

Universidad de Huelva

Departamento de Química y Ciencia de los Materiales



Especiación de arsénico en alimentos de origen marino : efectos del cocinado y su consumo en el metabolismo humano

**Memoria para optar al grado de doctor
presentada por:**

Manuel Contreras Acuña

Fecha de lectura: 19 de marzo de 2014

Bajo la dirección de los doctores:

José Luis Gómez Ariza

Tamara García Barrera

Huelva, 2014



ESPECIACIÓN DE ARSÉNICO EN ALIMENTOS DE ORIGEN MARINO. EFECTOS DEL COCINADO Y SU CONSUMO EN EL METABOLISMO HUMANO.

TESIS DOCTORAL.
MANUEL CONTRERAS ACUÑA



UNIVERSIDAD DE HUELVA

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA Y CIENCIA DE LOS MATERIALES

“PROFESOR JOSÉ CARLOS VÍLCHEZ MARTÍN”



**ESPECIACIÓN DE ARSÉNICO EN ALIMENTOS DE ORIGEN
MARINO. EFECTOS DEL COCINADO Y SU CONSUMO EN EL
METABOLISMO HUMANO.**

**PROGRAMA DE DOCTORADO:
TÉCNICAS INSTRUMENTALES EN QUÍMICA**

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR POR:

Manuel Contreras Acuña

Bajo la dirección de los directores:

Jose Luis Gómez Ariza

Tamara García Barrera

Huelva, 2014

ESPECIACIÓN DE ARSÉNICO EN ALIMENTOS DE ORIGEN MARINO. EFECTOS DEL COCINADO Y SU CONSUMO EN EL METABOLISMO HUMANO.

Directores:

Fdo. Jose Luis Gómez Ariza

Catedrático de Universidad

Fdo. Tamara García Barrera

Profesora Titular de Universidad



**UNIVERSIDAD DE HUELVA
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA Y
CIENCIA DE LOS MATERIALES
“PROFESOR JOSÉ CARLOS VÍLCHEZ MARTÍN”**

Trabajo presentado para optar al Grado de Doctor por:

Fdo. Manuel Contreras Acuña

Licenciado en Ciencias Ambientales

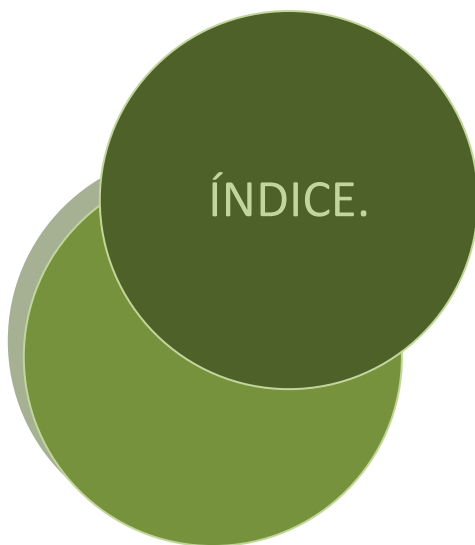
D. JOSÉ LUIS GÓMEZ ARIZA, Catedrático de Universidad y director del Departamento de Química y Ciencia de los Materiales “Profesor José Carlos Vílchez Martín” de la Universidad de Huelva

HACE CONSTAR QUE:

El presente trabajo de investigación, titulado “ESPECIACIÓN DE ARSÉNICO EN ALIMENTOS DE ORIGEN MARINO. EFECTOS DEL COCINADO Y SU CONSUMO EN EL METABOLISMO HUMANO”, realizado por D. Manuel Contreras Acuña, bajo la dirección del Prof. José Luis Gómez Ariza y la Prof. Tamara García Barrera, reúne los requisitos necesarios para ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en el Departamento de Química y Ciencia de los Materiales “Prof. J. C. Vílchez Martín” de la Universidad de Huelva.

Huelva, Marzo de 2014

Fdo. José Luis Gómez Ariza





ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	13
OBJETIVOS	20
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	22
ÍNDICE DE FIGURAS.	26
ÍNDICE DE TABLAS.	30
RESUMEN.....	33
1 INTRODUCCIÓN	38
1.1 La historia y el Arsénico.....	38
1.2 Principales Especies químicas de Arsénico. Aspectos toxicológicos.....	41
1.3 Metabolismo del arsénico en organismos marinos.	49
1.4 Metabolismo del arsénico en humanos.	56
1.4.1 Factores implicados en el metabolismo del arsénico.	68
1.5 El arsénico en el medio ambiente.	71
1.5.1 Especies de arsénico en la atmósfera.	72
1.5.2 Especies de arsénico en el medio terrestre.	73
1.5.3 Especies de arsénico en el medio acuático.	74
1.5.4 Presencia del arsénico en la flora y la fauna.	77
1.6 El arsénico en los alimentos de origen marino.....	93
1.6.1 <i>Anemonia Sulcata</i>	93



1.6.1.1	<i>Especiación de arsénico en anémonas</i>	96
1.6.2	Transformación del arsénico durante el cocinado.....	98
1.7	Metodologías analíticas para la caracterización y cuantificación de especies químicas.....	103
1.7.1	La Especiación química.....	103
1.7.2	Métodos y Aplicaciones para la determinación de Arsénico..	107
1.7.3	La especiación del arsénico en biomedicina.	113
1.7.4	Técnicas metalómicas en el análisis químico.	116
1.8	Biaccesibilidad del arsénico.	121
2	PARTE EXPERIMENTAL.....	128
2.1	Instrumentación Analítica.	128
2.1.1	Espectrómetros de masas atómico, ICP-MS.....	128
2.1.2	Separación Cromatográfica.....	129
2.1.3	Espectrómetro de masas.....	130
2.1.4	Otra instrumentación.....	132
2.2	Reactivos y Patrones.	135
2.3	Procedimientos.....	137
2.3.1	2.3.1 Determinación de la concentración total de arsénico. 137	
2.4	Especiación de arsénico en <i>Anemonia sulcata</i>	137
2.5	Especiación de arsénico en orina y suero.....	138
2.6	Determinación de creatinina en orina.....	139
2.7	Determinación de la fracción bioaccesible.....	139
2.8	Identificación de arsenicales mediante HPLC-MS.	140
2.9	Estudio metabolómico en organismos modelo.....	143



3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	148
	CAPÍTULO I.....	148
	CAPÍTULO II.....	160
	CAPÍTULO III.....	173
	CONCLUSIONES	193
	BIBLIOGRAFÍA	198

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco a todos los que han confiado y confían en mí, su apoyo, su aliento y comprensión. A los que apostaron por mí cuando estaba tan alejado de la química analítica, a José Luís y Tamara, por creer cuando más complicado resultaba hacerlo. Debo agradecer a todos mis compañeros su apoyo y ayuda, su escucha y su trabajo incansable juntos. Esta ha sido y será como mi familia.

Especialmente agradecer a Rocío, su apoyo, el que haya estado siempre a mi lado, ha sido genial haberte conocido y compartir tanto tiempo contigo. También a José Manuel, que ha pasado de ser un desconocido a ser un referente de humildad, trabajo y dedicación para mí, y un gran amigo.

También a aquellos compañeros con los que comencé la aventura de la investigación, Fernando y Macarena, ellos fueron los que me acogieron en un grupo de doctorandos por entonces incipiente. Y a los que llegaron después, a Amanda, siempre con una sonrisa y a Raúl, siempre dispuesto a escuchar. Y los nuevos, que ya no los sois tanto, Verónica, Miguel Ángel, Rocío Castilla y Jessica, por ser el aire fresco que todo grupo humano necesita. Todos habéis terminado siendo más que compañeros.

Y sobre todo tengo que agradecerse a mis padres y mi familia, nunca se han rendido conmigo, siempre por más problemas que nos han venido han estado junto a mí, ellos me han hecho ser mejor cada día. Y especialmente a mi abuelo Juan y mi tía Josefa, sois y seréis mi guía, me habéis enseñado a no rendirme nunca y a aceptar las dificultades con entusiasmo y coraje, siempre esteréis en mi memoria.

Gracias a todos de corazón, de otro modo no sé hacerlo.



OBJETIVOS



A mi tía Josefa, a mis padres y a mi familia.



OBJETIVOS



*Mis palabras serán ignoradas por la mayoría, no me importa, siempre
pertenece a la inmensa minoría.*



OBJETIVOS





OBJETIVOS

- Desarrollo, comparación y optimización de procedimientos analíticos para la extracción de especies de arsénico de alimentos de origen marino, en particular la anémoma (*Anemonia sulcata*), de elevado consumo en Andalucía.
- Desarrollo de una metodología analítica para la determinación de especies convencionales de arsénico en alimentos de origen marino (*Anemonia sulcata*) que permita su cuantificación a bajos niveles de concentración, así como la determinación de especies que carecen de patrones comerciales.
- Estudio del metabolismo del arsénico en humanos mediante el análisis de muestras biológicas (sangre y orina) tras el consumo de alimentos de origen marino en los que la presencia de arsénico ha sido previamente confirmada.
- Análisis metabolómico en experiencias de exposición controladas a arsénico utilizando como organismo modelo el ratón de laboratorio (*Mus musculus*).





ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.

AAS: Espectroscopia de absorción atómica.
ABC: (ATP-enlace casete)
ADN: Ácido desoxirribonucleico
AEC: Columna de intercambio aniónico
AES: Espectroscopia de emisión atómica
AFS: Espectroscopia de fluorescencia atómica
APCI: Ionización química a presión atmosférica.
APPI: Fotoionización a presión atmosférica.
ARN: Ácido ribonucleico
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
AsB: Arsenobetaína
AsC: Arsenocolina
ASE: Sistema de extracción acelerada con disolvente
AsZ: Arsenoazúcar
AsZ A: Sulfonatoarsenoribósido
AsZ B: Glycerolarsenoribósido
AsZ C: Sulfatoribósido
AsZ D: Fosfatoarsenoribósido
ATP: Adenosina trifosfato
CE: Electroforesis Capilar
DMA: Ácido dimetilarsínico
DMPS: Dimercaptopropano
DMDTA^V: Ácido dimetilditioarsínico
DMMTA^{III}: Ácido dimetilarsenioso
DMMTA^V: Ácido dimetiltioarsínico
ESI: Ionización por electrospray
FAO: Organización de Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura.
GC: Cromatografía de gases
GSH: Glutatión reducido



HG: Generación de Hidruros
HILIC: Cromatografía de interacción hidrofílica
HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución
HTX: Hexosa permeasa transportadora
ICP-MS: Espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo
IEC: Cromatografía de intercambio iónico
IMAC: Cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados
IT: Trampa de iones
LC: Cromatografía líquida
LC₅₀: Dosis letal para el 50% de una población expuesta a un tóxico.
MALDI: Ionización-desorción por láser asistida por la matriz
MMA: Ácido metilarsónico
MMDTA: Ácido metilditioarsónico
MMMTA: Ácido metiltioarsónico
MSⁿ: Espectrometría de masas en tándem
NCR: National Council Research
OMS: Organización Mundial de la salud
Q: Analizador de Cuadrupolo
Q-FTICR: Analizador de Cuadrupolo- resonancia ciclotrónica de iones con transformada de Fourier
qQq: Analizador de Triple Cuadrupolo
qQq-TOF: Analizador de Triple Cuadrupolo -Tiempo de vuelo
Q-TOF: Analizador de Cuadrupolo-Tiempo de vuelo
RPC: Cromatografía en fase reversa
SEC: Cromatografía de exclusión de tamaño
SAH: S-adenosil-homocisteína
SAM: S-adenosil-metionina
TEMA: Ión tetrametilarsonio
TETRA: TEMA
TMA⁺: TEMA, TETRA
TMAO: Óxido de trimetilarsina
TMAP: Propionato Trimetiltioarsonio



ÍNDICE DE ABREVIATURAS

TMAS: Sulfuro de trimetilarsina

UE: Unión Europea

UV: Ultravioleta

XAS: Espectrometría de absorción por rayos X.

Two overlapping green circles. The top circle is a darker shade of green and contains the text 'ÍNDICE DE FIGURAS'. The bottom circle is a lighter shade of green.

ÍNDICE DE
FIGURAS



ÍNDICE DE FIGURAS.

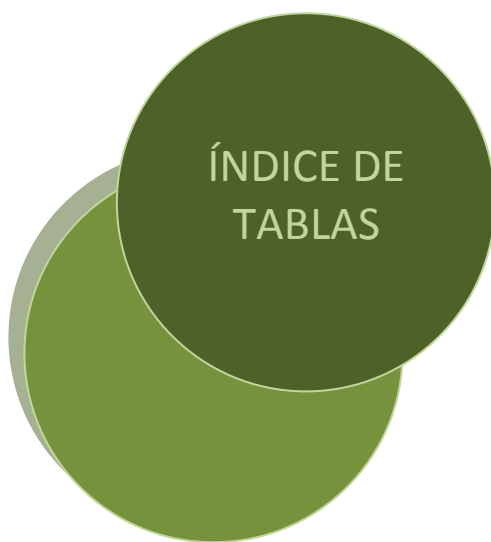
Figura 1.1 Arseniato de cobre.	39
Figura 1.2 Arsénico nativo.	41
Figura 1.3 Arsénico puro.	44
Figura 1.4 Estructuras de los compuestos de arsénico más comunes en la naturaleza.	46
Figura 1.5 Ruta de biotransformación en organismos marinos	49
Figura 1.6 Esquema de transformación de arsenicales en células de fitoplactón	50
Figura 1.7 Esquemas de metabolismo del arsénico.	51
Figura 1.8 Ciclo biológico del arsénico en el mar.	52
Figura 1.9 Esquema general de metilación en humanos.	56
Figura 1.10 Molécula de glutatión.	57
Figura 1.11 Esquema del metabolismo de las especies de arsénico en humanos.	58
Figura 1.12 Esquema de la transformación química y metabólica en seres humanos de arsenicales en distintas condiciones.	59
Figura 1.13 Patrones concentración-respuesta para la metilación de As^{III} en distintos mamíferos expuestos y en hepatocitos humanos.	61
Figura 1.14 Dosis excretada en orina y heces de ratones expuestos a arsénico.	63
Figura 1.15 Concentración de MMA^{V} radioactivo en diferentes tejidos de ratones expuestos.	64



Figura 1.16 Modelo conceptual de metabolismo de arsénico en células humanas.	67
Figura 1.17 Esquema general de la transformación y presencia del arsénico en el ciclo trófico marino. Bioacumulación y deposición.	82
Figura 1.18 Fotografía de algunas algas que forman parte de alimentos y productos dietéticos.	86
Figura 1.19 Fotografías de <i>Anemonia sulcata</i> .	93
Figura 1.20 Esquema general de un antozoo.	94
Figura 1.21 Esquema de un sistema HPLC-UV-HG-AFS.	111
Figura 1.22 Esquema ICP-MS con celda de colisión.	112
Figura 1.23 Colisión de moléculas en la celda de colisión de un ICP-MS	112
Figura 1.24 Esquema de las distintas ramas “ómicas”.	119
Figura 2.1 Esquema de los procesos de pérdida de energía y fraccionamiento de una molécula de ArCl en un ICP-MS con celda de colisión.	128
Figura 2.2 Fotografía de un API 2000	131
Figura 2.3 Fotografía de un microondas focalizado CEM, con automuestreador.	134
Figura 2.4 Espectros obtenidos mediante HPLC-(CEC)-ES-QqQ, en modo MS/MS y MRM.	142
Figura 2.5 Esquema del estudio metabolómico realizado a ratones expuestos a arsénico.	143



ÍNDICE DE FIGURAS





ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1.1 Principales compuestos inorgánicos de arsénico de origen natural.	42
Tabla 1.2 Principales compuestos orgánicos de arsénico de origen natural.	42
Tabla 1.3 Principales arsenicales de origen antrópico.	45
Tabla 1.4 Dosis letales (LC ₅₀) de algunos arsenicales en células humanas.	47
Tabla 1.5 Metabolitos resultantes de la exposición de ratones a MMA ^V y MMA ^{III} .	65
Tabla 1.6 Arsenicales orgánicos identificados en organismos terrestres y marinos.	77
Tabla 1.7 Relación presencia-ausencia de los principales arsenicales en algas.	88
Tabla 1.8 Relación presencia-ausencia de los principales arsenicales en distintos grupos de organismos marinos.	90
Tabla 1.9 Concentración de los principales arsenicales en anémonas marinas.	96
Tabla 2.1 Condiciones cromatográficas utilizadas para la separación de arsenicales.	130
Tabla 2.2 Condiciones empleadas en el uso de MS	132
Tabla 2.3 Condiciones utilizadas para DI-ESI-QTOF-MS	145





El arsénico ha sido considerado históricamente como un veneno para los humanos, aunque sus aplicaciones han sido y son muy numerosas, y determinadas especies han resultado ser inocuas o con un mecanismo de acción tóxica desconocido. Su uso generalizado en pinturas, en la metalurgia o en la agricultura, ha determinado que este elemento se encuentre en todos los compartimientos ambientales, a veces debido también a su naturaleza geogénica. Además, aunque el incremento de normativas que regulan su uso a partir de los años 70 ha reducido sustancialmente su presencia, su estudio es un tema de gran interés en la actualidad, debido al carácter tóxico de muchas de las especies de este elemento y al problema de salud ambiental que genera en algunos países como Bangladesh. En la actualidad se sabe además que los diferentes estados de oxidación y complejos o estructuras moleculares en los que este elemento puede encontrarse presentan diferente carácter tóxico y capacidad de bioacumulación, por lo que resulta imprescindible disponer de metodologías analíticas capaces de determinar estas especies por separado, a la vez que identificar nuevas especies del elemento, y conocer su mecanismo de acción en organismos modelo y finalmente en el hombre.

Teniendo en cuenta que los alimentos constituyen una importante interfase entre el medio ambiente y la salud, así como una frecuente vía de exposición, esta Tesis se ha centrado en el estudio de alimentos de origen marino, en los que habitualmente las concentraciones de arsénico suelen ser elevadas, así como en el análisis de metabolitos en organismos modelo y en el hombre. Para ello, se han seleccionado las anémonas de mar (*Anemonia sulcata*), de elevado consumo en Andalucía, especialmente Huelva y Cádiz, y sobre la que no existen estudios previos. En esta Tesis se ha estudiado la variación de la concentración total de arsénico durante el cocinado, la interconversión de especies durante el



proceso y su bioaccesibilidad, a fin de evaluar la posible repercusión que su consumo pudiera tener en la salud del hombre.

Para ello, la especiación de arsénico se ha llevado a cabo mediante el uso de técnicas analíticas de extracción tradicionales, como la extracción sólido-líquido, y otras más novedosas, como la extracción mediante sonda de ultrasonidos y microondas focalizado, desarrollando asimismo estudios de estabilidad de las especies durante su análisis. Por otra parte, el uso combinado de sistemas cromatográficos complementarios u ortogonales ha permitido la resolución de un elevado número de especies de arsénico que pueden ser cuantificadas a muy bajos niveles de concentración mediante acoplamiento en línea a un plasma de acoplamiento inductivo con detector de masas (ICP-MS). Debido a la presencia de especies de arsénico para las que no se disponía de patrones comerciales, la metodología propuesta en esta Tesis se basa en el uso de una segunda dimensión para la detección de especies mediante espectrometría de masas orgánicas, que ha permitido la identificación por primera vez de un compuesto de arsénico tiolado en un alimento, y de un derivado de la arsenocolina en un organismo no expuesto previamente a esta especie.

Finalmente, este estudio comprende el análisis de metabolitos de arsénico en el hombre mediante el análisis de fluidos biológicos (sangre y orina) en voluntarios que previamente consumieron este alimento, así como experiencias de exposición controlada a arsénico en el organismo modelo (*Mus musculus*). Para este último estudio se ha realizado un análisis metabolómico basado en el uso de infusión directa a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo tiempo de vuelo (QqQ-TOF), análisis quimiométrico utilizando la intensidad de los iones en el espectro como descriptores, e identificación de metabolitos por espectrometría de masas en tándem. Algunos de estos metabolitos han sido cuantificados mediante cromatografía de gases con detector de masas utilizando patrones comerciales, permitiendo todo ello relacionar la exposición a arsénico con importantes ciclos como el del metabolismo de la energía, aminoácidos,



colina, metionina y degradación de fosfolípidos asociados a la membrana celular.







1 INTRODUCCIÓN

1.1 La historia y el Arsénico.

Tan trascendental ha sido este elemento en la historia que miles de hombres murieron por su causa. Unos persiguiendo la transmutación de metales que permitía obtener, según la filosofía alquimista, la piedra filosofal, y que por tanto, tendría la cualidad de transformar cualquier elemento en oro. Y es que se pensó, no durante poco tiempo, que el oropimente (As_2S_3) estaba formado en parte por oro, debido a su color amarillento, y por tanto era constituyente de la tan preciada piedra filosofal, además de la Sandárac y el Realgar (As_2S_2).

Otros perecieron debido a su carácter tóxico, ya que la implacable ambición del ser humano lo convirtió en su mejor aliado para eliminar reyes, cortesanos y clérigos, y conseguir así sus propósitos. Se convertiría en el veneno de los ricos, llegando a ser conocido como “los polvos de la sucesión”.

Pero los no tan poderosos también lo sufrieron desde hace milenios, ya que desde la Edad del Bronce se han utilizado en la metalúrgica de los minerales que contenían arsénico en sus estructuras, y los vapores de óxido arsenioso que desprendían en el proceso acortaban sus esperanzas de vida y mermaban su salud [1, 2, 3].

El curtido de pieles con oropimente y realgar, también ha supuesto una actividad de riesgo para la salud durante muchos años [4].

Pero la medicina también ha ido de la mano de la singular historia de este alimento, siendo múltiples los usos del arsénico y sus derivados. Se utilizó contra el paludismo, la enfermedad de Hodgkin, para combatir eczemas o el lupus eritematoso. Así mismo, la sífilis, la tripanosomiasis, la psoriasis, la leucemia, el asma y la epilepsia han sido o son tratadas con arsénico, también son numerosos los tónicos fabricados tomando como base este elemento, sin olvidar su uso como sedante o amebicida. Incluso en la actualidad se sigue utilizando en la medicina tradicional china [4].



El término arsénico proviene del griego αρσενικόν el cuál significaba “masculino” o “potente”, de hecho al arsénico se le ha atribuido cualidades de masculinidad, como la dureza que transmitía al cobre al combinarse con éste [5].

El aislamiento y estudio del arsénico no se logró en la antigüedad, y ha sido un proceso largo. En el siglo VIII, Geber, descubre el arsénico blanco (As_2O_3), y tres siglos después, Avicena, distingue entre arsénico blanco, arsénico amarillo (orpimente) y arsénico rojo (realgar). El aislamiento de este metaloide es atribuido a San Alberto Magno, hacia el año 1250. Pero no se describió un método hasta que Schröder, en 1641, lo propuso. En 1733, Brand, demuestra que el arsénico blanco es simplemente el óxido de arsénico. En 1839 Bunsen aisló por primera vez un compuesto orgánico de arsénico [4].

En la actualidad los principales usos del arsénico están localizados esencialmente en las industrias madereras, ya que es un excelente conservante, en forma de arseniato de cromo y cobre (supone el 70 % del consumo total). Asimismo, se ha utilizado en la agricultura tradicional, donde sigue siendo muy importante, todavía, debido a su carácter tóxico, y a pesar de la prohibición por la Unión Europea, se sigue usando como plaguicida (arseniatos de plomo y de calcio), herbicidas (ácido cacodílico y sus sales sódicas) y fungicidas (arsenito de plomo) en otras zonas del mundo, representando el 22 % del consumo global [6].

En menor porcentaje se encuentran otros usos como la producción de vidrio (para aclarar, endurecer o enturbiar los mismos) (óxidos de As (III) y As (V)), pigmentos (arsenito de cobre (Fig. 1.1) para el verde Sheele) y en la industria electrónica, en la que se utiliza debido a las cualidades semiconductoras que posee los arseniuros de galio (AsGa) y de indio (AsIn) [7]

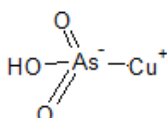


Fig. 1.1 Arseniato de Cobre.



También en ganadería el arsénico se emplea para eliminar los parásitos del ganado. Un uso menos habitual pero que hoy día aún persiste es el que se refiere al curtido de pieles, ya que el oropimente permite la eliminación del pelo [6].

La mayor época de producción mundial de arsénico se sitúa entre las décadas de 1850 y 1970. Pasando de una producción total inicial de 5.000 Tn hasta las más de 60.000 Tn en torno a 1940, y superándose las 70.000 Tn a finales de la década. La tendencia general en la actualidad es la de reducir su producción y consumo, fundamentalmente por razones medioambientales, debido a ello la producción se ha reducido a menos de 20.000 en la actualidad [4,6].

La OMS (Organización Mundial de la Salud) ha mostrado un gran interés por la reducción de la presencia de arsénico, especialmente en el agua.. Bangladesh es uno de los países más afectados por este problema, como así lo reflejan los últimos informes, en los cuales se hace referencia a los problemas de salubridad que afectan a países tan importantes en población como la India [8]



1.2 Principales Especies químicas de Arsénico. Aspectos toxicológicos.

El arsénico (Fig. 1.2) presenta un único isótopo natural y estable, ^{75}As , aunque se han preparado isótopos artificiales con vida media de varias horas (^{76}As , ^{77}As) o varios días (^{71}As , ^{72}As , ^{73}As , ^{74}As). El arsénico puede existir en cuatro estados de oxidación: -3, 0, +3 y +5, siendo el estado +5 el más habitual en ambientes oxigenados. Presenta una semejanza química con el fósforo, al que sigue dentro del mismo Grupo 15, aunque es más reactivo. Esto le permite formar uniones con diversos metales y enlaces covalentes con el carbono, hidrógeno, oxígeno y azufre, lo que contribuye de forma notable a su conocida toxicidad [6].



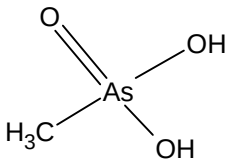
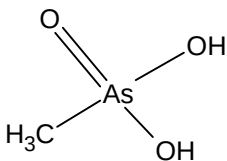
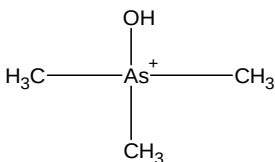
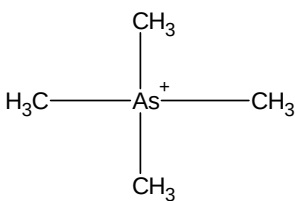
Fig. 1.2. Arsénico nativo.

Existen gran cantidad de compuestos de arsénico, tanto naturales como de origen antrópico. El arsénico en la naturaleza se encuentra tanto como especie inorgánica como orgánica (tablas 1.1, 1.2 y 1.3, Fig.1.3). Las especies inorgánicas se encuentran formando parte del medio ambiente inerte (suelos, aire, agua y sedimentos), mientras que las orgánicas están presentes fundamentalmente en la biota, ya que se origina como consecuencia del metabolismo de los seres vivos [6,9].



Compuesto	Sinónimos	Fórmula molecular
Óxido de As (III)	Arsénico blanco	As_2O_3 ó (As_4O_6)
Ácido arsenioso		HAsO_2 ó H_3AsO_3
Sulfuro de As (III)	Oropimente, amarillo	arsénico As_2S_3
Óxido de As (V)		As_2O_5
Ácido arsénico		H_3AsO_4
Sulfuro de arsénico	Realgar, arsénico rojo	As_2S_2 ó As_4S_4

Tabla 1.1. Principales compuestos inorgánicos de arsénico de origen natural [6,9]

Compuesto	Sinónimos	Estructura molecular
Ácido metil arsónico	Ácido monometil arsónico, MMA	
Ácido dimetil arsínico	Ácido cacodílico, DMA	
Óxido de trimetil arsina	TMAO	
Ion tetrametilarsonio	TETRA	



Arsenobetaína	AsB, AB	
Arsenocolina	AsC, AC	
Dimetil arsenoil ribósidos	Arsenoazúcares	
Trialkil arsonio ribósidos	Arsenoazúcares	
Ácido metiltioarsónico		
Ácido metilditioarsónico		



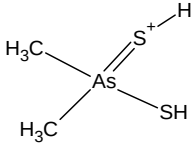
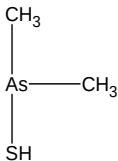
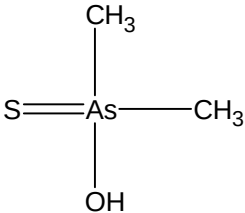
Ácido dimetilditioarsónico	
Ácido dimetilarsenioso	
Ácido dimetilarsínico	

Tabla 1.2 Principales compuestos orgánicos de arsénico de origen natural [6,9]



Fig.ura 1.3. Arsénico puro.



Compuesto	Sinónimo	Estructura
Dihidrocloreuro de 4,4-arsenobis (2-aminofenol)	Arsphenamina, salvaran	
Ácido (4-aminofenol)	Ácido arsinílico, atoxyl	
Ácido [4-[2amino-2-oxoetil]-fenil]arsónico	Tryparsamida	
Ácido [4-[aminocarbonil-amino]-fenil]arsónico	Carbarsona, ácido N-carbamoylarsanílico	
Ácido 4-nitrofenil arsónico	Nitarsona	
Ácido 3-nitro-4-hidroxifenilarsónico	Roxarsona	

Tabla 1.3. Principales arsenicales de origen antrópico [6].



INTRODUCCIÓN

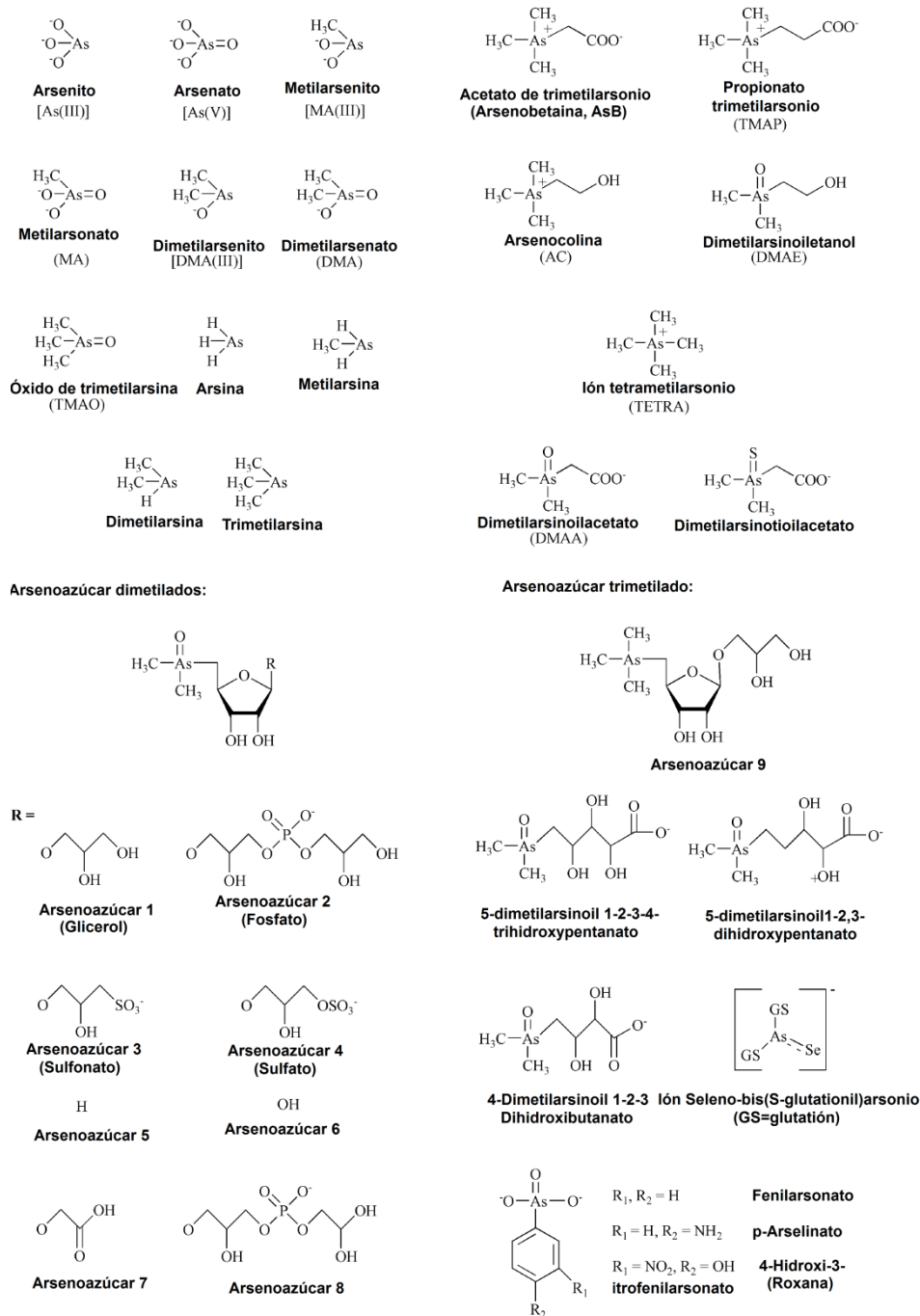


Fig. 1.4. Estructuras de los compuestos de arsénico más comunes en la naturaleza [10].



