente unida a los grupos -SH de proteínas citosólicas y constituyentes macromoleculares del arroz; se necesitan condiciones fuertes para

extraerlo. Por lo contrario, las formas orgánicas de arsénico (por ejemplo, DMA) no están químicamente ligadas a estructuras grandes en el arroz, por lo que dependen menos de los medios de extracción utilizados.

Welna *et al.*, (2015) detallan además que para determinar las concentraciones de arsénico total y especies arsenicales en arroz usando métodos de detección atómica y/o MS, las muestras deben estar en forma líquida. Las estrategias adecuadas para la preparación de la muestra de arroz son:

- Digestión seca o húmeda, que generalmente se emplea para la determinación de la concentración total de arsénico; utiliza reactivos agresivos (comúnmente ácidos concentrados) y tiene como objetivo descomponer la matriz de muestra y liberar arsénico en la forma de sus iones simples; y,
- Extracción con solventes basada en la no destrucción (o solo parcial) de la matriz de muestra; liberada como especies de interés de las muestras en solventes, por lo que proporciona un espectro de especiación de arsénico en el arroz.

Además, la eficiencia de extracción usando la digestión con microondas en recipientes cerrados fue mejor que usar la digestión con microondas en recipientes abiertos. Este aspecto es también constatado por Son, Lee, Kim, Lee, & Nam, (2019), los cuales aportan que la extracción asistida por microondas tiene algunas ventajas con su excelente y consistente eficiencia de extracción.

Otros estudios indican que existen diversas opciones de disolventes utilizados para el análisis de especiación de arsénico en tejidos de plantas. Entre ellos, los más importantes son el metanol, el agua, el ácido nítrico, el ácido fórmico, la solución enzimática, el tampón de fosfato y el tampón tris. Del mismo modo, los procedimientos de extracción también son numerosos, dentro de los que se pueden

señalar: agitación mecánica y calentamiento, asistida por ultrasonidos, extracción líquida presurizada o asistida por radiación de microondas, e incluso una combinación de estos procedimientos (Son *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2015 & Amaral, Nóbrega, & Nogueira, 2013).

En este sentido, Amaral *et al.*, (2013), Márquez *et al.*, (2012) & Zheng *et al.*, (2003), observaron que menos del 10% del total de arsénico en las plantas se extrajeron cuando se usó la mezcla de metanol/agua (9:1 v/v) como solvente, no obstante, se requerían nuevos estudios para buscar extractantes adecuados para plantas cultivadas en hábitats terrestres.

Otro estudio similar ensayó mezclas de metanol/agua, determinando que estas mezclas son extractantes eficaces de especies orgánicas y han sido empleadas comúnmente para la extracción de arsénico en plantas. Sin embargo, la eficacia de extracción para especies inorgánicas disminuye drásticamente cuando se usa una mezcla metanol/agua. Esto se debe a que las especies inorgánicas están principalmente unidas a la pared celular, lípidos, lignina y celulosa insoluble en plantas terrestres (Ma *et al.*, 2016).

En este contexto, Zheng Hintelmann (2009), estudiaron ocho extractantes diferentes para la separación de especies orgánicas e inorgánicas. Para ello se efectuaron procedimientos de extracción sólido-líquido y la especiación de arsénico en los extractos se llevó a cabo con HPLC-SF-ICP-MS. Los resultados obtenidos dependieron de los solventes de extracción utilizados en los diferentes procedimientos de extracción.

La extracción con metanol-agua condujo a recuperaciones de arsénico del 9% al 44%, mientras que se obtuvo un alto rendimiento de extracción (aproximadamente 82%) con agua. La hidrólisis alcalina también dio como resultado altos rendimientos de extracción (86% -98%), pero se observó una oxidación severa de As (III) a As (V).

Se observó que la extracción de especies de arsénico inorgánico fue reprimida por la presencia de metanol en los solventes de extracción, mientras que el alto contenido de metanol en los solventes de extracción fue efectivo para la extracción de especies orgánicas de arsénico. Por lo tanto, se recomienda realizar la extracción tanto con agua sola como con metanol-agua (9:1, v/v), para obtener el perfil completo de las especies de arsénico en las plantas terrestres.

Otro de los solventes extractantes es el ácido trifluoroacético (TFA), el cual ha mostrado ser apropiado para estos procedimientos (Zavala, Gerards, Gurleyuk, & Duxbury, 2008 & Gong, *et al.*, 2002). Ackerman *et al.*, (2005), ensayaron la especiación en arroz cocido. Las muestras de arroz se extrajeron usando ácido trifluoroacético y se especieron usando IC-ICP-MS. El procedimiento de TFA fue capaz de extraer 84-104% del arsénico de cinco diferentes muestras de arroz cocido. Las recuperaciones cromatográficas variaron del 99% al 116%, lo cual demostró que este solvente es recomendable para la especiación de arsénico.

En otro estudio, Schmidt *et al.*, (2008), compararon dos procedimientos de extracción: extracción de proteína modificada (MPE) y extracción con ácido trifluoroacético para raíces, tallos, hojas y granos de plantas de arroz. Los autores concluyeron que la extracción de MPE fue ineficiente (3-10%) para la extracción de arsénico en raíces, pero fue efectiva para otras partes de la planta, sin embargo, el procedimiento TFA fue efectivo en todas las partes de la planta.

2.6.2.4. Detección y cuantificación

En relación con la detección y cuantificación, los análisis de especiación, según lo señalado por Nogueira, Melo, & Figueiredo, (2018), Ma *et al.*, (2016), Carey *et al.*, (2012), Horner & Beauchemin, (2012) & Hymer & Caruso (2004), han crecido rápidamente especialmente con la utilización de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) integrado a espectrometría de masas acoplado inductivamente (ICP-MS), un sistema detector altamente sensible y robusto.

Aunque se han utilizado múltiples métodos para la especiación de arsénico en arroz, HPLC-ICP-MS es uno de los más empleados, debido especialmente a sus bajos límites de detección y versatilidad para determinar tanto especies volátiles como no volátiles. En este caso, se trata de una combinación de una técnica con alta potencia de separación, como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con una de detección que ofrece alta sensibilidad, robustez y un amplio rango dinámico lineal, como la espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (Ma *et al.*, 2016; Nogueira, Melo & Figueiredo, 2018 & Amaral *et al.*, 2013).

En otros estudios se combinaron las buenas capacidades de separación de HPLC con detección ICP-MS altamente sensible para identificar y cuantificar especies de arsénico en grano de arroz maduro, detectar arsenito, arseniato y arsénico dimetilado (DMA) con, ocasionalmente, trazas de arsénico monometilado (MMA). El porcentaje de rendimiento relativamente alto del HPLC-ICP-MS permite un análisis comparativo rápido del arsénico total y la especiación arsenical en cultivos de arroz (Carey *et al.*, 2012).

Por otro lado, se han utilizado una diversidad de fases móviles, obteniéndose diferentes resultados en el proceso de extracción (Ma *et al.*, 2016; Baba *et al.*, 2014 & Amaral *et al.*, 2013). Así, por ejemplo, la solución amortiguadora de fosfato se usa frecuentemente como fase móvil para la separación de intercambio aniónico; sin embargo, las sales no volátiles en el amortiguador pueden depositarse en los conos de la muestra y del skimmer, lo que da como resultado la inestabilidad de la señal y que se pierda mucho tiempo para limpiar las piezas del instrumento (Baba *et al.*, 2014).

También Baba *et al.*, (2014), señalan que: Xie *et al.*, separaron especies arsenicales en 12 minutos usando una columna de intercambio catiónico y una fase móvil de nitrato de amonio 10 mM y 0.0025% (v/v) ácido nítrico en modo isocrático. Sin embargo, los picos de As (V) y MAA se superpusieron parcialmente.

Las fases móviles de ácido nítrico y/o nitrato de amonio también se usaron en condiciones de elución en gradiente. El carbonato de amonio y el hidrógeno carbonato de amonio se han usado ocasionalmente como soluciones amortiguadoras volátiles para elución en gradiente en análisis de muestras de agua superficial, orina, pescado y músculo. Estas fases móviles son alcalinas, por lo que originan turbulencia cromatográfica en análisis con soluciones analíticas ácidas, como los extractos que se realizan en la determinación de este metaloide en arroz (Baba *et al.*, 2014).

Los trabajos de Francesconi *et al.*, también son referenciados por Baba *et al.*, (2014), quienes indican que recientemente se ha informado sobre la especiación de arsénico en alimentos que contienen arroz usando una columna PRP-X100 y ácido malónico acuoso a pH 5,6 bajo elución isocrática, logrando que estas condiciones den resultados rápidos (<6 min) con adecuada separación, condiciones que son esenciales para los análisis cotidianos con HPLC-ICPMS.

CAPÍTULO 3
ASPECTOS METODOLÓGICOS

3. ASPECTOS METODOLÓGICOS

3.1. Tipo de investigación

La investigación desarrollada en este trabajo es de tipo descriptiva y longitudinal.

3.1.1. Definición

La investigación corresponde a un estudio descriptivo debido a que como se señaló anteriormente especifica los niveles de concentraciones de 5 elementos potencialmente tóxicos a la salud del ser humano, a fin de establecer un análisis comparativo con los límites máximos permitidos por las normativas internacionales.

Adicionalmente, puede señalarse que se trata de una investigación longitudinal, pues en este estudio se han obtenido datos de diferentes tiempos de muestreo, permitiéndose comparar estos resultados y evidenciar si se han presentado cambios a través del tiempo en que se efectuó el muestreo y si entre los elementos analizados hay correlación.

3.2. Sujetos o fuentes de información

Se contó con la participación de fuentes de información humana, dentro de las cuales podemos destacar personal de instituciones públicas y privadas como: Ministerio de Desarrollo Agropecuario (MIDA), Asociación de Productores de Arroz de Chiriquí (APACH), Asociación Nacional de Molineros de Arroz (ANALMO), (ACODECO), Laboratorio de Análisis Medioambiental de la Universidad de Huelva.

3.3. Definición conceptual, instrumental y operacional de las variables

Variable dependiente: concentraciones de metales pesados.

Variable independiente: procedencia y clase de arroz.

Cuadro 5: Definición conceptual, operacional e instrumental

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Definición instrumental	Dimensiones	Indicadores
Procedencia del arroz	Procedencia: origen de algo o el principio de donde nace o deriva. Arroz: semilla de la planta <i>Oryza sativa</i> , perteneciente a la familia de las gramíneas, es un cereal que es considerado parte básica de la alimentación en gran parte del planeta.	Corresponde al origen geográfico de las semillas de <i>Oryza sativa</i> procesadas para el consumo humano y clasificadas como importado y nacional.	Entrevista a APACH y productores de arroz	Ubicación geográfica de los sembradíos de arroz	Arroz importado Arroz nacional
Clase de arroz	Clase: grupo de elementos que comparte características comunes	Clasificación asignada al arroz pulido, de acuerdo con la cantidad de granos enteros, granos dañados, rojos, amarillos y yesosos presentes durante la fase de empaque.	Entrevista a productores de arroz Etiquetado del producto	Características del arroz, clasificación durante el empaque	Arroz especial Arroz de primera clase
Concentración de metales pesados	Concentración: Cantidad de sustancia presente en un volumen determinado. Metales pesados: cualquier elemento químico metálico que tenga densidad 5 veces mayor al agua y sea tóxico en concentraciones bajas.	Cantidad de sustancia, expresada en $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ para elementos metálicos con densidad superior a 5 g.mL^{-1} .	Cuantificación mediante ICP-MS, HPLC-ICP-MS	Resultados de los análisis Normativas de la OMS y UE	Límites máximos permitidos y contenido de MP en los arroces

3.4. Población y muestra

Durante la fecha en que se realizó la etapa de muestreo de la investigación (octubre-diciembre de 2016), la provincia de Chiriquí contaba con 7 molinos encargados de procesar el arroz producido en esta región y el arroz importado (MIDA, 2016). Estos 7 molinos constituyeron los sitios donde se realizaría el muestreo.

La población estuvo representada entonces por el arroz procesado en estos 7 molinos, mientras que la muestra estuvo constituida por el arroz existente en 6 de los 7 molinos ya que uno de los molinos no estuvo anuente a participar de la investigación.

Estas muestras de arroz son empacadas según clase y por fecha, lo cual totalizó al final de la etapa de muestreo:

- 19 arroces nacionales, empacados como arroz de primera.
- 19 arroces importados, empacados como arroz especial.
- 2 muestras que contenían mezcla de arroz nacional y arroz importado.

3.4.1. Muestreo

Las muestras de arroz que se consideraron son aquellas que han sido sometidas a procesos de descascarillado y pulimiento (arroz especial y de primera).

Para considerar que la muestra sea similar al arroz utilizado para el consumo humano se muestreó en la fase de empacado de arroz. Se tomaron muestras en tres meses de producción: agosto, septiembre y octubre, a fin de realizar el muestreo posterior a la etapa de maduración del arroz en los silos (de 1-3 meses). Con la finalidad de disminuir la variabilidad de la muestra, la frecuencia de muestreo se efectuó quincenalmente y por clase de arroz se tomaron triplicados en cada fecha de muestreo.

Se muestrearon triplicados bolsas de arroz de 2 o 5 libras, dependiendo del tamaño de empaçado de los molinos. Es importante señalar que los empaques eran suministrados por el personal encargado del departamento de empaçado.

Posteriormente, las muestras fueron cuarteadas y se tomó una masa final aproximada de 10 g (por sugerencia del Laboratorio de Análisis Medioambiental de la Universidad de Huelva), y fueron almacenadas en bolsas para guardar alimentos elaboradas de polietileno y colocadas en desecador hasta el momento de enviarlas para los análisis.

Una vez en el laboratorio de la UHU las muestras triplicadas de cada una de las fechas fueron combinadas para formar una muestra compleja que fue la empleada para los análisis. Este procedimiento fue realizado por sugerencia del personal del laboratorio debido a los elevados costos de los análisis.

3.5. Métodos e instrumentos de investigación

3.5.1. Entrevistas

Se realizaron entrevistas con los directivos de la Asociación de Productores de Arroz de Chiriquí (APACH), a fin de conocer: la cantidad de molinos que comercializan arroz en Chiriquí, su localización, proceso que se realiza en los silos, así como la frecuencia en que llega nuevo arroz, todo ello con la finalidad de establecer un plan de muestreo.

Además, en cada fecha de muestreo se efectuó entrevista al personal asignado en los silos para identificar cómo se empaçaba el arroz según procedencia, es decir si el arroz nacional se empaçaba como arroz de primera o especial o si se mezclaba.

3.5.2. Trabajo experimental

3.5.2.1. Materiales, reactivos e instrumentación

Agua ultrapura (18,2M Ω) obtenida a través de un sistema Milli-Q Gradient de Millipore (Walford, Reino Unido), ácido nítrico, grado Suprapur 65% (Merck, Darmstadt, Germany) y peróxido de hidrógeno grado Suprapur 33% (Merck, Darmstadt, Germany) para la mineralización de la muestra y su posterior análisis por ICP-MS Thermo XSeries2 (Thermo Scientific), disolución primaria multipatrón-2A conteniendo todos los analitos de interés, disolución A a diferentes concentraciones de especies de arsénico, ácido malónico al que se le ajusta el pH hasta 5,6, amoníaco, argón, helio, oxígeno e hidrógeno (suministrados por Air Liquide España, S.A (Madrid, España), material de referencia certificado (CRM) IRMM-804 (Harina de arroz) obtenido del Instituto de Material de Referencias y Mediciones de Bélgica (European Commission, Directorate-General Joint Research Centre), sistema ICP-MS Thermo XSeries2 (Thermo Scientific) equipado con un sistema ORC y nebulizador MicroMist de Glass Expansion (Melbourne, Australia), columna cromatográfica Phenomenex Bondclone C18, 300 mm x 3.90 mm, 10 μ m (Phenomenex, Inc. Torrance, CA, Estados Unidos), sistema de detección empleado fue un detector ICP-MS modelo Thermo Xseries 2, utilizando un tubo de PEEK (0,17 i.d) de 20 centímetros de longitud conectado directamente a la entrada del nebulizador del ICP-MS.