Arsenical	Fórmula	Estructura	LC ₅₀ (μM) en células humanas.
DMA^{III}	(CH ₃) ₂ AsO	$ \begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \diagdown \\ \text{H}_3\text{C}-\text{As} \\ \diagup \\ \text{O}^- \end{array} $	2,61
As^{III}	AsO(OH) ₂	$ \begin{array}{c} \text{O}^- \\ \diagdown \\ \text{HO}-\text{As} \\ \diagup \\ \text{OH} \end{array} $	5,49
DMMTA	(CH ₃) ₂ AsS(OH)	$ \begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{As}=\text{S}^+-\text{H} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $	10,7
As^V	(OH) ₃ AsO	$ \begin{array}{c} \text{HO} \quad \text{OH} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{As} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{HO} \quad \text{O} \end{array} $	571
DMA^V,	C ₂ H ₇ AsO ₂	$ \begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \diagdown \\ \text{H}_3\text{C}-\text{As}=\text{O} \\ \diagup \\ \text{O}^- \end{array} $	843

Tabla 1.4. Dosis letal (LC₅₀) de algunos compuestos de arsénico en células humanas. [11].

Actualmente se sabe que el nivel de toxicidad para humanos es distinto del que se pensaba hace unos años, ya que se creyó que los compuestos inorgánicos de arsénico eran más tóxicos que los orgánicos, fundamentalmente que los metilados, y que determinados organismos eran capaces de detoxificar a través de un mecanismo de metilación. En general se cumple esta condición, excepto al comparar las formas inorgánicas de arsénico con las formas metiladas en estado de oxidación +3, los cuales a su vez son intermediarios en el proceso de detoxificación



antes comentado, el cual ya no debería considerarse como tal por este motivo (se muestran en la tabla 1.4) [11].

La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) publicó en 2006 datos sobre las dosis letales de arsenicales metilados que forman parte de pesticidas. Dicho informe recoge que la forma de asimilación de los compuestos es muy importante a la hora de definir la toxicidad de los mismos. En el estudio realizado sobre conejos y ratas se establece que entre los siguientes cuatro compuestos estudiados de arsénico: MSMA (metanoarsonato monosodio), DSMA (metanoarsonato disodio), DMA y CAMA (metanoarsonato de ácido de calcio), este último es el que presenta menor toxicidad, estableciéndose que la vía de inhalación es la que presenta mayor toxicidad [EPA, Revised Reregistration Eligibility Decision for MSMA, DSMA, CAMA, and Cacodylic Acid. 2006].

Los patrones de toxicidad del arsénico dependen de numerosas variables, que están relacionadas con la estructura, pero también con hábitos alimenticios, de vida, características genéticas de la población y variables medioambientales entre otras, como se desarrollará más adelante en el punto 1.3.2.



1.3 Metabolismo del arsénico en organismos marinos.

En general, en el medio marino, la ruta de biotransformación del arsénico es la representada en la Figura 1.5, produciéndose la transformación del arsénico inorgánico en diferentes especies hasta la arsenobetaina. Sin embargo, en el medio terrestre los organismos sólo son capaces de transformar el arsénico hasta el ácido dimetilarsínico [11b].

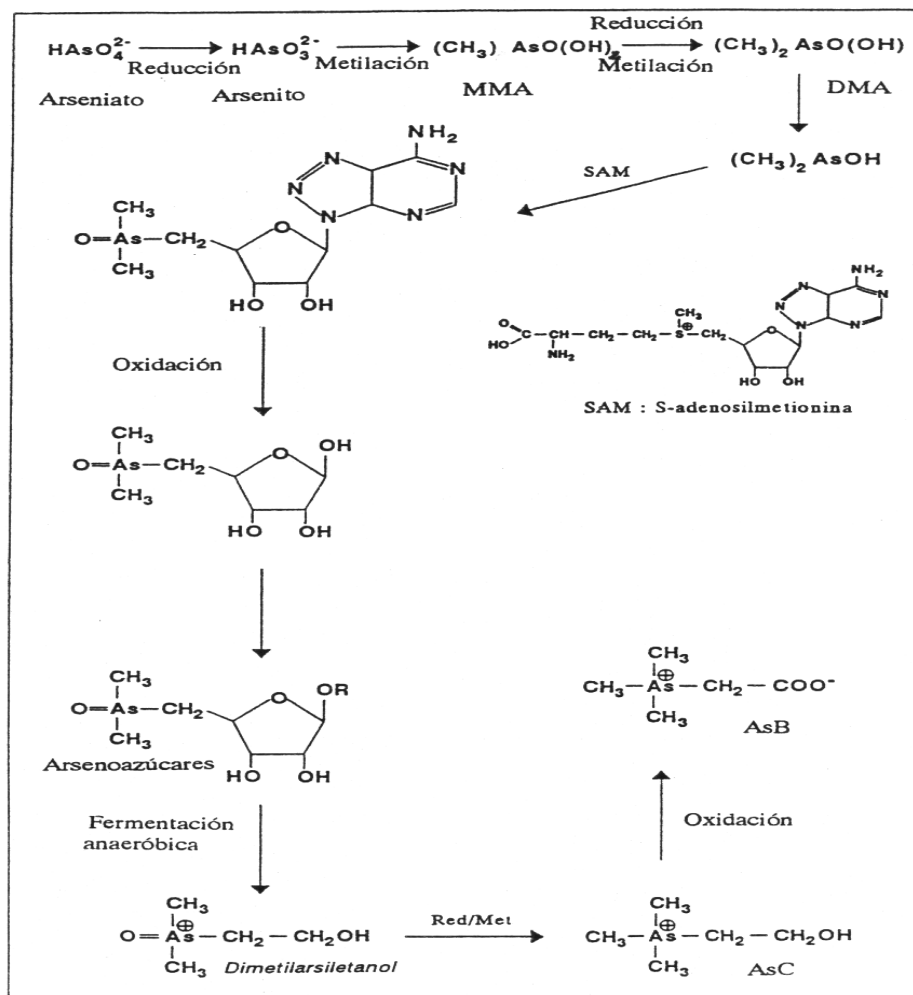


Figura 1.5. Ruta de biotransformación del As en organismos marinos [11b].



El proceso de biosíntesis de especies de arsénico en fitoplancton, representado en la Figura 1.6, sigue la siguiente secuencia: El As^{V} , que es la especie mayoritaria en el agua, se reduce a As^{III} y posteriormente se metila, formándose en primer lugar a MMA y posteriormente a DMA [12, 13, 14, 15]. Éste fenómeno se ha observado en *Neocaridina denticulata*, un camarón de río, y en *Oryzias latipes*, un pequeño pez de agua dulce. En ambas especies se llevaron a cabo exposiciones a As^{V} , DMA, MMA y As^{B} . *N. denticulata* acumulaba desde el inicio el arsénico presente en el agua, transformándolo para su posterior excreción al medio. La acumulación de especies de arsénico metilado en relación con el arsénico total aumenta progresivamente al subir el nivel trófico [16].

El proceso de absorción de As^{V} por parte del fitoplancton se debe a su semejanza química con el PO_4^{3-} [15]. A pesar de la similitud de PO_4^{3-} y As^{V} la sustitución de uno por otro provoca cambios en las estructuras y procesos celulares, que altera su correcto funcionamiento, y origina problemas de toxicidad. Sin embargo, como se ha comentado previamente, el As^{V} se transforma primero en As^{III} y posteriormente a MMA y DMA, como de muestra en la Fig. 1.6.

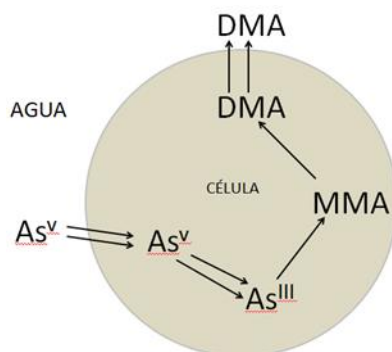


Fig. 1.6. Esquema de transformación de arsenicales en células de fitoplancton [17]

Como se ha comentado en el apartado 1.2., aunque la metilación es un proceso de biotransformación para detoxificar los aportes de arsénico en los organismos [18, 19], algunos investigadores afirman que DMA^{III} y MMA^{III} , especies intermedias en este proceso, son más tóxicas que el



arsénico inorgánico del que proceden [20, 21, 22], Fig. 1.7, referida a modelos metabólicos en células [23, 24].

D.J. Thomas / Toxicology and Applied Pharmacology 222 (2007) 365–373

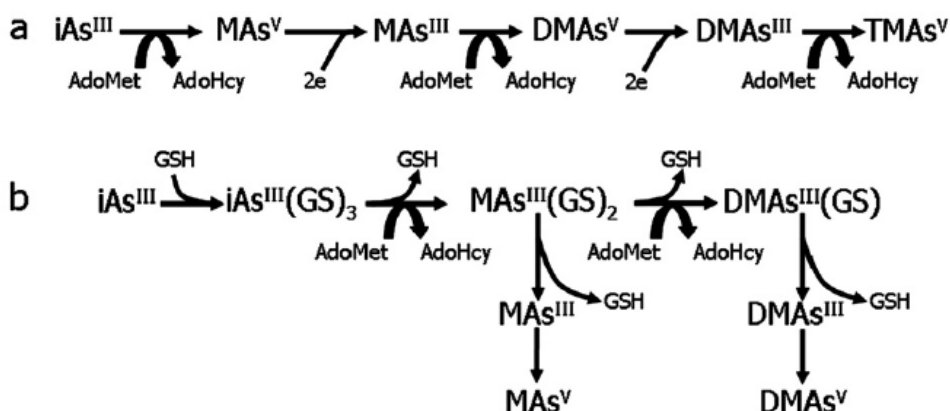


Fig. 1.7. Esquema de la conversión de arsénico inorgánico (iAs) a arsenicales metilados. (a) Esquema que representa la metilación oxidativa de arsenicales en el cual la reducción de cada arsenical oxidado se interpone entre cada proceso de metilación. (b) Esquema de metilación en el que se forma el complejo arsénico-glutatión (GSH). AdoMet, S-adenosylmetionina; AdoHcy, S-adenosilcisteína.

La biotransformación del arsénico está correlacionada con la tasa de crecimiento de los organismos y con la disponibilidad del fósforo en el medio ambiente [25].



Si la tasa de crecimiento es baja y en condiciones de presencia reducida de fósforo, el fitoplancton absorbe y metaboliza mucho más arsénico, para su posterior excreción. En condiciones inversas a las anteriores, el As^{V} se biotransforma en As^{III} y DMA, pero es más rápido el proceso de reducción que el de metilación [15]. También se produce una desmetilación por bacterias tanto en el mar [26] como en agua dulce [27], con lo que se cierra el ciclo de biotransformación en los organismos del primer nivel trófico.

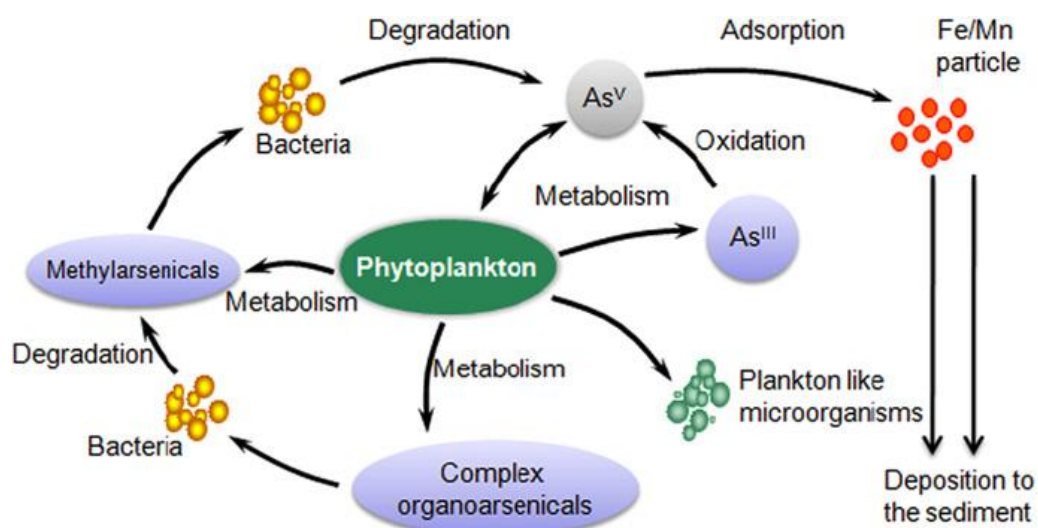


Fig. 1.8. Ciclo biológico del arsénico en el mar [17].

En organismos del segundo nivel trófico, que integran filtradores y herbívoros, como crustáceos, moluscos y peces no se ha evidenciado la biotransformación de arsénico inorgánico [28].

Por otro lado, un estudio realizado en las especies *Chlorella vulgaris*, *Daphnia magna*, *Neocaridina denticulate*, *Tilapia mossambica* y *Zacco platypus*, el cual cubre los tres primeros niveles tróficos, la exposición del alga *C. vulgaris* a As^{III} durante siete días, reflejó una acumulación de especies de este elemento siguiendo la siguiente proporción: 83% As^{V} , 9% As^{III} y 6% DMA, lo que sugiere un proceso de biotransformación. Por el



contrario en los dos herbívoros, *D. Magna* y *N. denticulata*, sólo se acumuló el arsénico en sus formas inorgánicas, 44% y 56 % de As^{III} y 9% y 91% de As^{V} , respectivamente. En los carnívoros que se alimentaron de los herbívoros sólo se encontró en los tejidos especies de arsénico inorgánicas. Como se evidencia en numerosos estudios, al ascender en los niveles tróficos la biotransformación de arsénico inorgánico disminuye o no se produce [29, 30, 31, 32, 33].

Por tanto la formación de arsenicales metilados es atribuible a fitoplancton, bacterias y microbios de ambientes acuáticos, tanto marinos como de agua dulce. Se ha comprobado que diatomeas y criptofitas transforman el arsénico inorgánico a DMA y MMA, respectivamente [12, 34, 35].

No obstante, la presencia de los arsenicales metilados en el medio ambiente no es únicamente atribuible al fenómeno de metilación, sino que también se debe a la degradación física, por fotodegradación solar, y biológica, por la acción de las bacterias sobre compuestos orgánicos que contienen arsénico [36, 37]. Es evidente que el fitoplancton toma el arsénico en la zona fótica y lo convierte, para después excretarlo, mientras que las bacterias y los microbios actúan preferentemente en zonas de decantación de materiales. Como ya se ha comentado antes hay numerosas especies de bacterias y arqueobacterias que son capaces de producir arsenicales metilados, tanto no volátiles, como volátiles como las “metilarsinas” [38,39].

Otra familia de arsenicales que aparece en los procesos de biotransformación son los denominados tioarsenicales, que tienen una estructura análoga a los oxoarsenicales, en los que el azufre reemplaza al oxígeno. Su formación habitualmente se debe a la exposición de los oxoarsenicales a sulfuro de hidrógeno [40]. Algunos autores basándose en consideraciones geoquímicas predijeron las siguientes cuatro estructuras: $\text{As}_3\text{O}_3\text{S}^{-3}$, $\text{AsO}_2\text{S}_2^{-3}$, AsOS_3^{-3} y AsS_4^{-3} [41], sólo recientemente se han encontrado por primera vez tioarsenicales metilados



[monometilmonotioarsenato, $(\text{CH}_3)\text{AsO}_2\text{S}^2$; monometilditioarsenato, $(\text{CH}_3)\text{AsOS}_2^2$; dimetilmonotioarsenato $(\text{CH}_3)_2\text{AsOS}$; y dimetilditioarsenato $(\text{CH}_3)_2\text{AsS}_2$] en el medio ambiente, en aguas subterráneas contaminadas con plaguicidas [42].

No existen evidencias de la biosíntesis de **tioarsenicales** tanto orgánicos como inorgánicos por el fitoplancton y las bacterias, sin embargo si se ha comprobado en el metabolismo animal de oxoarsenicales [43,44]. Así, se han detectado en humanos, en el tracto gastrointestinal y en la orina de personas expuestas a arsénico inorgánico y DMA^V [45, 46], posiblemente debido a la conversión del DMA^V en metabolitos con azufre por ciertos microbios aeróbicos presentes en heces humanas y de ratón son capaces de convertir DMA^V en metabolitos tiolados, como DMMTA (dimetiltioarsenato), y metabolitos trimetilados como TMAO (óxido de trimetilarsina) y TMA_S (sulfuro de trimetilarsina) [47]. Posiblemente, la presencia de estos microorganismos en el tracto gastrointestinal, unido a un elevado pH, favorece la formación de este tipo de compuestos [48].

Uno de los grupos de arsenicales más numerosos en la naturaleza son los **arsenoazúcares**, estos compuestos son básicamente ribósidos que contienen arsénico metilado. La presencia de estos arsenicales en el medio ambiente fue descrita por primera vez en 1981 al ser descubiertos en el Kelp [49]. Actualmente se han identificado 15 arsenoazúcares en diferentes familias de algas [50]. Los arsenoazúcares (Asz) más comunes son habitualmente dimetilarsenoribósidos, aunque también se han identificado trimetilarsenoribósidos y trialquilarsenoribósidos diastereoisómeros en algas [51, 52].

Aunque no están claros los mecanismos de formación de los arsenoazúcares, las hipótesis actuales se inclinan por una captación de As^V del agua y una conversión posterior por parte de las algas, como ya hemos expuesto con antelación [53]. La captación del arsénico por parte de las algas se produce a través de los canales de captación del fósforo como



ocurre en otras plantas marinas [54, 55, 56]. Sin embargo, los mecanismos de absorción de arsénico no son idénticos para todos los organismos, por lo que se prevén diferencias en los compuestos formados [26].

Hay muchos estudios que demuestran que las algas producen arsenoazúcares [49, 50, 58, 59, 60, 61] como un producto de detoxificación del arsénico y es probable que siga ciertas rutas de biosíntesis de metilación en la que están implicados algunos microorganismos [53].

Hay autores que establecen una posible ruta para la metilación y adenosilación del arsénico [50, 53], rutas que se han confirmado por el descubrimiento de un compuesto intermedio de dimetilarsinoiladenosina en hígado de *Tridacna máxima*, un tipo de almeja gigante. No se han hallado este tipo de compuestos más allá de organismos marinos y de la orina humana tras el consumo de alimentos de origen marino [63,64].

La **arsenobetaina** (AsB) es un arsenical muy frecuente en animales y organismos de diferentes niveles tróficos [65, 66, 67, 68]. Tanto los dimetilarsinoilribósidos como los trimetilarsinoilribósidos son precursores de AsB [50,53], para lo que se precisa la rotura del enlace de los carbonos tres y cuatro (C3-C4) del anillo de ribosa, y la posterior oxidación y reducción del C4, y finalmente una metilación [50]. Aunque en numerosos artículos publicados en distintas revistas se señala la coexistencia de AsB y Asz en un mismo organismo, no está muy claro que los mecanismos de biosíntesis y acumulación sean diferentes para ambos [69]. Un ejemplo lo constituye *Tridacna derasa*, en el que la ruta de biotransformación de Asz en AsB parece ser la referida anteriormente, ya que los dimetilarsinoilribósidos son degradados por oxidación y decarboxilación hasta dimetilarsinoilacético [70], que únicamente requiere un proceso de metilación para la conversión en AsB [53].



1.4 Metabolismo del arsénico en humanos.

Debido al conocido efecto tóxico del arsénico es conveniente conocer los mecanismos naturales de defensa frente a este elemento. Los primeros metabolitos descubiertos fueron MMA y DMA, los cuales se encontraron en orina humana en los años setenta del pasado siglo [71, 72, 73]. Años después se describió el primer esquema general de la metilación del arsénico en humanos [74, 75], en el que el arsénico se reduce y se metila varias veces, hasta DMA^{III} que es el punto final, como se ve en la Fig. 1.9.

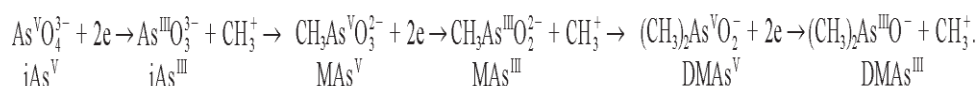


Fig. 1.9. Esquema general de metilación en humanos [74].

Para que se produzca esta reacción en cadena, se deben cumplir tres premisas: (i) debe haber un grupo donador de electrones para que el As^V se reduzca, (ii) el proceso de metilación debe ser oxidativo, por lo que debe haber un aceptor de electrones, y (iii) debe existir un donador de grupos metilo [76]. Se ha demostrado que el glutatión (GSH) Fig. 1.10 se comporta como donador de electrones en la reducción del arseniato a arsenito en soluciones acuosas y eritrocitos [77, 78, 79, 80], proceso que se realiza mediante la formación del complejo arsenotriglutatión (As^{III}(GSH)₃), en el que el arsénico se une al grupo tiol de la cisteína [78]. Los procesos de reducción de As^V a As^{III} y de MMA^V a MMA^{III} son catalizados por la enzima reductasa (homóloga funcional de la proteína bacteriana del operón Arsc) [81, 82]. Por lo que existe una vinculación directa a la actividad de las reductasas, la cual se ha demostrado muy variable [81, 83]. Estudios de enzimología han revelado que el proceso de metilación está regulado por metiltransferasas, las cuales se afectan de forma importante por el tiempo y la temperatura [84, 85, 86, 87]. La conversión de As^{III} en MMA es más rápida y extensa que a As^V, así mismo MMA^{III} es más fácilmente convertible en DMA que en MMA^V [76], por lo que el



proceso de metilación en humano se da claramente en un único sentido.

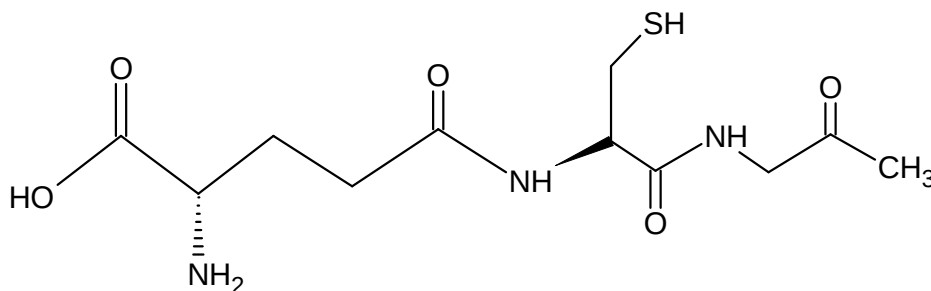


Figura. 1.10 Molécula de glutatión.

A partir de los años setenta se identificaron MMA y DMA como productos del metabolismo del arsénico inorgánico en humanos. Debido a que los métodos existentes permiten conocer el estado de oxidación del arsénico inorgánico, pero no del metilado, parece probable que la metilación de arsénico era una vía de detoxificación [88]. En la actualidad, como se ha comentado en apartados anteriores, esta vía de metilación no se considera como tal debido a la existencia de especies intermediarias metiladas de arsénico en estado de oxidación +3, las cuales presentan mayor toxicidad que las formas inorgánicas.

La toxicidad de las especies inorgánicas de arsénico con respecto a DMA y MMA no está clara por dos motivos, en primer lugar, porque hasta fecha reciente no se ha conocido el grado de toxicidad de las especies metiladas según su estado de oxidación, y en segundo lugar, porque se desconoce el grado exacto de conversión del arsénico inorgánico a MMA y DMA, ya que hay múltiples factores implicados, como se verá más adelante [76].

En un estudio de exposición oral a 0,6 y 60 ng As/g de tejido de DMA^{III} y DMA^V en ratas se certifica la presencia de As^{III}, MMA^{III} y DMA^{III} en orina, sangre y órganos después de dos horas en todos los casos. Sin embargo, TMAO que aparece en orina e hígado, no lo hizo en sangre, ni tampoco en pulmón cuando la dosis fue de de 0,6 ng As/g en tejido de DMA^V, ni en riñón para 0,6 ng As/ g de tejido de DMA^{III} [89].

Asimismo, se han detectado en sangre y bilis de rata, determinados complejos de arsénico con glutatión como se aprecia en el esquema Fig.



1.11, comprobándose que son producto de rutas metabólicas más complejas a las descritas clásicamente. Otra de las rutas que aparecen en el mismo diagrama es la que se refiere a las especies de arsénico que contienen algún grupo tiol, las cuales se han determinado en experiencias de exposición a dosis de DMA^{V} . El origen de estas especies con azufre se encuentra, por una parte, en la transformación microbiana de la flora intestinal, y por otra, en una posible transformación en el hígado. En cualquier caso, los arsenicales tiolados no han sido detectados en la sangre de ratas expuestas, aunque sí en la orina de éstas y en la orina y lana de ovejas expuestas [89, 90].

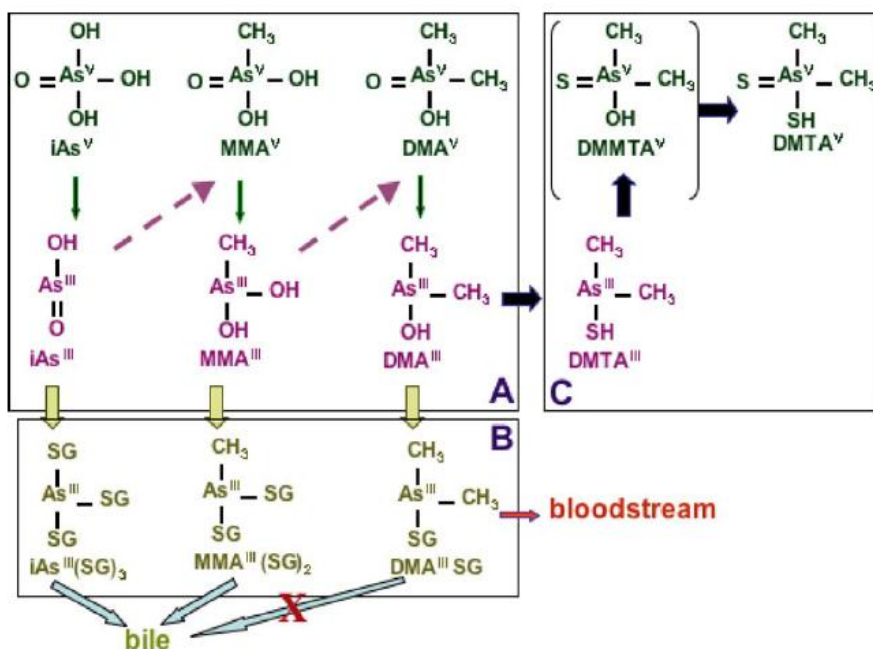


Fig. 1.11. Esquema del metabolismo de las especies de arsénico en humanos [89]. El arsénico inorgánico es reducido y metilado dando lugar a distintos arsenicales (MMA, DMA, TMAO) en la fase (A) (gastrointestinal-urinario). Una vez en el torrente sanguíneo, las especies de arsénico pueden formar complejos con glutatión, y pasar a la bilis (B). Finalmente, también es posible que en el intestino las bacterias den lugar a tioarsenicales (C) (también se han registrado en el hígado, y otros órganos en presencia de iones sulfuro).

En este mismo trabajo llevado a cabo en ovejas, se propuso un posible esquema de la transformación química y metabólica de los compuestos de arsénico Fig. 1.12 [104].

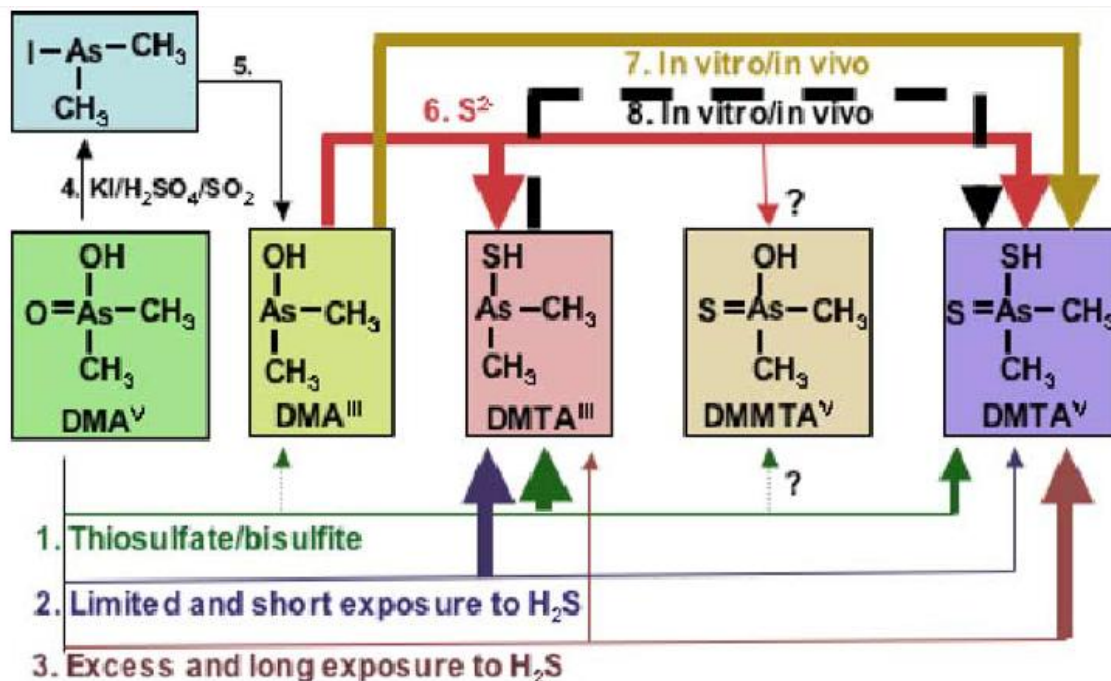


Fig. 1.12. Esquema de la transformación química y metabólica de los compuestos de arsénico en distintas condiciones [89].

En la Fig.ura 1.12 Se muestran ocho reacciones implicadas en la transformación de DMA a DMTA. Las reacciones 4 y 5 representan el paso de DMA^V a DMA^{III} y están dentro de la zona A de la Fig.ura 1.10 [89]. Las reacciones 1, 2, 3 y 6, dan lugar a distintas especies azufradas y se producen como paso desde la zona A a la C en la Fig. 1.11 [89], el cual se ve afectado por la flora bacteriana del intestino. Las reacciones 7 y 8 están asociadas a la inyección intravenosa de MMA^{III}, DMA^V, DMA^{III}, en la que se formaría mayoritariamente DMTA^V y de forma secundaria DMTA^{III}.



Este esquema sugiere que aunque la ruta descrita en la Figura 1.11 [89] es válida, no todas las reacciones se completan totalmente y hay especies intermedias resultantes del metabolismo del arsénico.

La mayoría de estudios sobre la transformación metabólica del arsénico se han llevado a cabo partiendo de las especies inorgánicas, fundamentalmente por ser compuestos más fáciles de obtener y la causa más común de intoxicación, al encontrarse presentes en numerosos episodios de aguas de uso doméstico contaminadas.

Debido a que el hígado es el principal órgano donde tiene lugar la metilación del arsénico [91], se han llevado a cabo estudios sobre la eficiencia de las células hepáticas en el hombre, los cuales han puesto de manifiesto una menor eficiencia en humanos respecto a otros mamíferos como perros, macacos y varios roedores. El proceso de metilación en humanos es dependiente de la concentración inicial, ya que a altas concentraciones se ha comprobado que existe un menor porcentaje de especies metiladas, fundamentalmente de DMA, respecto a experiencias llevadas a cabo con bajas concentraciones. Además, se han encontrado evidencias de una transformación distinta entre los diferentes organismos estudiados a lo largo del tiempo. De hecho, tanto las concentraciones de las especies metiladas como la relación DMA/MMA son distintas en los organismos estudiados con respecto al tiempo utilizando una dosis idéntica Fig. 1.13 [91].

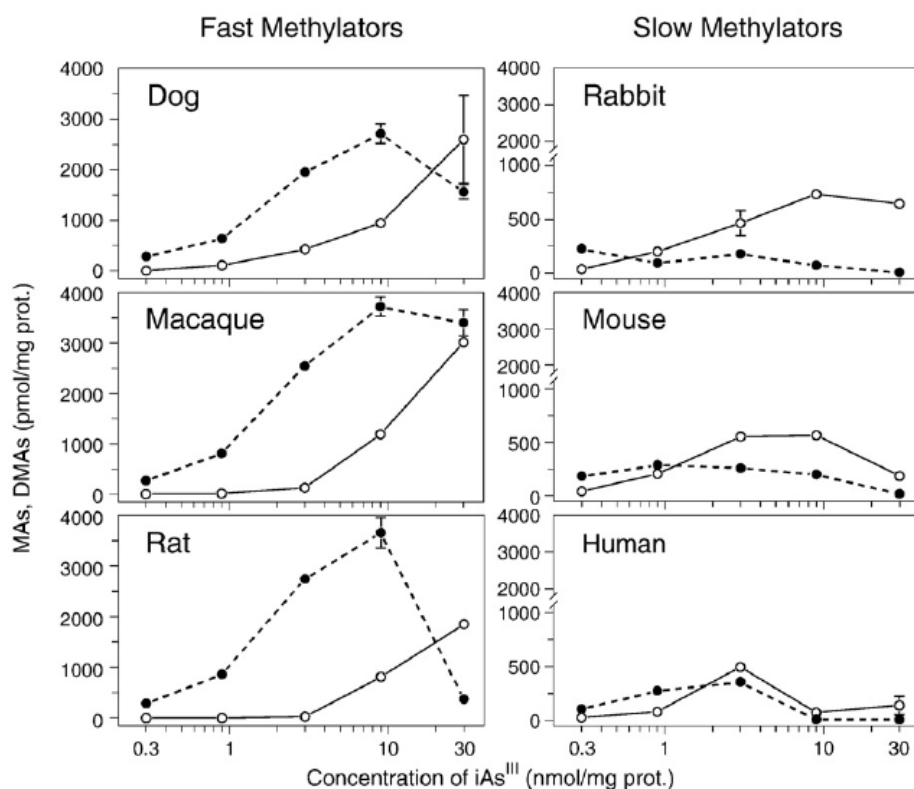


Fig. 1.13 Patrones de concentración-respuesta para la metilación As^{III} para hepatocitos de perro, macaco, rata, conejo, ratón, y hepatocitos humanos. Rendimientos de MMA (○) y DMA (●) después de 24-h desde la exposición As^{III} y a las concentraciones iniciales de 0,3, 0,9, 3, 9 y 30 nmol As^{III} / mg de proteína (media $\pm$ SD, $n = 3$) [91].

Una posible causa de esta variabilidad puede ser genética, más concretamente relacionada con la enzima $\text{As}3\text{mt}$, una metiltransferasa que regula y es clave en la metilación del arsénico, la cual está más expresada en macacos, perros y ratas, lo que explicaría que dichos organismos sean más sensibles a la presencia de arsénico y más eficaces en su metilación [91]. En cuanto a la entrada del arsénico en el organismo, las formas inorgánicas se absorben en el tracto gastrointestinal y se distribuyen por los tejidos, acumulándose en las estructuras biológicas ricas en queratina como lo son las uñas y el pelo (Los valores medios en humanos no expuestos son: $< 1 \mu\text{g/g}$ en pelo; $< 1,5 \mu\text{g/g}$ en uñas) [91]. El arsénico inorgánico absorbido se elimina por la orina con una vida media



de cuatro días, siendo más rápido en el caso de la sangre, en la que desaparece en pocas horas. Las especies pentavalentes son menos tóxicas que las trivalentes por varias razones, se absorben poco, tienden a una mayor acumulación celular y tienen un bajo flujo de salida. Sin embargo las especies con azufre, en concreto DMMTA^V, incluso las pentavalentes son hasta siete veces más citotóxicas en células humanas procedentes de la vejiga que las inorgánicas [92,93].

Sin embargo, se sabe poco sobre la metabolización de especies más complejas que forman parte del ciclo metabólico, como son las metiladas o las tioladas. La ingesta de este tipo de arsenicales se produce a través de los alimentos, fundamentalmente marinos, aunque también de productos como el arroz o el trigo [94] que forman parte de la dieta básica.

En un estudio reciente en ratones [90], se ha comprobado que el MMA^V se absorbe y distribuye muy rápidamente, y se excreta hasta el 80% a través de orina y heces. Dicha eliminación depende de las dosis a la que hayan sido expuestos, y como se ha descrito en párrafos anteriores la eliminación urinaria a altas dosis de arsénico inorgánico es peor que a bajas dosis, de forma inversa a lo que ocurre por vía fecal (la mayor excreción urinaria se ha alcanzado para una dosis de 0,4 mg/Kg; sin embargo en heces se produce con una dosis de 40 mg/Kg) Fig. 1.14. Al parecer, el MMA^V tiene una metilación limitada debido a que la reducción previa a MMA^{III} es catalizada por una reductasa, como se ha descrito en párrafos anteriores [81, 83], sin embargo la metilación del MMA^{III} no está limitada y es más extensa que la de su análogo pentavalente. Este estudio determinó que los órganos en los que principalmente se retiene el arsénico son la vejiga, el riñón y el pulmón. Se detectaron concentraciones de MMA^V similares en la sangre y el hígado, lo que sugiere una captación hepática limitada. El riñón tenía la mayor concentración y la menor tasa de aclaramiento. La acumulación en los órganos fue detectada tan sólo 0,25 horas después de la exposición a MMA. También se comprobó que existía una relación dosis-tiempo en los distintos órganos con respecto a la concentración acumulada Fig. 1.15 [90]. Asimismo, los periodos de



semivida del arsénico radiactivo, al que se expusieron los ratones, mostró una variación significativa entre los distintos órganos.

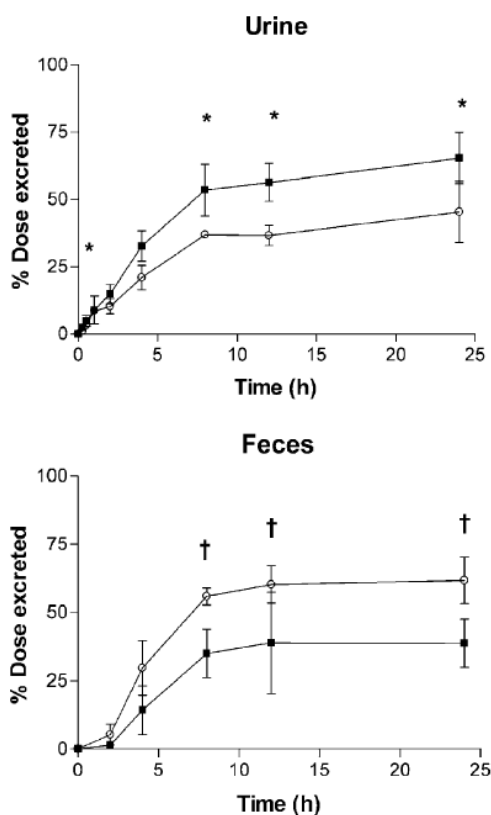


Fig. 1.14 Dosis excretada (%) respecto al tiempo en orina y heces de ratones expuestos oralmente a MMA^V- radioactivo a dos dosis distintas 0,4 mg/Kg (●) y 40 mg/kg. * Significativamente superior a 40 mg/kg. † Significativamente superior a 0.4 mg/kg. Los datos representan la media $\pm$ SD para n=4 [90].

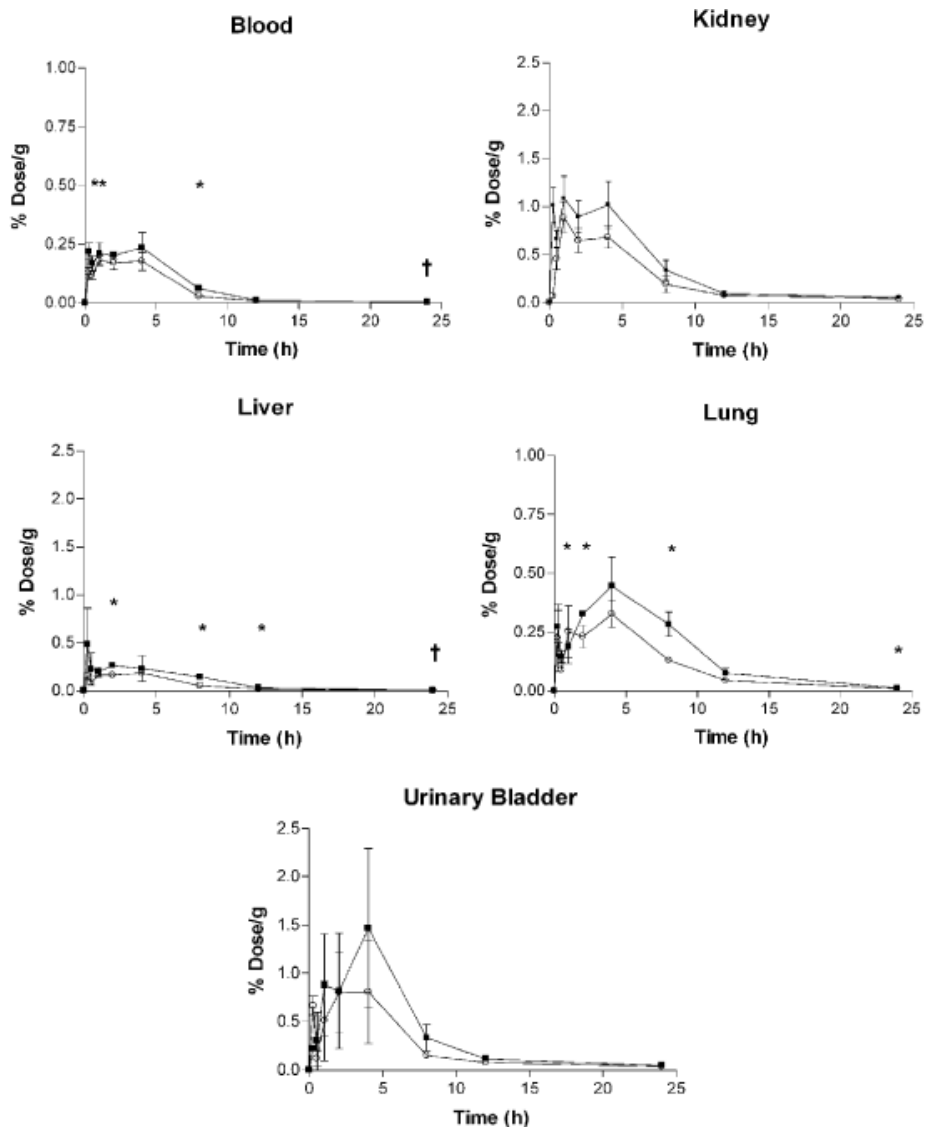


Fig. 1.15. Concentración de MMA^V radioactivo, basado en el porcentaje dosis/g, en tejidos de ratón expuestos a lo largo del tiempo a dosis 0.4 (●) ó 40 (○) mg As/kg [14C]- MMA^V. Los datos representan la media ± SD, N = 4, excepto para la vejiga que para una dosis de 0.4 mg As/kg a los 15 min se corresponde con N = 3. [90]

También se comprobó la presencia de especies dimetiladas y TMAO en orina y heces, sin embargo, TMAO no estaba presente en los órganos, lo que sugiere una rápida eliminación una vez formado. MMTA apareció en la bilis, en un porcentaje residual (1 %) en cuanto a la concentración total



de arsénico eliminado. MMA^{III} se metaboliza mucho más que MMA^V tanto a dosis bajas como altas, y tanto en orina como en tejidos (ver tabla 1.5).

	MMA ^V	MMA ^{III}
Orina (0,4 mg/Kg)	No hay productos	10%
Orina (40 mg/Kg)	10 % (DMA ^{III} , DMA ^V y TMAO)	>90% (DMA ^{III} , DMA ^V)
Tejidos	≤ 25%	75-100%

Tabla 1.5 Muestra el porcentaje de productos metabólicos resultantes de la exposición de ratones a MMA^V y MMA^{III}. [90]

Esta diferencia en la metabolización de MMA^{III} respecto a MMA^V puede deberse a tres razones: (i) MMA^V tiene una peor absorción por el hígado, (ii) la reducción de MMA^V a MMA^{III} es limitante, y (iii) existe una rápida eliminación de MMA^V por parte del riñón.

Según otro estudio, los ratones expuestos a DMA^{III} y DMA^V siguen un patrón similar de absorción, distribución y excreción al de los expuestos a MMA^{III} y MMA^V. Sin embargo, tienen mayor afinidad a quedar absorbidos en los pulmones, por lo que la probabilidad tumoral en dichos órganos es mayor cuando hay una exposición a especies dimetiladas. Finalmente, en los ratones expuestos a especies dimetiladas aparece en orina dos especies tioladas, DMTA y TMAS, que no lo hacen en las exposiciones a MMA^{III} y MMA^V [90 b].

Uno de los grandes interrogantes en el metabolismo del arsénico lo constituye el transporte celular, ya que al ser un tóxico es poco probable que las células hayan evolucionado hasta desarrollar mecanismos para tal fin. Sí es bien sabido, que el arsénico inorgánico carece de mecanismos específicos para su transporte, ya que al tener una estructura similar a la del fosfato, utiliza los de éste último. Pero se supone que la acumulación de arsénico inorgánico o sus metabolitos metilados en las células depende de los procesos moleculares implicados en el transporte de estas especies a través de las membranas celulares y no se puede considerar únicamente



el papel de la difusión pasiva a través de la membrana celular. Parece evidente que las concentraciones intracelulares dependen de las velocidades de entrada y salida de las correspondientes especies. Por tanto la variación de dichas concentraciones va a venir dado por las tasas de flujo intracelular existentes.

Algunas de las proteínas que están implicadas en el transporte son las pertenecientes a la familia de las acuaporinas (acuagliceroporina). Se trata de unas proteínas transmembrana que facilitan el movimiento de solutos no cargados a gradientes más bajos. Se ha descubierto en levaduras y oocitos de *Xenopus laevis* modificados para expresar la proteína rAQP9, una acuaporina modificada genéticamente, que mejoraba la captación y transporte de As^{III} y DMA. En *E. coli* GlpF, un facilitador de glicerol ha resultado ser un buen mecanismo de captación de As y Sb. Fps1p y LmAQP1 realizan las funciones homólogas en levadura y patógenos humanos respectivamente. Es posible que dichas proteínas sean el canal de transporte para especies que contengan azufre.

Otra de las familias implicadas son las HXT (permeasa transportadora de hexosas), homóloga al GLuT permeasas de los mamíferos. Se han identificado hasta 18 transportadores de esta familia que funcionan como catalizadores en la captación de arsénico en la levadura *S. Cerevisidae*.

GLuT 1 resultó estar relacionado con la captación de arsénico, fundamentalmente $As^{III}(OH)_3$ (forma en la que se encuentra el trióxido de arsénico a pH fisiológico) y MMA^{III} . Por otra parte, GLuT 4 es una isoforma sensible a la insulina, que también está relacionada con el transporte de $As^{III}(OH)_3$ y MMA^{III} en células cardíacas donde no están presentes ni GLuT 1, ni AQP9.

Otra de las familias de proteínas implicadas son las denominadas ABC (ATP-binding cassette), que utilizan proteínas de hidrólisis para generar ATP y que son resistentes a fármacos y a los efectos citotóxicos del arsénico, y que se han asociado a la expresión de ARNm.



Ciertas células cancerígenas (adenocarcinoma de pulmón) resisten el As^{III} , y en ellas se produce un flujo de salida favorable de la As^{III} y sus metabolitos frente al de entradas.

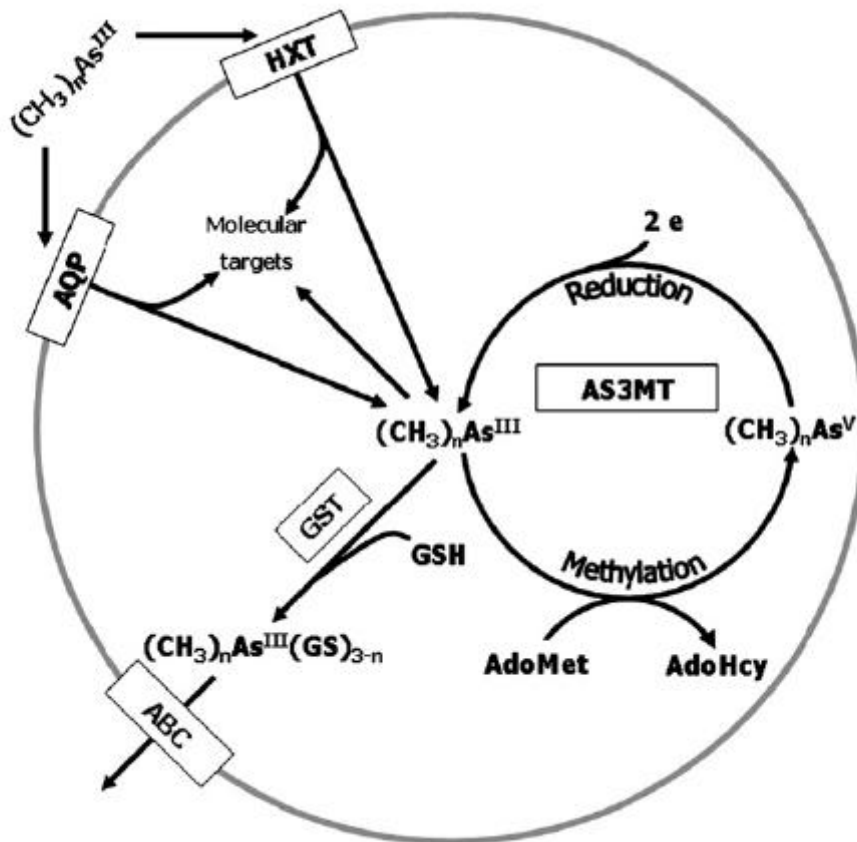


Fig. 1.16 [23] Modelo conceptual de metabolismo de arsénico en células humanas, en el que se incorporan componentes de los influjos, eflujos y transformaciones. $(\text{CH}_3)_n\text{As}^{\text{III}}$ metilarsenical ($n=0$ a 3); AQP, acuoparinas; HXT, permeasa transportadora de hexosa; AS3MT, arsénico (estado de oxidación $+3$) metiltransferasa; GSH, glutatión; GST, glutatión-S-transferasa; $(\text{CH}_3)_n\text{As}^{\text{III}}(\text{GS})_{3-n}$ complejo de metilarsenical con glutatión ($n=0$ a 3); ABC; "ATP-binding cassette transporter".



1.4.1 Factores implicados en el metabolismo del arsénico.

La variabilidad de la presencia del arsénico tanto en tejidos como en fluidos biológicos es consecuencia de una gran cantidad de factores que intervienen en la metabolización y eliminación de los distintos arsenicales.

La **dieta** es importante en la acumulación y metabolización del arsénico, se ha demostrado en ratones que una dieta pobre en colina limita la cantidad de S-adenosilmetionina disponible, y por tanto la metilación del arsénico [95]. El selenio, un elemento esencial para el organismo, modifica el metabolismo, la retención y la toxicidad del arsénico, de ahí la importancia de que esté presente dentro de un cierto rango de concentraciones en el organismo [96, 97, 98], en este mismo sentido la cantidad de caroteno β es un factor importante en la metilación, y su déficit puede estar asociado a enfermedades como el cáncer de piel y la enfermedad isquémica del corazón [99, 100]. Una dieta baja en metionina o en proteínas puede ser responsable de una peor metilación del arsénico, así mismo una alta presencia de antioxidantes, como Se, Zn, ácido fólico, colina, metionina, niacina, vitamina B-12, cisteína, ferritina o α -tocoferol modifican el metabolismo, la retención y toxicidad del arsénico, por tanto, un factor muy importante cuando se habla de la dieta o la nutrición es el de la escasez de ciertos elementos que merman las defensas, de ahí que se asocie la desnutrición a un mayor riesgo de sufrir intoxicaciones por arsénico. Otros de los factores asociados con la dieta que influyen en la metabolización del arsénico son el alcohol, el café y el té, los cuales se han asociado con una peor metilación [101, 102, 103], aunque hay opiniones disonantes sobre este hecho [104]. Los alimentos cuando son cocinados pueden responder de tres formas con respecto al arsénico: *uno*, que este elemento no sufra variación, parece ser que la cocción de los alimentos no varía la composición de los arsenicales incluso por encima de 120 °C, *dos*, que sufran alguna transformación, se ha registrado en alimentos la transformación de AsB en TMAO y TMA⁺. Y tres, que el lavado y la secreción del jugo de los alimentos (una vez retirado este) disminuya la concentración de los arsenicales presentes en la ingesta final [102].



Aunque algunas especies han sido consideradas como inocuas, como es el caso de los arsenoazúres, lo cierto es que el metabolismo de los mismos los convierte en arsenicales que sí lo son, como el DMA^V, y en otros (hasta cinco desconocidos se han encontrado de los que no se sabe su toxicidad). Y aunque parezca obvio, la dosis también es muy importante en cuanto a los niveles presentes en el organismo, pero no está clara la proporción, así pues parece ser que a altas y bajas dosis el porcentaje eliminado vía urinaria es distinto, esto puede ser causa de la saturación de las enzimas implicadas en algunas fases de reducción de unas especies a otras [100,102].

El **tabaquismo** está íntimamente relacionado con una mayor presencia de arsénico en el organismo, ya que los cigarrillos contienen arsénico, y otras sustancias que inhiben enzimas o cofactores relacionados con el metabolismo del mismo [102,105].

Uno de los factores a tener en cuenta en el metabolismo del arsénico es la variación **genotípica**, que conlleva un cambio en los efectos tóxicos y cancerígenos. Habiéndose constatado la presencia de polimorfismos en la metabolización del MMA [106, 107].

En un estudio se marcó con ⁷³As, un isótopo artificial del arsénico, a dos cepas de ratones endogámicos y un híbrido, comprobándose diferencias en las tasas de aclaramiento entre el híbrido y el resto de ratones, lo que sugiere que alguno/s de los procesos de absorción, distribución, metabolismo o de eliminación de arsenicales se encuentran bajo control genético. También hay evidencias de polimorfismo interindividual y entre cepas en relación con la formación de arsenicales metilados (DMA y MMA) en cultivos celulares de rata y humanos (diferencias de hasta diez veces) [108]. Este tipo de estudios en seres humanos requiere la evaluación de un gran número de muestras, lo que se traduce en un aumento de la variabilidad interindividual. Un reciente estudio sobre el **coeficiente de masa corporal (CMC)** y el arsénico indica que hay una relación entre una mejor eficiencia en la metilación y un alto CMC. Según este estudio las personas obesas tienen cierta inclinación a tener cambios



en el perfil de la expresión genética relacionado con la metilación del arsénico. Así mismo, se han demostrado estos cambios en ratones, los cuales modificaron hasta el 56% de los genes dependiendo de la dieta. En este sentido, se ha demostrado que AS3MT tiene una correlación con CMC, de tal modo que a mayor CMC existe una menor expresión de AS3MT. Así pues, se han llegado a describir hasta 45 polimorfismos relacionados con 7388 AS3MT. También han sido descritos polimorfismos relacionados con la MMA metiltransferasa, y en concreto, el M287T, tiene una relación positiva con respecto al porcentaje de MMA presente en orina, y negativo con respecto a la relación MMA/DMA también en orina. [101,105]. Por último, el gen que expresa la cistoationina- B- sintetasa está relacionado con el metabolismo de MMA, y con la asociación de éste último y el cáncer de pulmón, así como a los niveles excretados de DMA en orina en población expuesta a arsénico [101].

Uno de los factores que se han estudiado y que más controversia ha suscitado es el de **etnicidad**, ya que hay estudios que muestran una posible relación entre el origen étnico y el metabolismo del arsénico, como es el caso de los atacameños mejicanos que metilan mejor el arsénico que los de origen europeo debido a su exposición desde milenios, lo cierto es que hay muchas voces que ponen en cuestión este tipo de estudios, ya que a menudo no se tienen en cuenta otros factores que están implícitos: Como podrían ser la mezcla genética en mucha de las poblaciones estudiadas, los hábitos alimenticios o los estilos de vida de cada grupo étnico (distintas culturas) [101,102, 105]. Por otro lado, no se han hallado evidencias de **cambio intraindividual** en un corto plazo de tiempo (a lo largo de un año) en el metabolismo, por lo que parece que éste es estable, aunque sí respecto a distintas fases de la vida (**edad**), así, de manera que los **niños** tienen una mayor capacidad de metilación que los adultos, y que los ancianos (> 63 años) en los que disminuye la capacidad de metilación debido a disfunciones en los órganos implicados en el metabolismo y a una mayor presencia de **enfermedades concurrentes**. Durante el **embarazo y la lactancia** se ha comprobado que existe una mejora de la eficacia de metilación a medida que se desarrolla



el feto, como se comprobó en una estudio con 26 mujeres chilenas de Aguacón, en el que el arsénico urinario aumentaba a medida que avanzaba el embarazo [102,109] (DMA es el principal arsenical que podría pasar al feto, es por ello que se describió un aumento significativo en la orina en mujeres embarazadas). La metilación eficiente de arsénico durante la infancia puede explicarse por la presencia de elevadas concentraciones de folato y colina necesarios para la metilación de homocisteína a metionina. Los fetos las almacenan en el hígado mientras dura el embarazo y siguen recibéndolas durante la lactancia a través de la leche materna. Los **estrógenos**, que durante el embarazo cambian notablemente en su concentración, tienen un papel importante en las rutas metabólicas de la colina, la betaína, la vitamina B-12, el ácido fólico y en la metilación del arsénico, por lo que su ajuste podría ser un posible remedio en casos de exposición crónica. Esta es una de las posibles razones que explican la diferencia de metilación según el **sexo** (la mujer presenta mayor capacidad de metilación el hombre) [102].

Finalmente, se ha demostrado que la metabolización y la capacidad urinaria aumentan con el incremento de ácido sulfónico 2,3-dimercaptopropano (DMPS), debido a la formación de un quelato con MMA en orina, y que es un producto muy usado como tratamiento en toxicología [76, 102].

1.5 El arsénico en el medio ambiente.

El arsénico y sus compuestos son muy abundantes en la naturaleza apareciendo habitualmente en los suelos en forma de sulfuros asociados a metales como plata, plomo, cobre, níquel, antimonio, cobalto y hierro. Puede encontrarse en niveles trazas tanto en el suelo como en otros compartimientos. En aguas bien oxigenadas predomina el arseniato, sin embargo, en condiciones reductoras, como son los casos de las aguas subterráneas, la forma más usual es el arsenito [110].



El arsénico ocupa la posición 20 en cuanto a abundancia en la corteza terrestre, con una concentración media entre 2 a 3 mg Kg⁻¹. Sin embargo, su concentración es muy variable, siendo en general mayor en rocas sedimentarias que en las ígneas. Se estima que más del 99% de todo el arsénico del medio ambiente está asociado a minerales (245) y rocas. El resto se reparte por el medio terrestre, el medio marino y la atmósfera [111, 112, 113].

El arsénico se distribuye en niveles de concentración muy variables por el medio ambiente debido a su alta movilidad y a su enorme capacidad de transformación, sorbiéndose o desorbiéndose del material particulado presente, y reaccionando con el oxígeno u otras moléculas presentes en el aire, lo que permite que cambie de estado de oxidación. Por otra parte, los microorganismos juegan también un papel muy importante en estos procesos de movilización y transformación [114,115].

1.5.1 Especies de arsénico en la atmósfera.

Las concentraciones en la atmósfera son muy variables debido a que las fuentes de emisión suelen ser puntuales. De forma natural destacan sobre el resto las emisiones volcánicas, ya que el aporte de las partículas que arrastra el viento o el de los exudados de las plantas representan un porcentaje muy pequeño en cuanto al aporte de arsénico. Por el contrario, los aportes antropogénicos a la atmósfera son hasta tres veces superiores a los de origen natural. Aunque las fuentes son numerosas, destacan la quema de combustibles fósiles como el carbón, el uso de plaguicidas con arsénico, no prohibida aún en numerosos países, las fundiciones de metales, su uso como pigmento y/o aislante para pinturas [37,115].

Las concentraciones en la atmósfera suelen estar entorno a 0,01 µg/m³, concentraciones que pueden llegar a ser hasta 100 veces más altas cerca de ciudades o de zonas industrializadas [116]. El arsénico en el aire se encuentra como especies inorgánicas, normalmente como óxido, y generalmente como arseniato [117,118]. Un ejemplo de todo ello lo



encontramos en un reciente estudio realizado en Pekín, en el que además se observa un cierto patrón estacional en las concentraciones de los arsenicales. [119].

1.5.2 Especies de arsénico en el medio terrestre.

1.5.2.1 *Presencia del arsénico en suelos y sedimentos.*

La presencia de este elemento en el suelo es mayoritariamente debido a la proximidad de rocas o minerales que contienen este elemento, el cual se libera por acción de los procesos naturales (fundamentalmente erosión) o por la acción del hombre (fundamentalmente minería). El arsénico forma parte de 245 minerales y múltiples tipos de rocas, dentro de los minerales el más abundante es la arsenopirita (FeAsS). También son destacables minerales como arsenolita (As_2O_3), olivinita ($\text{Cu}_2\text{OHAsO}_4$), y la proustita (Ag_3AsS_3). El arsénico suele liberarse normalmente en estos casos como arsenato, arsenito y trióxido de arsénico. Las concentraciones medias en suelo se hallan entre 2 y 5 mg Kg^{-1} , aunque pueden ser mayores como consecuencia de la contaminación, habiéndose descrito en la literatura niveles superiores a los 100 mg Kg^{-1} [6]. Al igual que en la atmósfera, en suelos y sedimentos predominan las formas inorgánicas, aunque también se ha encontrado arsénico orgánico, fundamentalmente metilado [9,111].

En sedimentos de lagos continentales se han encontrado concentraciones elevadas de arsénico, comprendidas entre 0.5 y 60 mg Kg^{-1} , siendo la causa más probable el uso durante el pasado siglo del arsenato sódico como biocida acuático [117]

Otra de las causas de la presencia de arsénico en los suelos son los lixiviados de vertederos, fundamentalmente en zonas y países, en los que los residuos no están controlados. En estudios sobre estos lixiviados se han determinado diferentes especies de arsénico, As^{V} , As^{III} , DMA, MMA, AsB y TMAO [120]. En un reciente estudio realizado en lixiviados de



vertedero en Australia se han determinado DMMTA^v y DMDTA^v (Dimetilditioarsénico), además de otros dos arsenicales desconocidos [121].