3.5.2.2. Determinación de la concentración de metales pesados y arsénico

Previo a la cuantificación, los granos fueron secados en horno a 80 ° C durante 24 horas o hasta obtener peso constante. Los granos fueron pulverizados en un molino de café comercial hasta obtener un polvo fino cuyo tamaño de partícula no fue controlado.

Para el análisis se pesó 0,25 g de arroz previamente secado y molido y se realizó una pre digestión con 2 mL de ácido nítrico concentrado durante 24 horas.

Posteriormente se añadió 2 mL de peróxido de hidrógeno concentrado y se efectuó la digestión asistida por microondas. Para la digestión se programaron las siguientes condiciones en el horno microondas:

- 10 minutos a 95 °C
- 10 minutos a 120 °C
- 30 minutos a 160 °C

Posteriormente el extracto resultante de la digestión se aforó a 50 mL con agua miliQ, se filtraron con jeringas de 5 mL y filtros de 0,45 µm de PTFE y se cuantificaron mediante el ICP-MS.

3.5.2.3. Detección, identificación y cuantificación

El ICP-MS fue programado siguiendo las condiciones operacionales que se presentan a continuación en el cuadro 6.

Cuadro 6: Condiciones operacionales para el plasma acoplado inductivamente con detector masa

Parámetro	Condiciones operacionales
Potencia	1300 W
Profundidad de muestreo	7-8 mm
Flujo del gas auxiliar/portador/plasmógeno (Argón)	1,0/1,0/13,0 L/min
Caudal He/H ₂	4 mL/min
Q _{oct}	-19 V
Q _p	-17 V
Foco	-9,0 V
Tiempo de permanencia	0,1 por isótopo
Isótopos monitorizados	⁷⁵ As, ⁷⁷ ArCl ⁺ , ⁵³ Cr, ⁶³ Cu, ¹¹¹ Cd, ²⁰⁸ Pb

3.5.2.4. Control de calidad

Para efectuar la cuantificación de metales pesados y arsénico se prepararon patrones a fin de elaborar la curva de calibración. Los patrones preparados eran de concentraciones de 100 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$, 250 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$, 500 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$, 750 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$, 1 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$, 5 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$, 10 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$, 25 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$, 50 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$, 75 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$, 100 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$, 250 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ y 500 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$.

Aunque se prepararon y analizaron múltiples patrones, los gráficos fueron contruidos dependiendo de los niveles de concentración a los que se encontraban los elementos analizados en las muestras de arroz.

En forma simultánea al análisis de las muestras de arroz, se analizó el material de referencia certificado IRMM-804, el cual consistía en una matriz de polvo de arroz, obtenido del Instituto de Materiales de Referencia y Medida (IRMM) de la Unión Europea.

Los resultados obtenidos se compararon con los reportados para este material de referencia a fin de asegurar de una manera efectiva la trazabilidad de nuestros resultados a la referencia. La forma de asegurar la trazabilidad puede variar ligeramente dependiendo de la referencia utilizada, aunque siempre seguirá unos parámetros generales. En el caso de esta investigación, el material de referencia se analiza en conjunto con las muestras a fin de evaluar la exactitud y precisión del método empleado, contrastando con valores reportados y certificados. Los resultados para este material se muestran en el cuadro 11.

Se emplearon los parámetros empleados por la literatura y que se explican a continuación:

- Los coeficientes de correlación de las curvas de calibración para cada elemento deberían ser ≥ 0.995 para proceder con el análisis de la muestra.

- La precisión se evaluó mediante la desviación estándar relativas (% RSD) y se aceptan como válidos valores de 0.2-10%, lo que confirma la confiabilidad de los resultados.
- La exactitud se evaluó comparando los valores obtenidos con los valores esperados para cada uno de los elementos analizados.

3.5.2.5. Especiación

Se especió únicamente el arsénico debido a que la especiación para los otros elementos requiere de reactivos no disponibles en el laboratorio de la UHU.

El protocolo de especiación de arsénico inició pesando 0,2 g de arroz y se realizó la extracción añadiendo 5 mL de ácido trifluoroacético 0,02 M y digiriendo la muestra en horno microondas durante 45 minutos a 95°C. Posteriormente el extracto se pesó y centrifugó por 10 minutos a 7000 rpm a 4 °C. Se filtró en jeringas de 5 mL empleando filtros de 0,45 µm de PTFE. El extracto filtrado fue analizado en el sistema HPLC-ICP-MS, empleando las condiciones mostradas en el cuadro 7.

Cuadro 7 Condiciones operacionales para el sistema HPLC-ICP-MS

Parámetro	Condiciones operacionales
Columna	PRP-X-100 (250 X 4,6 mm X 5 µm)
Fase móvil	Ácido malónico 10 mM, pH 5,8 (ajustado con amoniaco)
Velocidad de flujo de la fase móvil	0,8 mL/min
Volumen de inyección	25 µL
Potencia	1500 W
Flujo del gas plasmógeno (Ar)	15,0 L/min
Flujo del gas auxiliar (Ar)	1,0 L/min
Flujo del gas portador (Ar)	0,9 L/min
Profundidad de muestreo	8 mm
Conos de muestreo y Skimmer	Ni
Flujo de Helio	3,9 mL/min
Q _{oct}	-18 V
Q _p	-16 V
Tiempo de permanencia	0,3 min por isótopo
Isótopos monitorizados	⁷⁵ As

3.6. Tratamiento de la información

Los resultados de cada metal pesado por molino se analizaron comparando los valores obtenidos contra los valores reportados como máximos permitidos por la Organización Mundial de la Salud y la Unión Europea a fin de establecer si el arroz procesado en octubre-diciembre de 2016 pueden ser considerados como inocuos según los criterios establecidos por estas organizaciones.

Además, se compararon los arroces por procedencia a fin de establecer si la procedencia del arroz incidía sobre el contenido de metales pesados. Para ello se confeccionaron los respectivos cuadros y se empleó el software estadístico XL-STAT 2016.

Se emplearon parámetros estadísticos como t de student a fin de comprar medias de los valores obtenidos y reportados para el material de referencia y prueba de Wilcoxon para comparar los valores obtenidos para las muestras. En forma similar, se realizó el Análisis de Componentes Principales, APC, para los resultados obtenidos empleando también el programa estadístico XL-STAT 2016, agrupando los resultados por metales. Los resultados y tratamientos estadísticos son presentados en el siguiente capítulo, donde se muestran además los análisis correspondientes.

CAPÍTULO 4
ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS
RESULTADOS

4. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

4.1. Análisis de metales y metaloides pesados

4.1.1. Análisis estadístico y comparación con parámetros toxicológicos

Los resultados de los análisis químicos fueron tratados estadísticamente mediante el programa XLSTAT-2016 para generar los parámetros estadísticos que se utilizaron como guía en la interpretación de los resultados.

La estadística básica incluyó los siguientes parámetros: media, mediana, desviación típica, varianza, asimetría, error estándar de la varianza, rango, mínimo y máximo. Estos parámetros contribuyeron a identificar el modelo de distribución de los datos, y son presentados en los cuadros 8 y 9.

Cuadro 8: Parámetros estadísticos de los metales analizados para el arroz nacional

Estadístico	⁵³ Cr	⁶³ Cu	¹¹¹ Cd	²⁰⁸ Pb	⁷⁵ As
No. de observaciones	19	19	19	19	19
No. de valores perdidos	1	0	0	1	0
Mínimo	0,42	1225,81	8,09	2,75	7,55
Máximo	65,25	9655,56	59,67	563,79	134,70
Intervalo	64,83	8429,75	51,58	561,04	127,15
Mediana	8,53	2394,81	25,67	27,22	23,14
Media	15,43	2657,45	29,94	61,86	50,22
Varianza (n)	261,31	2982012,64	202,62	15267,14	2305,67
Desviación típica (n)	16,17	1726,85	14,23	123,56	48,02
Coefficiente de variación (%)	104,8	65	47,5	200	96
Error estándar de la varianza	94,90	1049226,67	71,29	5544,62	811,25

Cuadro 9: Parámetros estadísticos de los metales analizados para el arroz importado

Estadístico	⁵³ Cr	⁶³ Cu	¹¹¹ Cd	²⁰⁸ Pb	⁷⁵ As
No. de observaciones	19	19	19	19	19
No. de valores perdidos	1	0	0	1	0
Mínimo	0,59	1161,06	5,55	3,53	16,66

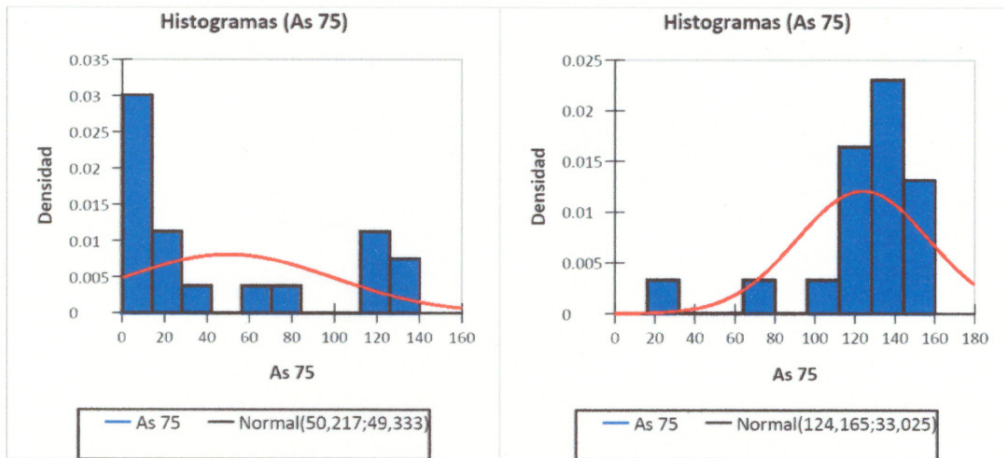
Cuadro 9, continuación

Máximo	115,56	2637,08	30,77	722,01	159,40
Intervalo	114,98	1476,02	25,22	718,47	142,74
Mediana	13,49	1553,50	15,79	27,23	129,30
Media	22,03	1638,77	15,71	72,97	124,17
Varianza (n)	711,68	122314,27	36,52	26739,41	1033,24
Desviación típica (n)	26,68	349,73	6,04	163,52	32,14
Coefficiente de variación (%)	121,1	21,3	38,4	224	25,9
Error estándar de la varianza	258,46	43036,50	12,85	9711,04	363,55

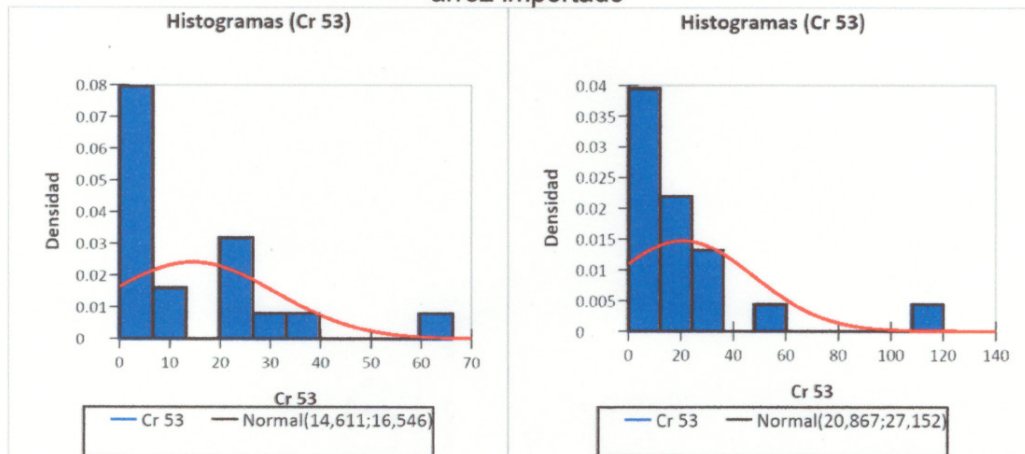
La mayor parte de los elementos estudiados presentan valores de varianza muy altos, excepto el cadmio en el arroz importado. Cuanto mayor sea este valor, mayor variabilidad se presenta en los datos y por lo tanto menos homogénea es la población.

El intervalo o amplitud con sus máximos y mínimos nos proporcionan una idea con relación a la variabilidad de los datos. El cobre (8430 para el nacional y 1476,02 para el importado), plomo (722,00 para el importado y 536,78 para el nacional), y el arsénico (127,15 para el nacional y 142,74 para el importado), resultaron los elementos con mayor intervalo de variación, en cuanto que el cromo (65,0 para el nacional y 115,56 para el importado) y cadmio (51,59 para el nacional y 25,22 para el importado) presentaron los menores intervalos.

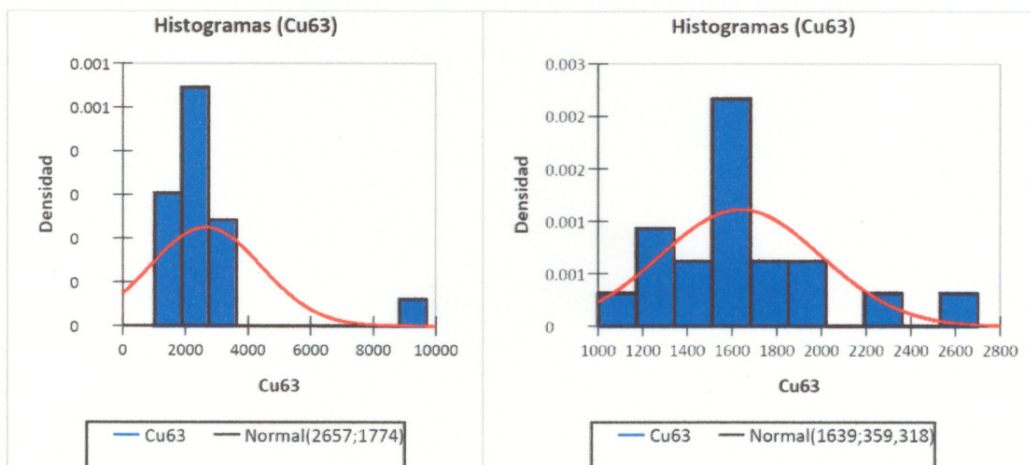
Los histogramas fueron determinantes para establecer el modelo de distribución de los datos ya que en ellos se pueden reflejar visualmente las características estadísticas explicadas anteriormente. Los histogramas de cada elemento se presentan en las Figuras 5-14, graficándose cada uno por clase de arroz.