1.5.3 Especies de arsénico en el medio acuático.

1.5.3.1 *Presencia del arsénico en aguas dulces.*

La concentración de arsénico en los sistemas de aguas continentales superficiales (ríos y lagos) varía en más de cuatro órdenes de magnitud, según la fuente, la disponibilidad y la geoquímica de las cuencas [122].

La concentración en ríos contaminados de todo el mundo oscila entre 0,1 y 2,1 $\mu\text{g L}^{-1}$, con una media de 0,8 $\mu\text{g L}^{-1}$. De forma natural, los niveles de arsénico pueden ser muy altos si existe una fuente geológica importante, estos son los casos de algunos ríos estadounidenses, australianos, tailandeses y ghaneses con niveles superiores a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ [123].

La actividad minera es una importante fuente de aporte de arsénico al medio acuático continental; se han descrito niveles de concentración de 556 $\mu\text{g L}^{-1}$ en zonas mineras del Reino Unido, y hasta 13.900 $\mu\text{g L}^{-1}$ en Australia asociados a la extracción y procesamiento de arsenopirita [124,125].

Las concentraciones de arsénico en lagos son muy similares en término medio a las existentes en los ríos (0,2 a 2,8 $\mu\text{g L}^{-1}$) pudiendo ser superiores a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$. Igual que en el caso de los ríos las fuentes suelen ser geológicas, ya sea por procesos naturales o por actividad minera. Sin embargo, en los lagos se produce una mayor acumulación del elemento en los lechos debido a la falta de corrientes [123, 124,126].

En los lagos se produce estratificación térmica de las aguas motivada por la temperatura, siendo los niveles disueltos de arsénico mayores en el verano [124,127]. Este proceso origina un agotamiento de oxígeno en el hipolimnion, debido a la alta actividad biológica, lo que provoca que el



arsénico pase a la columna de agua, produciéndose un efecto de redistribución por todo el lago [124,128].

1.5.3.1.1 Presencia del arsénico en aguas subterráneas.

El arsénico se ha detectado en niveles superiores a lo que establece la normativa para consumo humano, 10 $\mu\text{g/L}$ [129], en aguas subterráneas de un gran número de países. Aunque por lo general la presencia de este metaloide está relacionada con procesos geológicos, en otras ocasiones se relaciona con la actividad humana. En los casos en los que la presencia de arsénico es prolongada en el tiempo se producen afecciones crónicas en la salud de la población [122, 130, 131, 132, 133, 134, 135].

Se han descrito contaminación de aguas subterráneas en todo el mundo, pero el riesgo es mucho mayor en países pobres, en los que los medios para la detección y remediación del problema son menores. Así, las zonas más afectadas son Latinoamérica y los países asiáticos bañados por el Océano Índico y fronterizos con la India. También se han encontrado contaminaciones en ciertas zonas de Canadá, Estados Unidos y Australia [136] y más recientemente se han detectado contaminación en ciertas zonas de la península Ibérica [137]. Por lo general los análisis en este tipo de ambientes acuáticos se han venido realizando sobre las especies inorgánicas, ya que las especies orgánicas se han considerado tradicionalmente menos tóxicas y menos abundantes en aguas subterráneas. No obstante, existen casos en los que su presencia es importante debido al uso de biocidas, que presentan un problema importante de toxicidad, considerando las especies presentes y sus derivados, especialmente los tiolados.

Especies de arsénico en agua de mar.

El arsénico es el vigésimo segundo elemento químico más abundante en las aguas marinas, y sus concentraciones medias tienden a ser menos variables que las de agua dulce [123, 138]. La concentración media en aguas profundas es de 1,5 mg L^{-1} ; en el océano Pacífico y el Atlántico oscila entre 1 y 1,8 mg L^{-1} , en la costa este de España es de 1,5 mg L^{-1} , en el sur



de Australia se determinaron concentraciones que variaban entre 1 y 1,6 mg L⁻¹ [123]. Los niveles de arsénico en aguas oceánicas son mucho más constantes que en las zonas costeras y superficiales debido a las mareas y a las contaminaciones puntuales, las cuales se disipan mar adentro [111].

Las concentraciones de arsénico en las aguas de estuarios son más uniformes que las de las aguas marinas abiertas. Las principales variaciones se deben a episodios de contaminación industrial o geoquímica [122].

Una posible razón de esta baja variabilidad en estuarios es la simple mezcla física entre agua dulce y salada, con concentraciones muy diferentes; un ejemplo que representa éste fenómeno es el descrito en el estuario del río Krka, en Croacia, que presenta una concentración media de 0,13 mg L⁻¹ frente a los 1,8 mg L⁻¹ en el mar; otra razón es la propia salinidad de estos ambientes tan peculiares [139]. Otro factor que influye de manera importante en la concentración y tipo de los arsenicales presentes es la actividad biológica.

El agotamiento de la concentración de fosfatos en aguas con elevado nivel trófico se relaciona también con la bajada en la concentración de As^V, cuyos niveles se incrementan ligeramente con la profundidad, sin embargo las concentraciones de As^{III}, DMA^{III} y DMA^V son superiores en capas altas de la columna de agua [140]. También existe una cierta influencia de la estratificación térmica respecto a los niveles de arsénico en estuarios [123].

Las fuentes hidrotermales de las dorsales oceánicas constituyen un ambiente singular, asociado a la actividad volcánica, donde se desarrollan animales extremófilos, que resisten condiciones de alta temperatura y presión, y altas concentraciones de elementos, tóxicos para la mayoría de los seres vivos. Entre ellos se encuentran el arsénico y el azufre, procesos



que ocurren en la oscuridad en ausencia de fotosíntesis. Sin embargo, estos ambientes han sido muy poco estudiado [141].

1.5.4 Presencia del arsénico en la flora y la fauna.

El arsénico es un elemento prácticamente omnipresente en los tejidos biológicos en los que sufre procesos de oxidación, reducción y metilación. La concentración de fondo en la flora y fauna terrestre, y en la biota marina es generalmente menor a $1 \mu\text{g g}^{-1}$. Estos niveles son mucho más elevados en tejidos biológicos de organismos que están en contacto con zonas ricas en arsénico. En los organismos marinos, especialmente los crustáceos, hay concentraciones muy elevadas, incluso por encima de $100 \mu\text{g g}^{-1}$, aunque generalmente está en su forma soluble en agua, como AsB , que es una especie sin actividad tóxica conocida para el ser humano [123].

1.5.4.1 Presencia de arsénico en la fauna y la flora terrestre.

La presencia del arsénico en zonas no contaminadas es mayor en ambientes acuáticos, lo que declinó la balanza hacia el estudio del arsénico en la biota acuática, en detrimento de la terrestre [142]. Una de las principales causas de esta tendencia eran de carácter metodológico, ya que la mayoría de las muestras terrestres precisaban límites de detección muy bajos debido a las bajas concentraciones existentes, aunque la mejora de la instrumentación analítica ha hecho hoy posible la determinación de arsenicales en este tipo de muestras [142].

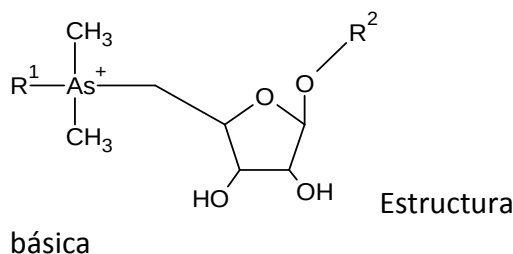
Inicialmente, se pensó que los organismos terrestres difícilmente podían biotransformar el arsénico en arsenicales simples (As^{V} , As^{III} , DMA, MMA y TMAO). Sin embargo, se han identificado un gran número de compuestos de arsénico en el ambiente terrestre, en la mayoría de los casos en zonas contaminadas [142] (ver tabla 1.6).



Nombre	Abreviatura	Estructura
Óxido de trimetilarsina	TMAO	
Tetrametilarsonio (catión)	TETRA	
Arsenobetaina	AsB	
Arsenocolina	AsC	
Óxido de dimetil (5-ribosil) arsina	DMAz	Estructura Básica
Óxido de dimetil (5-ribosil) arsina. DMArsenonoazucar A*.	DMAz A	
Óxido de dimetil (5-ribosil) arsina. DMArsenonoazucar O.	DMAz O	$R^1, R^2: -(CH_2)_n - CH_3$



**Alquil (dimetil)(5-
ribosil) arsonio**



**Alquil (dimetil)(5-
ribosil) arsonio**

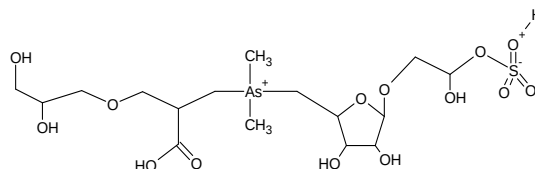


Tabla 1.6. Muestra algunos de los arsenicales orgánicos identificados en organismos terrestres y marinos.

En este sentido, se han determinado especies como AsB, AsC, TETRA y TMAO en diversas especies de plantas, líquenes, hongos, lombrices de tierra y hormigas [142]. En general, en los organismos terrestres (plantas y animales) las formas inorgánicas son mayoritarias frente a las orgánicas, como el trigo (5 µg/Kg de DMA y MMA, y de 152 µg/Kg de arsénico inorgánico) [94]. Por otra parte, se ha determinado que ciertos hongos son capaces de biosintetizar a partir de compuestos inorgánicos otros orgánicos, tales como, MMA, DMA, TMAO, e incluso AsB [143, 144].

En un estudio reciente en diversos alimentos vegetales de origen terrestre se encontró TMAO, MMA y DMA en bambú procedente de china, sin embargo en el resto, entre las que había tubérculos (patatas, zanahorias, etc.), *Allium* sp. (cebollas, ajos, puerros, etc.), varias especies de la familia de la col (coliflor, colza, brocoli, etc.) y otros tipos de vegetales (lechuga, tomate, espinacas, pepino, etc.) únicamente se hallaron arsenicales inorgánicos. En ninguno de los casos la suma (arsénico orgánico e inorgánico) superó los 150 µg/Kg, siendo muy variable entre las diferentes especies vegetales [145]. Sin embargo, otro estudio en una zona contaminada de Polonia, encontró la presencia de MMA y DMA así como arsénico inorgánico, dos especies silvestres, *Athyrium filix-femina* y



Calamagrostis arundinacea, con concentraciones, inferiores a los 150 µg/Kg, concentrándose mayoritariamente en raíces y rizomas [146].

También se encontró DMA en arroz y paja, lo que tiene una gran repercusión en la salud humana, por tratarse de un alimento de amplio uso, en el caso del arroz, y en el segundo caso por su uso en ganadería [147,148].

Las concentraciones de arsénico en vegetales terrestres silvestres no presentan por lo general un riesgo elevado para los herbívoros, ya que no llegan a acumular cantidades suficientes del elemento [114], aunque existen algunas excepciones, como algunas especies de helecho que son capaces de alcanzar niveles altos de arsénico [149, 150].

Una de las especies vegetales en las que la presencia de arsénico posee mayor impacto en estos momentos es el arroz. Lo que ha generado numerosos estudios y publicaciones en los últimos años. Una de las conclusiones más importantes de estos estudios es que al igual que en otros vegetales terrestres, las especies de arsénico mayoritarias son inorgánicas, habiéndose hallado DMA y algunos arsenicales no identificados en harina de arroz japonés [151] y MMA y DMA en diez variedades de todo el mundo (0,4-12 µg/Kg MMA y 10-166 µg/Kg DMA, 25-71 µg/Kg arsénico inorgánico) [94]. Debido a ello, la Dirección General de Salud y Consumo de la Comisión Europea (Unión Europea) pidió la realización de una evaluación interlaboratorio para determinar la fiabilidad de los métodos usados para este tipo de análisis. En dicho programa participaron casi 100 grupos de investigación [152].

Uno de los problemas importantes asociados a la presencia de arsénico en el arroz es su empleo en la fabricación de alimentos para bebés, lo que conlleva un gran riesgo para la salud [153]. En este sentido se han determinado los niveles de arsénico en cuarenta preparados alimenticios, como el arroz inflado, que fundamentalmente contienen especies inorgánicas (75-91%) [154].



El uso de ciertos medicamentos en el ganado y de fertilizantes aumentan los contenidos de arsénico en las plantas y los animales que consumimos como alimento. Un caso lo representan las harinas de plumas de pollo en Estados Unidos, las cuales son usadas a menudo como fertilizantes y alimento de otros animales y que contienen altos niveles de arsénico inorgánico, existiendo indicios de que su presencia se puede deber al empleo del medicamento roxarsona en aves de corral, aunque esta hipótesis no se ha llegado a confirmar [155].

1.5.4.2 *Presencia de arsénico en la fauna y la flora acuática.*

La presencia del arsénico en los ambientes acuáticos es notable y por tanto está presente en muchos de los organismos que viven en ellos o se nutren de éstos. La distribución, bioacumulación y biotransformación del elemento a lo largo de la cadena trófica es muy relevantes a la hora de comprender la gran variedad de arsenicales que hay en el medio natural.

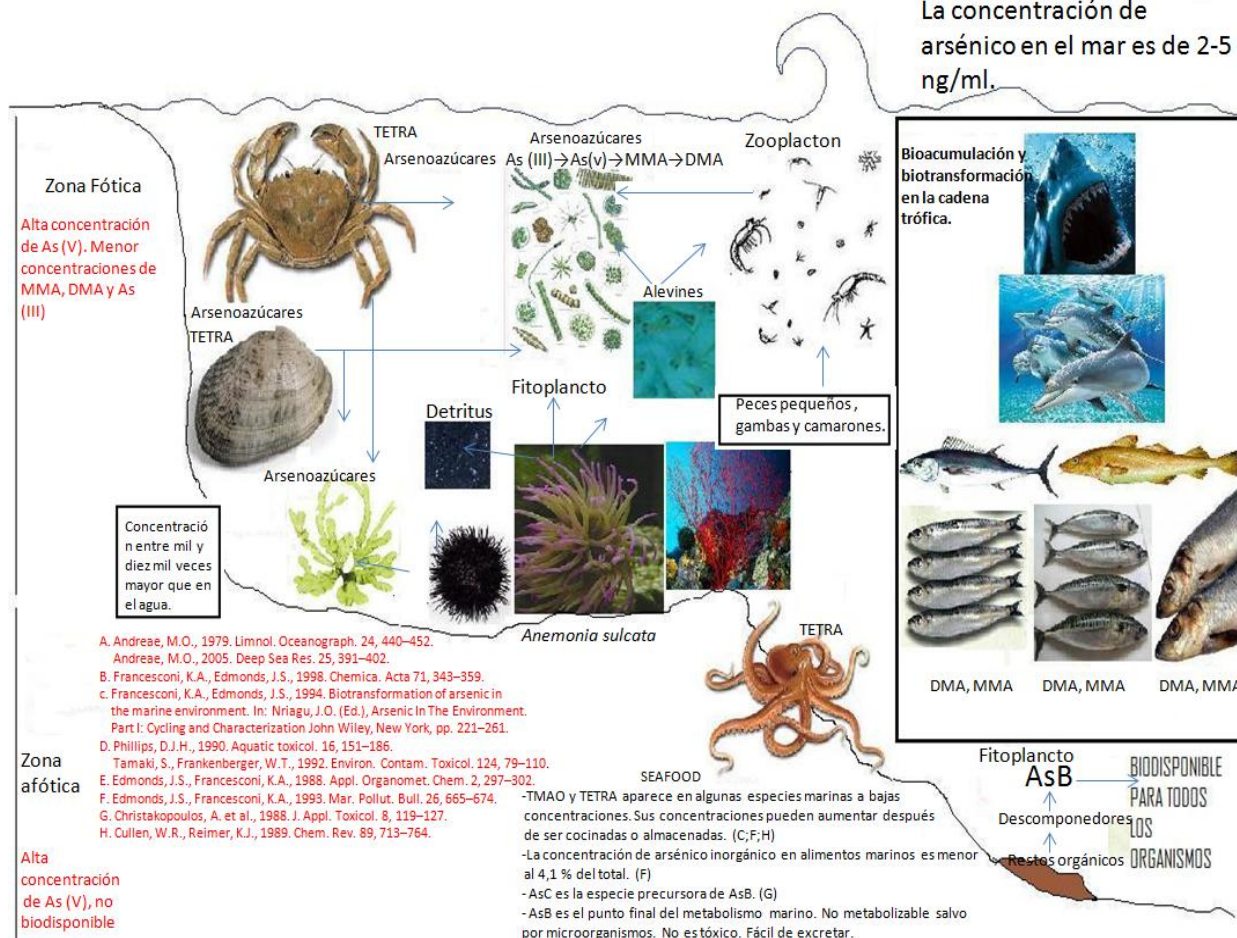
Cada organismo sintetiza, metaboliza y acumula el arsénico en sus cuerpos de distinta forma cuando está expuesto a arsénico, ya sea a través de la dieta o mediante otra ruta o fuente como pueden ser el agua, el suelo o las partículas del medio, por lo que los arsenicales presentes, así como, sus concentraciones son muy variables [30,156, 157].

Las especies de arsénico más abundantes en los medios acuáticos son las inorgánicas. El As^{V} es termoestable en aguas óxicas, sin embargo As^{III} es predominante en aguas con ambiente reductor. En cualquier caso el fitoplancton lo transforma en compuestos metilados y en arsenoazúcares, pasando fácilmente a la cadena trófica donde es transformado de nuevo [51]. Los compuestos orgánicos del arsénico son mineralizados mediante la acción bacteriana cerrando el círculo [65]. Así mismo, podemos afirmar que tanto el plancton como las bacterias ejercen un papel fundamental en la especiación de arsénico en los medios acuáticos [15, 34, 156, 158].

Uno de los procesos más importantes que ocurren en el medio natural con respecto al arsénico es la biomagnificación de su presencia, la cual puede ser definida como el aumento paulatino de la concentración de este

Ronald, E., 1994. A review of arsenic hazards to plants and animals with emphasis on fishery and wildlife resources. *Adv. Environ. Sci. Technol.* 27, 185–259.

La concentración de arsénico en el mar es de 2-5 ng/ml.



Página | 82



Es muy complicado generalizar en cuanto al grado de toxicidad del arsénico en el medio natural, ya que además de las condiciones del entorno en la que se encuentre y de la forma química en la que esté, su toxicidad dependerá de cada organismo. Aunque se sabe que las especies inorgánicas son de las más tóxicas, existen numerosas excepciones. Un ejemplo de ello lo encontramos en el fitoplancton. Generalmente el fitoplancton marino es más sensible a As^{III} y el de agua dulce a As^{V} [18, 160, 161]. Sin embargo, *Dunaliella sp.*, y *Polyphysa peniculus*, ambos casos de fitoplacnton marino, son más sensibles a As^{V} [162, 163]. *Stichococcus bacillaris*, un fitoplancton de agua dulce, es igualmente sensible a ambas especies de arsénico a pH 8.2 [164]. Y aunque hay estudios que demuestran que el As^{V} es más toxico que As^{III} a pH bajos [164], hay organismos que no cumplen esta norma, como es el caso de *Chlorella sp.* que es igualmente sensible a ambas especies a pH 7.6 [161].

En cuanto a las concentraciones que encontramos en los organismos marinos, la dinámica es muy similar a la del medio acuático terrestre, siendo casi imposible establecer un patrón general de comportamiento. Como ejemplos, MMA y DMA están presentes en las plantas marinas, aunque son más frecuentes en las de agua dulce de alta productividad [127, 128]. Algunas plantas marinas contienen mayoritariamente arsénico inorgánico [165, 166, 167, 168, 169, 170] y en menor medida especies metiladas [149].

La mayoría de peces y moluscos marinos contienen mayoritariamente AsB, AsC y DMA (entre el 85% y el 90 % del contenido total), y en torno al 10% lo representa el arsénico inorgánico. Por ejemplo, la concentración de AsB en algunos peces marinos (elasmobranquios y teleósteos) representa el 94 % del total, y DMA y TMAO representan el 95 % del total en langostas y camarones marinos [17].



En macroalgas marinas los arsenicales solubles en lípidos son mayoritarios, y en ellas se han identificado 16 arsenoazúcares (cuatro son los mayoritarios) [171].

Se han determinado grandes diferencias en la concentración de arsenicales entre las distintas clases de algas y entre los diversos hábitat (la tabla 1.7 muestra la relación presencia-ausencia para las principales algas comestibles), por ejemplo *Pelagophycus porra* (Kelp) tiene mayor concentración de arsenicales metilados que de especies inorgánicas, mientras que en otras macroalgas como *Eisenia arborea*, *Agarum fimbriatum* y *Cystoseira osmundacea*, ocurre todo lo contrario.

Por otro lado *Phaeophyceae*, un tipo de macroalga marina, contiene un 22 % de arsénico inorgánico respecto al arsénico total, pero en otras macroalgas como las *Chlorophyceae* y *Rhodophyceae*, se encuentra alrededor del 45%. A pesar de estas variaciones, a modo general, las algas verdes tienen una mayor proporción de arsenicales liposolubles (19-44%) que las rojas (5-34%) o las que habitan en estuarios (10-24%), [172, 173, 174]. Por otra parte, otros estudios afirman que las algas de aguas dulces y marítimas siguen patrones similares [175].

En general el contenido total de arsénico en algas pardas es 10 veces superior al presente en algas verdes (230 $\mu\text{g/g}$ frente a 2,3 $\mu\text{g/g}$), siendo también superior al de las algas rojas (39 $\mu\text{g/g}$) [50]. Por otra parte las concentraciones de arsénico en algas rojas son superiores a las de algas verdes y azules [173].

Todas estas variaciones en las concentraciones de arsénico inorgánico y metilado en fitoplancton se deben en gran medida a la biotransformación metabólica que dichos organismos efectúan sobre el arsénico. Este proceso es altamente dependiente de cada especie de fitoplancton, ya que hay diferencias significativas en la eficiencia según el organismo que la realiza. El As^{V} es absorbido e introducido al organismo a través del agua



circundante al mismo, y se une a estructuras hidrocarbonatadas, donde se metaboliza a organoarsenicales [50]. La mayoría de los arsenicales orgánicos presentes en el fitoplancton marino son arsenoazúcares y representan los principales precursores de AsB y AsC [176, 177].

Las fuentes más habituales de arsénico en organismos marinos son el agua y los organismos de niveles tróficos inferiores que sirven como alimento. Es posible que As^V se convierta mayoritariamente a As^{III} por algunos organismos, lo que explicaría la presencia de este mismo en organismos de niveles tróficos superiores [17], alcanzando concentraciones de hasta el 5% en algunos peces y crustáceos [179].

Los productores primarios son los encargados de la transformación o síntesis de arsenicales inorgánicos, ya que los animales marinos no son capaces de realizarla. La AsB es el mayor arsenical presente en los organismos marinos, como ya se ha comentado, y está presente en todos los niveles tróficos (incluyendo peces crustáceos - langostas y camarones- y moluscos), y aunque es también biosintetizado en todos ellos, parece existir una biomagnificación al respecto, por el incremento que se produce al progresar en la cadena trófica [51].

Existe una gran variedad de arsenicales en organismos marinos y de agua dulce, incluyendo muchos desconocidos, que aún no se han podido identificar [37, 180, 181].

Las dorsales oceánicas albergan uno de los hábitats más extremos del mundo, con temperaturas muy altas, contenidos elevados de arsénico y azufre, una gran presión, escaso oxígeno y poca luz. Pero a pesar de ello estas fuentes de origen volcánico albergan animales adaptados a tales condiciones (extremófilos), dos ejemplos son, *Rimicaris exoculata* y *Bathymodiolus puteoserpentis*, que son fundamentalmente quimiolitotrófos, en los que se han encontrado una gran variedad de arsenicales.



La concentración de arsénico media en el camarón (*Rimicaris exoculata*) es de 3 a 5 veces menor al de la misma especie en superficie, sin embargo en *Bathymodiolus puteoserpenti* las concentraciones fueron inferiores a las halladas en especies de almejas similares de la costa [156].



Fig. 1.18 Fotografías de algunas algas que forman parte de alimentos y productos dietéticos. De derecha a izquierda y de arriba abajo (*Ulva rigida* , *Sargassum fusiforme* , *Ecklonia cava*, *Hizikia fusiformis*, *Himanthalia elongate*)



Nombre del alga	As(III)	As(V)	DMA	MMA	AsB	AsB-2, AsC, TMAO, TETRA, DMAE	DMAz A	DMAz B	DMAz C	DMAz D	DMAz G	Desconocidos	REF.
Kelp		X	X							X	X		[182]
<i>Sargassum fusiforme</i>	X	X	X	X				X	X	X	X		[182]
<i>Enteromorpha prolifera</i>	X	X	X					X	X	X			[182]
Laver			X							X	X		[182]
<i>Eisenia arborea</i>		X	X							X	X		[183]
<i>Fucus vesiculosus</i>		X	X				X	X	X	X	X		[183]
<i>Himanthalia elongate</i>		X					X			X	X		[183]
<i>Sargassum fulvellum</i>		X	X					X	X	X	X		[183]
<i>Laminaria ochrolenca</i>		X	X							X	X		[183]
<i>Laminaria digitata</i>		X								X	X		[183]
<i>Hizikia fusiformis</i>		X	X				X	X	X	X	X		[183]
<i>Undaria pinnatifida</i>		X	X							X	X		[183]
<i>Porphyra umbilicalis</i>			X							X	X		[183]
<i>Ceramium</i> sp.	X	X			X								[184]
<i>Gelidium</i> sp.		X	X		X			X					[184]
<i>Polysiphonia</i> sp.	X	X						X					[184]



Ulva rigida				X			X	X	X			[184]
Enteromorpha sp.				X			X					[184]
Cystoseira barbata		X					X		X	X		[184]
Fucus Virsoides			X	X			X		X	X		[184]
Padina pavonica		X		X			X		X			[184]
Sargassum piluliferum							X	X	X			[185]
Melanosiphen intestinalis							X	X	X			[185]
Ecklonia cava							X	X	X			[185]
Myelophycus simplex							X	X	X			[185]

Tabla 1.7. Tabla presencia-ausencia de los principales arsenicales en algas.

A medida que subimos en la cadena trófica dejamos de encontrar arsenoazúcares en los tejidos de los organismos, lo cual es fácilmente apreciable en la Tabla 1.8, que representa la presencia-ausencia de arsenicales en diferentes especies marinas, que se corresponden a distintos estratos tróficos. Así podemos comprobar que aquellos animales que tienen una alimentación puramente carnívora no contienen arsenoazúcares.

Nombre del animal	As(III)	As (V)	DMA	MMA	AsB	AsB-2	AsC	TMAO	TETRA	DMAE	DMAz A	DMAz B	DMAz C	DMAz D	DMAz G	Descor- nocios	Ref
<i>Littorina litorea</i>	X	X		X	X				X								[192]
<i>Cyclope neritea</i>	X	X	X	X	X	X	X		X				X		X	X	[188]
<i>Chlamys islandica</i>					X						X		X	X	X	X	[191]
<i>Placopecten maellanicus</i>					X				X		X		X	X	X	X	[191]
<i>Bathymodiolus puteoserpentis</i>	X	X	X	X	X									X		X	[141]
<i>Arenicola marina</i>	X	X	X		X	X			X					X	X		[190]
<i>Rimicaris exoculata</i>	X	X	X	X	X							X				X	[141]
<i>Oreochromis mossambicus</i>	X	X	X	X													[194]
<i>Terapon jarbua</i>	X	X	X	X													[187]
<i>Mugil cephalus</i>		X	X	X	X		X	X	X		X	X	X	X	X		[193]
<i>Caretta caretta</i>			X		X		X										[189]
<i>Chelonia mydas</i>	X	X	X	X	X		X	X	X								[186,189]
<i>Eretmochelys imbricate</i>	X	X	X	X	X		X	X	X								[186,189]
<i>Phoebastria nigripes</i>			X	X	X		X		X								[186,189]

<i>Larus crassirostris</i>			X	X	X		X		X								[186,189]
<i>Phocoenoides dalli</i>	X	X	X	X												X	[186,189]
<i>Globicephala melas</i>	X	X	X	X	X											X	[189]
<i>Globicephala macrorhynchus</i>	X	X	X	X	X											X	[189]
<i>Delphinapterus leucas</i>	X	X	X	X												X	[189]
<i>Pagophilus groenlandicus</i>	X	X	X	X					X							X	[189]
<i>Pusa hispida</i>	X	X	X	X	X		X		X							X	[186,189]
<i>Erignathus barbatus</i>	X	X	X	X					X							X	[189]
<i>Callorhinus ursinus</i>			X	X	X		X		X								[186]
<i>Dugong dugon</i>			X	X	X												[189]

Tabla 1.8. Presencia-ausencia de los principales arsenicales en distintos grupos de organismos marinos.

CLAVE

Moluscos	Anélidos	Artrópodos	Peces
Reptiles (Tortugas)	Aves	Cetáceos y dugong	Mamíferos Focas



En las **aguas continentales** As^{V} y As^{III} son los arsenicales mayoritarios disueltos en ellas [195, 196]. Estos pasan a los organismos a través de las branquias o tegumentos, o bien, a través de la dieta. La concentración suele ser mayor que en agua de mar debido fundamentalmente a la deposición atmosférica [197] y directa de las fuentes geotérmicas y antropogénicas, así como a los efluentes procedentes de las minas [180, 198, 199]. Por lo tanto, los organismos de agua dulce estarán expuestos potencialmente a mayores concentraciones de arsénico que sus homólogos marinos, lo que podría resultar en una mayor bioacumulación de arsénico en la cadena trófica de las aguas continentales. Al igual que en aguas marinas, tanto el fitoplacton como las macroalgas son los principales productores primarios en las cadenas tróficas en agua dulce. Sin embargo, el arsénico contenido en las algas de agua dulce es menor que en las algas marinas y la mayoría de los compuestos de arsénico en ellas son solubles en agua [200, 201, 202]. En las cianobacterias *Nostoc. Sp.*, que se encuentran en la base trófica, el 93% del contenido de arsénico es oxo-arsenoazúcar-glicerol, aunque también se encontró As^{V} [203].

El Oxo-arsenoazúcar-glicerol es el principal arsenoazúcar en algas verdes (*Cladophora sp.*) de agua dulce y en varias algas del río Danubio, de las que, a su vez, era su principal constituyente, mientras que el As^{V} resultó ser minoritario [204]. Dentro de los arsenicales solubles en agua, DMA, es significativamente mayor al de otras especies en algas continentales. En otros estudios en algas verdes y diatomeas se determinó como principal componente arsenical el DMA (más del 80% en ambos casos), mientras que el arsénico inorgánico estaba en una proporción menor del 10% del total, lo que probaría que el arsénico inorgánico es convertido en DMA por estos organismos [176].

Existe una gran controversia en cuanto a las especies de arsénico presentes en la fauna y la flora de las aguas continentales, así en las larvas y pupas de tricópteros (insectos que tienen una fase acuática) el DMA es



mayoritario con porcentajes del 86 y 56 %, respectivamente, mientras que en el caracol de pantano representa solamente el 27%. En este caracol los contenidos mayoritarios corresponden a especies orgánicas (principalmente AsC y AsB) y en menor medida a las inorgánicas [28]. Sin embargo, en los peces del río Hayakawa, el 93% de la concentración de arsénico correspondía a arsénico inorgánico y el resto a trimetilados [176]

Hay investigadores afirman que AsB es el principal arsenical en peces de agua dulce [205, 206] mientras que otros encontraron pequeñas cantidades de AsB [207] o no las detectaron [208].

Por otro lado, hay autores que afirman que los arsenicales predominantes en peces de agua dulce son los arsenoazúcares y que AsB es minoritario [209, 210]. Por el contrario, hay estudios que señalan que los trimetilarsenicales están en mayor proporción que los dimetilados tanto en peces como en caracoles de pantano a excepción del *Hakoensis tribolodon* [176]. La concentración de arsénico en peces de niveles tróficos inferiores es mayor que en peces de niveles superiores [211]. En salmónidos la AsB es la principal especie de arsénico (97%), mientras que en la lota (*Lota lota*) es el DMA (75 %) y el resto AsB [206]. A pesar de todo, parece evidente que AsB y DMA son las principales especies de arsénico en peces de agua dulce [212], pero lo cierto es que la distribución y especiación en organismos de agua dulce resultan ser más complicadas que en los de agua salada. Dicha diferencia puede deberse a una mayor variabilidad espacial y temporal en la movilización del arsénico. Otro factor importante es la influencia más directa de la contaminación [17]. Como conclusión podemos decir que sería imposible establecer unos patrones de concentración por grupos de organismos (familias, por ejemplo) o por hábitat, seguramente resultado de la inmensidad y complejidad que el propio estudio conlleva.

.



1.6 El arsénico en los alimentos de origen marino.

1.6.1 *Anemonia Sulcata*

Anemonia sulcata, conocida con el nombre común de ortiguilla o anémona de mar común, es una especie de cnidario antozoo, del orden de los Hexacoralarios y de la familia Actiniidae. La anatomía habitual de las anémonas, con un cuerpo blando y contráctil, y con numerosas filas de tentáculos urticantes que son usados para cazar, que rodean a la boca superior, hacen que este animal se confunda con una planta marina [213].



Fig. 1.19 Fotografías de *Anemonia sulcata*.

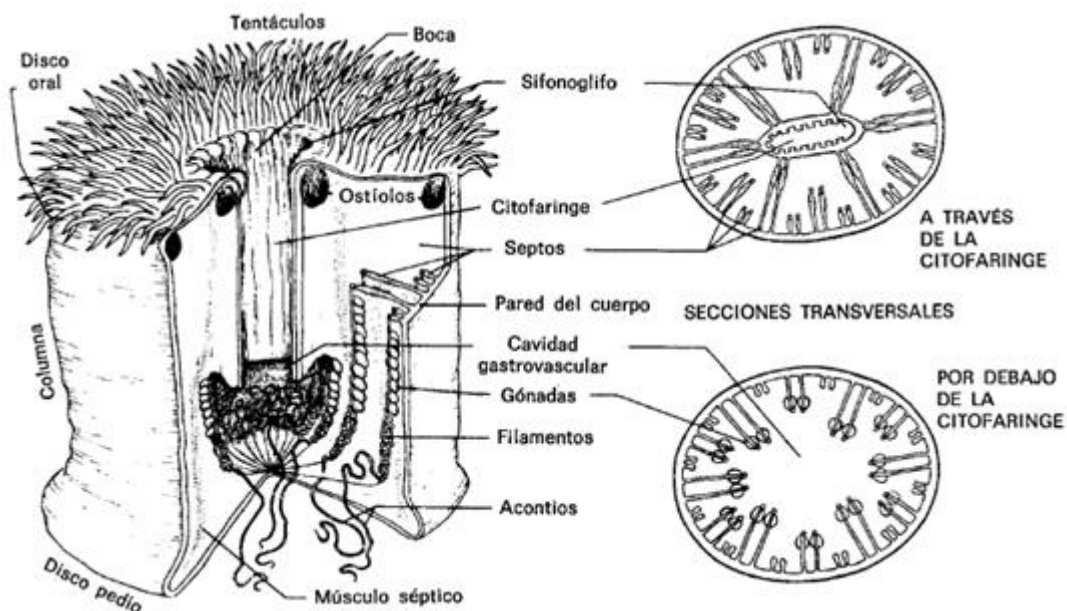


Fig. 1.20 Esquema general de un antozoo. Clase ANTOZOOS. Estructura de la anémona de mar *Metridium*. Parte del cuerpo ha sido cortada para mostrar rasgos internos. Las secciones transversales, a través de la citofaringe y por debajo de ella, muestran la disposición de los septos [214].

La anatomía de los cnidarios es relativamente simple, son animales con simetría radial, sin cefalización, con extremo oral y aboral. Las anémonas son pólipos con un disco basal que se une a una superficie de manera permanente, por lo que son sésiles. En el otro extremo se sitúa el disco bucal, que hace las funciones de boca y ano. Su cuerpo está formado por dos capas (diblastos), una exterior, *epidermis*, y otra interior, *gastrodermis*, entre ellas se sitúa la mesoglea, muy gelatinosa, compuesta mayoritariamente por colágeno. En su interior se encuentra la cavidad gastrovascular, que hace las veces de estómago, tanto en dicha cavidad, como en los numerosos tentáculos hay un tipo de célula especializada, *cnidos*, que a modo de arpón inyecta veneno a sus presas. Carecen de sistema nervioso (funcionan por plexos) y de sistema muscular, se mueve mediante proteínas contráctiles. Tampoco tienen sistema respiratorio, ya que esta función la realizan mediante difusión. Su reproducción puede ser asexual mediante germinación de alguna parte del individuo o sexual (en



el caso de la *Anemonia sulcata* es una especie con separación de sexos (monoica) y ovípara (los óvulos se liberan de mayo a julio). Las anémonas pueden reproducirse también por bipartición, sobre todo cuando alcanzan un gran tamaño, si la partición se da en la zona basal, dará lugar a dos anémonas idénticas, si este proceso se da en la zona de la corona o collar los individuos resultantes son distintos.

Como todas las anémonas, la *Anemonia sulcata* es un animal sésil, que se ancla a través de su base a los lechos marinos, en zonas rocosas y someras. Su alimentación la realiza mediante la captura de pequeños artrópodos con sus tentáculos, aunque también se alimenta de copépodos, anfípodos, o peces de pequeño tamaño y de detritos que vienen arrastradas por la corriente. Es un animal que alcanza por término medio un tamaño de 6 cm de alto y tres de ancho, pudiendo llegar hasta los 20 cm. Tiene dos ecotipos que se diferencia en su aspecto externo influido por el hábitat: una de ellas (tipo I) tiene de 70 a 192 tentáculos y el tipo II es más grande y tiene más de 192 tentáculos.

Son de coloración muy variada desde verde oliva con las puntas de los tentáculos violáceos a blanquecino, las que se sitúan a mayor profundidad tienden a ser blanquecinas ya que deben su coloración a que vive en simbiosis con zooxanthelas (algas) ubicadas en el tubo digestivo bajo el ectodermo. Esta especie habita sobre rocas expuestas a la luz, desde la línea de mareas hasta los 6 m. Con frecuencia se da abundantemente en aguas poco profundas de bahías tranquilas y soporta bien las aguas sucias. El ecotipo I aparece en aguas medianamente movidas y en colonias más o menos densas hasta unos 5 metros de profundidad. El ecotipo II aparece en profundidades entre los 3 y 25 metros. [214, 215, 216]

Puede asociarse con otras especies como: *Gobius bucchichii*, *Leptomysis mediterranea*, decápodos del género *Periclimenes*, las arañas de mar *Maja crispata*, los cangrejos *Maia verrucosa*, *Inachus phalangium* y *Scyllarus artus* y juveniles de *Chromis chromis* (castañuela) [215, 216, 217]



Su área de distribución es amplia, abarcando todo el mediterráneo y gran parte del océano atlántico [218]. Es, además, una especie muy abundante, por lo que no es extraño que tenga cierta importancia gastronómica en las zonas costeras del mediterráneo, de hecho está reconocida como especie de pesca o acuicultura [219]. En Andalucía se consumen rebozadas en harina o pan rallado y fritas, si el individuo es pequeño se fríen enteros, si es grande se suele trocear previamente [220, 221].

1.6.1.1 *Especiación de arsénico en anémonas.*

Desde hace unos años se conoce que las especies de arsénico o arsenicales que aparecen en mayor proporción en animales marinos y algas son AsB y Arsenoazúcares. En cuanto a las anémonas de mar, TEMA ha sido identificado como el arsénico más importante en *Entacmaea actinostoloides* (originaria de Filipinas) (antes llamado *actinostoloides Parasicyonis*), mientras que AsB y arsenicales desconocidos han sido detectados en *Actinia equina*, ambas anémonas de la clase antozoo, como las ortiguillas [222, 223, 224].

En estudios previos sobre anémonas de mar no comestibles se determinaron patrones de concentración de arsenicales diferentes a las de otras especies marinas, siendo en estos casos el TEMA un arsenical con una proporción muy elevada. Según un estudio realizado en nueve anémonas, el rango de concentraciones de arsénico se encuentra entre 1,6 y 7 µg/g. Además, se ha identificado en ellas un arsenical poco común, el TMAP (Trimetiltioarsoniopropionato), mediante LC-ESI-MS de m/z 193. Por otra parte, la AsB es el arsenical predominante en algunas especies de anémonas (*S. gigantea*, *S. haddoni* y *M. senil*), sin embargo, no es un patrón aplicable a todas las especies de anémonas, según se pudo comprobar en el estudio realizado sobre nueve anémonas originarias de Japón [225]. Los resultados de este estudio se presentan en la Tabla 1.9.



Nombre del organismo	Arsenicales presentes (µg/g)	Imagen
<i>Anthopleura asiática</i>	AsB (1,2) AsB-2 (0,47) AsC (0,31) TETRA (1,4)	
<i>Actinia equine</i>	AsB (0,18) AsB-2 (0,11) AsC (0,33) TETRA (1,4)	
<i>Actinodendron arboretum</i>	AsB (0,17) AsB-2 (0,03) AsC (1) TETRA (0,03)	
<i>Phymanthus loligo</i>	AsB (0,29) AsB-2 (0,19) AsC (1,3) TETRA (0,96)	
<i>Entacmaea actinostoloides</i>	AsB (0,0) AsB-2 (0,0) AsC (0,53) TETRA (5,4)	 
<i>Stichodactyla gigantea</i>	AsB (3,0) AsB-2 (0,25) AsC (0,06) TETRA (1,4)	



<i>Stichodactyla haddoni</i>	AsB (2,8) AsB-2 (1,3) AsC (0,07) TETRA (2.5)	
<i>Stichodactyla mertensii</i>	AsB (1,4) AsB-2 (0,0) AsC (0,0) TETRA (3,4)	
<i>Metridium senile</i>	AsB (3,7) AsB-2 (0,22) AsC (0,13) TETRA (0,22)	

Tabla 1.9. Concentración de los principales arsenicales en anémonas marinas [225]

1.6.2 Transformación del arsénico durante el cocinado.

Aunque el uso de arsénico como veneno es bien conocido, lo cierto es que los casos agudos de intoxicación son anecdóticos frente a la intoxicación crónica. Además de la inhalación de partículas y el contacto dérmico, la ingesta de agua y alimentos contaminados es una de las vías de exposición más importante a especies de arsénico.

Por ello tiene gran importancia el control de los alimentos en cuanto a sus niveles de arsénico y su posible transformación durante el cocinado, habida cuenta del distinto nivel tóxico que presentan los diferentes arsenicales.

Uno de los procesos de cocinado más comunes es la aplicación de calor a los alimentos, lo que provoca distintos cambios que hay que tener en cuenta, como son la pérdida de agua y otros compuestos solubles como



proteínas y vitaminas, así como, la solubilización y la transformación química de ciertos compuestos[226].

Hay numerosos estudios que citan un aumento o disminución de la concentración de arsénico en el alimento cocinado frente al crudo. El aumento de temperatura en el alimento tiene como consecuencia la pérdida de agua, lo que provoca, a su vez, que pueda eliminarse el arsénico si es soluble o que aumente su concentración si no lo es. Dabeka [227] llegó a cabo un amplio estudio en Canadá, tanto en peces marinos como de aguas continentales, en los que observaron una disminución clara de la concentración de arsénico después del cocinado. Algo similar ocurre cuando se cocina la lubina mediante microondas o fritas, como detallan Ersoy et al. [228]. Sin embargo, Devesa et al. [229] comprobaron que durante el cocinado de diferentes muestras marinas se producen tanto pérdidas como aumentos de la concentración, de hecho, se determinó un aumento de hasta un 37% en muestras de bacalao y bivalvos, a causa de la pérdida de agua y otros compuestos solubles, a la vez que cierta pérdida en peces, bivalvos y crustáceos, que fue motivada por la vaporización y solubilización del propio arsénico. En este estudio, la solubilización fue comprobada mediante el análisis del líquido de cocción en el que se halló AsB para el caso de crustáceos, y AsB y DMA en bivalvos.

Por su importancia en el consumo, sobre todo en países como Japón, cada vez toman mayor importancia los estudios sobre macroalgas. Hay estudios [230, 231, 232] que afirman que el lavado de *Hizikia fusiforme* disminuye hasta en un 60% el arsénico total presente en este alimento, sin embargo, el cocinado en algas verdes, rojas y marrones no se produce esta disminución [231, 232, 233].

La mayoría de estudios sobre el cocinado de vegetales que contienen arsénico se centran en zonas donde ya de por sí el agua usada está contaminada. Sin embargo, de los escasos estudios sobre alimentos que contienen arsénico no procedente del agua de cocinado, se concluye que al hervir verduras o pastas se reduce notablemente la concentración total de arsénico hasta en un 60 %. Cuando el agua de cocinado está



contaminada, se han llegado a determinar niveles tan altos como 2 µg/g (peso seco) en verduras y pastas [226]. La concentración final de arsénico que podemos encontrar en un alimento vegetal, viene dada por la concentración en el ambiente de crecimiento de la planta en cuestión y por los procesos empleados en la elaboración culinaria de la misma, siendo enormemente importante la concentración del agua empleada en el cocinado, por ejemplo, se han observado aumentos hasta del 50 % en la concentración total de arsénico tras cocinarse arroz con agua contaminada debido a su alta capacidad de absorción [234].

Más allá de la pérdida total de arsénico durante el cocinado de alimentos es importante conocer la interconversión de especies en el mismo durante este proceso. Para ello, se han estudiado varias especies de arsénico [235], sometiéndolas a una temperatura de 160 °C durante 24 horas, observándose que **AsB** se transformó en TMAO (11%) y TMA⁺ (68%), **DMA** en MMA (5%), AsO₃⁻³ (3%) y otros productos volátiles de degradación y **MMA** a AsO₃⁻³ (39%) y AsO₄⁻³ (9%). Devesa et. al. [236] realizaron un estudio similar en el que se comprobó la respuesta de diferentes arsenicales en un rango de temperaturas de entre 85 y 190 °C y de tiempos entre 15 y 44 minutos, comprobándose que el AsB se transforma parcialmente en TMAO (16%) a 150 °C y en TMA (2%) a 160 °C. También se observó la transformación de AsC en TMAO (<1%) a temperaturas de entre 150 y 180 °C y de AsC en DMA (0,1%) a temperaturas superiores a 170 °C.

Se ha establecido de forma generalizada que la transformación en alimentos del arsénico es poco habitual porque se deben superar los 150 °C. Así, en un estudio reciente [237] se observó el aumento de arsénico inorgánico, DMA y TMA en algunos tipos de mariscos tras su cocinado, siempre que estos fueron fritos, asados o cocinados a la parrilla, todos procesos en los que es posible que la superficie del alimento alcance temperaturas superiores a los 150 °C. Otro estudio [238] realizado sobre un alga roja, Yakinori, que se consume habitualmente tostada mostró un leve aumento de organoarsenicales (DMA y arsenoazúcares) frente a la



cruda. Sin embargo, si las algas son cocinadas al modo tradicional, es decir, lavado y cocción no sólo no hay transformación sino que, y como se ha comentado con anterioridad, hay una pérdida sustancial de arsénico inorgánico, que en el mejor de los casos puede ser de hasta el 87 % [226], por lo que parece evidente que el tipo de cocinado es fundamental para determinar el grado de transformación del arsénico, la pérdida de arsenicales y el grado de toxicidad final.

En los vegetales, que contienen en su mayoría especies inorgánicas, se producen poca variabilidad después del cocinado, ya que estos arsenicales son muy estables, sólo el uso de agua contaminada puede aumentar la concentración final (el arroz puede incrementar su concentración de arsénico hasta diecisiete veces) [226].

En cuanto a los productos marinos en conserva, lo cuales son cocinados a altas temperaturas, la solubilización del arsénico es notable, pero no hay una reducción del mismo, ya que dichos productos son envasados en su líquido de cocción. AsB y DMA son los principales arsenicales que se han encontrado en dichos productos; por ejemplo, en un estudio sobre cangrejo se detectaron en el líquido del alimento AsB, DMA y algunos arsenoazúcares. No hay en la bibliografía estudios sobre la transformación de arsénico en productos de conserva. El proceso de esterilización no produce ninguna transformación aparente en los arsenicales presentes [239].

La actividad microbiana es una de las principales causas de transformación de los arsenicales presentes en los alimentos, la cual puede reducirse mediante métodos de refrigeración, como reconoce la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) [240]. Se ha demostrado en *Procambarus clarkii* que a 8 °C las especies TMAO, TMA, DMA y MMA no sufren transformación alguna durante 29 días, mientras que AsC y AsB sufren alteraciones a dicha temperatura. La AsB se transforma en DMA, MMA, TMAO y un arsenical desconocido que podría ser dimetilsinoylacetato, por su parte, la AsC se transforma rápidamente



en AsB. La *Pseudomonas putida* es la única especie bacteriana con actividad a esa temperatura [241].

No existen estudios suficientemente contrastados como para hacer afirmaciones concluyentes sobre la transformación que pudieran sufrir los arsenicales durante los procesos de congelación, aunque sí hay cierta información que puede acercarnos un poco más a entender dichos procesos. El porcentaje total de arsénico en los productos del mar congelados (<18-82%) es menor que los porcentajes hallados en productos frescos (50-119%), lo que sugiere que esto podría deberse a la descomposición de AB durante el proceso de congelación [240].



1.7 Metodologías analíticas para la caracterización y cuantificación de especies químicas.

1.7.1 La Especiación química.

El concepto de especiación es relativamente moderno en química analítica y se definió por primera vez como “la presencia de un elemento en formas separadas e identificables, tanto en forma química, como física o estado morfológico” en el *Second International Symposium on Speciation of Elements in Toxicology and Environmental and Biological Sciences* (Loen, Noruega, 15-18 de junio 1994) [242].

Una definición más reciente y aceptada es la que hace Templeton en 2000 [243] según la cual, una **especie química** queda definida como aquella forma química en la que se encuentra un elemento químico definida por su composición isotópica, su estado electrónico o estado de oxidación, así como, la estructura molecular o complejo del que forma parte.

A través de la especiación es posible determinar las diversas formas químicas de un elemento (tanto atómicas como moleculares), las respuestas específicas que los sistemas vivos dan a la presencia o ausencia de cada especie, la participación en procesos de asimilación de nutrientes por vía intra- y extracelular, y su papel biológico. La distribución, movilidad, toxicidad, bioacumulación y biodegradabilidad de los elementos depende no sólo de su concentración, sino también de la forma química en la que éstos se encuentran. Por lo que la especiación se convierte en una potente herramienta que nos permite profundizar en el estudio de cada elemento y en sus diversos comportamientos químicos, siendo posible conocer en cada caso las propiedades, singularidades y posibles interacciones en el ambiente. Todo ello es aplicable en diferentes áreas, como la tecnología, la industria, la toxicología, la biología o la medicina, entre otras.

Existen ciertos aspectos a tener en cuenta a la hora de desarrollar un método de especiación química, fundamentalmente si se tratan de



muestras biológicas complejas, ya que existen algunas dificultades que es necesario considerar. Estas son fundamentalmente: La estabilidad termodinámica de los compuestos, que no es siempre la misma, ya que depende de la propia matriz, y en segundo lugar, la cinética de transformación de las diversas especies.

A menudo el tiempo durante el que los analitos son estables no sobrepasa unas pocas horas y siempre en condiciones de refrigeración, por lo que es vital para el buen desarrollo del análisis que éste se ajuste lo más posible al tiempo de vida de la especie en cuestión. Este proceso de inestabilidad química viene dado por equilibrios ácido-base, de oxidación-reducción o de complejación. Habida cuenta de lo frágiles que pueden resultar algunos de estos equilibrios a las condiciones ambientales es preciso tener un especial cuidado en que la muestra esté bajo en condiciones óptimas antes de ser analizada.

El arsénico en los organismos vivos se encuentra a menudo en concentraciones muy bajas (μgL^{-1} o ngL^{-1}) y como especies desconocidas, de las que no hay patrones para su comprobación. Esto ha supuesto dos grandes retos que afrontar, el primero de ellos se ha resuelto con técnicas analíticas mucho más sensibles, ya que las dosis letales de algunos arsenicales suelen establecerse en concentraciones del orden del μgL^{-1} , sin embargo, en la misma matriz suelen convivir con otras especies que se encuentran en mayor concentración. Este problema se ha resuelto combinando de técnicas espectroscópicas y cromatográficas [244, 245]. El segundo aspecto es de vital importancia, ya que no se conocen en muchos casos ciertas especies por lo que resulta una incógnita su papel en las muestras de origen biológico. Como se ha visto previamente, las formas de arsénico resultan claves para la comprensión del metabolismo de muchos organismos, de su bioacumulación y de la posible toxicidad de los mismos tanto en humanos como en otros organismos vivos. Lo que supone un reto para futuros estudios en los campos del medio ambiente, la calidad de los alimentos y la salud.



A grandes rasgos, podemos distinguir dos grandes grupos de especies químicas, las que se forman a través de la unión de un metaloide, por ejemplo el arsénico con una pequeña molécula, por ejemplo azúcares como la ribosa, y en segundo lugar, las que forman parte de grandes moléculas, como proteínas o grupos proteicos.

Por tanto, en los últimos años se ha producido un cambio notable en este campo, que ha llevado del análisis de especies químicas conocidas y relativamente simples, al análisis de especies a menudo desconocidas y en gran medida más complejas. Por ello además de las técnicas de especiación ya citadas, se ha hecho imprescindible el uso de otras técnicas y metodologías, y sobre todo el empleo de plataformas instrumentales utilizadas offline u online, lo que ha configurado una nueva disciplina, la metalómica. Esta comprende el estudio cualitativo/cuantitativo del metaloma o conjunto de especies de metales o metaloides en una célula o tejido, ya sean iónicas (ionoma) o complejos con proteínas (metaloproteoma). En dichos análisis metalómicos hay un triple enfoque: Detección de la presencia de la especie en cuestión, su cuantificación y su identificación o establecimiento de su estructura. En muchos casos los estudios tienen una segunda fase que integra la metalómica con los estudios del analito dentro del metabolismo de un organismo (metabolómica). Por ello, la metabolómica se asocia cada vez más a estudios metabolómicos, proteómicos (proteínas) etc. que conforman la familia de las comúnmente conocidas como -ómicas. Todo ello resulta razón más que suficiente para que, además de los acoplamientos utilizados en especiación, se haga necesario el uso en paralelo de nuevas técnicas analíticas, fundamentalmente de identificación de moléculas, siendo la más usual la espectrometría de masas con distintas fuentes de ionización: Electrospray (ESI), ionización química a presión atmosférica (APCI), fotospray (APPI), ionización-desorción por láser asistida por la matriz (MALDI), etc. [246, 247, 248].



A pesar de los grandes resultados obtenidos con la especiación debido fundamentalmente a su gran fiabilidad y bajos límites de detección, y del gran interés existente por los organismos oficiales y la empresa privada para su aplicación en biomedicina, toxicología, calidad de los alimentos o el control medioambiental, su aplicación fuera del mundo académico es casi anecdótico, ya que resultan a menudo costosa y tediosa, además de necesitar de personal altamente cualificado en la materia para realizar los acoplamientos oportunos y aplicar los diferentes métodos analíticos.

Otro aspecto que actualmente resulta un inconveniente, es la dificultad existente en la validación de las metodologías analíticas desarrolladas por los diferentes grupos para su aplicación al análisis de rutina. Aunque ha habido avances en la normativa que regula este tipo de especies químicas tanto en los campos de la salud como del medio ambiente, aún queda mucho para que se ponga a la altura de los avances metodológicos ya existentes, y a menudo se siguen utilizando métodos clásicos para el análisis de estos compuestos. Como ejemplo la UE (Unión Europea) está realizando un borrador que establecerá los límites de arsénico inorgánico en arroz y sus derivados, cuando ya es posible la identificación y cuantificación de una mayor variedad de arsenicales, más aun teniendo en cuenta su distinta capacidad tóxica [152].

Una de las etapas críticas del proceso de especiación de arsénico es la de preparación de la muestra. Habida cuenta que las metodologías de separación más usadas se basa en la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), es habitual la necesidad de realizar algún tipo de extracción. Por lo que hay que tener presente la diferente naturaleza polar de los arsenicales presentes en una muestra real (arsenolipidos, arsénico inorgánico, arsenoazúcares, etcétera) lo que dificulta dicha etapa. Así mismo, la simplificación de los procedimientos de especiación en muestras complejas con el fin de que se puedan utilizar de modo rutinario, constituye un reto a día de hoy [10].



1.7.2 Métodos y Aplicaciones para la determinación de Arsénico.

En la **preparación de la muestra** la diferente polaridad de las especies de arsénico presentes en la muestra (arsenolípidos, arsénico inorgánico, arsenoazúcares, etc) puede añadir complejidad a esta etapa.

La extracción de las especies a partir de la matriz se realiza normalmente con agua y metanol, por separado o formando una mezcla de diferente proporción dependiendo de la muestra. Tradicionalmente, sobre todo en la década de los noventa, la mezcla que se consideró más óptima era la de agua y metanol a partes iguales, con un rendimiento de extracción del 90%, sin embargo, la mayoría de las muestras analizadas eran de origen marino y con elevadas concentraciones de AsB. En la actualidad, los estudios que se han venido realizando en otro tipo de muestras, fundamentalmente en algas, han demostrado que no es posible determinar un porcentaje óptimo para todo tipo de muestra, ya que los rendimientos pueden variar en un rango entre el 50% y 80%. La variación de las proporciones de ambos disolventes se ha mostrado clave a la hora de mejorar el rendimiento extractivo.

El uso del agua como único disolvente es la mejor opción para algunas muestras de origen terrestre, como es el caso de distintas especies de helecho, sin embargo, en otro tipo de muestras como melocotones y manzanas la mejor opción es una mezcla de metanol y agua en una proporción de 3:1. En muestras de arroz la mezcla de metanol y agua resultó ser poco eficaz según algunos estudios y por ello ha sido necesario el uso del ácido trifluoroacético, debido posiblemente a la poca cantidad de agua del grano de arroz con respecto a otras muestras. Otra forma alternativa de extracción es el uso de ácido fosfórico para muestras que contengan tioarsenicales ya que es más eficaz para romper los enlaces As-S. Los arsenolípidos también requieren condiciones específicas para su extracción eficiente por lo que es posible que sobre una misma muestra compleja se tengan que hacer distintas extracciones, dependiendo de los arsenicales a determinar.



La eficacia de la extracción no depende únicamente del disolvente o mezcla de ellos, sino por el sistema de extracción utilizado. Los más habituales son la extracción líquido-líquido o sólido-líquido, la extracción con ultrasonidos y los sistemas de extracción por presión. El rendimiento de la extracción mejora considerablemente cuando se realiza una extracción asistida por microondas o mediante el uso de un sistema de extracción acelerada por disolventes (ASE), sin embargo, este último método tiene algunos inconvenientes, ya que la muestra debe dispersarse en un medio inerte y homogéneo, y a menudo algunos arsenicales pueden quedar retenidos en el material usado como medio de dispersión, por lo que es poco utilizado.

Brisbin y Caruso [249] compararon distintos sistemas de extracción de compuestos de arsénico a partir de langosta (Tort-2), utilizando soxhlet, agitación mecánica, ultrasonidos, microondas-calefacción asistida, y la extracción de fluidos super- y subcríticos con dióxido de carbono o agua,. Los resultados obtenidos mostraron un gran rendimiento para todas ellas, a excepción de la extracción por fluidos supercríticos, y finalmente se consideró que la extracción asistida por microondas era el más adecuado por razones de operatividad [10].

Un avance en este sentido lo proporciona el método de extracción asistida por microondas focalizado, que permite mantener temperaturas más estables y en un amplio rango, lo cual es muy importante para aquellos arsenicales que se degradan térmicamente a bajas temperaturas.

La etapa de **limpieza o clean-up** también es crítica habitualmente puesto que puede implicar la pérdida de las especies de arsénico antes de su análisis. Sin embargo, también tiene importantes ventajas si se efectúa de un modo correcto, ya que permite la concentración de especies inorgánicas, metiladas y solubles en lípidos, que en ocasiones están en concentraciones por debajo del límite de detección, por lo que el simple hecho de detectarlas puede ser de gran utilidad en muestras reales en cuanto a su potencial riesgo tóxico. Los métodos de limpieza más usuales para la determinación de arsénico suelen estar basados en métodos



cromatográficos bi-, tri- o multidimensionales, ya sean acoplados en línea con el método de detección, o utilizados secuencialmente. Asimismo, también se ha utilizado extensamente la extracción y/o purificación mediante fase sólida [10].

La estabilidad de la muestra es clave, como hemos visto en puntos anteriores, a la hora de llevar a cabo el análisis. En agua el As (V) se convierte en As (III) tras 24 horas, tanto con luz como en la oscuridad. Además, la matriz de la muestra tiene una gran importancia en la estabilidad de los arsenicales, así como el estado de oxidación, por lo que hay estudios que ponen de manifiesto una gran estabilidad de As (V), DMA y MMA en aguas residuales durante más de 4 meses a pH entre 1,6 y 7,3 y a temperaturas de entre 4 y 40 °C, mientras que el As (III) se comporta de distinto modo en estas aguas y su estabilidad depende enormemente de la temperatura, el pH y la matriz. Para especies descubiertas recientemente y más complejas no existen estudios de estabilidad exhaustivos por lo que resulta un desafío a tener en cuenta [10].

En cuanto a la estabilidad de arsenicales en muestras biológicas está muy influenciada por la matriz, como demuestra un estudio [250] reciente con dos algas comestibles, Sargaso (*Sargassum fulvellum*) y Hijiki (*Hizikia fusiformis*), que pone de manifiesto la necesidad de llevar a cabo estudios de estabilidad para cada tipo de muestra estudiada. Este mismo estudio establece que las muestras liofilizadas son muy estables incluso a temperatura ambiente, sin embargo en el caso de los extractos acuosos, la estabilidad se reduce a menos de 15 días y siempre en condiciones de oscuridad y baja temperatura (-18 °C). Así pues, es posible decir que la liofilización es el mejor método de conservación de muestra, y que una vez extraídos los analitos, el análisis debe hacerse en unos días como máximo. Sin embargo, la liofilización supone en determinados casos la pérdida sustancial de determinadas especies volátiles [10].

La posibilidad de interconversión de los distintos arsenicales, hace más complejo el desarrollo de un método analítico ya que las condiciones, por ejemplo de pH, que favorecen la estabilidad de unos arsenicales son



perjudiciales para la de otros. Por este motivo, es imprescindible llevar a cabo estudios de estabilidad particulares [10].

La técnica de **separación** utilizada habitualmente para la determinación de las distintas especies de arsénico es la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), fundamentalmente basada en los mecanismos de fase reversa (RP) e intercambio iónico (IEC). Para la separación de especies de arsénico mediante intercambio aniónico (AEC) la columna más utilizada es PRP-X 100, normalmente con fases móviles con diferentes proporciones de fosfatos, menos para los casos en los que hay una fase previa de generación de hidruros, en cuyo caso se utilizan fases móviles con distintas proporciones de carbonatos. Sin embargo, para la separación mediante intercambio catiónico (CEC) no hay ninguna columna o fase móvil que destaque por ser la más utilizada.

En cuanto a la **detección** existen numerosos sistemas que hacen posible la determinación de especies de arsénico con diferentes parámetros analíticos. Por un lado, las más tradicionales como la espectroscopia de emisión atómica (AES) y de absorción atómica (AAS) no presentan buena sensibilidad. Sin embargo, la fluorescencia atómica (AFS) soluciona este problema ya que tiene una gran sensibilidad, similar a la del plasma de acoplamiento inductivo con detector de masas (ICP-MS) para ciertos arsenicales, fundamentalmente aquellos que dan arsinas con facilidad, ya que permite el uso previo de una etapa de generación de hidruros (HG), por lo que es una buena alternativa para análisis de aguas y orina, debido fundamentalmente a su bajo coste frente a ICP-MS. Es posible la detección mediante AFS de arsenicales que no forman arsinas con facilidad siempre y cuando se le añada una etapa previa para la descomposición de estos compuestos. Una de las más utilizadas es una etapa de fotooxidación mediante una lámpara de emisión ultravioleta (UV).