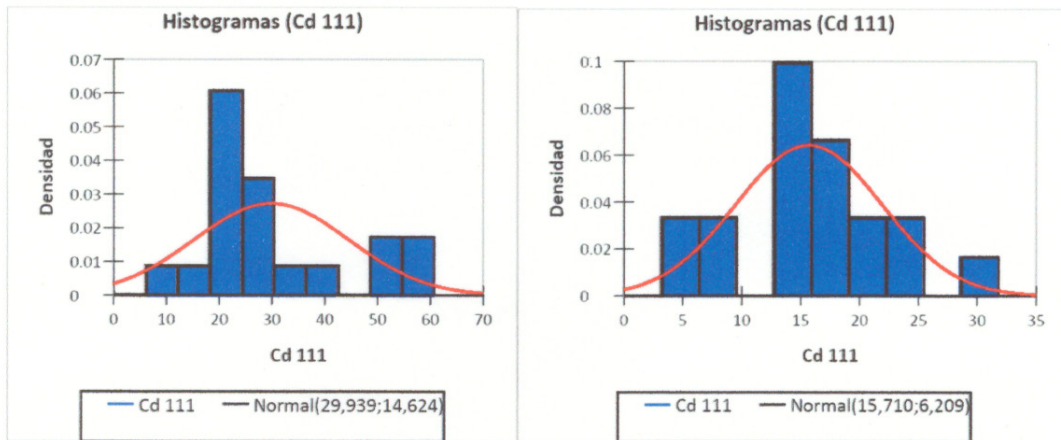
Figuras 5 y 6: Histogramas para el As, Arroz nacional e Histograma para el As, arroz importado



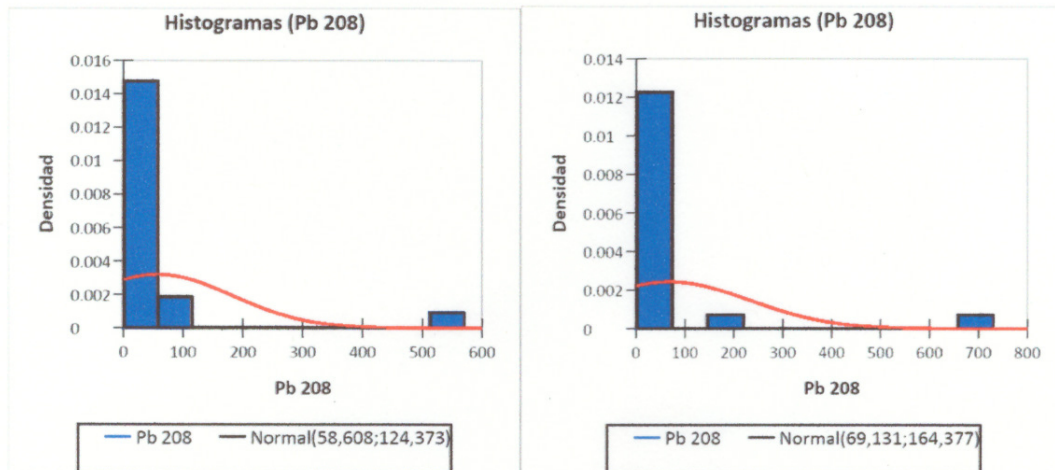
Figuras 7 y 8: Histogramas para el Cr, arroz nacional e Histograma para el Cr, arroz importado



Figuras 9 y 10: Histogramas para el Cu, arroz nacional e Histograma para el Cu, arroz importado.



Figuras 11 y 12: Histograma para el Cd, arroz nacional e Histograma para el Cd, arroz importado.



Figuras 13 y 14: Histogramas para el Pb, arroz nacional e Histograma para el Pb, arroz importado.

Las figuras 5 y 6 permiten evidenciar que los resultados para el arsénico en ambas clases de arroz son asimétricos: hacia la derecha en el caso del nacional y hacia la izquierda en el importado.

Según los resultados para el arsénico en el arroz importado, la distribución que se ajusta mejor a los datos es la distribución logística, mientras que para el arroz nacional es la de Weibull (3).

Los gráficos para los elementos cromo, cobre y plomo muestran comportamientos similares, presentando curvas asimétricas a la derecha. Por último, en el caso del cadmio se apreció que en ambas clases de arroz se presentaron modelos que siguen una distribución normal.

Los modelos de distribución para estos elementos fueron los siguientes: cadmio y cobre en muestras de arroz nacional presentan una distribución Log-normal, mientras que en el caso del cobre en el arroz importado el modelo de: familia de distribuciones de valores extremos generalizada (GEV) y para el cadmio distribución logística.

En contraste, los resultados para el cromo y plomo en ambos tipos de arroz (nacional e importado), sugieren que la distribución que mejor se ajusta a los datos es la distribución de Weibull (3).

Se ha documentado que las concentraciones de estos metales y metaloides pueden incrementarse debido a variaciones geoquímicas locales o actividad antropogénicas (Olivares, *et al.*, 2013). Al ser sustancias que persisten en el ambiente y que pueden llegar a la cadena alimentaria, siendo potencialmente tóxicas al ser humano, se analizó su concentración en el arroz, específicamente los isótopos: ^{75}As , ^{111}Cd , ^{53}Cr , ^{63}Cu y ^{208}Pb .

Por otro lado, para una correcta caracterización los niveles de concentración de metales pesados y metaloides y su comparación con los parámetros estadísticos, se realizó previamente una clasificación de las muestras de arroz por procedencia.

Estos resultados se muestran y clasifican en el cuadro 10, por molino, fecha y procedencia. Los resultados para las muestras y el material de referencia se expresan en función del peso seco. Se indican también los valores de referencia: límites máximos permisibles (LMP), según la OMS y la Unión Europea.

Es importante señalar que el nombre de los molinos ha sido codificado mediante letras (A, B, C, D, E, F), para mantener la confidencialidad de los resultados. Conviene señalar además que en el caso del material de referencia se realizaron duplicados, mientras que en el caso de las muestras se realizó únicamente un ensayo.

Se comparan los valores obtenidos con el límite máximo permisible (LMP), que es definido como: la medida de la concentración o grado de elementos, sustancias o parámetros fisicoquímicos o biológicos que caracterizan en este caso a un alimento, y que al ser excedida causa o puede causar daños a la salud.

En el cuadro 10 se han resaltado en rojo aquellos valores que superan los LMP, pudiéndose observar que únicamente se superan los valores para el plomo. Específicamente, tres muestras de arroz: dos importados (A 24/20 y B 14/11) y uno nacional (E 17/10), exceden los valores reportados por el comité Mixto FAO-OMS y por la Unión Europea.

En contraste, en este cuadro se muestra que los valores obtenidos en los arroces analizados no superan los valores máximos permitidos para el arsénico y el cadmio, los cuales son: 200 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ (ppb) para ambos metales.

Cuadro 10: Concentración de metales pesados por molino y fecha

NOMBRE Y FECHA	PROCEDENCIA	CONCENTRACIÓN POR METAL ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$)				
		As ₇₅	Cu ₆₃	Cd ₁₁₁	Cr ₅₃	Pb ₂₀₈
A 10/10	mezcla	141,3	1506,9	18,2	20,7	58,5
A 24/10	importado	132,9	1706,6	24,4	54,9	208,3
A 7/11	nacional	112,5	1727,7	40,7	21,9	40,5
A 21/11	mezcla	110,1	1423,6	17,7	14,3	8,0
B 17/10	nacional	124,2	1225,8	8,1	13,1	67,4
B 31/10	importado	119,5	1331,9	8,8	34,4	32,2
B 14/11	importado	103,6	1921,8	30,8	20,8	29,1
B 17/10	importado	116	1276,0	8,6	15,8	16,0
B 31/10	importado	127,9	1161,1	5,9	8,6	3,5
B 14/11	importado	113,2	1268,6	5,6	115,6	722,0
C 17/10	nacional	118,2	1644,6	19,6	25,5	54,8

Cuadro 10, continuación

C	31/10	nacional	134,7	1602,3	18,5	10,4	27,3
C	14/11	nacional	11,83	2096,0	20,0	25,8	15,8
C	5/12	nacional	7,55	2394,8	21,6	20,0	30,8
C	17/10	Importado	150,9	1500,4	15,2	5,9	6,8
C	31/10	importado	128,2	1883,9	19,3	Nd	18,7
C	14/11	importado	16,66	2326,0	14,2	8,1	25,4
C	5/12	nacional	8,41	2251,4	19,3	3,6	24,4
D	17/10	nacional	23,14	2546,1	29,4	3,5	24,0
D	31/10	nacional	23,12	2792,9	51,5	2,6	4,3
D	14/11	nacional	8,42	2704,1	17,5	5,8	nd
D	5/12	nacional	7,69	2640,5	55,5	6,6	35,3
D	17/10	nacional	23,14	1695,7	20,0	0,4	24,2
D	31/10	importado	130,6	1661,0	15,8	13,2	11,9
D	14/11	importado	156,6	1532,9	16,6	4,8	56,3
D	5/12	importado	140,4	1568,1	14,1	5,1	7,7
E	17/10	nacional	13,38	9655,6	28,9	nd	563,8
E	31/10	nacional	79,67	2201,8	20,6	1,4	2,7
E	21/11	nacional	10,72	2987,4	49,0	4,4	20,1
E	5/12	nacional	11,2	2895,3	33,4	2,6	27,2
E	17/10	Importado	159,4	1567,4	15,9	13,8	25,2
E	31/10	importado	137,2	1738,3	19,8	1,7	31,3
E	21/11	importado	129,3	1512,2	14,8	7,8	44,3
E	5/12	importado	120,8	1451,2	12,7	0,6	32,9
F	5/12	importado	75,68	2637,1	22,5	34,7	7,0
F	31/10	importado	157,7	1538,6	17,0	15,9	nd
F	17/10	Importado	142,6	1553,5	16,5	34,7	34,9
F	17/10	nacional	64,57	2495,2	59,7	29,2	56,8
F	31/10	nacional	129,7	1896,0	25,7	35,6	9,1
F	5/12	nacional	41,99	3038,3	29,8	65,2	85,0
Valores de referencia	FAO-OMS		200	NR	400	NR	200
	UE		200	NR	100	NR	200

nd = No detectado por el instrumento

NR= no referenciado

A pesar que los metales cromo y cobre no están referenciados por ninguno de estos dos organismos, se aprecia que los valores de cobre superan los 1000 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$.

En contraste, los valores de cromo son significativos al ser comparados con otras normativas como la que legisla la inocuidad de este grano en Brasil, en donde se ha establecido un valor de cromo de 100 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ según lo señalado por la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (2013).

Dentro de los factores que pueden incidir sobre los resultados obtenidos se encuentran: la concentración de estos elementos en el suelo, agua de cultivo y en el ambiente, así como también la movilidad y translocación de los elementos que a su vez depende principalmente de la presencia de ligandos quelantes, pH, el estado de oxidación-reducción, cationes competitivos, hidrólisis, polimerización y la formación de sales insolubles (por ejemplo, fosfato, oxalato), electroquímica variable de elementos.

Se ha demostrado que en general, se transportan fácilmente desde las raíces hasta las partes aéreas: plata, boro, litio, molibdeno y selenio; moderadamente móviles son manganeso, níquel, cadmio y zinc; y fuertemente unidas en las células de la raíz son cobre, cobalto, cromo, plomo, hierro y mercurio (Kabata-Pendias & Pendias, 2001).

Esta idea es similar a la expresada por Pozo et al., (2011), quienes señalan que el cadmio se absorbe más fácilmente sobre la superficie del suelo que otros metales. En otros estudios se indica también que el cadmio se acumula en el arroz cuando se cultiva aeróbicamente (AOAC, 2015).

Lo anterior expresado, hace referencia a que es probable que las concentraciones de cadmio en el suelo donde se cultivaron estas muestras sean bajas ya que de haber sido elevadas al ser un metal fácilmente translocable se encontraría a altas concentraciones en el grano.

En el caso del cromo las concentraciones en el grano pulido fueron bajas, lo que puede ser atribuido a que la translocación de este metal en la planta de arroz no se realiza ya que es retenido en las células de la raíz.

Es importante señalar además que la poca movilidad del cromo en el suelo puede ser responsable de un suministro inadecuado de cromo a las plantas, el cual presenta importancia nutricional porque es un elemento requerido en la nutrición humana y animal. La mayoría de los suelos contienen cantidades significativas de

romo, pero su disponibilidad para las plantas es muy limitada y depende de varios factores del suelo y la planta. Estudios de Kabata & Pendias (2001), indicaron que, por lo general, se observa un mayor contenido de cromo en las raíces que en las hojas o los brotes, mientras que la concentración más baja se encuentra en los granos.

Para el arsénico, se conoce que las concentraciones son más altas cuando el arroz se cultiva bajo condiciones de inundación, y en el caso de las muestras nacionales pudo contribuir el hecho que se cultivan bajo riego, lo que ocasiona concentraciones más bajas de arsénico.

La poca movilidad del plomo es posiblemente la razón de sus bajas concentraciones en las muestras analizadas. Por otra parte, se conoce que el plomo en las plantas proviene de la absorción de los suelos o de la deposición atmosférica (Kabata & Pendias 2004). Cuando la vía de contaminación es a través de la absorción del plomo de los suelos, la mayor acumulación ocurre en las raíces de las plantas, ya que la traslocación a otros órganos de la planta es limitada, factor que también puede explicar la baja concentración en las partes aéreas de la planta como lo es el grano.

Este aspecto de la translocación de plomo se encuentra documentada por al AOAC (2015), quienes indican que este proceso de translocación desde la raíz hasta la parte superior es muy limitada y solo el 3% del plomo en la raíz se transloca al brote. De hecho, se explica además que aparentemente, la mayor parte del plomo en el suelo no está disponible para las raíces de las plantas. Sin embargo, hay evidencia que las raíces absorben plomo de los suelos, tanto a concentraciones bajas como altas de plomo, y que este proceso está fuertemente gobernado por factores del suelo y de la planta.

Para el cobre, aun cuando la AOAC (2015), indica que las barreras fisiológicas son evidentes con respecto al transporte de algunos metales (por ejemplo, cobre) de las

raíces a las partes aéreas, se encontró valores elevados de este metal en las muestras analizadas, lo cual puede ser explicado por diversos factores.

En primer lugar, en el arroz blanco, (al que se ha eliminado la cáscara, salvado y germen) presenta diferencia definida en el término del contenido de minerales de este tipo de arroz comparado con el arroz integral, lo cual depende también del procesamiento del arroz, la calidad del suelo y el fertilizante utilizado en el cultivo del arroz.

Específicamente, estudios de Jian, & Zeng, concluyeron que algunos minerales (potasio, magnesio, manganeso y zinc) en arroz integral con concentraciones más del doble de veces con respecto al arroz pulido, podría estar asociado con un mayor riesgo de enfermedades crónicas (Bagirathy, 2014). Sin embargo, en el caso del cobre este autor señala que la concentración de cobre varía de $2,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ a $2,8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ si se compara el arroz integral con el arroz blanco pulido. Esto indicaría que en promedio el 78,6 % del cobre permanece en el grano.

Además, se ha documentado que en Panamá se emplean cerca de 10 agroquímicos con cobre en su formulación, para el cultivo de arroz, aplicados en dos etapas del crecimiento: durante la fase de macollamiento y diferenciación de la panícula lo cual pudiera contribuir también a los valores obtenidos.

4.1.2. Precisión y exactitud del método

El cuadro 11 muestra la comparación de los valores obtenidos y esperados para el material de referencia, así como los coeficientes de variación (CV) y el error relativo.

Como se evidencia en este cuadro, en el caso del arsénico, el material de referencia se encuentra dentro de los valores permitidos, los cuales han sido reportados como $(0,045-0,053) \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$, y además el error relativo es de 6,1%. También se observa que el coeficiente de variación es de 10,2%, pudiendo establecerse que la extracción y análisis se realizaron con elevada exactitud y precisión.