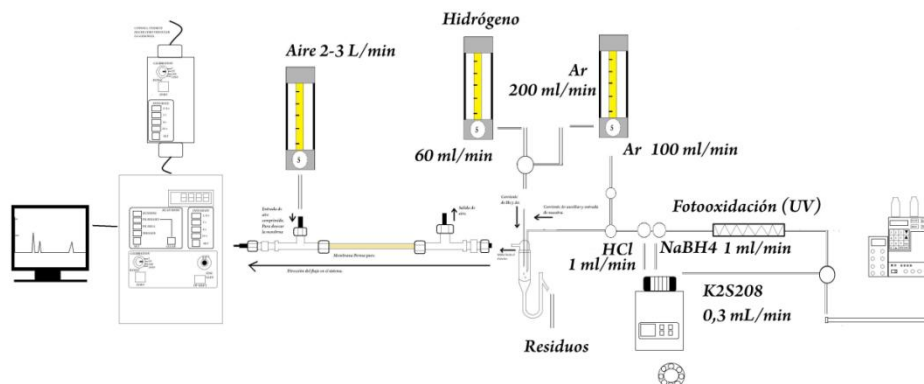


Fig. 1.21. Esquema de un sistema HPLC-UV-HG-AFS

Sánchez-Rodas et. al. [251] realizó un estudio con un sistema similar al que se representa en la imagen y con el que detectaron una especie desconocida de arsénico en ostras. En dicho trabajo, el efecto matriz resultó muy importante ya que la cuantificación no concordaba con la proporción establecida en el cromatograma obtenido previamente mediante AFS, y en el que destacaba un gran pico perteneciente al arsenical desconocido.

Sin embargo, uno de los detectores más utilizados en la actualidad es el ICP-MS, debido fundamentalmente a su sensibilidad (menos de 1 µg de As por litro), estabilidad, alta tolerancia a la matriz, amplio rango lineal y posibilidad de llevar a cabo análisis multiisotópico. Además, la sensibilidad puede mejorarse mediante una etapa previa de HG, tal y como se ha explicado para los sistemas de detección mediante AFS (la fotooxidación no tiene sentido si tenemos un plasma). Pero sin duda, el avance más significativo en la técnica ICP-MS ha sido el desarrollo de celdas de colisión-reacción, que ha permitido una eliminación eficiente de interferencias, sobre todo en aquellas muestras con altos contenidos de cloro, como el suero o la orina, ya que la suma de Cl^- y Ar^+ dan como resultado una interferencia isobárica con el único isótopo del arsénico de m/z 75. En este sentido el uso de la celda de colisión (o reacción), en cuyo interior se da un contraflujo entre la muestra y el He (o H_2), elimina gran



parte de las interferencias isobáricas, por iones poliatómicos o aductos, por óxidos e hidróxidos e iones con doble carga. Lógicamente este contra flujo provoca cierta pérdida de sensibilidad en la detección final, más apreciable en metodologías cromatográficas, por lo que gran parte del éxito de la medición en especiación está en el ajuste previo de los gases tanto de nebulización, como de colisión [10].

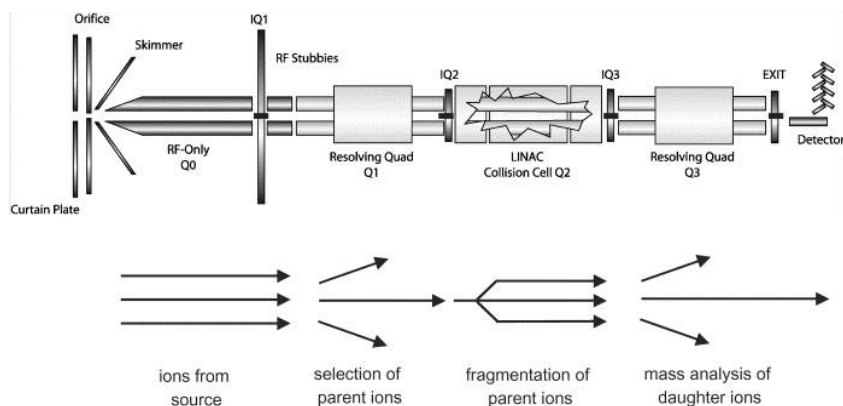


Fig. 1.22 Esquema de un ICP-MS con celda de colisión [252]

En la imagen superior se puede ver un esquema de un ICP-MS con celda de colisión, y en la inferior, la colisión entre una interferencia presente en la muestra (rojo) y el gas de colisión (azul), la esfera roja cambia su dirección inicial y sale del cuadrupolo, por lo que no llega al electromultiplicador y no es detectada. <http://www.youtube.com/watch?v=L-FYh2z9mi0>

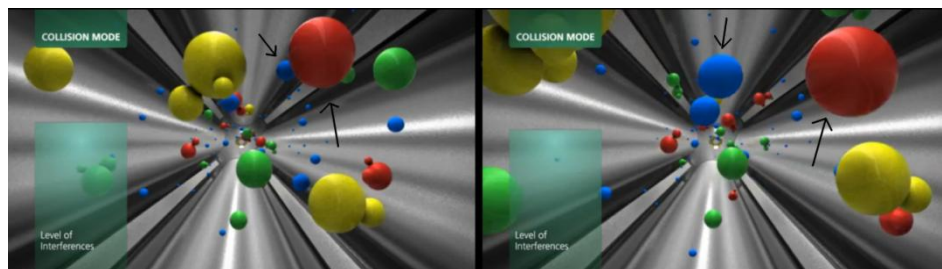


Fig. 1.23 Colisión de moléculas en la celda de colisión de un ICP-MS.

La **espectrometría de masas molecular** permite por su parte detectar y realizar análisis cualitativos de nuevos arsenicales. Son numerosos los trabajos realizados al respecto, fundamentalmente basados en el



acoplamiento de la espectrometría de masas orgánicas al HPLC, los cuales han permitido en los últimos años la identificación de arsenicales desconocidos hasta la fecha.

Dentro de la espectrometría de masas molecular, los analizadores de masas con uno o varios cuadrupolos son los más habituales y han dado grandes resultados. No obstante los espectrómetros de masas híbridos con uno o más cuadrupolos asociados a tiempo de vuelo (Q-TOF-MS) o cuadrupolo con transformada de Fourier de resonancia de ión ciclotrón (Q-FTICR-MS) representan una gran alternativa. Ambos sistemas en tandem tiene una elevada resolución de masas, lo que los convierte en instrumentos muy potentes para la identificación de especies de arsénico desconocidas, como se ha demostrado en numerosos trabajos [10].

Uno de los retos actuales es la simplificación en la detección del arsénico, eliminando la mayor cantidad de etapas posible y creando métodos más sencillos. Sin embargo, a día de hoy, la especiación de arsénico requiere del uso combinado de HPLC-ICP-MS y HPLC-MS-MS como alternativa más habitual.

1.7.3 La especiación del arsénico en biomedicina.

De forma tradicional, para la especiación de arsénico en matrices biológicas, se han utilizado fundamentalmente técnicas analíticas basadas en la espectroscopia, como ya se ha comentado con anterioridad. Así mismo para la separación previa de arsenicales la HPLC resulta la más utilizada debido a su mejor versatilidad y su buena reproducibilidad frente a otros métodos cromatográficos como por ejemplo la cromatografía de gases (GC) o la electroforesis capilar (CE). La combinación de ambas técnicas, cromatográficas y espectroscópicas, resulta ser la más atractiva y versátil actualmente en biomedicina [253].

En el caso de la especiación en biomedicina, el estudio y desarrollo de nuevos métodos y aplicaciones se ha centrado en la orina, la cual se ha considerado una matriz adecuada para los estudios del metabolismo de arsénico. Sin embargo, la falta de medios económicos por parte de centros



médicos y de métodos de análisis sencillos y rápidos, que no requieran de personal altamente especializado, ha provocado que la determinación de arsénico total sea el parámetro de uso habitual en dichos centros.

Dentro de los sistemas instrumentales más utilizados, como son HPLC-HG-ICP-MS, HPLC-HG-AFS y HG-ASS, parece ser que por coste y sensibilidad, HPLC-HG-AFS se ajusta más a las necesidades en el análisis de orina por parte de los centros médicos.

La especiación de arsénico en muestras biológicas es importante para la evaluación de exposiciones agudas o crónicas a través del medio ambiente, alimentos o el ambiente laboral. En este sentido se han desarrollado números estudios que intentan establecer métodos sencillos para el estudio en el ambiente laboral, como es el caso del realizado por Morton [254], en el que se llega a establecer una correlación entre la exposición de trabajadores a cinco arsenicales y ciertas enfermedades utilizando una técnica basada en intercambio aniónico e ICP-MS.

Mediante HPLC-ICP-MS Christian et al. [255], correlacionó los efectos de As y Se, en mujeres embarazadas de una zona contaminada de Chile, llegando a la conclusión de que había una alteración del metabolismo urinario. Xu, et al [256] realizó un estudio peculiar por tratarse de un grupo de trabajadores expuestos de forma aguda, ya que en la mayoría de estudios las personas están expuestas de forma crónica. Dicho trabajo realizado mediante HG-ASS con trampa fría, concluyó que la biometilación sufre un proceso claro de dosis dependencia, ya que los niveles de arsénico (fundamentalmente MMA) fueron descendiendo con el tiempo una vez que los trabajadores fueron alejados de la fuente contaminante.

Pero no sólo el ambiente es un foco importante de arsénico, la dieta cobra cada día más importancia en los estudios relacionados con la presencia de arsenicales en el metabolismo humano, y en la orina. Hay numerosos estudios a este respecto, Raml et. al. [257] determinó mediante HPLC-ICP-MS siete arsenicales en la orina de humanos que ingirieron un arsenoazúcar, tres de ellos desconocidos hasta la fecha. La mayoría de estudios de especiación de arsénico se hacen a escala poblacional, sin



tener en cuenta la dosis concreta de cada individuo, y en la mayoría de los casos se efectúan en zonas ya contaminadas, como Bangladesh con altas concentraciones de arsénico en el agua. Sin embargo, hay estudios, como el de Schmeisser [258] que aportan información muy valiosa sobre la ingesta de un determinado alimento y en personas voluntarias no expuestas. En este estudio los dos voluntarios ingirieron hígado de bacalao, y tras el análisis de la orina mediante HPLC-ICP-MS, se encontraron DMA y cuatro arsenolípidos.

Todos estos estudios en orina deben ir ajustados a los cambios metabólicos que se producen en los organismos debidos a distintas causas como la edad, el índice de masa corporal, el ejercicio físico, la dieta o el embarazo entre otros. Para ello uno de los ajustes más comunes es el que se realiza mediante la medición de la creatinina en orina, un producto de transformación de la creatina, que tiene gran vinculación al metabolismo renal. El ajuste se realiza dividiendo la concentración de arsénico entre el de creatinina, siempre y cuando los niveles de creatinina no muestren una disfunción (niveles normales entre 50 y 550 mg de creatinina/dL de orina). Si bien para estudios poblacionales es posible no utilizar este ajuste sin grandes consecuencias en los resultados [259], se hace imprescindible para el estudio de un metabolito concreto en voluntarios.

En muestras de **sangre** el uso de HPLC-ICP-MS es también el más común debido, como ya hemos comentado con anterioridad, a que permite obtener buenos límites de detección y escaso efecto matriz. Con este método se ha logrado la detección de diferentes arsenicales en sangre, tanto inorgánicos (arsenito, arsenato) como orgánicos (AsB, AsC, DMA, MMA). Además el arsénico, en forma de trióxido de arsénico, se ha utilizado para el tratamiento de enfermos de leucemia promielocítica aguda a los que se ha hecho el seguimiento mediante HPLC-ICP-MS. Uno de los aspectos más importantes en este tipo de muestra es su preparación, a fin de evitar la presencia de posibles artefactos, que puedan inducir a errores en el análisis [253].



El análisis de metales pesados y metaloides en **uñas y pelo** son muy habituales tanto en estudios de exposición como de control terapéutico, ya que son muestras accesibles por medios no invasivos, y que a diferencia de la orina y el suero, permiten conocer la exposición crónica a contaminantes. La especiación de arsénico en pelo y uñas, tanto de las manos como de los pies, también se lleva a cabo generalmente mediante el acoplamiento HPLC-ICP-MS. Como ya se ha comentado con anterioridad para otro tipo de muestras, la fase de preparación de muestra es básica, ya que el estado óptimo de las mismas es clave para evitar errores de cuantificación e identificación. En ese sentido Raab y Feldmann [260] realizaron un estudio de estabilidad para distintos arsenicales utilizando un método de extracción habitual para este tipo de muestras, el cual consiste en una extracción con agua en ebullición, comprobando que mientras el arsénico inorgánico y metilado con estado de oxidación cinco se mantenían estables, no ocurría lo mismo con las formas reducidas.

En 2007 se dio a conocer en los medios de comunicación el hallazgo del contenido de arsénico en el pelo de Napoleón Bonaparte, en el que se descubrió que la alta concentración de arsénico se debió a un envenenamiento y no a una exposición crónica [261].

Aunque de manera menos habitual, y a veces más discutida, la especiación de arsénico se ha realizado en otros fluidos biológicos, como la **saliva**. Así Yuan [262] realizó análisis de arsénico en saliva humana usando HPLC-ICP-MS y pudo relacionar la incidencia de enfermedades de la piel con ciertas concentraciones de arsénico en la saliva.

1.7.4 Técnicas metalómicas en el análisis químico.

En 1995 se dio a conocer el primer mapa genómico de un organismo procedente del medio natural, *Haemophilus influenzae*, un bacilo cuya carga genética es muy pequeña. A posteriori se ha descubierto el genoma de otras especies más complejas, incluida el ser humano, en el año 2002, y se han desarrollado numerosas técnicas y metodologías que tienen como



objetivo el análisis masivos de genes, proteínas, metalobiomoléculas o metabolitos de los organismos vivos, definidas bajo el nombre de –ómicas.

Una de las ómicas más significativas, más allá de la precursora, genómica, es la proteómica basada en el estudio del conjunto de proteínas pertenecientes a una célula, órgano u organismo, además del de la localización, estructura, estabilidad e interacciones de las mismas. Todo ello ha sido posible gracias al uso de la espectrometría de masas y de la técnica MALDI (ionización/desorción láser asistida por matriz). Uno de los estudios de mayor interés en proteómica es el de los cofactores en proteínas con estructura terciaria, ya que el papel de éstos es fundamental para el funcionamiento de las proteínas, muchos cofactores son simplemente algún metal como son los casos de Cu, Zn, Mo, Fe o metaloides como As y Se. Las proteínas realizan funciones imprescindibles para el organismo, dentro de las diversas rutas metabólicas, en la distribución de sustancias intra y extracelular y en la regulación de numerosos procesos que tienen lugar en los seres vivos, la lista es casi ilimitada [263].

Ahondando más en las –ómicas y en el papel de los cofactores, es importante la definición de metaloma y por consiguiente de la metalómica. El metaloma fue definido por primera vez por Williams, como la distribución de un elemento, la concentración de equilibrio de iones metálicos libres o como el contenido de un elemento libre en un compartimento celular, en una célula u organismo [264]. Un estudio metalómico implica:

- La presencia de metales o metaloides en sistema biológico.
- La existencia de una cierta correlación con el genoma, ya sea estadística o funcional.
- La existencia de un enfoque sistemático, integral o global. La mera identificación de un elemento no significa que sea un estudio metalómico [263].



Un término asociado y que tiene cierta importancia es el de **metalometabolito**, definido como: el complejo formado por un metal y un ligando producido por una reacción química o biosintetizado por un organismo, que está expuesto al estrés por el metal, o bien como una metalobiomolécula que ha sido alterada biológicamente [263]. La formación de nuevos arsenicales orgánicos en los procesos de detoxificación en el metabolismo de los distintos seres vivos puede ser enfocados bajo este término.

Las áreas dónde la metalómica tiene mayor presencia son la catálisis biológica (por ejemplo catálisis enzimática), biogeoquímica y química ambiental, bioquímica de las plantas (por ejemplo, en la captación de elementos trazas o pocos solubles por las plantas), química clínica (por ejemplo la mutación de genes por presencia de metales) y nutrición y suplementos alimenticios (por ejemplo el estudio de metales o metaloides (Zn o Se) en la dieta como suplemento para evitar ciertas enfermedades)[263].

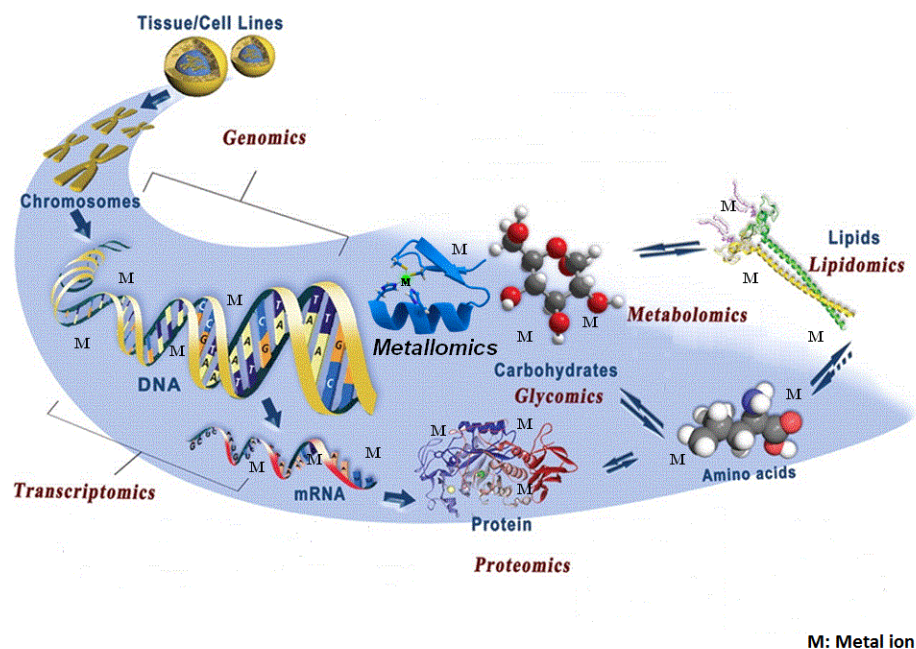


Fig. 1.24. En la Figura se representa a través de los procesos de transcripción genética, síntesis de proteínas y de formación de metametabolitos, las distintas –ómicas. Nótese la presencia de iones metálicos en todo el proceso.

Como en el caso de la especiación, las distintas –ómicas precisan de una fase de **separación** de muestras, que se consigue generalmente mediante cromatografía, ya sea HPLC o electroforesis capilar. Es frecuente el uso conjunto de distintas técnicas cromatografías complementarias u ortogonales, que permite obtener separaciones multidimensionales. Entre ellas podemos destacar la exclusión de tamaño (SEC), fase reversa (RPC), de intercambio iónico (IEC), de interacción hidrofílica (HILIC) y de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC).

En cuanto a la etapa de **detección**, es posible hacer una división dependiendo si es *in vivo*, *in vitro* o *in silico*, como establece Mounicou [263].

a) **In vivo**: Dentro del análisis de biomoléculas procedentes del medio natural que contienen algún metal, es necesario evitar lo máximo posible la transformación de la matriz original, ya que a menudo, este hecho



puede provocar la pérdida o transformación del analito. Por ello el uso de espectroscopia de absorción por rayos X (XAS) es una buena elección, ya que proporciona información sobre la coordinación del metal y su estado de oxidación. Sin embargo, ésta técnica tiene varios inconvenientes que no la hacen la más utilizada, ya que necesita de una muestra de gran pureza y con alta concentración del metal en cuestión, lo que la limita a muy pocos organismos vivos.

Sin embargo, estas carencias son fácilmente salvables mediante el uso conjunto de técnicas de separación (HPLC, CE) y de espectrometría (ICP-MS ó MS). La ventaja de esta combinación es que permite el análisis de trazas, ya que además de la sensibilidad de los detectores, mediante la separación se gana en resolución y se eliminan posibles interferentes en la ionización. Como se comentó en el punto dedicado a la especiación hay que tener especial cuidado con el estado de la muestra, por lo que es imprescindible que sea inerte cinéticamente, que tenga cierta estabilidad termodinámica y que no sufra transformación durante los procesos de medición como los previos, como puede ser la extracción. Por tanto, y como ya se dijo anteriormente, se hace necesario realizar estudios previos en ese sentido y comprobar que las recuperaciones son aceptables como para considerar válido nuestros análisis. Por ello se deben adaptar el método extractivo, de separación o detección a la muestra en cuestión. Si bien la combinación HPLC- ICP-MS, es la más habitual debido como hemos dicho anteriormente a su alta sensibilidad, elevado rango lineal y a su carácter multielemental [265,266]. Su principal inconveniente es el carácter destructivo de la misma, lo que la invalida para el análisis molecular, es por ello que se hace imprescindible el uso combinado de analizadores atómicos y moleculares, como ya esbozamos en puntos anteriores. En ese sentido la espectrometría de masas molecular como ESI o MALDI ofrecen un potencial analítico considerable en la determinación estructural de los complejos formados en metaloproteómica, ya que en muchos casos permiten que la estructura de las proteínas y los enlaces metal-biomolécula se conserven [267]. Los espectrómetros de masas de alta resolución tales como los sistemas híbridos cuadrupolo- tiempo de



vuelo (Q-TOF), triple cuadrupolo (qQq), triple cuadrupolo tiempo vuelo (QqQTOF), trampa de iones (IT), cuadrupolo-trampa (QTrap) o resonancia de ion ciclotrón con transformada de Fourier (FTIRC) proporcionan una caracterización de biomoléculas muy precisa. Además, la espectrometría de masas de alta resolución combinada con la espectrometría de masas en tándem (MS^n) es una herramienta indispensable para la elucidación estructural de metaloproteínas. La espectrometría de masas en tándem (ESI-Q-TOF-MS y MALDI-TOF-MS) es frecuentemente usada para el análisis de biomoléculas, así mismo, qQq resulta una técnica muy atractiva para el análisis cuantitativo de metalomoléculas, dada su alta sensibilidad y alta selectividad [269, 270].

b) Métodos basados en la modificación *in vitro* del ADN de un organismo y la determinación del impacto que produce en el metaloma.

c) *In silico*. Que estudia la unión de metales a proteínas mediante su secuencia a través de bases de datos.

1.8 Biaccesibilidad del arsénico.

Los contaminantes presentes en el medio, entre los que se encuentran los metales y metaloides, como es el caso del arsénico, no acceden siempre en su totalidad a los organismos, debido a que deben salvar distintas barreras químicas, físicas y biológicas. Es muy importante conocer cuáles son las vías por las que dichos contaminantes acceden a los organismos vivos, y fundamentalmente, al ser humano, así como, la proporción en la que se incorporan al organismo [271].

De manera general se ha adoptado que la biodisponibilidad es del 100% en el caso de que la sustancia en cuestión sea introducida por vía intravenosa, sin embargo, es muy variable si es por otra vía y depende del compuesto (debido a la absorción incompleta y a los primeros pasos del metabolismo), así como a otros factores [271].

La NCR (The Committee on Bioavailability of Contaminants in Soils and Sediments) en 2003 definió **biodisponibilidad** como la cantidad de un



contaminante que es absorbido por un organismo debido al contacto con la piel del cuerpo, a la ingestión o la inhalación [271].

Para el estudio de este proceso se define la biodisponibilidad de dos formas, de tal modo que, se adjetiva como **absoluta**, para referirse a la fracción o proporción de un compuesto que realmente se adsorbe, se ingiere o se inhala y que finalmente llega al sistema circulatorio. Debido a que no siempre es posible comparar un compuesto por su nivel en sangre, se utiliza la **biodisponibilidad relativa** que relaciona una fracción absorbida en una exposición estándar conocida frente a la del estudio (dosis) en cuestión [271].

Por otro lado, se define **Bioaccesibilidad**, como la fracción de un compuesto que es soluble en el tracto gastrointestinal y por tanto es biodisponible para su absorción. Es muy común el uso de Bioaccesibilidad y Biodisponibilidad como sinónimos, sin embargo es un error sustancial, ya la biodisponibilidad es un proceso más largo y complejo que va desde que el contaminante se encuentra en el medio hasta que pasa al torrente sanguíneo y la bioaccesibilidad se centra en el sistema gástrico [271].

Aunque parece que incorporar los estudios de biodisponibilidad-bioaccesibilidad como parte de los estudios de toxicología rutinarios parece algo lógico, no siempre suele hacerse por las siguientes razones:

- Los resultados de los estudios de bioaccesibilidad y biodisponibilidad son muy variables dependiendo de la metodología de análisis, la matriz y el contaminante en cuestión.
- Existe una alta dificultad para validar los métodos, ya que varían sustancialmente de un compuesto a otro.
- Igualmente son difícilmente validables para un mismo compuesto, ya que varía de un tipo de matriz a otra.
- No existen materiales de referencia para validar los resultados y la reproducibilidad de los mismos. En la mayoría de países no se consideran válidos los estudios *in vitro* y solicitan estudios paralelos *in vivo* [271].



Dentro de los procesos que ponen en contacto a los contaminantes con el hombre: inhalación, contacto cutáneo e ingestión, es el más común. Por ello los estudios de biodisponibilidad y bioaccesibilidad *in vitro* imitan los procesos de ingestión y asimilación, desde la trituración y corte dental y la consecuente salivación, hasta el transporte celular. Hay que decir, que llevar a cabo un estudio completo es muy complicado y laborioso, por lo que frecuentemente se suele parcelar. En los estudios a nivel gástrico, se simulan los pasos del bolo alimenticio desde la boca hasta su excreción final, simulándose, tanto las condiciones del medio, por ejemplo el pH, como las condiciones enzimáticas. Por otro lado, y dependiendo del contaminante, es necesario conocer como se moviliza a nivel celular, cuales son los transportadores moleculares (normalmente proteicos) implicados, si forman o no aductos, si pueden afectar al ADN o si pueden dar lugar a radicales libres.

Dentro de los metales-metaloides el arsénico es ampliamente estudiado, porque utiliza los canales del fosforo y a su capacidad para formar aductos, radicales libres, inhibir la reparación del ADN y por ser mutagénico y carcinogénico, es extremadamente tóxico, dependiendo de su forma química o especie [271].

Los estudios *in-vivo* suelen utilizar mamíferos para comprobar la biodisponibilidad y biaccesibilidad, los más comunes son los roedores (ratones, ratas y conejos) por su alta tasa natal, precio, tamaño y fácil manejo, aunque tienen como principal inconveniente que a veces su metabolismo es muy distinto al humano para un contaminante determinado, por ello se han utilizado otros modelos animales, como perros, ganado o primates. Estos últimos tienen grandes dificultades éticas y de coste. Un caso habitual es el uso de lechones para simular la biodisponibilidad a un contaminante en niños.

Como puntos finales de los estudios de biodisponibilidad se pueden incluir la determinación del analito en sangre, heces y órganos (riñón, hígado), de metabolitos en la orina (por ejemplo DMA, MMA), de los aductos de ADN y la inducción de enzimas.



Centrándonos en el arsénico, que es junto al plomo el elemento más estudiado desde el punto de su biodisponibilidad, se puede afirmar que su coeficiente de absorción es elevado (0,7-0,98), lo cual lo convierte en un elemento fácilmente accesible, fundamentalmente si hablamos de arsenicales solubles. Tras una única dosis oral en animales de laboratorio el arsénico inorgánico tanto tri- como pentavalente es rápidamente y ampliamente absorbido.

Como se ha comentado con anterioridad en esta Tesis, el grado de absorción en las diferentes fases de la ingestión, va a depender de manera trascendente de la forma química que presente el arsénico. Así, y como también se ha comentado, el arsenito se absorbe mejor a dosis bajas que el arsenato, ocurriendo todo lo contrario a altas dosis.

Uno de los factores más importantes en los estudios de Bioaccesibilidad es la dieta, ya que, una dieta rica en fibra provoca una rápida excreción con una menor absorción. Otro caso claro, lo establecen los estudios realizados en ratones por Vahter y Odanaka [272,273], el primero no alimentó a los ratones durante el estudio en el que se suministraba de forma oral arsenicales, mientras que Odanaka, sí lo hizo, y como resultado, para una misma dosis, los ratones alimentados absorbieron menos arsénico que los no alimentados.

La solubilidad del arsénico en la dieta es muy variable, ya que es muy dependiente de la constitución de los alimentos y nutrientes y del pH a lo largo del tracto digestivo. Los ambientes químicos a los que se enfrenta un mismo analito varían sustancialmente dependiendo de la composición del bolo alimenticio, ya que puede haber variaciones químicas sustanciales en los alimentos (por ejemplo diferentes proporciones de lípidos, azúcares o proteínas), en el pH, la salivación o la concentración enzimática, por poner algunos ejemplos. También es significativo el tamaño de partícula en el que se encuentre el contaminante al ser ingerido, ya que a menor tamaño (<250 μm) mayor absorción, siendo este hecho muy importante para microcontaminantes, como partículas de polvo.



Otro aspecto a tener en cuenta a la hora de hacer un estudio de bioaccesibilidad, es la distinta capacidad de absorción que se establece en el tracto gástrico e intestinal, por lo que habitualmente se simulan ambas fases de forma diferencial. Una muestra de este hecho la constituye un estudio reciente [274] realizado sobre alimentos silvestres canadienses en el que se analizan tanto plantas, como hongos y animales. Por otra parte, en este estudio, se concluyó que dependiendo del alimento y de la fase digestiva, el porcentaje de absorción es muy variable. Así, las bayas y plantas, tuvieron menor porcentaje de absorción que en las setas y animales, y la composición de arsenicales presentes en unos y otros alimentos era notablemente distinto, ya que en bayas y plantas destacaban las formas inorgánicas de arsénicas frente a las orgánicas más abundantes en setas y animales, sin embargo, no se puede generalizar este hecho para otros casos.

En resumen, los estudios de bioaccesibilidad son de gran utilidad para estimar la posible toxicidad de un alimento, pero a la vez son complejos de realizar debido a la diversidad de factores que afectan a los resultados obtenidos, como puede ser la muestra en cuestión sobre la que se hace el estudio, la fase del proceso digestivo, el organismo que se estudia, su genética, hábitos de vida, y otros muchos factores.





Parte
Experimental



2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Instrumentación Analítica.

2.1.1 Espectrómetros de masas atómico, ICP-MS.

Durante los trabajos que se desarrollaron en esta Tesis se utilizó un sistema ICP-MS para la determinación de arsénico elemental, así como para la especiación y los análisis metalómicos. El ICP-MS presenta ciertas características, que lo hacen una herramienta ideal para este tipo de análisis, como son su alta sensibilidad, su amplio rango lineal, la posibilidad de análisis multielemental, escaso efecto matriz y menor nivel de interferencias.

En la mayor parte de los trabajos realizados se utilizó un ICP-MS Agilent 7500ce (Agilent Technologies, Tokio, Japón) equipado con una celda de colisión/reacción de tipo octapolo (ORC) y nebulizador MicroMist de Glass Expansion (Melbourne, Australia). El equipo posee una elevada tolerancia a sales disueltas. El uso del sistema ORC₇ permite la eliminación de interferencias poliatómicas, por óxidos e hidróxidos, dobles cargas e isobáricas.

En el caso del arsénico, al tratarse de un elemento monoisotópico, el uso de la celda de colisión permite eliminar eficazmente las interferencias, pudiendo destacarse por su abundancia en muestras biológicas la correspondiente al ion poliatómico $^{40}\text{Ar}+^{35}\text{Cl}$ (Fig.ura 2.1).

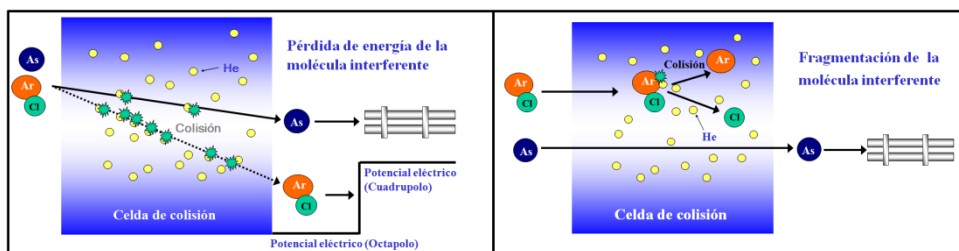


Fig.. 2.1 Muestra de forma esquemática los procesos pérdida de energía y fraccionamiento de una molécula ArCl en un ICP-MS con celda de colisión.



Los valores típicos de sensibilidad obtenidos, en el sistema ICP-MS Agilent 7500ce, para una disolución de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de Li, Y, Tl y Ce, en modo estándar (sin celda colisión/reacción) son para $^7\text{Li} > 4000$ cps (cuentas por segundo), $^{89}\text{Y} > 8000$ cps y $^{205}\text{Tl} > 5000$ cps, siendo la RSD inferior al 10% en los tres casos. El nivel de óxidos (MO^+) se mide a partir de la relación CeO/Ce , ya que el ^{150}Ce se une al oxígeno formando un enlace muy fuerte, siendo CeO muy estable en el plasma, y por tanto esta relación nos informa de los óxidos generados en el plasma, que debe ser menor al 2%. La reducción de dobles cargas M^{2+} se optimiza a un porcentaje inferior al 2,5% teniendo en cuenta la relación $\text{Ba}^{2+}/\text{Ba}^+$. Para eliminar las interferencias se utilizó un flujo de helio en la celda de colisión de $3,9 \text{ mL min}^{-1}$, y como el arsénico es monoisotópico, se monitorizó únicamente ^{75}As , usando Rh como patrón interno.

En la última etapa de la investigación se utilizó otro modelo de ICP-MS, el Thermo Scientific XSeries 2, que mejora la sensibilidad del análisis. Este ICP-MS también presenta la posibilidad de uso de una celda de colisión. Con este último instrumento, se ha utilizado un nebulizador micromist (Burgener, Mississauga, Ontario, Canada) y conos de níquel. .

2.1.2 Separación Cromatográfica.

Como se ha descrito en la introducción, uno de los sistemas más eficaces de separación para muestras reales es la cromatografía basada en el uso del HPLC, en nuestro caso hemos utilizado el sistema Agilent modelo 1100 (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA) equipado con una válvula Rheodyne de seis vías. Se utilizaron, según la metodología analítica dos bucles o “loops” de carga, con volúmenes de 50 y 100 μL . Se utilizaron dos columnas cromatográficas distintas, una de intercambio aniónico (PRP X 100, 25 cm x 4.6 mm, 5 μm , Hamilton) y otra de intercambio catiónico, (Supelcosil LC-SCX, 25 cm x 4.6 mm, 5 μm , Supelcosil).



Las condiciones operativas son las que aparecen en la tabla 2.1.

Condiciones de Separación		
Intercambio aniónico	Columna	Hamilton PRPX-100 (250mmx4.6 mmx5 μ m)
	Fase móvil	Carbonato amónico, 50 mM pH 8.5
	Flujo	0,8 mL/min
	Volumen de inyección	50 μ L
Intercambio catiónico	Columna	Supelcosil SCX (250mmx4.6 mmx5 μ m)
	Fase móvil	Pyridine, 20 mM (pH 2,5)
	Flujo	1 mL/min
	Volumen de inyección	50 μ L

Tabla 2.1. Condiciones cromatográficas utilizadas para la separación de arsenicales.

2.1.3 Espectrómetro de masas.

Para identificar de manera inequívoca las especies de arsénico presentes en muestras de anémonas y fluidos biológicos, considerando que en determinados casos no se disponían de patrones, se utilizó una segunda dimensión analítica basada en el uso de un espectrómetro de masas con triple cuadrupolo, modelo API 2000 (AB/MDS, Sciex, Concord, Canada) y fuente de electrospray (ESI), acoplado a un sistema de cromatografía líquida provisto de un dispositivo de división de flujo post-columna, para mejorar la resolución e ionización de las especies. A la fase móvil se



le añadió un 10% (v/v) de ácido fórmico para favorecer la ionización de los analitos. Los datos se obtuvieron en modo positivo (ES^+) y con el modo de adquisición de barrido completo, desde 50 a 500 m/z, que comprende las masas habituales de las especies de arsénico. Asimismo, las especies de arsénico para las que no disponíamos de patrones, se identificaron mediante el modo de adquisición MRM. La cuantificación de arsénico en cada pico cromatográfico se llevó a cabo mediante el acoplamiento HPLC-MS, utilizando DMA como patrón.



Fig. 2.2. Fotografía de un API 2000.



Las condiciones operacionales se muestran en la Tabla 2.2.

Condiciones operacionales MS.	
Temperatura de la fuente	400 °C
Voltaje de Ionización	5500 V
Gas de arrastre	15 unidades
Gas de Nebulización	10 unidades
Gas de colisión	5 unidades
Energía de ionización	0,5 V
Voltaje electro-multiplicador	2500 V
Potencial de entrada	10 V
Celda de colisión	-20 V
Tiempo de barrido	0,5 s
Potencial Declustering	30 V
Potencial Focusing	400 V

Tabla 2.2. Muestra las condiciones empleadas en el uso de MS. Se utilizó Nitrógeno de alta pureza

2.1.4 Otra instrumentación.

Para la determinación atómica del arsénico es necesario mineralizar las muestras, lo cual se realiza utilizando reactores de Teflón cerrados herméticamente del modelo MARSXpress asistido



por un horno microondas modelo MARS (CEM corporation, Matthews, Carolina del Norte, Estados Unidos), que acelera el proceso. El sistema permite ajustar la temperatura en los reactores, pero no la presión.

Para la extracción de arsénico de las muestras de *Anemonia sulcata* se probaron diferentes procedimientos que se indican a continuación:

- Baño de ultrasonidos Powersonic 510 (Hwashin Tecnology, Korea) con una potencia de 510 W durante 30 min y 25 °C.
- Sonda de ultrasonidos modelo Sonoplus HD UW 2200 (Bandelin Electronic, Berlín, Germany) equipada con una punta MS72. La potencia usada fue de 550 W durante 3 min. No fue posible controlar la temperatura.
- Microondas focalizado, para la extracción de especies de arsénico a bajas temperaturas, el sistema permite mantener una temperatura y presión constantes, mediante una corriente de aire. Las muestras se disponen en tubos de pyrex cerrados herméticamente. El sistema está constituido por un microondas modelo Discover y un muestreador automático, dotado de brazo mecánico, modelo Explorer (CEM Corporation, Matthews, USA) que permite la toma de muestra secuencial. La optimización de la temperatura de operación permitió fijarla en 100 °C, ya que a temperaturas superiores algunos arsenicales pueden La eficiencia óptima de extracción se fijó en 50 °C durante 5 min, utilizando una potencia de 150 W.

La extracción se completó con centrifugación de los extractos a 10.000 r.p.m durante 10 min usando una centrífuga del modelo 5804 R (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). El sobrenadante se filtró con filtros de vidrio GF/C usando una cámara de vacío. Para concentrar la muestra se evaporó hasta sequedad mediante un



rota-evaporador Buchi-R114, posteriormente se redisolvió y se filtró nuevamente.



Fig. 2.3 Microondas focalizado CEM, con auto-muestreador.

Las medidas de absorbancia, para la determinación de creatinina en orina, se llevaron a cabo mediante un espectrofotómetro UV/Vis modelo Ultrospec 3100 pro (biochromm Ltd, Cambrige, Reino Unido).

Las determinaciones de pH se realizaron con una sonda combinada modelo Crison micropH 2000 (Crison Intruments, S.A. Barcelona, España).

Antes de realizar la medidas metabólicas las muestras de suero, se centrifugaron, para lo cual se utilizó una ultracentrífuga modelo L9-90 K de Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA) provista de un rotor Beckman 70.1 Ti (Beckman Coulter) y tubos de policarbonato de 10 ml (Beckman Coulter). Previamente dichas muestras, se homogeneizaron con un criomogeneizador SPEX SamplePrep (freezer/Mills 6770), y posteriormente se extrajeron mediante un pellet mixer (VWR, England, United Kingdom). Las medidas metabólicas se realizaron con un espectrómetro de masas QSTAR XL Hybrid system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) usando una fuente de ionización por electroespray (ESI).



En la fase final del estudio metabolómico en órganos de ratón de laboratorio *Mus musculus*, los biomarcadores se identificaron mediante QqQ-TOF/MS, y algunos de ellos se cuantificaron mediante GC/MS, en este último caso, tras derivatizar la muestra. El GC/MS utilizado fue un Trace GC ULTRA acoplado a un espectrómetro con trampa de iones ITQ900, ambos de Thermo Fisher Scientific. La columna capilar utilizada fue la VF-5MS 30m x 0,25 mm de diámetro interno (Varian).

2.2 Reactivos y Patrones.

Todos los reactivos y patrones tienen la máxima pureza posible y todas las disoluciones acuosas se prepararon con agua ultrapura (18,2 MΩ) obtenida mediante un sistema Milli-Q Gradiente de Millipore (Watford, Reino Unido).

El arsenito de sodio y el arsenato de sodio utilizados para la preparación de los patrones de As^{III} y As^{V} , así como la AsB fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). El ácido monometilarsónico (MMA^{V}) y el ácido dimetilarsínico (DMA^{V}) fueron suministrados por Supelco (Bellefonte, Estados Unidos). El ácido dimetilmonotioarsínico (DMAS) fue sintetizado y suministrado por las doctoras Vélez y Devesa (Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC), Valencia, Spain). El ion tetrametilarsonio (TETRA) y el óxido de trimetilarsina (TMAO) fueron donados por la Dra. Riansares Muñoz (Universidad Complutense de Madrid).

Para la mineralización de la muestra se utilizó ácido nítrico (65 %) y agua oxigenada (30 %) Suprapure grade (Merck, Darmstadt, Alemania).

Como material certificado para la validación de los análisis en anémonas de mar se utilizó músculo de pez-perro (DORM-2) y hepatopáncreas de langosta (TORT-2) (National Research Council Canada). Y para las muestras de orina y suero se utilizó orina



lío filizada (Clinchek, Level II) y suero (nivel I) (Riciphe Chemicals, Munich, Alemania).

La creatinina se determinó mediante la reacción de Jaffe utilizando un kit comercial (Spinreact, Barcelona, España).

Para la preparación de las fases móviles empleadas en cromatografía se utilizó carbonato de amonio (Fluka, Seelze, Alemania), hidróxido de amonio (Sigma Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos), ácido fórmico (>98%, Fluka, purísimo, p.a) y piridina (Sigma Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos). El metanol fue suministrado por Aldrich (Aldrich, Steinheim, Alemania).

Para realizar la calibración del ICP-MS se utilizó una disolución de sintonía con Li, Y, Tl, Co y Ce ($1 \mu\text{L}^{-1}$ de cada elemento) suministrado por Agilent Technologies (Estados Unidos) y otra con Li, In, U, Co y Ce ($1 \mu\text{L}^{-1}$ de cada elemento) de Thermo Fisher Scientific (Bremen, Alemania).

Los espectrómetros de masas se calibraron con un kit estándar de AB Sciex (AB Sciex, Foster City, CA, Estados Unidos). La digestión in-vitro se realizó mediante tratamiento enzimático (pepsina porcina, pancreatna porcina y amilasa) y sales biliares (aproximadamente 50 % colato de sodio y 50% de deoxicolato de sodio) que fueros suministradas por Sigma Aldrich Sigma Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos).

Las anémonas se se compraron a buceadores profesionales que se encargan del suministro de este alimento a restaurantes de Huelva, la procedencia de las mismas era Tavira (Portugal).

La orina y el suero se obtuvo de cinco voluntarios que ingirieron una cantidad de 100 g de la anémona cocinada, que es la habitual en una ración.



2.3 Procedimientos

2.3.1 Determinación de la concentración total de arsénico.

La determinación de la concentración total de arsénico en *Anemonia sulcata* se realizó sobre un pool de veinte anemonas liofilizadas, analizando independientemente las crudas y las cocinadas. De cada mezcla se tomaron 100 mg que se mineralizaron con 800 μL de una mezcla $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2$ (4:1 v/v) en un microondas Mars 5, al que se aplicó una rampa de temperaturas desde 25°C hasta 160 °C, manteniéndose esta última durante 45 min. La digestión se diluyó posteriormente hasta 10 ml y se filtró (25 mm de diámetro, 0,45 μm de tamaño de poro).

Para la determinación de la concentración total de arsénico en suero y orina se modificaron las condiciones descritas en el párrafo anterior, diluyendo las muestras de orina en proporción 1:5 con agua ultrapura y centrifugando a 4000 r.p.m. durante 5 min. Para el análisis de suero se ajustaron las cantidades a la muestra disponible, de tal modo, que tomamos alícuotas de 0,2000 g a las que añadimos 800 μL de una mezcla $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2$ (4:1 v/v). Las condiciones operacionales del microondas fueron idénticas a las ya descritas.

2.4 Especiación de arsénico en *Anemonia sulcata*.

Como ya hemos citado previamente se realizaron dos pool de anémonas, una cocinada y otra cruda, que posteriormente se liofilizaron.

Las especies de arsénico se extrajeron con 5 ml de una mezcla de metanol y agua (1:1) por cada 0,1 g de muestra, posteriormente el extracto se centrifugó a 10.000 r.p.m durante 10 min, y el sobrenadante se filtró mediante filtros de vidrio GF/C usando una



cámara de vacío. A continuación se concentró la muestra mediante evaporación hasta sequedad utilizando un rotavapor. Finalmente, se redisolvió y se filtró nuevamente con filtros PVDF de 0,45 μm . Entre los métodos de preparación de la muestra utilizados, el que presenta mejores características analíticas es el microondas focalizado.

Tras la etapa de preparación de la muestra, los extractos de analizaron mediante el acoplamiento HPLC-ICP-MS, para lo que se utilizaron dos columnas distintas, una de intercambio catiónico y otra de intercambio iónico (las condiciones utilizadas con ambas columnas se resumen en la tabla 2.1.). El uso de ambas columnas se justifica por la coelución de AB, TETRA, TMAO y DMAS en intercambio aniónico y de DMA y DMAS en intercambio catiónico.

2.5 Especiación de arsénico en orina y suero.

La especiación de arsénico se realizó con el procedimiento descrito en el epígrafe anterior, basado en el uso combinado de AEC y CEC acopladas a ICP-MS. Sin embargo, el procedimiento de extracción se modificó para adaptarlo a este tipo de muestras.

Las muestras de orina se diluyeron en proporción 1:5 con agua ultrapura, posteriormente se centrifugaron durante 5 min a 4.000 g y por último se filtraron. Para el análisis de muestras de suero, se llevó a cabo una precipitación previa de proteínas, adicionando 500 μL de una mezcla de metanol y agua (2:1) por cada 0,1 g de muestra. La mezcla resultante se agitó con vigorosidad en un vortex durante 5 minutos y posteriormente se centrifugó durante 10 min a 4.000 g y 4 °C. El sobrenadante se evaporó con una corriente de nitrógeno hasta sequedad, y se conservó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. Antes de su uso se reconstituyó con fase móvil y se centrifugó nuevamente, inyectando en el HPLC el sobrenadante.



2.6 Determinación de creatinina en orina.

Las concentraciones de arsénico en orina se normalizaron con la concentración de creatinina, la cual representa la actividad renal de los diferentes individuos. En todos los casos comprobamos que el funcionamiento renal de los individuos se ajustaba a los parámetros que establece la Organización Mundial de la Salud (WHO) situados entre 0,3 y 3 g L⁻¹, y que se definen como normales. Dichas medidas se realizaron mediante la medida la absorbancia con un espectrofotómetro UV/VIS empleando un método basado en la reacción de Jaffe. Una vez realizadas las medidas, se ajustaron matemáticamente los valores obtenidos por HPLC-ICP-MS.

2.7 Determinación de la fracción bioaccesible.

Como se ha descrito en la Introducción, la fracción bioaccesible de un alimento es la que está biodisponible para absorción en el tracto digestivo. Dicha proporción nos informará sobre la parte que puede ser asimilada del total que está presente en el alimento.

La digestión *in vitro* de las muestras se realizó mediante el siguiente procedimiento [276].

1. Simulación absorción gástrica: se tomó 1 g de un pool de anemonas cocinadas y liofilizadas y se le añadieron 10 ml de jugo gástrico artificial, compuesto por—100 mg de pepsina y 10 ml de cloruro sódico (15 mM, pH 2,5). Dicha mezcla se mantuvo a 37 °C (temperatura corporal) durante 4 horas con una agitación de 150 r.p.m. en un agitador orbital-horizontal.
2. Simulación absorción intestinal: Se tomó 1 g del pool, se ajustó el pH a 7,4 y se le adicionó el jugo intestinal, compuesto por un 3% (peso/volumen) de pancreanina, un 1% (peso/volumen) de amilasa y 1,5 gL⁻¹ de bilis disuelta en



agua ultrapura. Dicha mezcla se mantuvo a 37 °C (temperatura corporal) durante 4 horas con una agitación de 150 r.p.m. en un agitador orbital-horizontal.

Ambos extractos se centrifugaron a 8000 g durante 30 min a 4 °C y el sobrenadante se separó para la determinación de arsénico total y sus especies.

3. Para la determinación de la concentración total de arsénico de los extractos, se tomó 1 g de muestra y se mineralizó mediante digestión ácida en un microondas, siguiendo el protocolo descrito en el Apartado 2.3.

2.8 Identificación de arsenicales mediante HPLC-MS.

Algunas especies de arsénico se han identificado por los tiempos de retención de patrones en el sistema HPLC-MS otras, en cambio precisan del detector de masas para su identificación, al no disponer de patrones. En todos los casos se precisa conocer las masas de las diversas especies para completar la identificación.

Es fundamental tener en cuenta que los arsenicales o sus fragmentos poseen masas entre 50 y 500 m/z. Mediante una base de datos elaborada a partir de la bibliografía existente recopilamos la mayor parte de los arsenicales descritos, así como sus fragmentos.

Los arsenicales se identificaron de dos formas:

- a) Mediante inyección directa, para obtener un espectro completo de todas las masas, y hacer barridos de masas concretas y de sus patrones de fraccionamiento.
- b) Mediante cromatografía, para relacionar las masas de las especies con los tiempos de retención.. La



separación cromatográfica diluye los arsenicales presentes, por lo que se mejora la señal acidificando con ácido fórmico.

Después de las dos etapas anteriores se procede a la identificación de las especies utilizando un software y base de datos adecuados basado en la bibliografía existente.

Se comprobó la presencia de especies de arsénico relacionadas con los patrones y otras cuatro desconocidas: GPAsC , AsC, DMAS y DMAE (dimetil arsinoilmetanol), como puede verse en la Fig. 2.6.

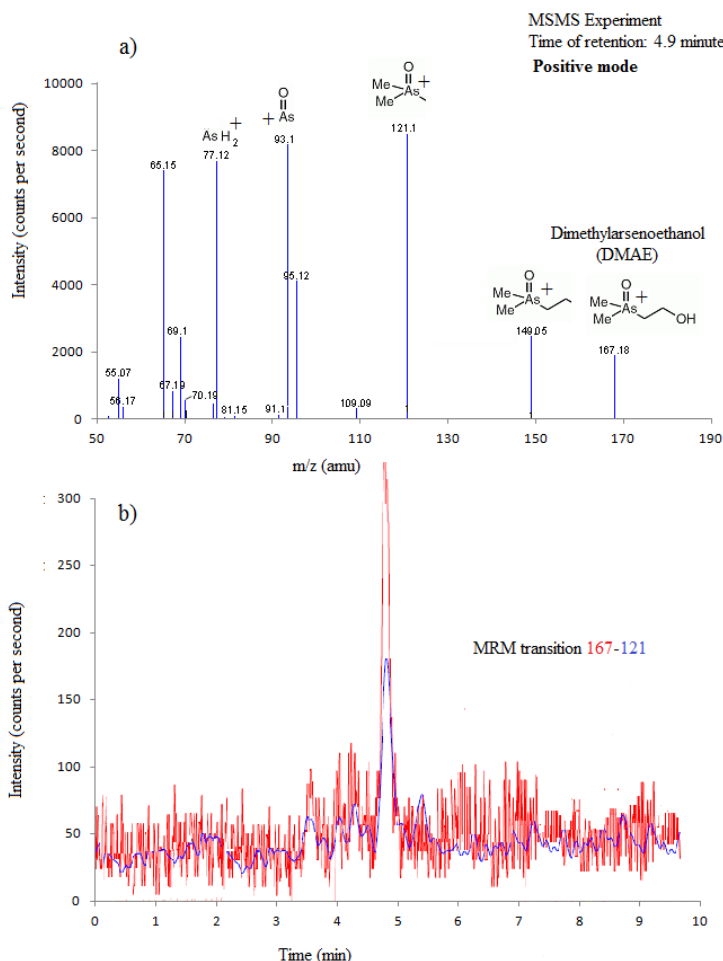


Fig. 2.4 Muestra los espectros obtenidos mediante HPLC-(CEC)-ESI-QqQ-MS, en modo MS/MS y MRM.

En modo MS/MS se fragmenta una masa concreta, en el caso de la Figura, la correspondiente a 167 m/z, el patrón de fragmentación nos permite saber si se trata de una molécula u otra, ya que dichos patrones son únicos para cada una de ellas. En el modo MRM, se busca una transición concreta, en este caso 167-121 m/z, que constituye es una prueba de confirmación del patrón de fragmentación para un tiempo cromatográfico concreto, en este



caso, 4,9 min, por lo que se puede confirmar que el analito de masa 167 es DMAE.

2.9 Estudio metabolómico en organismos modelo.

Para evaluar la respuesta biológica a arsénico en organismos modelo, se llevó a cabo una experiencia de exposición a este elemento en el ratón de laboratorio *Mus musculus*. Para ello, los ratones se aclimataron y posteriormente se les suministró una dosis oral diaria de As^{III} en forma de As_2O_3 , de 3 mg/kg de peso corporal. Los ratones se sacrificaron al sexto y duodécimo día, comparando estos grupos con el control (no expuesto a As). Posteriormente, los órganos se limpiaron con NaCl (0,9%) y se almacenaron a -80°C hasta su análisis. Por otra parte, se extrajo también plasma, el cual se centrifugó (4000 g, 30 min y 4°C) y se le añadió heparina como anticoagulante. Estas muestras biológicas se analizaron mediante un procedimiento metabolómico, que se muestran en el siguiente esquema:

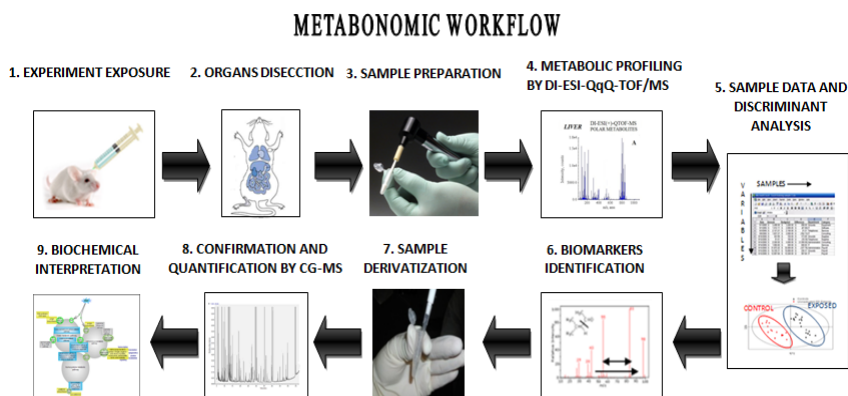


Fig. 2.5 Esquema del estudio metabolómico realizado en ratones expuestos a arsénico.

La preparación de los extractos para su análisis posterior mediante DI-ESI(±)-QTOF-MS, se llevó a cabo de la siguiente forma:



a) Extractos polares. Las muestras se extrajeron con 500 μL de una mezcla metanol/agua (1:1 v/v) por cada 50 mg de órgano, posteriormente se agitaron manualmente durante 5 min. La rotura celular se llevó a cabo por centrifugación a 4000 g durante 10 minutos a 4°C. Se extrajo el sobrenadante y se realizó una segunda extracción al precipitado con 100 μL metanol/agua (1:1), que se centrifugó de nuevo bajo las mismas condiciones ya descritas, separando nuevamente el sobrenadante. Por último se mezclaron ambos sobrenadantes y se conservaron a – 80 °C.

b) Extractos apolares. Del precipitado anterior se extrajo su parte lipófila adicionando 500 μL de una mezcla cloroformo/metanol (2:1) y agitando durante 2 minutos. Posteriormente se centrifugó a 10.000 g a 4 °C durante 10 minutos, y el sobrenadante resultante se llevó a sequedad con nitrógeno para su conservación final a – 80 °C.

Para eliminar las proteínas del plasma se añadieron 400 μL de una mezcla metanol/etanol (1:1) a 100 μL de plasma, posteriormente se agitó manualmente durante 5 min y después se centrifugó (4000 g, 10 min y 4 °C). El sobrenadante se recogió y se llevó a sequedad, posteriormente se conservó a -80 °C. El precipitado se homogeneizó con 200 μL de cloroformo/metanol (2:1) usando un mezclador durante 2 min, para extraer la parte lipofílica por centrifugación de esta mezcla (10.000 g, 4 °C, 10 minutos). Finalmente, el sobrenadante resultante se llevó a sequedad bajo corriente de nitrógeno y se almacenó a -80 °C hasta su análisis.

Tanto los extractos polares, como los lipofílicos se reconstituyeron con 200 μL de una mezcla cloroformo/agua (1:1) antes de su análisis. Mientras que en modo negativo ambos extractos se analizaron directamente, en modo positivo se añadió ácido fórmico 0,1% a los extractos polares y 30 mM de acetato amónico a los lipofílicos.

Las condiciones operacionales aparecen en la siguiente tabla.



Condiciones <i>DI-ESI(±)-QTOF-MS</i>		
Flujo	5 µL min ⁻¹	
Tiempo de adquisición	0.2 min (1.005 segundos por escáner)	
Rango masa/carga (m/z)	50-1100	
Gas cortina (N ₂)	1.13 L min ⁻¹	
Gas de nebulucización (N ₂)	1.56 L min ⁻¹	
Temperatura de la fuente	60 °C	
<i>Modo de Adquisición</i>		
	<i>Positivo</i>	<i>Negativo</i>
Voltaje del aerosol iónico (IS)	3500 V	-4000 V
Potencial Declustering (DP)	60 V	-100 V
Potential de focalización (FP)	250 V	-250 V
Energía de iones (IE)	2.0 V	-2.0 V
Canal electrón multiplicador (CEM)	2400 V	2400 V

Tabla 2.3 Condiciones utilizadas para DI-ESI-QTOF-MS.

A partir de los espectros obtenidos mediante infusión directa y utilizando los iones como descriptores, se llevó a cabo un análisis estadístico que permitió identificar las variables (iones) responsables de la discriminación entre grupo control, expuesto a arsénico durante 6 y 12 días. Finalmente, estos metabolitos se identificaron mediante MS/MS utilizando bases de datos de metabolitos. Algunos de ellos se cuantificaron en plasma mediante GC/MS con patrones comerciales, después de su derivatización. Para la extracción de metabolitos a partir de plasma, se mezclaron 100 μL de plasma con 400 μL de una mezcla 1:1 de metanol /etanol en un tubo Eppendorf y se agitó durante 5 min a temperatura ambiente, seguidamente se centrifugó a 4000 g durante 10 min a 4 ° C. El sobrenadante se transfirió a otro vial y se secó bajo corriente de nitrógeno. Todas las muestras secas se derivatizaron con 50 μL de disolución de hidrócloruro de metoxilamina (20 mg mL^{-1} en piridina) a 70 ° C durante 40 min para la proteger los grupos carbonilo por metoximación. Seguidamente se añadieron 50 μL MSTFA (N-metil-Ntrimetilsililtrifluoroacetamida) con 1 % de TMCS (trimetilclorosilano) a 50 ° C durante 40 min consiguiendo



con ello, la derivatización de aminas primarias y los grupos hidroxilo primarios y secundarios en el caso de MTSFA, y de amidas, aminas secundarias y grupos hidroxilos impedidos con TMCS. Finalmente, las muestras derivatizadas se mezclaron en un vortex durante 2 minutos, se centrifugaron a 4.000 g durante 5 min y se analizó el sobrenadante.





3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO I. Especiación química de arsénico en alimentos de origen marino (*Anemonia sulcata*) mediante espectrometría de masas orgánicas e inorgánicas. Estudio de los efectos del cocinado en la interconversión de especies

M. Contreras Acuña, T. García-Barrera, J.L. Gómez-Ariza, "Speciation of arsenic in marine food (Anemonia sulcata) by liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry". J. Chromatogr. A, 1282 (2013) 133-141

En este Capítulo se describe la optimización y aplicación de un método analítico basado en la extracción de especies de arsénico con microondas focalizado y determinación mediante cromatografía de intercambio aniónico y catiónico acopladas a plasma de acoplamiento inductivo con detector de masas (AEC/CEC-ICP-MS). Este método se ha aplicado al estudio de especiación química de arsénico en anémonas de mar (*Anemonia sulcata*), un alimento de origen marino de elevado consumo en Andalucía, especialmente en Huelva y Cádiz, y para el que no existen estudios previos.

Para ello, se compararon tres métodos de extracción de especies de arsénico, basados en el uso del baño de ultrasonidos, sonda de ultrasonidos y microondas focalizado. Estos tres métodos se validaron con un material de referencia (dogfish muscle, DORM-2), así como con anémonas fortificadas con las distintas especies de arsénico (AB, DMA, MA, As^V, As^{III}, TMAO y TETRA), comprobándose que la eficiencia de extracción de arsenobetaína (AB) es mejor con el microondas focalizado y con la sonda de ultrasonidos (85%), mientras que con el baño de ultrasonidos ésta es ligeramente



inferior (80%). Para el resto de las especies de arsénico, los resultados son muy similares y superiores al 80% utilizando sonda de ultrasonidos o microondas focalizado. Asimismo, el tiempo de análisis con la sonda de ultrasonidos y microondas focalizado es muy inferior (3-5 min) al requerido con el baño de ultrasonidos (30 min). Finalmente, se utilizó el microondas focalizado en experiencias posteriores ya que, aunque las características analíticas son muy similares a la sonda de ultrasonidos, se trata de un método automatizado por lo que el análisis se simplifica significativamente. La aplicación de este método al material de referencia permitió comprobar una recuperación de DMA y TETRA de 90 y 95 %, respectivamente. El arsénico total en las muestras se determinó mediante ICP-MS tras una mineralización en microondas utilizando HNO_3 y H_2O_2 .

Para la separación de las especies de arsénico en anémonas de mar, se utilizaron dos mecanismos de separación cromatográfica complementarios, como son la cromatografía de intercambio aniónico y catiónico. Con ello, se consiguió la resolución de AB, DMA, MA, As^{V} , As^{III} , TMAO y TETRA, con dos cromatogramas de 12 minutos. La separación mediante intercambio catiónico permite separar AB, TMAO y TETRA que coeluyen en la aniónica, mientras que ésta permite separar MA y As^{III} , que coeluyen en la catiónica. Asimismo, la combinación de estos dos mecanismos, permite cuantificar DMA ya que éste coeluye con DMAS en la catiónica pero no en la aniónica. El análisis de las muestras mediante AEC/CEC acopladas triple cuadrupolo (QqQ), permitió la identificación de GPAsC y DMAS en las muestras, con lo que por primera vez se consigue identificar un derivado de la AsC en un organismo no expuesto previamente a ésta, y de DMAS en un alimento.