Cuadro 11: Resultados para el material de referencia IRMM-804

	CONCENTRACIÓN POR ELEMENTO (mg.Kg ⁻¹)				
	⁵³ Cr	⁶³ Cu	¹¹¹ Cd	²⁰⁸ Pb	⁷⁵ As
Valor obtenido ($\bar{X} \pm S_{n-1}$)	45 ± 12,7	1,89 ± 0,12	1,03 ± 0,06	0,30 ± 0,03	0,046 ± 0,005
CV (%)	28,3	5,9	5,6	2,7	10,2
Valor esperado	N.R.	2,74 ± 0,24	1,61 ± 0,07	0,42 ± 0,007	0,049 ± 0,004
Error relativo (%)	---	31,02	36,02	28,57	6,12

N.R. No referenciado
n = 2

Se puede apreciar que los valores obtenidos de la concentración total para el cadmio, cobre y plomo no están dentro de los intervalos referenciados. Esta diferencia puede deberse a errores analíticos como: ineficiente digestión y extracción, supresión de la ionización, problemas en la interfase (bloqueo de conos y deriva de la señal), interferencias espectrales, bloqueo del nebulizador, entre otros.

Debido a esta inconsistencia en los resultados para el material de referencia, se analizó la concordancia entre las medias obtenidos y esperadas a través de la prueba de t de Student, según lo establecido por CENMA (2006) que establece que: para el proceso de verificación de la trazabilidad generalmente se emplea una comparación estadística entre los valores de la referencia y los valores proporcionados mediante el procedimiento analítico. Esta comparación estadística suele llevarse a cabo mediante un test *t* de student.

Además, a fin de realizar un análisis más completo se evalúa este parámetro en conjunto con el error relativo, el cual establece la diferencia entre el valor obtenido y el valor esperado.

Los resultados de los valores relativos son elevados en el caso de los tres metales, siendo: 31,02%, 36,02% y 28,57% para el cobre, cadmio y plomo, respectivamente.

En el caso de la t de student los tres metales presentan t similares a un nivel de significancia del 5% ($p > 0,05$). En el cuadro 11 se muestra el coeficiente de variación, el cuadro muestra imprecisión en el análisis de cromo; contrario un bajo coeficiente de variación para los metales cobre, cadmio y plomo que reflejaron repetibilidad en los análisis.

Los resultados obtenidos al ser diversos indican que es necesario adecuar el método previo a su uso para la determinación de la concentración de metales totales a fin que se puedan obtener resultados precisos y exactos para todos los metales. Así por ejemplo es necesario realizar más réplicas para el material, ajustar las condiciones de extracción en el microondas (por ejemplo, aumentar el tiempo de extracción y temperatura), revisar adecuadamente las condiciones operacionales del equipo (emplear configuraciones que sean consistentes para el análisis de todos los elementos), usar patrones internos, emplear materiales de referencia con niveles de concentraciones próximos a los de la muestra.

4.1.3. Comparación por procedencia

Se presentan en los cuadros 12 y 13 los valores máximos y mínimos expresados en $\mu\text{g.Kg}^{-1}$, para los diferentes metales analizados tanto en los arroces nacionales e importados.

Podemos observar lo siguiente:

- Para los metales arsénico y cadmio se aprecian intervalos muy similares al comparar los resultados obtenidos en las muestras de arroces nacionales e importados analizados.
- Para el cromo los valores obtenidos variaron entre (0,59-115,56) $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ para el arroz importado y entre (0,42 - 65,25) $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ para el arroz nacional.
- En relación al cobre y plomo en ambos casos se aprecian intervalos muy diferentes.

Lo anterior podría hacer referencia a que la procedencia del arroz al ser diversa podría incidir significativamente en los amplios intervalos obtenidos en las diferentes muestras de arroz analizadas por metal. Adicionalmente, la movilidad en términos geoquímicos también podría contribuir al contraste menor o mayor.

Cuadro 12: Valores máximos y mínimos por metal para el arroz importado

Estadístico	⁷⁵ As	⁵³ Cr	⁶³ Cu	¹¹¹ Cd	²⁰⁸ Pb
Mínimo ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$)	16,66	0,59	1161,06	5,55	3,53
Máximo ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$)	159,4	115,56	2637,08	30,77	722,01

Cuadro 13: Valores máximos y mínimos por metal para el arroz nacional

Estadístico	As ₇₅	Cr ₅₃	Cu ₆₃	Cd ₁₁₁	Pb ₂₀₈
Mínimo ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$)	7,55	0,42	1225,81	8,09	2,75
Máximo ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$)	134,70	65,25	9655,56	59,67	563,79

Estos resultados indican que es conveniente verificar el comportamiento de la distribución del conjunto de datos, así como la comparación entre los valores para los arroces nacionales e importados, resultados que son analizados mediante la comparación de medianas y por análisis de componentes principales.

Para efectuar la comparación del contenido por procedencia se emplean las medianas (reportadas en el cuadro 14), y debido a que como se indicó anteriormente los resultados no atienden a una distribución normal se utilizó la prueba de Wilcoxon, resultados que se muestran a continuación en los cuadros 15 y 16.

Cuadro 14: Medianas por procedencia y metal

Procedencia	Valores promedios ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$)				
	⁷⁵ As	¹¹¹ Cd	⁵³ Cr	⁶³ Cu	²⁰⁸ Pb
Importado	129,30	15,79	13,49	1553,50	27,23
Nacional	23,14	25,67	8,53	2394,81	27,22

Se puede inferir que según lo evidenciado en el cuadro 14, que los metales cromo y plomo presentan contenidos aparentemente similares en las muestras de arroz nacional e importado.

Cuadro 15: Prueba de Wilcoxon para arsénico, cromo y cobre

Parámetro	⁵³ Cr	⁷⁵ As	⁶³ Cu
V	124	178	12
Valor esperado	95 000	95 000	95 000
Varianza	617 500	617 500	617 500
Valor p (bilateral)	0,251	0,001	0,001
A	0,05	0,05	0,05
Hipótesis	H ₀ : La distribución de las dos muestras es la misma. H _a : Las distribuciones de las dos muestras son diferentes.		
Interpretación de la prueba	Puesto que el valor-p calculado es mayor que el nivel de significación $\alpha=0,05$, no se puede rechazar la hipótesis nula H ₀ .		
	Puesto que el valor-p computado es menor que el nivel de significación $\alpha=0,05$, se debe rechazar la hipótesis nula H ₀ , y aceptar la hipótesis alternativa H _a .		
	Puesto que el valor-p computado es menor que el nivel de significación $\alpha=0,05$, se debe rechazar la hipótesis nula H ₀ , y aceptar la hipótesis alternativa H _a .		

Cuadro 16: Prueba de Wilcoxon para cadmio y plomo

Parámetro	¹¹¹ Cd	²⁰⁸ Pb
V	179	84
Valor esperado	95 000	95 000
Varianza	617 500	617 500
Valor p (bilateral)	0,001	0,673
A	0,05	0,05
Hipótesis	H ₀ : La distribución de las dos muestras es la misma. H _a : Las distribuciones de las dos muestras son diferentes.	
Interpretación de la prueba	Puesto que el valor-p computado es menor que el nivel de significación $\alpha=0,05$, se debe rechazar la hipótesis nula H ₀ , y aceptar la hipótesis alternativa H _a .	
	Puesto que el valor-p calculado es mayor que el nivel de significación $\alpha=0,05$, no se puede rechazar la hipótesis nula H ₀ .	

En contraste, para los metales cadmio, arsénico y cobre la prueba de Wilcoxon muestra que el contenido de los arroces importados es posiblemente diferente a los nacionales.

El comportamiento mostrado en el contenido de los arroces nacionales e importados no podría emplearse para indicar que arroz es más recomendable para el consumo.

4.1.4. Análisis de Componentes Principales

El modelo de distribución de metales pesados de esta investigación fue realizado con el método de Análisis de Componentes Principales, (ACP).

La selección de estos metales obedece a que desde el punto de vista de la contaminación son usualmente los más asociados a la actividad antropogénica. En el caso del arsénico se utiliza como referencia al ser un elemento que tiene un origen geogénico que se encuentra normalmente en los suelos como parte de su composición.

El ACP es una técnica estadística multivariantes que permite simplificar un conjunto de una gran cantidad de datos y reducirlos hasta un número más pequeño de datos o factores ortogonales (con magnitud y dirección) para facilitar su interpretación mediante la visualización de las correlaciones existentes entre las variables originales (Jolliffe, 2002).

La aplicación del **ACP** tiene sentido sólo si existen altas correlaciones entre las variables, esto quiere decir que pocos factores explican o son responsables en gran parte de la variabilidad total de los datos.

La correlación indica la fuerza y dirección de una relación lineal entre dos o más variables aleatorias. El valor de r varía entre -1 y $+1$, significando $r = 0$ que no existe correlación entre las dos variables, $r = -1$ que existe una relación lineal inversa entre las dos variables y $r = +1$ que existe una relación lineal directa entre las dos variables

Los datos fueron tratados estadísticamente y ensayados con los modelos de Pearson, Spearman y Kendal del paquete estadístico del XLSTAT 16 con la finalidad

de verificar con cuál de los ellos se lograba el mejor ajuste de la distribución de los datos.

Este tratamiento reveló que los mejores resultados correspondieron a la distribución de Spearman ya que permite interpretar los datos de manera mucho más coherente que los otros dos modelos (ver cuadro 17).

El cuadro 17 presenta los valores propios (Eigenvalues) que corresponden a los coeficientes de los diferentes modelos y que se utilizaron de referencia para seleccionar cuantos factores deberían ser tomados en consideración.

Cuadro 17: Valores propios de las distribuciones de las muestras

Modelo y Variabilidad	Valores propios		
	F1	F2	F3
Spearman			
Valor propio	2,395	1,269	0,713
Variabilidad (%)	47,903	25,375	14,270
% acumulado	47,903	73,279	87,548
Pearson	F1	F2	F3
Valor propio	2,000	1,659	0,758
Variabilidad (%)	40,005	33,177	15,168
% acumulado	40,005	73,182	88,350
Kendal	F1	F2	F3
Valor propio	1,984	1,198	0,803
Variabilidad (%)	39,677	23,970	16,053
% acumulado	39,677	63,647	79,700

En esta investigación determinamos el número de factores en base a la regla de Kaiser (Kaiser, 1958) que establece que sólo aquellos factores con valores propios superiores a la unidad deben ser seleccionados. También se utilizó el criterio que señala que para la selección de los factores debe considerarse aquellos que contribuyan a una frecuencia acumulada superior al 75% (Morrison, 1967), lo que significa que es posible considerar factores que tengan una contribución acumulada inferior a uno.

Del cuadro 17 podemos apreciar que la distribución de Spearman nos proporciona tres factores que justifican el 87,5% de la varianza total de los datos con tan sólo tres factores. Observamos que los dos primeros factores están de acuerdo con la regla de Kaiser, no obstante, hemos incluido un tercer factor debido a que, aunque no cumple con este último requisito, incrementa la varianza en un 14,2% (en vez del 73,2% con dos factores).

Otro de los datos aportados por el ACP es el análisis factorial R, que para esta investigación se correlaciones superiores a 0,5.

El cuadro 18 presenta los valores de los coeficientes de correlación para los elementos de interés observándose claramente una tendencia de correlaciones altas entre los elementos cadmio y cobre y (0,815) y correlación negativa entre el cobre y el arsénico (- 0,687) y entre el cadmio y el arsénico (-0,509) lo que indica que existe una correlación lineal inversa entre las dos variables.

Cuadro 18: Matriz de correlaciones para los elementos analizados

Variables	⁵³ Cr	⁶³ Cu	¹¹¹ Cd	²⁰⁸ Pb	⁷⁵ As
Cr 53	1	-0,210	-0,040	0,271	0,178
Cu63	-0,210	1	0,815	-0,059	-0,687
Cd 111	-0,040	0,815	1	0,077	-0,509
Pb 208	0,271	-0,059	0,077	1	0,029
As 75	0,178	-0,687	-0,509	0,029	1

Los valores en negrita son diferentes de 0 con un nivel de significación alfa=0,05

La asociación de elementos del factor F1 en el eje de las abscisas (x) está representado por los elementos cadmio y cobre. Este factor es responsable del 47,90% de la varianza total de los datos y posiblemente tenga relación con elemento.

Adicionalmente hay que tomar en consideración la presencia de metales pesados en formulaciones de agroquímicos ampliamente utilizados en las actividades agrícolas sin mayores regulaciones.

Por otro lado, el factor F2 en el eje de las ordenadas (y) está representado por el cromo y explica el 27,38% de la varianza total de los datos y también podría estar asociado a fuentes antropogénicas provenientes de actividades humanas.

Un tercer factor, F3, está relacionado con el arsénico y podría estar relacionado y representa un 14,7% de la varianza total de los datos. En este caso podríamos sugerir que la fuente de este elemento es de naturaleza geogénica ya que forma parte de la composición de los suelos.

Simultáneamente se aplicó el método de rotación Varimax, con la finalidad de interpretar los factores más fácilmente al momento de indicar si existe una clara asociación positiva o negativa entre las variables y el factor. La Figura 15 representa la relación entre los factores y las variables después de la rotación Varimax.

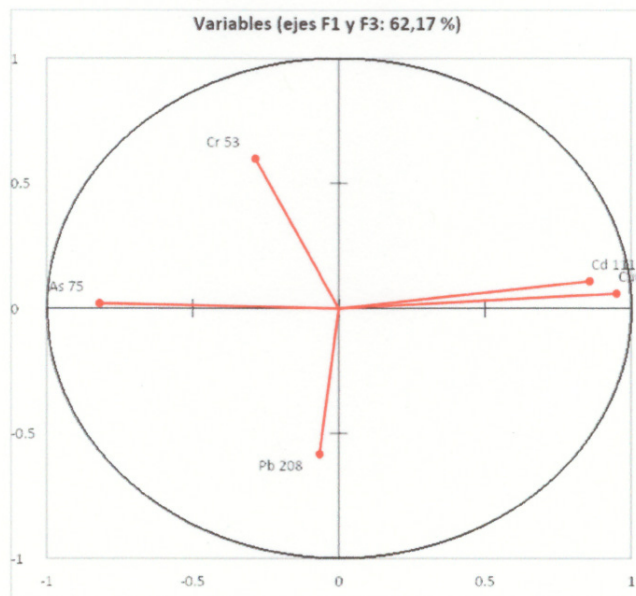


Figura 15: Relación entre los factores F1 y F2 obtenidos del Análisis de Componentes Principales después de la rotación Varimax (B).

La rotación Varimax mejora significativamente los valores obtenidos lo que permite obtener resultados más confiables. Los resultados de los valores de comunalidad indican que los factores son superiores al 0,5 indicando con ello una excelente

distribución de las correlaciones entre las variables como podemos ver en el cuadro 19.

Los datos también se pueden representar en función de la carga de los coeficientes factoriales. Esto permite obtener información adicional que es complementaria al cuadro 16 lo que posibilita seguir el comportamiento geoquímico de algunos elementos en términos de su grado de dispersión en función a su contenido.

Cuadro 19: Valores de los coeficientes factoriales obtenidos como resultado de la rotación Varimax.

Elemento	Cargas factoriales				
	F1	F2	F3	F4	F5
Cr ₅₃	-0,285	0,740	0,598	-0,113	0,032
Cu ₆₃	0,950	0,040	0,059	0,114	0,281
Cd ₁₁₁	0,858	0,256	0,108	0,376	-0,212
Pb ₂₀₈	-0,066	0,809	-0,584	-0,015	0,025
As ₇₅	-0,818	-0,009	0,020	0,567	0,091

En forma similar se realizó el Análisis de Componentes Principales por procedencia, etiquetándose con la letra A los arroces importados y con la letra B los arroces nacionales.

En la figura 16 se observa que por procedencia se dan dos agrupamientos característicos, agrupándose por separado las muestras nacionales de las importadas.

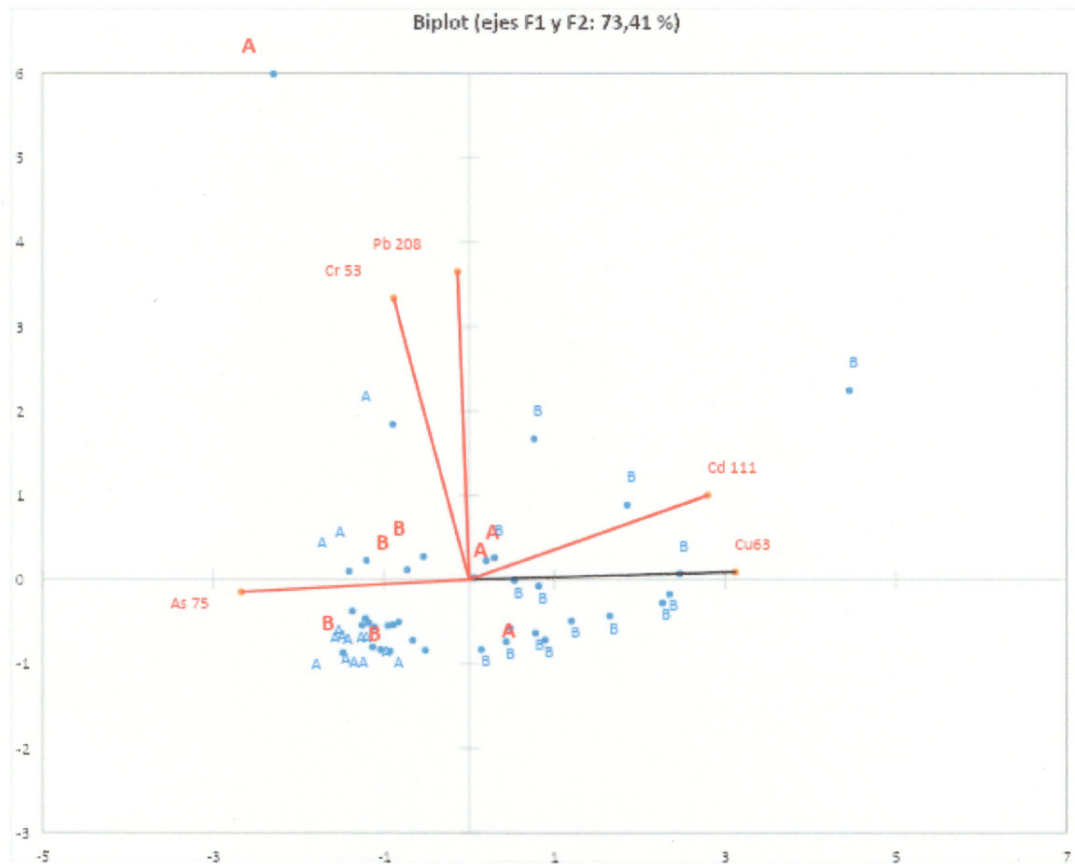


Figura 16: Análisis de Componentes Principales por procedencia

Además, se muestra claramente que hay algunas muestras (resaltadas en rojo) que se dispersan de manera significativa del resto por presentar concentraciones de metales pesados muy superiores a la media. El grado de homogenización de las muestras se da en función de la dispersión alrededor del punto de origen y en la medida que se dispersan reflejan un comportamiento diferente.

Estos puntos corresponden para el arroz importado a: molino B (31/10), molino C (31/10), molino E (5/12) y para el arroz nacional a: molino B (17/10 y 31/10), molino C (17/10 y 31/10) y molino F (31/10). Estas muestras no presentaron un claro agrupamiento debido a que posiblemente se realizaron mezclas de ambos arroces (arroces nacionales con arroces importados).

Es importante señalar además que 5 de esos puntos corresponden a muestras tomadas el 31 de octubre, lo cual podría indicar que la procedencia de los arroces para esa fecha haya variado con respecto a las otras fechas de muestreo, o a variabilidad en las condiciones de almacenamiento en los silos, entre otros factores.

También se puede observar que las muestras de arroz nacional se correlacionan con el cadmio y cobre, mientras que las importadas con el arsénico y que los elementos que más contribuyen a la variabilidad son el cadmio y cromo.

4.2. Especiación de arsénico

La determinación de la concentración total de metales no proporciona información suficiente para evaluar la toxicidad y biodisponibilidad de los elementos, por lo que es necesario conocer además el contenido de las formas físico-químicas en las que se encuentran estos elementos en una muestra. Los metales presentan diferente grado de toxicidad en función de su especiación.

Para el arsénico, se realizó la especiación empleando HPLC/ICP-MS en columna de intercambio iónico, la cual es la forma más ampliamente utilizada para la especiación de arsénico (Litter, Armienta & Farias, 2013). Al realizar la separación cromatográfica empleando ácido malónico 10 mM a pH 5,8 se obtuvieron los tiempos de retención mostrados en la figura 17.

El orden de elución son As III (101 328 ms), DMA (189 160 ms), MMA (236 224 ms) y As V (262 237 ms).

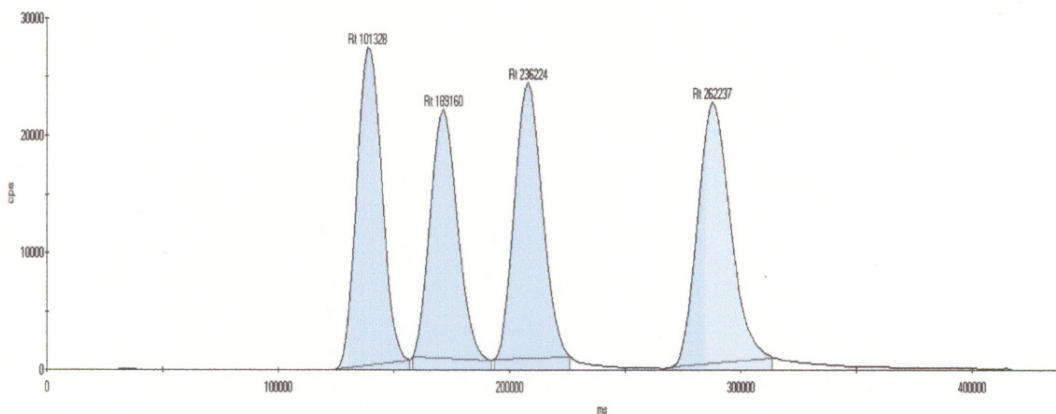


Figura 17: Cromatograma obtenido para el patrón de 25 ppb. Se grafica la intensidad de señal (cps) y el tiempo (ms)

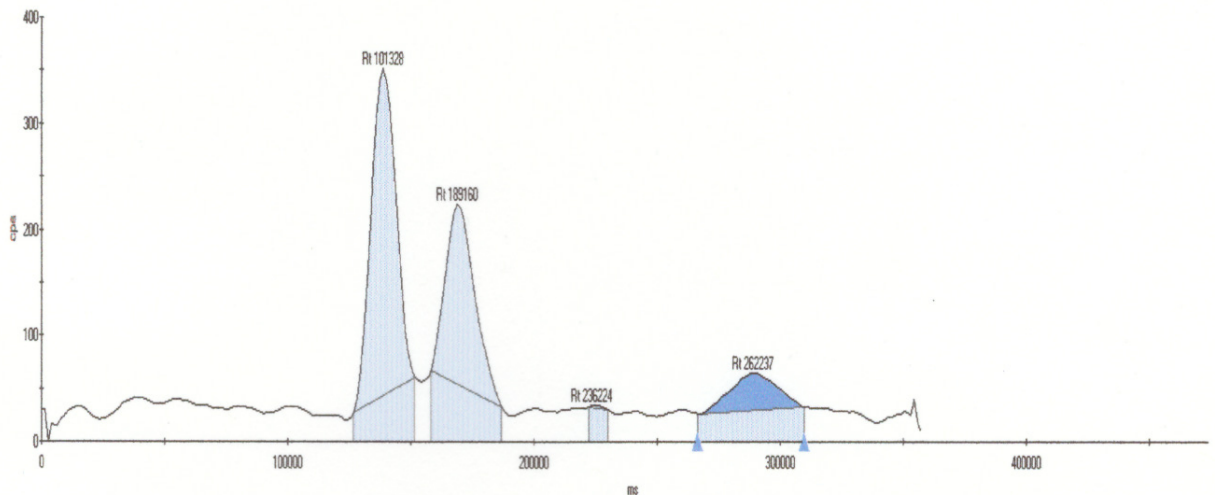


Figura 18: Cromatograma obtenido para la muestra 26. Se grafica la intensidad de señal (cps) y el tiempo (ms)

Como se observa en ambos cromatogramas (figuras 17 y 18), la fase móvil empleada permite una adecuada separación y tiempos de elución rápidos por lo que permite tiempos de análisis cortos con resultados satisfactorios.

En otro orden de ideas, aun cuando los valores de arsénico total no superan los niveles máximos permitidos y podría señalarse que no representan riesgo para la salud humana se realizó el análisis de especies para cada muestra, resultados que

se resumen en el cuadro 20. Se expresa además el porcentaje de arsénico inorgánico para cada una de las muestras.

Cuadro 20: Especiación de arsénico por molino, fecha y procedencia

Molino	Procedencia	As III (ppb)	DMA (ppb)	MMA (ppb)	As V (ppb)	Suma (ppb)	% As inorgánico
D 5/12	Importado	70,4	53,1	nd	7,5	131	58,0
D 14/11	Importado	70,5	69,3	nd	12	152,3	54,5
D 17/10	Importado	51,8	63,9	nd	15	130,9	51,2
D 5/12	Nacional	5,3	0,3	nd	2,3	7,9	96,7
D 17/10	Nacional	18,3	5,7	nd	2,1	26,1	78,3
D 31/10	Nacional	13,2	8,9	1,8	6,2	30,1	64,7
D 14/11	Nacional	1,7	11,7	nd	1,1	14,5	19,3
E 17/10	Nacional	4,3	4,2	nd	2,1	10,6	60,2
E 21/11	Nacional	6,7	8,6	nd	0,6	15,9	45,6
E 31/10	Nacional	39	47,1	nd	5,7	91,9	48,7
E 31/10	Importado	72,8	53,4	nd	5,2	131,3	59,4
E 17/10	Importado	77	70,1	nd	9,5	156,5	55,2
E 21/11	Importado	92	43,9	nd	4,3	140,2	68,7
C 5/12	Nacional	0,3	6,5	nd	2,5	9,3	30,4
C 17/10	Nacional	46,4	41,5	nd	13	101	58,9
C 31/10	Nacional	62	47,8	nd	13	122,4	61,0
C 14/11	Nacional	7,7	1,2	0,6	1,8	11,4	83
C 17/10	Importado	79	45,5	nd	3,3	127,8	64,4
C 5/12	Nacional	7,3	0,7	nd	2,6	10,7	93,5
C 14/11	Importado	9,2	6,6	nd	5,7	21,5	69,5
C 31/10	Importado	59,2	63,5	nd	11	133,3	52,4
F 31/10	Nacional	62,4	32,9	1	6	102,3	66,9
F 17/10	Importado	68,2	36,9	0,3	10	115,4	67,8
F 31/10	Importado	74,8	53,3	nd	6,8	134,9	60,5
A 24/10	Importado	64,9	53,3	nd	13	131	59,3
A 7/11	Nacional	55,6	36,4	nd	1,2	93,2	60,9
A 21/11	Mezcla	63,4	36,1	nd	3,7	103,3	65,0
B 17/10	Nacional	71,7	34,8	nd	10	116,5	70,1
B 31/10	Importado	72,3	29,4	nd	1,4	103,2	71,5
B 14/11	Importado	44,2	40,2	nd	11	95,1	57,8
B 17/10	Importado	64	23,3	0,9	4,9	93,1	74,0
B 31/10	Importado	63,9	26	nd	9,4	99,4	73,8
Material de referencia		32,9±1,1	7,1±3,7	nd	9,4±2,6	49,4±1,3	

nd= no detectado por el instrumento

En su mayoría las muestras analizadas presentan como especies principales arsénico inorgánico, especies que han sido ampliamente documentadas debido a su toxicidad.

Se ha evidenciado que las especies inorgánicas ocasionan cánceres de vejiga urinaria, pulmón y piel, riñón, hígado, así como lesiones en la piel, hepatomegalia, cirrosis, alteraciones en el metabolismo hemo, encefalopatía, retrasos en el desarrollo, enfermedades cardiovasculares, degeneración de los túbulos renales, necrosis cortical neurotoxicidad y diabetes.

Se puede además evidenciar que para el material de referencia se obtiene valores de sumatoria de las especies dentro de los reportados (45-53) $\mu\text{g.Kg}^{-1}$, lo cual indica que el método analítico empleado es válido y permitió una adecuada digestión, separación cromatográfica y detección para el arsénico y sus especies. Se obtuvo además resultados con alta precisión analítica al obtener desviaciones estándar bajas y por ende coeficiente de variación de 2,63%.

Una explicación de los resultados obtenidos es presentada por Ma et al., (2008), quienes señalan que el arsénico metilado es absorbido en menor proporción que AsIII y AsV. Un estudio reciente también muestra que el transportador Lsi1 de Si y AsIII puede mediar en la absorción de As metilado en arroz.

Cuadro 21: Comparación de contenido de especies As (III) y As (V) por procedencia

Parámetro	As (III)	As (V)
Valor p (bilateral)	0,000	0,020
α	0,05	0,05
Hipótesis	H0: La diferencia de posición entre las muestras es igual a 0. Ha: La diferencia de posición entre las muestras es diferente de 0.	H0: La diferencia de posición entre las muestras es igual a 0. Ha: La diferencia de posición entre las muestras es diferente de 0.
Interpretación de la prueba	Puesto que el valor-p computado es menor que el nivel de significación $\alpha=0,05$, se debe rechazar la hipótesis nula H0, y aceptar la hipótesis alternativa Ha.	Puesto que el valor-p computado es menor que el nivel de significación $\alpha=0,05$, se debe rechazar la hipótesis nula H0, y aceptar la hipótesis alternativa Ha.

El cuadro 21 presenta la comparación de medianas para los arroces nacionales e importados en relación con las especies arsenicales inorgánicas pentavalentes y trivalentes, empleando la prueba de Mann-Whitney. Se observa que en ambos casos se acepta la hipótesis alterna, es decir que el contenido de las especies arsenicales es aparentemente diferente entre los arroces nacionales e importados.

En ambos casos, las muestras de arroz importado presentaron valores superiores a los obtenidos para el arroz nacional, los cuales fueron para el arsénico trivalente: 65,0 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ para el importado y 26,8 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$; mientras que para el arsénico pentavalente: 8,24 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ para el nacional y 4,68 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ para el importado.

CAPÍTULO 5
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

De acuerdo a los resultados analíticos obtenidos podemos concluir que tanto el método analítico como el tratamiento de la muestra deberán ser optimizados para llegar a obtener resultados más precisos y exactos que permitirá minimizar los errores sistemáticos.

El uso del ácido malónico como fase móvil para la separación de las especies arsenicales permite tiempos de retención cortos y con una separación adecuada.

En relación con el contenido de metales pesados y arsénico, se acepta la hipótesis alterna, ya que las muestras de arroz procesadas en la provincia de Chiriquí superaron los límites máximos permitidos para el plomo y en el caso del cobre se obtuvieron concentraciones elevadas en ambas clases de arroz analizadas.

Con respecto al contenido de metales pesados, se acepta la hipótesis alterna debido a que los arroces nacionales e importados procesados en la provincia de Chiriquí, difieren en contenido cadmio, cobre y arsénico.

Para el arroz importado se observó que las concentraciones de los analitos se encontraban en el siguiente orden: $Cu > As > Pb > Cr > Cd$; mientras que para el arroz nacional se obtuvo que las concentraciones disminuían en el siguiente orden: $Cu > Pb > As > Cd > Cr$.

Las muestras analizadas contienen principalmente arsénico inorgánico, siendo estas especies consideradas como las más tóxicas y asociadas con múltiples afecciones al ser humano.

En relación con las especies arsenicales inorgánicas pentavalentes y trivalentes, en ambos casos se acepta la hipótesis alterna, ya que los contenidos de dichas especies resultaron aparentemente diferentes entre los arroces nacionales e importados.

El Análisis de Componentes Principales reveló también 4 agrupaciones bien definidas, las cuales podría hacer referencia a que los metales cadmio y cobre presentan orígenes similares entre ellos, pero que difieren del origen del arsénico, cromo y plomo.

5.2. Recomendaciones

Los resultados para el material de referencia sugieren que es recomendable adecuar el método previo a su uso para la determinación de la concentración de metales totales a fin de obtener resultados precisos y exactos.

Continuar documentando el contenido de metales pesados en productos de consumo masivo con el propósito de garantizar la inocuidad de los alimentos consumidos por la población panameña y poder documentar parámetros como la ingesta diaria.

Sugerir a las entidades involucradas de salud que se realicen esfuerzos destinados a documentar la procedencia de los arroces importados, de forma accesible.

Recomendar el establecimiento de laboratorios de control que analicen los alimentos importados a fin de garantizar la inocuidad de los alimentos ingresados al país.

Determinar concentraciones de metales pesados en suelos y aguas dedicados al cultivo de arroz y otros granos.

Evitar la utilización de agroquímicos con formulación de metales pesados.

CAPÍTULO 6
BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS

6. BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS

6.1. Bibliografía

1. Abadin, H., Ashizawa, A., Stevens, Y.-W., Lladós, F., Diamond, G., Sage, G., ... Swarts, S. G. (2007). Toxicological Profile for Lead. *U.S Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry*, (August), 582. https://doi.org/doi:10.1201/9781420061888_ch106
2. Abedin, J.; Cresser, M.; Meharg, A.; Feldmann, J. & Cropper-Howells, J. (2002). *Environmental Science Technology*, 6, 962-968.
3. Achmad, R. T., & Auerkari, E. I. (2017). Effects of Chromium on Human Body Effects of Chromium on Human Body, (January). <https://doi.org/10.9734/ARRB/2017/33462>
4. Ackerman, A. P., Creed, P., Parks, A., Fricke, M., Schwegel, C., Creed, J., Heitkemper, D., & Vela, N. (2005). Comparison of a Chemical and Enzymatic Extraction of Arsenic from Rice and an Assessment of the Arsenic Absorption from Contaminated Water by Cooked Rice. *Environmental Science and Technology*, 2005, 39 (14), pp 5241-5246. <https://doi.org/10.1021/es048150n>
5. Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades. (2007). Resumen de Salud Pública Arsénico, 11.
6. Alava, P., Van de Wiele, T., Tack, F., & Du Laing, G. (2012). Extensive grinding and pressurized extraction with water are key points for effective and species preserving extraction of arsenic from rice. *Analytical Methods*, 4, 1237-1243. <https://doi.org/10.1039/C2AY25094B>
7. Amaral, C. D. B., Nóbrega, J. A., & Nogueira, A. R. A. (2013). Sample preparation for arsenic speciation in terrestrial plants - A review. *Talanta*, 115, 291-299. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.04.072>
8. Ambiente, P. de N. U. para el M. (2010). Análisis de flujo del comercio y revisión de prácticas de manejo ambientalmente racionales de productos conteniendo cadmio, plomo y mercurio en América Latina y El Caribe.
9. Ammann, A. A. (2007). SPECIAL FEATURE : Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS): a versatile tool. *Journal of Mass Spectrometry*, 42, 419-427. <https://doi.org/10.1002/jms>
10. Angelova V., Ivanova, R., Delibaltova, V. and Ivanov, K. 2004. Bio-accumulation and distribution of heavy metals in fibre crops (flax, cotton and hemp). *Industrial Crops and Products*, 19: 197-205.
11. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução - RDC n.42, de 29 de Agosto de 2013. Disponível em:

- <portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/8100bb8040eac2e8b590b79cca79f4cf/RDC+n%C2%BA+42_2013_final.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 10 mar. 2015.
12. AOAC. (2015). AOAC Official Method 2015.01 Heavy Metals in Food Inductively Coupled Plasma–Mass Spectrometry First Action 2015. *AOAC Official Method 2015.01*, 1–15. Retrieved from doi: 10.5740/jaoac.int.2012.007
 13. Arias JA, Peralta-Videa JR, Ellzey JT, Ren M, Viveros MN, Gardea-Torresdey JL (2010) Effects of *Glomus deserticola* inoculation on *Prosopis*: enhancing chromium and lead uptake and translocation as confirmed by X-ray mapping, ICP-OES and TEM techniques. *Environ Exp Bot* 68(2):139–148
 14. Arroyo, S., Ortiz, B., Enrique, L., & Vicentina, C. (2013). Cadmio: efectos sobre la salud. Respuesta celular y molecular. *Acta Toxicológica Argentina*, 21, 33–49.
 15. ASTDR. (2012). Toxicological Profile for Chromium. *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*, (September), 121–189. <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp7.pdf>
 16. ATSDR. (2004). Toxic profile copper, CAS#: 7440-50-8. *Atsdr*, 2. Retrieved from <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp132-c1-b.pdf>
 17. Baba, K., Arai, T., Yamaguchi, N., Watanabe, E., Eun, H., & Ishizaka, M. (2014). Chromatographic separation of arsenic species with pentafluorophenyl column and application to rice. *Journal of Chromatography A*, 1354, 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.05.072>
 18. Bagirathy, G. (2014). A comparative study of mineral contents in select Malaysian Brown rice and white rice. *University of Malaya*.
 19. Banu, B. S., Danadevi, K., Jamil, K., Ahuja, Y. R., Rao, K. V., & Ishaq, M. (2001). In vivo genotoxic effect of arsenic trioxide in mice using comet assay. *Toxicology*, 162, 171–177.
 20. Barrutia O, Garbisu C, Hernández-Allica J, García-Plazaola JI, Becerril JM (2010) Differences in EDTA-assisted metal phytoextraction between metallicolous and non-metallicolous accessions of *Rumex acetosa* L. *Environ Pollut* 158(5):1710–1715
 21. Bernard, A. (2008). Cadmium & its adverse effects on human health. *The Indian Journal of Medical Research*, 128(4), 557–564.
 22. Bhattacharya, S.; Gupta, K.; Debnath, S.; Chand Ghosh, U.; Chattopadhyay, D. & Mukhopadhyay, A. (2012). Arsenic bioaccumulation in rice and edible plants and subsequent transmission through food chain in Bengal basin: a review of the perspectives for environmental health. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 94(3), 429–441.

23. Bhattacharya, P.; Welch, A.; Stollenwerk, K.; Mc Laughlin, M. & Bundschuh G. (2007). Arsenic in the environment: Biology and Chemistry. *Science of the Total Environment*, 379, 109–120.
24. Bost, M., Houdart, S., Oberli, M., Kalonji, E., Huneau, J. F., & Margaritis, I. (2016). Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 35, 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.02.006>
25. Brinkel, J., Khan, M. H., & Kraemer, A. (2009). A Systematic Review of Arsenic Exposure and Its Social and Mental Health Effects with Special Reference to Bangladesh, 1609–1619. <https://doi.org/10.3390/ijerph6051609>
26. Bundschuh, J., Nath, B., Bhattacharya, P., Liu, C., Aurora, M., Moreno, M. V., Tenuta, A. (2012). Science of the Total Environment Arsenic in the human food chain : the Latin American perspective. *Science of the Total Environment*, The, 429, 92–106. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.09.069>
27. Carey, A. M., Lombi, E., Donner, E., De Jonge, M. D., Punshon, T., Jackson, B. P., Meharg, A. A. (2012). A review of recent developments in the speciation and location of arsenic and selenium in rice grain. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402(10), 3275–3286. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5579-x>
28. Centro Nacional del Medio Ambiente. (2006). *Materiales de referencia y comparaciones interlaboratorios*. (G. de Chile, Ed.). Santiago, Chile.
29. Chang, Y.; Yang, Z & Chao, H. (2018). Reduction in cadmium accumulation in japonica rice grains by. *Journal of Integrative Agriculture*, 17(0). [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(18\)61904-5](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(18)61904-5)
30. Chen, J.; Qin, J.; Zhu, Y.; Lorenzo, V. & Rosen, B. (2013). Engineering the soil bacterium *Pseudomonas putida* for arsenic methylation. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(14), 4493–4495. <https://doi.org/10.1128/AEM.01133-13>
31. Chen, Y., Han, Y.-H., Cao, Y., Zhu, Y.-G., Rathinasabapathi, B., & Ma, L. Q. (2017). Arsenic Transport in Rice and Biological Solutions to Reduce Arsenic Risk from Rice. *Frontiers in Plant Science*, 8(March). <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00268>
32. Comisión Europea, (2017). Contenido máximo de metales pesados en productos alimenticios. Secretaría de Estado de Comercio.
33. Cuberos, Esther; Rodríguez, Alba & Prieto, E. (2009). Niveles de Cromo y Alteraciones de Salud en una Población Expuesta a las Actividades de Curtiembres en Bogotá, Colombia. *Revista de Salud Pública*, 11(2), 278–289.

34. Da Silva, D. G., Scarminio, I. S., Anunciação, D. S., Souza, A. S., Da Silva, E. G. P., & Ferreira, S. L. C. (2013). Determination of the mineral composition of Brazilian rice and evaluation using chemometric techniques. *Analytical Methods*, 5(4), 998–1003. <https://doi.org/10.1039/c2ay26158h>
35. Delgadillo, A. E., & González, C. A. (2011). Fitorremediación: Una alternativa para eliminar la contaminación, 14 (2011): 597- 612. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14, 597–612.
36. Delince, I. W., Carmenate, C. R. V., Olivia, I., Morgado, L., Izquierdo, C. F. G., & Arias, C. M. I. B. (2015). Riesgo agroambiental por metales pesados en suelos con Cultivares de *Oryza sativa* L y *Solanum tuberosum* L Heavy metals agroenvironmental risk in soils with cultivate *Oryza sativa* L . and *Solanum tuberosum* L. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 24(1), 44–50.
37. Deng, F., Yamaji, N., Xia, J., & Ma, J. F. (2013). A Member of the Heavy Metal P-Type ATPase OsHMA5 Is Involved in Xylem Loading of Copper in Rice. *Plant Physiology*, 163(3), 1353–1362. <https://doi.org/10.1104/pp.113.226225>
38. Dos Santos, I. F., Dos Santos, A. M. P., Barbosa, U. A., Lima, J. S., Dos Santos, D. C., & Matos, G. D. (2013). Multivariate analysis of the mineral content of raw and cooked okra (*Abelmoschus esculentus* L.). *Microchemical Journal*, 110, 439–443. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2013.05.008>
39. Duker, A. A., Carranza, E. J. M., & Hale, M. (2005). Arsenic geochemistry and health, 31, 631–641. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2004.10.020>
40. FAO. (2017). Seguimiento del mercado del arroz de la FAO, 10.
41. FAO/OMS. (2015). Norma General Para los Contaminantes y las Toxinas Presentes en los Alimentos y Piensos.
42. FAO/OMS. (2007). Informe de la 1ª Reunión del Comité del Codex sobre Contaminantes de los Alimentos. En línea. Disponible en: http://www.fao.org/tempref/codex/Reports/Alinorm07/al30_41s.pdf
43. Faria, B.; Rozane, D.; Romeiro, S.; Barth, G.; Barbosa, R.; Rodriguez, T.; Ferreira, M.; Pereira, C.; Boaretto, A. & Malavolta, E. (2011). Comissão 3 . 4 - Poluição , remediação do solo e recuperação de áreas degradadas. Cadmium Availability and Accumulation by Lettuce and Rice (1). *Nuclear Energy*, (9), 645–654.
44. Ferrer, A. (2013). Intoxicación por metales. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 26(9), 141–153. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
45. Food and Agriculture Organization. (2004). El arroz es vida. En línea.

Disponible en: <http://www.fao.org/rice2004/es/f-sheet/hoja3.pdf>

46. Fujimaki, S.; Suzui, N.; Ishioka, N.; Kawachi, N.; Ito, S.; Chino, M. & Nakamura, S. (2010). Tracing Cadmium from Culture to Spikelet: Noninvasive Imaging and Quantitative Characterization of Absorption, Transport, and Accumulation of Cadmium. *Breakthrough Technologies*, 152(April), 1796–1806. <https://doi.org/10.1104/pp.109.151035>
47. García, S. (2013). Estudios de especiación de arsénico y acumulación de metales en muestras de interés medioambiental. *Universidad Politécnica de Madrid*, 400. Retrieved from http://oa.upm.es/153111/1/SARA_GARCIA_SALGADO.pdf
48. García, P. E. P., & Cruz, M. I. A. (2012). Los efectos del cadmio en la salud. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 17(3), 199–205.
49. García, I. & Dorronsoro, C. (2005). Contaminación por Metales Pesados. En Tecnología de Suelos. Universidad de Granada. Departamento de Edafología y Química Agrícola. <http://edafologia.ugr.es>.
50. Gómez-Ariza, J.; Morales, E.; Sánchez-Rodas, D.; Giráldez, I. (2000). Stability of chemical species in environmental matrices. *TrAC, Trends Anal. Chem.* 2000a, 19, 200-209.
51. Gong, Z., Lu, X., Ma, M., Watt, C., & Le, X. C. (2002). Arsenic speciation analysis. *Talanta*, 58, 77–96.
52. Guertin, J. (2004). Toxicity and Health Effects of Chromium (All Oxidation States), 213–232.
53. Hayat, S., Khaliq, G., Irfan, M., Wani, A. S., Tripathi, B. N., & Ahmad, A. (2012). Physiological changes induced by chromium stress in plants: An overview. *Protoplasma*, 249(3), 599–611. <https://doi.org/10.1007/s00709-011-0331-0>
54. Horner, N. S., & Beauchemin, D. (2012). Analytica Chimica Acta A simple method using on-line continuous leaching and ion exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry for the speciation analysis of bio-accessible arsenic in rice. *Analytica Chimica Acta*, 717, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.12.049>
55. Huang, X.-Y., Deng, F., Yamaji, N., Pinson, S. R. M., Fujii-Kashino, M., Danku, J., Ma, J. F. (2016). A heavy metal P-type ATPase OsHMA4 prevents copper accumulation in rice grain. *Nature Communications*, 7, 12138. <https://doi.org/10.1038/ncomms12138>
56. Huda, A. K. M. N., Swaraz, A. M., Reza, M. A., Haque, M. A., & Kabir, A. H. (2016). Remediation of Chromium Toxicity Through Exogenous Salicylic Acid in Rice

(*Oryza sativa* L.). *Water, Air, and Soil Pollution*, 227(8).
<https://doi.org/10.1007/s11270-016-2985-x>

57. Hughes, M. (2002). Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicology Letters*, 133, 1–16.

58. Hymer, C. B., & Caruso, J. A. (2004). Arsenic and its speciation analysis using high-performance liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1045, 1–13.

59. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. (2009). *Plan de acción para la competitividad de la cadena de arroz de Panamá. Hacia un mecanismo de reconocimiento de la calidad*.

60. Jackson, B. P., & Punshon, T. (2015). Recent Advances in the Measurement of Arsenic, Cadmium, and Mercury in Rice and Other Foods. *Current Environmental Health Reports*, 2(1), 15–24. <https://doi.org/10.1007/s40572-014-0035-7>

61. Jolliffe, I. T. (2002). *Principal Component Analysis, Second Edition*. (Springer, Ed.) (Second). New York.

62. Kabata, A., H. & Pendias, H. (2004). Soil-plant transfer of trace elements: An environmental issue. Descargado de http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi

63. Kabir, A. H. (2016). Biochemical and molecular changes in rice seedlings (*Oryza sativa* L.) to cope with chromium stress. *Plant Biology (Stuttgart, Germany)*, 18(4), 710–719. <https://doi.org/10.1111/plb.12436>

64. Kaiser, H.F. (1958). The varimax criterion for analytic rotation in factor analysis. *Psychometrika*, 23, 187-200.

65. Kariyawasam, T. I., Godakumbura, P. I., Prashantha, M. A. B., & Premakumara, G. A. S. (2016). Proximate composition, calorie content and heavy metals (As, Cd, Pb) of selected Sri Lankan traditional rice (*Oryza sativa* L.) varieties. *Italian Oral Surgery*, 6(1csusl 2015), 253–256. doi:10.1016/j.profoo.2016.02.036

66. Klein, C.; Leszczynska, J.; Hickey, C. & Rossman, T. (2006). Further evidence against a direct genotoxic mode of action for arsenic-induced cancer. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 222,289-297.

67. Krupanidhi, S., Sreekumar, A., & Sanjeevi, C. B. (2008). Copper & biological health. *Indian Journal of Medical Research* (Vol. 128). <https://doi.org/10.1080/10937400600755911>

68. Kumar, B., Smita, K., & Cumbal Flores, L. (2017). Plant mediated detoxification

of mercury and lead. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S2335–S2342.
<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.08.010>

69. Laparra, J.; Vélez, D.; Barberá, R.; Farré, R. & Montoro, R. (2005). Bioavailability of Inorganic Arsenic in Cooked Rice: Practical Aspects for Human Health Risk Assessments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(22), 8829–8833.

70. Lee, S., & An, G. (2009). Over-expression of OsIRT1 leads to increased iron and zinc accumulations in rice. *Plant, Cell and Environment*, 32, 408–416.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01935.x>

71. Lima, C., Hoehne, L. & Meurer, E. (2015). Cádmio, cromo e chumbo em arroz comercializado no Rio Grande do Sul. *Ciência Rural*, 45, 2164–2167.
<https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20140654>

72. Lin, S.; Cullen, W.; Thomas, D. (1999). Methylarsenicals and arsinothiols are potent inhibitors of mouse liver thioredoxin reductase. *Chemistry Research Toxicology*, 12:924–930.

73. Llugany, M., Tolrà, R., Poschrieder, C., & Barceló, J. (2007). Hiperacumulación de metales: ¿ una ventaja para la planta y para el hombre? *Ecosistemas*, 16(2), 4–9.

74. Londoño Franco, L. F., Londoño Muñoz, P. T., & Muñoz Garcia, F. G. (2016). Los Riesgos De Los Metales Pesados En La Salud Humana Y Animal. *Bioteconología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial*, 14(2), 145.
[https://doi.org/10.18684/BSAA\(14\)145-153](https://doi.org/10.18684/BSAA(14)145-153)

75. Lucho, C., Álvarez, M., Beltrán, R. I., Prieto, F., & Poggi, H. M. (2005). A multivariate analysis of the accumulation and fractionation of major and trace elements in agricultural soils in Hidalgo State, Mexico irrigated with raw wastewater. *Environment International*, 31(3), 313–323.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2004.08.002>

76. Ma, L., Wang, L., Tang, J., & Yang, Z. (2016). Optimization of arsenic extraction in rice samples by Plackett – Burman design and response surface methodology. *FOOD CHEMISTRY*, 204, 283–288.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.126>

77. Ma, J. F., Yamaji, N., Mitani, N., Xu, X.-Y., Su, Y.-H., McGrath, S. P., & Zhao, F.-J. (2008). Transporters of arsenite in rice and their role in arsenic accumulation in rice grain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(29), 9931–9935.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0802361105>

78. Mahurpawar, M. (2015). Effects of heavy metals on human health. *International Journal of Research-Granthaalayah*, 2350(530), 2394–3629.

79. Mandal, B. K. and K. T. Suzuki. 2002. Arsenic round the world: A review. *Talanta* 58: 201-235.
80. Mandal, B.K., Ogra, Y., Suzuki, K.T., (2001). Identification of dimethylarsinous and monomethylarsonous acids in human urine of the arsenic-affected areas in West Bengal, India. *Chemical Research in Toxicology* 14, 371–378.
81. Mataveli, L. R. V., Buzzo, M. L., Arauz, L. J. De, Carvalho, M. D. F. H., Arakaki, E. E. K., Matsuzaki, R., & Tiglia, P. (2016). Total Arsenic, Cadmium, and Lead Determination in Brazilian Rice Samples Using ICP-MS. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/3968786>
82. Mc Sheely, S.; Szpunar, J.; Morabito, R. & Quevauviller, P.(2003). The speciation of arsenic in biological tissues and the certification of reference materials for quality control. *Trends in Analytical Chemistry*, 22,191-209.
83. Meharg, A., Williams, P., Adomako, E., Lawgali, Y., Deacon, C., Villada, A., Cambell, R., Sun, G., Zhu, Y., Feldmann, J., Raab, A., Zhao, F., Ialam, R., Hossain, S. & Yanai, J.(2009). Geographical variation in total and inorganic arsenic content of polished (white) rice. *Environmental Science and Technology* 43, 1612-1617.
84. Mandal, B.K., Suzuki, K.T. (2002). Arsenic round the world: a review. *Talanta* 58, 201-235.
85. Márquez-García, B.; Pérez-López, R.; Ruíz-Chancho, M.J.; López-Sánchez, J.F.;Rubio, R.; Abreu, M.M.; Nieto, J.M.; Córdoba, F. (2012). Arsenic speciation in soils and *Erica andevalensis* Cabezudo & Rivera and *Erica australis* L. from São Domingos Mine area, Portugal. *J. Geochem. Explor.* 2012, 119-120, 51-59.
86. Méndez, P., Ramírez, G., César, A., Gutiérrez, R., Alma, D., & García, P. (2009). Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10(1), 29–44.
87. Miloc, T.; Jiménez, J. (2014). Estudio descriptivo del comportamiento de la intoxicación aguda por metales pesados en Colombia. Bogotá, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales.
88. Ministerio de Comercio e Industrias de la República de Panamá. (2002). Reglamento Técnico DGNTI-COPANIT-75-2002.
89. Ministerio de Desarrollo Agropecuario. (2017). Producción agrícola en el marco del desarrollo de sectores económico estratégico .
90. Molina, N. Aguilar, P. & Cordovez, C. (2010). Plomo, cromo III y cromo VI y sus efectos sobre la salud humana. *Ciencia Y Tecnología Para La Salud Visula Y Ocular*, 8(1), 77–87.

91. Morrison, D. 1967. *Multivariate Statistical Methods*. Universidad de Pensilvania. Segunda edición, McGraw – Hill Book Company. pp. 128-136. Peña, D. 2002. *Análisis de Datos Multivariantes*.
92. Nakanishi H, Ogawa I, Ishimaru Y, Mori S, Nishizawa NK 2006: Iron deficiency enhances cadmium uptake and translocation mediated by the Fe²⁺ transporters OsIRT1 and OsIRT2 in rice. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 52, 464–469. Pate
93. National Institutes of Health. (2005). Lead and Your Health. *National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS)*, (October), 1–2. Retrieved from https://www.niehs.nih.gov/health/materials/lead_and_your_health_508.pdf
94. Nava, C., & Méndez, M. (2011). Efectos neurotóxicos de metales pesados (cadmio, plomo, arsénico y talio). *Archivos de Neurociencia*, 16(3), 140–147.
95. Navarro, J. P., Aguilar Alonso, I., & López, J. R. (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas*, 16(2), 10–25. <https://doi.org/10.7818/re.2014.16-2.00>
96. Ng, J. C., Wang, J., & Shraim, A. (2003). A global health problem caused by arsenic from natural sources, 52, 1353–1359. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00470-3](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00470-3)
97. Nordberg, G., Langard, S., Sunderman, F. W., Mager Stellman, J., Osinsky, D., Markkanen, P., ... Atsdr. (2001). Metales: propiedades químicas y toxicidad. *Enciclopedia de Salud Y Seguridad En El Trabajo*, 1–76.
98. Nogueira, R., Melo, E. A., & Figueiredo, J. L. C. (2018). Arsenic Speciation in Fish and Rice by HPLC-ICP-MS Using Salt Gradient Elution, 29(8), 1593–1600.
99. Olivares, S.; García, D.; Lima, L.; Saborit, I.; Llizo, A. & Pérez, P. (2013). Niveles de cadmio, plomo, cobre y zinc en hortalizas cultivadas en una zona altamente urbanizada de la ciudad de la habana, Cuba. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 29(4), 285–293. <https://doi.org/10.1007/s00128-012-0544-8>
100. Oliveira Da Silva, A. L., Barrocas, P. R. G., Do Couto Jacob, S., & Moreira, J. C. (2005). Dietary intake and health effects of selected toxic elements. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(1), 79–93. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202005000100007>
101. Organización Mundial de la Salud-Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2016). Programa Conjunto FAO/OMS Sobre Normas Alimentarias Comité del Codex Sobre Contaminantes de los Alimentos,

Propuesta de Niveles Máximos Para Arsénico Inorgánico en Arroz Descascarillado. Roma, febrero de 2016.

102. Organización Mundial de la Salud. (2009). Diez datos sobre inocuidad de los alimentos. Consultado el 8 de diciembre de 2013. Disponible en: www.who.int/features/factfiles/food_safety/es/index.html.

103. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación-Organización Mundial de la Salud. (2004). Programa Conjunto FAO/OMS Sobre Normas Alimentarias Comisión del Codex Alimentarius. Ginebra, 2-7 de julio de 2001.

104. Pereira, P. C. S., Freitas, C. F., Chaves, C. S., Estevão, B. M., Pellosi, D. S., Tessaro, A. L., ... Hioka, N. (2014). Chemistry in Undergraduate Chemistry Courses: A proposal for the use of Multivariate Analysis in the Determination of pK a. *Química Nova*, 37(8), 1417–1425. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140216>

105. Pizarro, I., Gómez, M., Cámara, C., & Palacios, M. A. (2003). Arsenic speciation in environmental and biological samples Extraction and stability studies, 495, 85–98. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.08.009>

106. Poma, P. (2008). Lead effects on humans. *Anales de La Facultad de Medicina*, 69(Universidad Nacional Mayor de San Marcos Perú), 120–126.

107. Pourrut, B., Shahid, M., Dumat, C., Winterton, P., Pourrut, B., Shahid, M., ... Uptake, L. (2011). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* Volume 213, 213. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9860-6>

108. Pozo, W., Sanfeliu, T., & Carrera, G. (2011). Metales pesados en humedales de arroz en la cuenca baja del río Guayas, 2(1), 17–30.

109. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. (2010). Análisis de flujo del comercio y revisión de prácticas de manejo ambientalmente racionales de productos conteniendo cadmio, plomo y mercurio en América Latina y El Caribe.

110. Ramos, O., Guevara, N., Macias, B., & y Ortiz, Y. (2003). Evaluacion De Riesgo a La Salud Por La Presencia De Metales Pesados En Pescado De El "Laguito" De Nuevo Laredo Tamulipas. *Environmental Toxicology and Risk Assessment*, 1–8. Retrieved from http://web.uaemex.mx/Red_Ambientales/docs/memorias/Extenso/QA/EC/QAC-08.pdf

111. Repetto, Manuel & Cameán, A. (1995). *Toxicología avanzada. Toxicología avanzada*. Madrid: Díaz de Santos.

112. Reyes, Y. C., Vergara, I., Torres, O. E., Díaz, M., & González, E. E. (2016).

Contaminación por metales pesados: implicaciones en salud, ambiente y seguridad alimentaria. *Revista Ingeniería Investigación y Desarrollo*, 16(2), 66–77. <https://doi.org/10.19053/1900771X.v16.n2.2016.5447>

113. Sáenz Arce, P. (2014). El papel de la productividad en el sector agrícola panameño. Retrieved from http://www.cncpanama.org/cnc/pdf_cnc/EIPapelDeLaProductividad.pdf

114. Schmidt, A.C.; Fahlbusch, B.; Otto, M. Size exclusion chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry for analysis and quantitative characterization of arsenic interactions with peptides and proteins. *J. Mass Spectrom.* 2009, 44, 898-910.

115. Sebastian, A., & Prasad, M. N. V. (2014). Cadmium minimization in rice. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 34(1), 155–173. <https://doi.org/10.1007/s13593-013-0152-y>

116. Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación. (2015). Política Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación de Panamá y Plan Nacional 2015-2019. *Gaceta Oficial Digital*, viernes 27 de marzo de 2015.

117. Shekhawat, Kiri; Chatterjee, Sreemoyee & Joshi, B. (2016). Chromium Toxicity and its Health Hazards. *International Journal of Advanced Research*, 3(July 2015), 167–172.

118. Shi, S., Wang, T., Chen, Z., Tang, Z., Wu, Z., Salt, D. E., Zhao, F.-J. (2016). OsHAC1;1 and OsHAC1;2 Function as Arsenate Reductases and Regulate Arsenic Accumulation. *Plant Physiology*, 172(3), 1708–1719. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01332>

119. Silva, M. L. D. S., Vitti, G. C., & Trevizam, A. R. (2007). Concentração de metais pesados em grãos de plantas cultivadas em solo com diferentes níveis de contaminação. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42(4), 527–535. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2007000400011>

120. Sinha, V., Pakshirajan, K., & Chaturvedi, R. (2018). Chromium tolerance, bioaccumulation and localization in plants: An overview. *Journal of Environmental Management*, 206, 715–730. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.10.033>

121. Son, S. H., Lee, W. B., Kim, D., Lee, Y., & Nam, S. H. (2019). An alternative analytical method for determining arsenic species in rice by using ion chromatography and inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 270(December 2017), 353–358. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.066>

122. Stambulska, U. Y., Bayliak, M. M., & Lushchak, V. I. (2018). Chromium(VI) Toxicity in Legume Plants: Modulation Effects of Rhizobial Symbiosis. *BioMed*

- Research International*, 2018(Table 1), 1–13. <https://doi.org/10.1155/2018/8031213>
123. Takahashi, R., Ishimaru, Y., Senoura, T., Shimo, H., Ishikawa, S., & Arao, T. (2011). The OsNRAMP1 iron transporter is involved in Cd accumulation in rice. *Journal of Experimental Botany*, 62(14), 4843–4850. <https://doi.org/10.1093/jxb/err136>
124. Tanaka, K., Fujimaki, S., Fujiwara, T., Yoneyama, T., Tanaka, K., Fujimaki, S., & Fujiwara, T. (2010). Quantitative estimation of the contribution of the phloem in cadmium transport to grains in rice plants (*Oryza sativa* L.) Quantitative estimation of the contribution of the phloem in cadmium transport to grains in rice. *Soil Science and Plant Nutrition*, 768. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2007.00116.x>
125. Tripathi, R.D., Srivastava, S., Mishra, S., Singh, N., Tuli, R., Gupta, D.K., Maathuis, F.J.M., 2007. Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants. *Trends Biotech.* 25, 158e165.
126. Tirado, L., González, F., Martínez, L., Wilches, L., & Celedón, J. (2015). Niveles de metales pesados en muestras biológicas y su importancia en salud. *Rev. Nac. Odontol.*, 85. <https://doi.org/10.16925/od.v11i21.895>
127. Torres, S. (2011). Bioaccesibilidad de arsénico y mercurio en alimentos con potencial riesgo toxicológico. Valencia, Universidad de Valencia: Tesis Doctoral.
128. Ueno, D., Yamaji, N., Kono, I., Feng, C., Ando, T., Yano, M., & Feng, J. (2010). Gene limiting cadmium accumulation in rice. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005396107>-DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1005396107
129. Uruguchi, S., & Fujiwara, T. (2012). Cadmium transport and tolerance in rice: Perspectives for reducing grain cadmium accumulation. *Rice*, 5(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1939-8433-5-5>
130. Uruguchi, S., Kamiya, T., Sakamoto, T., Kasai, K., Sato, Y., & Nagamura, Y. (2011). Low-affinity cation transporter (OsLCT1) regulates cadmium transport into rice grains, (27). <https://doi.org/10.1073/pnas.1116531109>
131. Uruguchi, S., Mori, S., Kuramata, M., Kawasaki, A., Arao, T., & Ishikawa, S. (2009). Root-to-shoot Cd translocation via the xylem is the major process determining shoot and grain cadmium accumulation in rice, 60(9), 2677–2688. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp119>
132. Voica, C., Dehelean, A., & Kovacs, M. H. (2012). The use of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for the determination of toxic and essential elements in different types of food samples. *AIP Conference Proceedings*, 1425(February 2015), 110–113. <https://doi.org/10.1063/1.3681979>
133. Wang, P., Zhang, W., Mao, C., Xu, G., & Zhao, F. J. (2016). The role of OsPT8

in arsenate uptake and varietal difference in arsenate tolerance in rice. *Journal of Experimental Botany*, 67(21), 6051–6059. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw362>

134. Ward, E. (2003). Impact of Copper on Human Health. *International Copper Association, Ltd.*

135. Welna, M., Szymczycha-madeja, A., & Pohl, P. (2015). Trends in Analytical Chemistry Comparison of strategies for sample preparation prior to spectrometric measurements for determination and speciation of arsenic in rice. *Trends in Analytical Chemistry*, 65, 122–136. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.11.007>

136. Williams LE, Mills RF. 2005. P1B-ATPases: an ancient family of transition metal pumps with diverse functions in plants. *Trends in Plant Science* 10, 491–502.

137. Winship, K.A. Toxicity of inorganic arsenic salts. *Adverse Drug React. Toxicol. Rev.* 1984, 3, 129-160

138. WHO. (2011). Copper in Drinking-water. *America*, 3, 23. <https://doi.org/10.1016/j.kjms.2011.05.002>

139. Wu, C., Ye, Z., Li, H., Wu, S., Deng, D., Zhu, Y., & Wong, M. (2012). Do radial oxygen loss and external aeration affect iron plaque formation and arsenic accumulation and speciation in rice? *Journal of Experimental Botany*, 63(8), 2961–2970. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers017>

140. Zavala, Y.; Gerards, R.; Gurleyuk, H. & Duxbury, J. (2008). Arsenic in Rice: II. Arsenic Speciation in USA Grain and Implications for Human. *Health Environmental Science & Technology*, 42 (10), 3861–3866.

141. Zhao, D., Li, H. B., Xu, J. Y., Luo, J., & Ma, L. Q. (2015). Arsenic extraction and speciation in plants: Method comparison and development. *Science of the Total Environment*, 523, 138–145. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.051>

142. Zheng, J.; Hintelmann, H.; Dimock, B.; Dzurko, M.S. Speciation of arsenic in water, sediment, and plants of the Moira watershed, Canada, using HPLC coupled to high resolution ICP-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 2003, 377, 14-24.

143. Zhu, Y.; Sun, G.; Lei, M.; Teng, M.; Liu, Y.; Chen, N.; Wang, L.; Carey, A.; Deacon, C.; Raab, A.; Meharg, A. & Williams, P. (2008). High Percentage Inorganic Arsenic Content of Mining Impacted and Nonimpacted Chinese Rice. *Environmental Science Technology*, 42, 5008–5013.

6.2. Anexos

6.2.1. Anexo 1: Especificaciones del material de referencia

Se presenta algunas especificaciones para el material de referencia empleado, la información completa se encuentra disponible en:

<https://crm.jrc.ec.europa.eu/p/40455/40460/By-material-matrix/Plant-materials/IRMM-804-RICE-FLOUR/IRMM-804>

Código

IRMM-804

Peso neto

15g

Procedencia

El CRM fue procesado y certificado por la Comisión Europea, Dirección General Centro de Investigación Conjunta, Instituto de Materiales de Referencia y Mediciones (IRMM), Geel, Bélgica.

Preparación

La certificación del CRM incluyó pruebas de la homogeneidad y estabilidad del material, así como la caracterización utilizando un enfoque de intercomparación.

El arroz se molió y se embotelló en unidades de 60 g en el Instituto Nacional de Metrología de Japón (NMIJ). En el IRMM, la harina de arroz se redistribuyó en unidades de 15 g y se embotelló en botellas de vidrio ámbar de 60 mL con un sello engarzado. Se produjo un total de 1526 botellas.

La distribución del tamaño de partícula del material se evaluó utilizando un analizador de tamaño de partícula con un dispositivo de medición Helos (Sympatec, Alemania). Se mostró que el tamaño de partícula superior era de 500 μm . Se determinó que el contenido de agua en el momento del embotellado era de $4.5 \pm 0.2\%$ ($n = 20$) por valoración volumétrica Karl Fisher.

Se determinó que la actividad de agua era de 0.102 ± 0.005 ($n = 20$) usando un medidor de actividad de agua (Aqualab CX3, Decagon, EE. UU.). Este valor bajo indica que el material es higroscópico.

Recomendaciones sobre su uso

Almacenamiento del material

Las muestras deben almacenarse refrigeradas a 4°C . Se debe tener cuidado para evitar la humedad. Una vez abiertas deben sellarse ya que el material es higroscópico.

Uso del material

Las botellas deben agitarse dando la vuelta al menos dos minutos antes de abrirlas. Asegurar la re homogeneización del contenido.

Corrección de masa seca

La determinación de la masa seca se debe realizar en submuestras separadas.

Las muestras para la determinación de la masa seca y el análisis deben realizarse al mismo tiempo para evitar diferencias en la humedad debido a la higroscopicidad de la harina de arroz. La determinación de masa seca debe llevarse a cabo secando en un horno ventilado a 85°C durante al menos 12 horas, hasta que se alcanza peso constante. En esta etapa, dos pesos netos consecutivos de la muestra deben diferir en menos del 0,5%.

6.1.2. Anexo 2: Curva de calibración para la especiación de arsénico

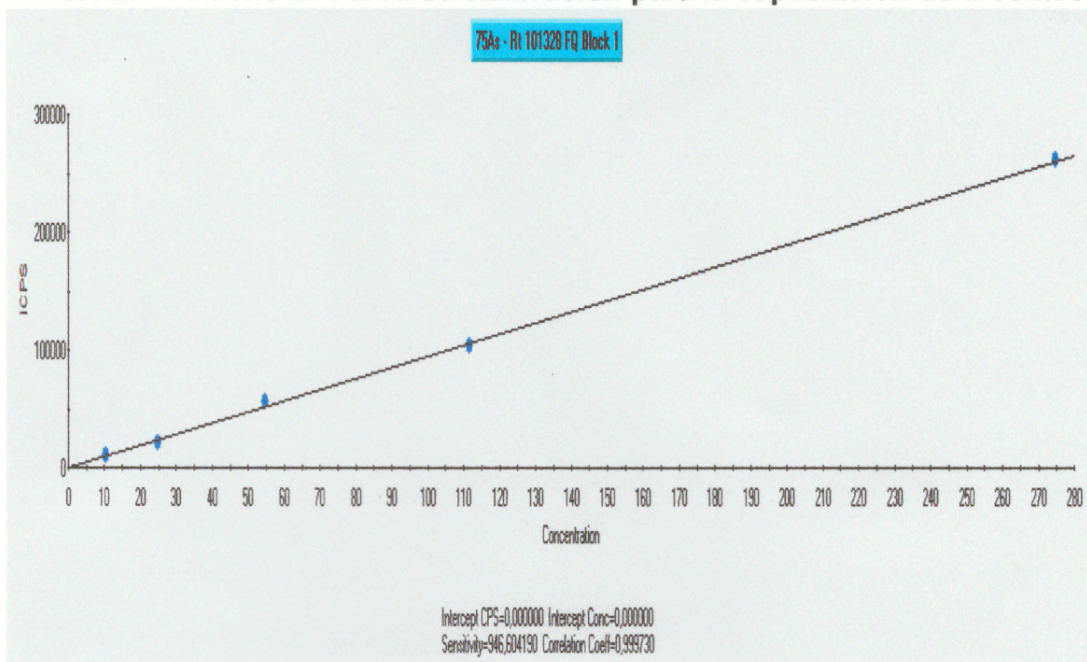


Figura 19: Curva de calibración para el As III. Se aprecia el tiempo de retención $R_t=101328$ ms y $r=0,99973$

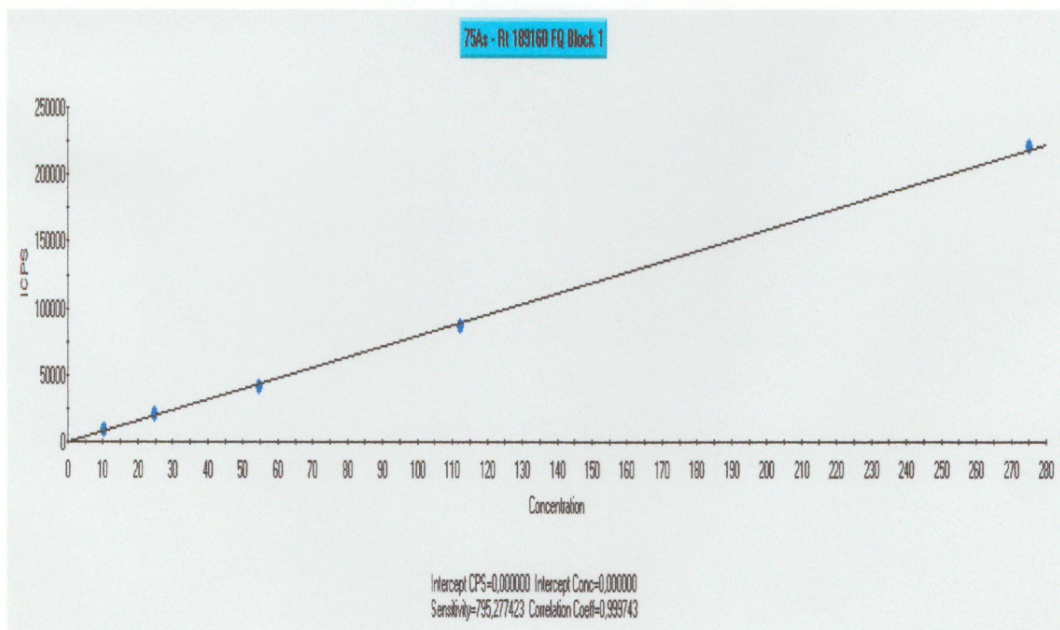


Figura 20: Curva de calibración para el DMA. Se aprecia el tiempo de retención $R_t=189160$ ms y $r=0,99974$

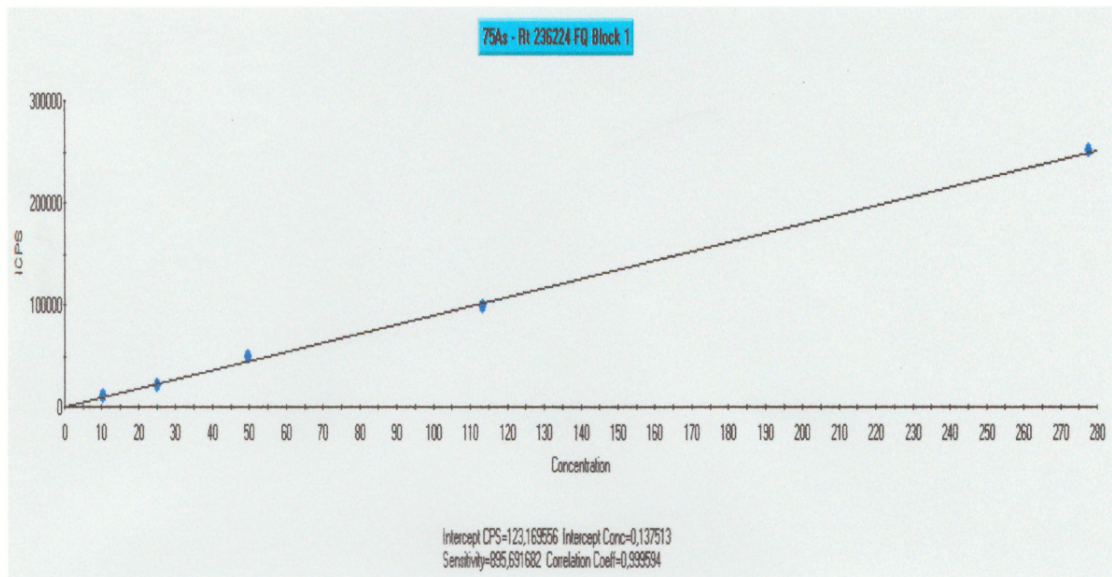


Figura 21: Curva de calibración para el MMA. Se aprecia el tiempo de retención $R_t=236$ 224 ms y $r=0,99959$

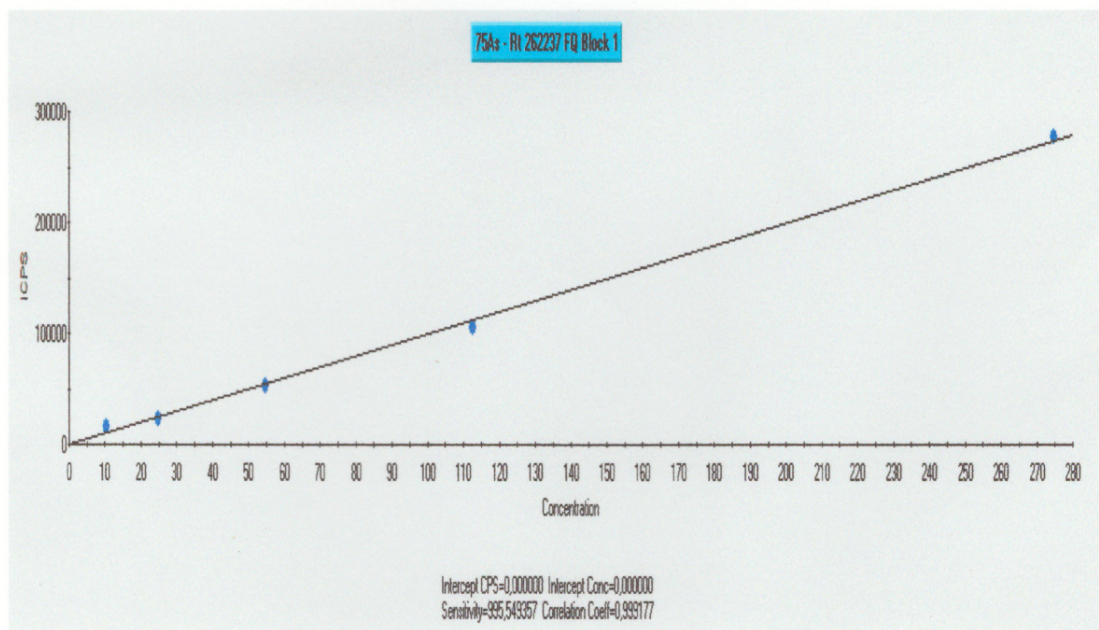


Figura 22: Curva de calibración para el As V. Se aprecia el tiempo de retención $R_t=262$ 237 ms y $r=0,99917$