La cuantificación de las especies permitió establecer una concentración media ($n=10$ pool de 20 anémonas) de arsénico



total de 4905 y 1758 ng/g en anémonas crudas y cocinadas, respectivamente, lo que implica que aproximadamente el 64 % del arsénico total se pierde tras el cocinado, del cual, el 90% pasa al aceite utilizado para freirlas. El orden de abundancia de las especies de arsénico en anémonas crudas es: DMA>AB>DMAS>AsC>As^V>TETRA>GPAsC>MA>TMAO, al igual que en las cocinadas, debiendo señalarse que en estas últimas, GPAsC y MA no se detectaron. Por otro lado, como es habitual en alimentos de origen marino, el arsénico inorgánico no representa más del 10% del total (6 y 5% en crudas y cocinadas, respectivamente).



CAPÍTULO II. Metabolitos de arsénico en suero y orina tras el consumo de alimentos de origen marino (*Anemonia sulcata*) y estudio de la bioaccesibilidad de las especies.

M. Contreras Acuña, T. García-Barrera, M.A. García-Sevillano, J.L. Gómez-Ariza, "Arsenic metabolites in human serum and urine after seafood (Anemonia sulcata) consumption and bioaccessibility assesment using liquid chromatography coupled to inorganic and organic mass spectrometry". Microchem. J., 112 (2014) 56-64

En este trabajo se ha aplicado la metodología optimizada y descrita en el capítulo anterior a la especiación de arsénico en suero y orina de voluntarios que consumieron previamente las anémonas de mar. Además, se ha llevado a cabo un estudio de estabilidad de especies de arsénico en extractos, para comprobar la posible interconversión de las mismas, así como un estudio de su bioaccesibilidad en anémonas cocinadas.

El análisis de la estabilidad de las especies de arsénico se llevó a cabo en muestras de orina y suero fortificadas con las distintas especies de arsénico y analizadas durante 2 meses y cada 15 días mediante AEC/CEC-ICP-MS. Se observó que la concentración de AB disminuye ligeramente durante el almacenamiento de las muestras a -80°C, lo cual puede deberse a su transformación en DMA. También se determinaron disminuciones de las concentraciones de MA y DMA tras 45 días, aunque resultaron ser insignificantes. Por el contrario, las concentraciones de As^V aumentan durante el almacenamiento, especialmente en las muestras de orina, mientras que las de As^{III} disminuyen ligeramente. Todo ello pone de manifiesto que durante 2 meses de almacenamiento, aunque se producen interconversiones entre las especies, éstas no son significativas, pero el tiempo de almacenamiento no debe superar



este periodo, y además, es necesario tener en cuenta que el tipo de matriz influye en la estabilidad de las especies.

En este capítulo se analizaron nuevamente muestras de anémonas, que posteriormente se utilizaron para el estudio con voluntarios. La concentración total media (n=12 anémonas) de arsénico en las mismas es de 12,20 y 6,62 $\mu\text{g/g}$ en anémonas crudas y cocinadas, respectivamente. Como puede observarse, las concentraciones son superiores a las descritas en el Capítulo I, lo cual puede explicarse por la diferente concentración de arsénico en el agua en que éstas habitaban en el momento de su captura. Se comprobó, que el 54% del arsénico en anémonas crudas se pierde tras el cocinado, frente a un 64 % descrito en el capítulo anterior. El orden de abundancia de especies de arsénico en las anémonas cocinadas de este estudio es: AB (48% of total As)>DMA (26%)>DMAS(12%)>AsC(5%)>TETRA(4%)>TMAO(2%)>As^V>GPAsC>MA>DMAE. Como puede observarse, aunque DMA y MA son especies poco abundantes en alimentos de origen marino, en anémonas, DMA es una de las especies predominantes. Del estudio de bioaccesibilidad realizado puede concluirse que el 95% del arsénico total presente en anémonas cocinadas es bioaccesible tras una digestión gastrointestinal *in vitro*, siendo las especies más bioaccesibles As^V y MA, que presentan porcentajes superiores al 100% indicando la conversión de otras especies en éstas.

Para este estudio se seleccionaron 5 individuos a los que se les analizó la orina y la sangre antes y después del consumo de 100 g de anémonas de mar, previamente analizadas. Antes del consumo, los análisis de orina se repitieron hasta que la concentración de arsénico fue mínima y constante, y durante el experimento, los voluntarios no consumieron otros alimentos de origen marino. Los voluntarios consumieron las anémonas por la mañana y se analizaron todas las muestras de orina de los cinco voluntarios hasta las 90 h siguientes a su consumo. Las muestras de sangre se



recogieron inmediatamente después del consumo y cada media hora, hasta transcurridas dos horas desde el inicio del experimento. Las concentraciones de arsénico en orina se normalizaron con la concentración de creatinina para evitar sesgos debidos a la diferencia en actividad renal de los voluntarios. La especiación de arsénico en muestras de orina mediante CEC-ICP-MS y –QqQ permitió identificar DMAE en las mismas, lo cual puede explicarse por su presencia en las anémonas utilizadas en este estudio, ya que en la bibliografía se ha detectado esta especie tras el consumo de arsenoazúcares en alimentos de origen marino, que en este caso no se detectaron en las anémonas. Antes del consumo de las anémonas AB y DMA son los metabolitos principales en orina, como ya han comprobado otros autores. En este estudio no se observaron grandes diferencias entre los distintos individuos y se comprobó que transcurridas 10 h del consumo, la abundancia de las especies en orina sigue el orden: AB~DMA >AsC>TETRA>TMAO>MA>As^V>DMAE, mientras que en las anémonas cocinadas analizadas sigue el orden: AB>DMA>DMAS>AsC>TETRA>TMAO>As^V>GPAsC>MA>DMAE. Así, la especie dominante en orina tras 20 h después del consumo es AB con una media de AB excretada en este periodo de 140 µg de As/g de creatinina, lo que representa el 40 % de la AB total en la anémona cocinada, y la concentración decrece hasta 23 µg de As/g de creatinina después de 80 h (88% de la AB total en anémonas cocinadas se excreta en 90 h). Estos datos concuerdan con otros que se han publicado previamente, en los que se estableció que en 36 h se eliminaba el 66% de la AB presente en gambas. También se ha comprobado en estudios previos que la AsC puede convertirse en AB, MA y DMA, siendo inexistente o despreciable la cantidad transformada en arsénico inorgánico. Por otro lado, en este trabajo se demuestra que el DMA no se elimina completamente del cuerpo, como ya han descrito otros autores. Alrededor del 130% de DMA presente en las ortiguillas, se excreta por la orina en 90 h



(408 μg de As/g de creatinina), lo cual puede explicarse por la conversión de otras especies en DMA, como el DMAS, el cual está presente en orina y no en las anémonas analizadas en este estudio. Otras especies de arsénico son menos abundantes en orina, especialmente As^{V} , MA y DMAE. Unas especies de arsénico se eliminan rápidamente, como AsC , TETRA, TMAO y As^{V} o progresivamente como MA y DMAE. En este estudio se demuestra que el 89 y el 93 % del TMAO y TETRA, respectivamente, presentes en las anémonas cocinadas, se eliminan en 10-30 h sin transformación.

En relación con las muestras de suero analizadas, sólomente se detectaron AB, As^{V} , MA, DMA y AsC . Transcurridas 30 h desde el consumo de las anémonas, la especie predominante en suero es DMA, seguida de AB, MA y AsC . Después de este periodo, y durante 2 h, la cantidad de AsC en suero es constante, pero la concentración de otras especies aumenta progresivamente, mientras que el As^{V} sólo se detecta después de 1 h. Este último hecho puede explicarse según la bibliografía, porque tras la absorción del As^{V} por el tracto gastrointestinal, éste se reduce rápidamente a As^{III} , el cual cruza rápidamente las membranas celulares a pH fisiológico, para finalmente metilarse y oxidarse.

Finalmente, podemos concluir que aproximadamente el 54% del arsénico total en las anémonas de mar se pierde tras el cocinado, que sobre el 95% presente en las anémonas cocinadas es bioaccesible, y que transcurridas 10 h desde su consumo, se elimina el 85% a través de la orina.



CAPÍTULO III. Estudio metabolómico en plasma, hígado y riñón del ratón de laboratorio *Mus musculus* expuesto a arsénico.

M.A. García-Sevillano, M. Contreras Acuña, T. García-Barrera, J.L. Gómez-Ariza, "Metabolomic study of plasma, liver and kidney of mice exposed to inorganic arsenic based on mass spectrometry". Anal. Bioanal. Chem. (2014) DOI: 10.1007/s00216-013-7564-z

Puesto que el mecanismo de acción tóxica del arsénico no está en la actualidad suficientemente claro, en este capítulo se describe el estudio de la respuesta biológica del ratón de laboratorio *Mus musculus* expuesto a arsénico inorgánico. Para ello, como se ha descrito previamente en el apartado "Procedimientos" de esta Tesis, se tomaron 32 ratones de siete semanas de edad, alimentados *ad libitum* con un pienso que contiene < 0.35 µg/g de As. Los ratones se dividieron en dos grupos, uno de ellos utilizado como control, mientras que al otro grupo se le suministró una dosis oral diaria de As^{III} (como As₂O₃) de 3 mg/kg de peso corporal. Los ratones se sacrificaron a los 6 y 12 días, para poder establecer comparaciones. Posteriormente se extrajeron el hígado y riñón, por ser los órganos metabólicamente más activos, y el plasma. A partir de las muestras, se prepararon dos tipos de extractos para el análisis metabolómico, uno de ellos polar y otro apolar. Finalmente, estos extractos se analizaron mediante infusión directa a un triple cuadrupolo tiempo de vuelo con fuente de electrospray, y utilizando los modos de ionización positivo y negativo (DI-ESI(±)-QTOF-MS). A partir de los espectros obtenidos mediante infusión directa y utilizando los iones como descriptores, se llevó a cabo un análisis estadístico que permitió identificar las variables (iones) responsables de la discriminación entre grupo control, expuesto a arsénico durante 6 días y durante 12 días.



Finalmente, estos metabolitos se identificaron mediante MS/MS y bases de datos. A partir de estos datos se detectaron alteraciones en el metabolismo de la energía, aminoácidos, degradación de los fosfolípidos de la membrana, ciclo de degradación de la colina y ciclo de la metionina, así como apoptosis y aumento del riesgo vascular. Algunos de estos metabolitos se cuantificaron posteriormente en plasma mediante GC/MS con patrones comerciales, después de su derivatización.

Se comprobó que los metabolitos intermediarios en el metabolismo de la energía, como la glucosa, gliceraldehído-3-fosfato, piruvato y ácido cítrico, se alteran tras la exposición a arsénico inorgánico. Los niveles de estos metabolitos disminuyen con la exposición a As en hígado y plasma. En plasma, se comprobó por GC-MS que el ácido láctico y alanina disminuyen en los ratones expuestos, mientras que aumentan las concentraciones de ácido isocítrico, α -cetoglutarato, ácido glutámico y ácido cítrico. Este hecho puede relacionarse con alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos y con el agotamiento de la glucosa, como ya han señalado otros autores en relación a la exposición a arsénico inorgánico. La disminución de piruvato en hígado de los ratones expuestos, el cual es un producto final del ciclo de la glicolisis, también confirma este hecho. Por otro lado, en el ciclo de Krebs, el acetil-CoA transforma los átomos de carbono del grupo acetilo en ácido cítrico, el cual se oxida para producir energía. En este estudio se ha detectado un aumento de ácido cítrico conforme aumenta la exposición a arsénico en hígado, riñón y plasma. También se han observado en hígado y plasma, aumentos en la concentración de lípidos (ácidos grasos libres, triacilglicerol, diacilglicerol y lisofosocolinas) como resultado de la apoptosis inducida por el arsénico. Por otra parte, se han observado incrementos de carnitina y acetilcarnitina en plasma. Este hecho se explica porque la carnitina se requiere para transportar ácidos grasos desde el



citosol hasta la mitocondria durante la ruptura de lípidos para la generación de energía metabólica por β -oxidación.

Los ratones expuestos a arsénico también mostraron alteraciones en el metabolismo de los aminoácidos como disminuciones en los niveles de arginina en hígado, riñón y plasma, la cual presenta actividad antioxidante. Se observaron también aumentos en los niveles de cisteína y ácido glutámico en hígado y plasma, y disminuciones correlativas de glutatión reducido, el cual puede sintetizarse a partir de los primeros y es un antioxidante que protege a la célula de radicales libres que pueden ser importantes contra la carcinogénesis provocada por el As, debido a su actividad como dador de electrones en la metilación del arsénico. Por otro lado, se sabe que el As^{III} inhibe la actividad de la encima GSSG reductasa. Además, la metionina, que está implicada en la síntesis de cisteína, carnitina, taurina, lecitina, fosfatidilcolina y otros fosfolípidos aumenta en hígado, riñón y plasma, lo cual se explicaría por el hecho de que la metionina interviene en la metilación del arsénico, convirtiéndose en S-adenosilmetionina que dona el grupo metilo al arsénico.

Se detectaron también niveles elevados de colina y fosforilcolina en hígado y plasma, los cuales pueden estar relacionados con la ruptura de la membrana celular inducida por el arsénico. Asimismo, se detectaron aumentos en los niveles de ácidos grasos libres como el araquidónico pipecólico, oleico, linoléico, gamma-linoléico, docosahexanóico, piranárico y ácido láurico, que son productos de degradación de las fosfatidilcolinas, las cuales son mayoritarias en los fosfolípidos de las membranas celulares. Por otro lado, la degradación de los fosfolípidos de las membranas celulares conllevan una acumulación de colina en plasma y tejidos, produciéndose perturbaciones en el ciclo de la colina, que en nuestro estudio se observan por el aumento de betaína aldehído en riñón, la cual es un intermediario en la oxidación de la colina en



betaína, y ésta una fuente de grupos metilo para el arsénico, la cual aumenta en hígado. También se detectaron cambios en los niveles de taurina en hígado, riñón y plasma la cual interviene en la conjugación de ácidos biliares, actúa como antioxidante, estabilizador de membrana, modulación de la señalización del calcio y osmoregulación.

Finalmente, este estudio también pone de manifiesto el incremento de di- y triglicéridos en plasma e hígado de ratones expuestos, lo cual unido al ya comentado aumento de ácidos grasos, puede relacionarse con hiperlipidemia, que constituye uno de los factores de riesgo vasculares más importantes.





CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en la presente memoria se pueden extraer las siguientes conclusiones generales:

- 1) Se ha desarrollado un método analítico basado en la extracción de especies de arsénico con microondas focalizado. Este método se ha aplicado satisfactoriamente a muestras de alimentos de origen marino (*Anemonia sulcata*), y es simple, automatizado, con tiempos cortos de análisis (5 min) y recuperaciones para AB, TETRA y DMA del 85, 90 y 95%, respectivamente.
- 2) Se ha optimizado un método de separación cromatográfica de especies de arsénico basado en el uso combinado de la cromatografía de intercambio aniónico y catiónico. Con ello, se consiguió la resolución de AB, DMA, MA, As^V, As^{III}, TMAO y TETRA, con dos cromatogramas de 12 minutos. Estas columnas cromatográficas se han acoplado a un ICP-MS permitiendo una detección sensible y selectiva de las especies de arsénico.
- 3) El análisis de las muestras mediante AEC/CEC acopladas triple cuadrupolo (QqQ), permitió la identificación de GPAsC y DMAS en anémonas de mar, con lo que por primera vez se consigue identificar un derivado de la AsC en un organismo no expuesto previamente a ésta, y de DMAS en un alimento.
- 4) Se ha comprobado que entre el 54 y el 64 % del arsénico total se pierde tras el cocinado, del cual, el 90% pasa al aceite utilizado.
- 5) El orden de abundancia de las especies de arsénico en anémonas crudas es: DMA~AB>DMAS>AsC. El orden de abundancia del resto de las especies se altera ligeramente



al analizar muestras tomadas en momentos y sitios diferentes.

- 6) Como es habitual en alimentos de origen marino, el arsénico inorgánico no representa más del 10% del total (6 y 5% en anémonas crudas y cocinadas, respectivamente).
- 7) El estudio de estabilidad de especies de arsénico en fluidos biológicos pone de manifiesto la ausencia de interconversiones significativas durante un periodo máximo de 2 meses, no obstante, la estabilidad depende de la matriz de la muestra.
- 8) El 95% del arsénico total presente en anémonas cocinadas es bioaccesible tras una digestión gastrointestinal *in vitro*, siendo las especies más bioaccesibles As^{V} y MA, que presentan porcentajes superiores al 100% indicando la conversión de otras especies en éstas.
- 9) Se ha aplicado la metodología descrita a la especiación de arsénico en suero y orina de voluntarios que consumieron previamente las anémonas de mar. Se comprobó que transcurridas 10 h del consumo, la abundancia de las especies en orina sigue el orden: $\text{AB} \sim \text{DMA} > \text{AsC} > \text{TETRA} > \text{TMAO} > \text{MA} > \text{As}^{\text{V}} > \text{DMAE}$, siendo la especie dominante en orina tras 20 h después del consumo AB, lo que representa el 40 % de la AB total en la anémona cocinada (88% de la AB total en anémonas cocinadas se excreta en 90 h).
- 10) Alrededor del 130% de DMA presente en las anémonas de mar, se excreta por la orina en 90 h, lo cual puede explicarse por la conversión de otras especies en DMA, como el DMAS, el cual está presente en orina y no en las anémonas analizadas en este estudio.
- 11) En las muestras de suero, sólo se detectaron AB, As^{V} , MA, DMA y AsC. Transcurridas 30 h desde el consumo de las anémonas, la especie predominante en suero es DMA,



- seguida de AB, MA y AsC, mientras que el As^{V} sólo se detecta después de 1 h. Este último hecho puede explicarse
- 12) según la bibliografía, porque tras la absorción del As^{V} por el tracto gastrointestinal, éste se reduce rápidamente a As^{III} , el cual cruza rápidamente las membranas celulares a pH fisiológico, para finalmente metilarse y oxidarse.
- 13) El estudio metabólico del organismo modelo *Mus musculus* expuesto a arsénico inorgánico muestra que éste provoca alteraciones en el metabolismo de la energía, aminoácidos, degradación de los fosfolípidos de la membrana, ciclo de degradación de la colina y ciclo de la metionina, así como apoptosis y aumento del riesgo vascular.







BIBLIOGRAFÍA

1. Harper, M., 1988. Occupational health aspects of arsenic extractive industry in Britain. Br. J. Indust. Med. 45, 602-605.
2. Polmer, I.J., 1998. Metallurgy of the elements, in Chemistry of Arsenic, Antimony, Bismuth. Ed. Norman, N.C., Chapman & Hall, London. 39-63.
3. Enseñanza de la física y la química, educación secundaria.2012.
<http://www.heurema.com/Origenes/Origenes2-As/ARS%C9NICO.pdf>.
4. Nriagu, J.O., 2002. Arsenic Poisoning Through Ages, en Environmental Chemistry of arsenic. Ed. Frankenberger, W.T. Marcel Dekker, Inc., New York, 1-26.
5. Frost, D. V., 1984. What is in a name? Sci. Tot. Environmen. 35, 1-6.
6. International Programme on Chemical Safety, 2005. Environment Health Criteria 224: Arsenic and arsenic compounds.
<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc224.htm#2.0>
7. Enciclopedia libre wikipedia 2012. Arsénico.
<http://es.wikipedia.org/wiki/Ars%C3%A9nico>
8. Environmental Health Update (Sustainable Development and Healthy Environments) Vol 4, No. 1. January 2009. OMS (Organización Mundial de la Salud).



9. Francesconi, K.A., Kuehnelt, D., 2002. Arsenic Compounds in the environment. *Environment Chemistry of Arsenic*. Ed. Frankenberger, W.T. Marcel Dekker, Inc., New Yprk, 51-94.
10. Francesconi, K.A., Kuehnelt D., 2004. Determination of arsenic species: A critical review of methods and applications, 2000–2003. *The Analyst*. 129, 373–395.
11. Wallschläger D., London J., 2008. Determination of Methylated Arsenic-Sulfur Compounds in Groundwater. *Environ. Sci. Technol.* 42, 228–234.
- 11.b Edmonds, J.S., Francesconi, K.A., 1987. Transformation of arsenic in the marine environment. *Experntia* 43, 553-557.
12. Hasegawa, H., et al., 2001. Biosynthesis and release of methylarsenic compounds during the growth of freshwater algae. *Chemosphere* 43, 265–272.
13. Aurilio, A.C., et al., 1994. Speciation and fate of arsenic in three lakes of the Aberjona watershed. *Environ. Sci. Technol.* 28, 577–585.
14. Sohrin, Y., et al., 1997. Arsenic biogeochemistry affected by eutrophication in Lake Biwa, Japan. *Environ. Sci. Technol.* 31, 2712–2720.
15. Hellweger, F.L., Lall, U., 2004. Modeling the effect of algal dynamics on arsenic speciation in lake Biwa. *Environ. Sci. Technol.* 38, 6716–6723.
16. Kuroiwa, T., et al., 1994. Biomethylation and biotransformation of arsenic in a freshwater foodchain: Green alga (*Chlorellavulgaris*) shrimp (*Neocaridina denticulata*) killifish (*Oryzias iatipes*). *Appl. Organometal. Chem.* 8, 325–333.
17. Rahman, M.A., Hasegawa, H., Lim, R.P. 2012. Bioaccumulation, biotransformation and trophic transfer of



- arsenic in the aquatic food chain. *Environmental Research* 116, 118–135.
18. Knauer, K., et al., 1999. Toxicity of inorganic and methylated arsenic to algal communities from lakes along an arsenic contamination gradient. *Aquat. Toxicol.* 46, 221–230.
 19. Murray, L.A., et al., 2003. Biotransformation of arsenate to arsenosugars by *Chlorella vulgaris*. *Appl. Organometal. Chem.* 17, 669–674.
 20. Mass, M.J., et al., 2001. Methylated trivalent arsenic species are genotoxic. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 355–361.
 21. Petrick, J.S., et al., 2000. Monomethylarsonous acid (MMAIII) is more toxic than arsenite in Chang human hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 163, 203–207.
 22. Dopp, E., et al., 2010. Cellular uptake, subcellular distribution and toxicity of arsenic compounds in methylating and non-methylating cells. *Environ. Res.* 110, 435–442.
 23. Thomas D.J., 2007. Molecular processes in cellular arsenic metabolism. *Toxicology and Applied Pharmacology* 222, 365–373.
 24. Mass MJ, Tennant A, Roop BC, Cullen WR, Styblo M, Thomas DJ, et al. Methylated trivalent arsenic species are genotoxic. *Chem Res Toxicol* 2001;14:355–61.
 25. Hellweger, F.L., et al., 2003. Greedy algae reduce arsenate. *Limnol. Oceanogr.* 48, 2275–2288.
 26. Sanders, J.G., 1979. Microbial role in the demethylation and oxidation of methylated arsenicals in seawater. *Chemosphere* 8, 135–137.



27. Maki, T., et al., 2006. Isolation of monomethylarsonic acid-mineralizing bacteria from arsenic contaminated soils of Ohkunoshima Island. *Appl. Organometal. Chem.* 20, 538–544.
28. Henry, T.R., 2003. Technical Summary of Information Available on the Bioaccumulation of Arsenic in Aquatic Organisms. Office of Science and Technology Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, pp. 42.
29. Suhendrayatna, et al., 2002. Studies on the accumulation and transformation of arsenic in freshwater organisms II. Accumulation and transformation of arsenic compounds by *Tilapia mossambica*. *Chemosphere* 46, 325–331.
30. Suhendrayatna, A.O., Maeda, S., 2001. Biotransformation of arsenite in freshwater food chain models. *Appl. Organometal. Chem.* 15, 277–284.
31. Maeda, S., et al., 1990. Transformation of arsenic compounds in a freshwater food chain. *Appl. Organometal. Chem.* 4, 251–254.
32. Maeda, S., et al., 1992. Bioaccumulation of arsenic and its fate in a freshwater food chain. *Appl. Organometal. Chem.* 6, 213–219.
33. Maeda, S., et al., 1993. Arsenic metabolism in a freshwater food chain: Blue-green alga (*Nostoc* sp.) shrimp (*Neocaridina denticulata*) carp (*Cyprinus carpio*). *Appl. Organometal. Chem.* 7, 467–476.
34. Howard, A.G., et al., 1995. Arsenic speciation and seasonal changes in nutrient availability and micro-plankton abundance in Southampton water, U.K. *Estuarine. Coastal Shelf Sci.* 40, 435–450.



35. Sanders, J.G., Osman, R.W., 1985. Arsenic incorporation in a salt marsh ecosystem. *Estuarine Coastal Shelf Sci.* 20, 387–392.
36. Anderson, L.C.D., Bruland, K.W., 1991. Biogeochemistry of arsenic in natural waters: the importance of methylated species. *Environ. Sci. Technol.* 25, 420–427.
37. Hasegawa, H., Matsui, M., Okamura, S., Hojo, M., Iwasaki, N., Sohrin, Y. 1999. Arsenic speciation including “hidden” arsenic in natural waters. *Appl. Organomet. Chem.* 13, 113–119.
38. Bente, R., Chasteen, T.G., 2002. Microbial methylation of metalloids: arsenic, antimony, and bismuth. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 250–271
39. Meyer, J., et al., 2008. Volatilisation of metals and metalloids: An inherent feature of methanoarchaea? *Syst. Appl. Microbiol.* 31, 81–87.
40. Fricke, M.W., et al., 2005. Chromatographic separation and identification of products from the reaction of dimethylarsinic acid with hydrogen sulfide. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 1821–1829.
41. Wallschläger, D., Staley, C.J., 2007. Determination of (oxy) thioarsenates in sulfidic waters. *Anal. Chem.* 79, 3873–3880
42. Wallschläger D., London J., 2008. Determination of Methylated Arsenic-Sulfur Compounds in Groundwater. *Environ. Sci. Technol.* 42, 228–234
43. Suzuki, K.T., et al., 2004. Dimethylthioarsenicals as arsenic metabolites and their chemical preparations. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 914–921.



44. Hansen, H.R., et al., 2004. Sulfur-containing arsenical mistaken for dimethylarsinous acid [DMA(III)] and identified as a natural metabolite in urine: Major implications for studies on arsenic metabolism and toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 1086–1091.
45. Raml, R., et al., 2007. Thio-dimethylarsinate is a common metabolite in urine samples from arsenic-exposed women in Bangladesh. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 222, 374–380.
46. Naranmandura H, Suzuki N, Suzuki KT. 2006. Trivalent arsenicals are bound to proteins during reductive methylation. *Chem Res Toxicol* 19, 1010–1018.
47. Kubachka, K.M., et al., 2009. Exploring the in vitro formation of trimethylarsine sulfide from dimethylthioarsinic acid in anaerobic microflora of mouse cecum using HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MS. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 239, 137–143.
48. Pinyayev, T.S., et al., 2011. Preabsorptive metabolism of sodium arsenate by anaerobic microbiota of mouse cecum forms a variety of methylated and thiolated arsenicals. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 475–477.
49. Edmonds, J.S., Francesconi, K.A., 1981. Arseno-sugars from brown kelp (*Ecklonia radiata*) as intermediates in cycling of arsenic in a marine ecosystem. *Nature* 289, 602–604.]
50. Francesconi, K.A., Edmonds, J.S., 1993. Arsenic in the sea. In: Ansell, A.D., et al. (Eds.), *Oceanography and Marine Biology. An Annual Review*. UCL Press, London, pp. 111–151
51. Francesconi, K.A., Edmonds, J.S., 1996. Arsenic and marine organisms. In: Sykes, A.G. (Ed.), *Advances in Inorganic Chemistry*. Academic Press, pp. 147–189
52. Francesconi, K.A., et al., 1991. Arsenic-containing ribosides from the brown alga *Sargassum lacerifolium*: X-ray molecular



- structure of 2-amino-3-[5[prime or minute]-deoxy-5[prime or minute]-(dimethylarsinoyl)ribose]oxy]propane-1-sulphonic acid. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 2707–2716.
53. Edmonds, J.S., Francesconi, K.A., 2003. Organoarsenic compounds in the marine environment. In: Vraig, P.J. (Ed.), *Organometallic Compounds in the Environment*. Wiley, West Sussex, England, pp. 196–222
54. Sanders, J.G., Windom, H.L., 1980. The uptake and reduction of arsenic species by marine algae. *Estuarine Coastal Mar. Sci.* 10, 555–567.
55. Andreae, M.O., Klumpp, D.W., 1979. Biosynthesis and release of organoarsenic compounds by marine algae. *Environ. Sci. Technol.* 13, 738–741
56. Klumpp, D.W., 1980. Characteristics of arsenic accumulation by the seaweeds *Fucus spiralis* and *Ascophyllum nodosum*. *Mar. Biol.* 58, 257–264.
57. Klumpp, D., Peterson, P., 1981. Chemical characteristics of arsenic in a marine food chain. *Mar. Biol.* 62, 297–305.
58. Francesconi, K.A., et al., 1998. A novel arsenic containing riboside (arsenosugar) in three species of gastropod. *Sci. Total Environ.* 221, 139–148.
59. Edmonds, J.S., et al., 1982. Isolation and crystal structure of an arsenic-containing sugar sulphate from the kidney of the giant clam, *Tridacna maxima*. X-ray crystal structure of (2S)-3-[5-deoxy-5-(dimethylarsinoyl)-BD-ribofuranosyloxy]-2-hydroxypropyl hydrogen sulphate. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 2989–2993.
60. Edmonds, J.S., Francesconi, K.A., 1983. Arsenic-containing ribofuranosides: isolation from brown kelp *Ecklonia radiata*



- and nuclear magnetic resonance (N.M.R.) spectra. Journal of the Chemical Society. Perkin Trans. 1, 2375–2382.
61. Cooney, R.V., Benson, A.A., 1980. Arsenic metabolism in *Homarus americanus*. Chemosphere 9, 335–341.
 62. Edmonds, J., et al., 1987. Isolation and identification of arsenic-containing ribofuranosides and inorganic arsenic from Japanese edible seaweed *Hizikia fusiforme*. Journal of the Chemical Society. Perkin Trans. 1, 577–580.
 63. Francesconi, K.A., et al., 1992. Arsenic compounds from the kidney of the giant clam *Tridacna maxima*: isolation and identification of an arsenic-containing nucleoside. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 1349–1357.
 64. Le, X.C., et al., 1994b. Human urinary arsenic excretion after one-time ingestion of seaweed, crab, and shrimp. Clin. Chem. 40, 617–624.
 65. Hanaoka, K., et al., 1995. Degradation of arsenobetaine to inorganic arsenic by bacteria in seawater. Hydrobiologia 316, 75–80.
 66. Ochsenkühn-Petropulu, M., et al., 1997. Speciation of arsenobetaine in marine organisms using a selective leaching/digestion procedure and hydridegeneration atomic absorption spectrometry. Anal. Chim. Acta. 337, 323–327.
 67. Goessler, W., et al., 1998. Arsenobetaine and other arsenic compounds in the National Research Council of Canada Certified Reference Materials DORM 1 and DORM 2. J. Anal. Atom. Spectrom. 13, 183–187.
 68. Francesconi, K.A., et al., 2000. A new arsenobetaine from marine organisms identified by liquid chromatography–mass spectrometry. Chem. Commun. 2000, 1083–1084.



69. Edmonds, J.S., Francesconi, K.A., 1998. Arsenic metabolism in aquatic ecosystems. In: Langston, W.J., Bebbiano, M. (Eds.), *Metal Metabolism in Aquatic Environments*. Chapman and Hall, London, pp. 159.
70. McSheehy, S., et al., 2002. Characterization of arsenic species in kidney of the clam *Tridacna derasa* by multidimensional liquid chromatography-ICPMS and electrospray time-of-flight tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 74, 2370–2378.
71. Smith, T. J., Crecelius, E. A., and Reading, J. C., 1977. Airborne arsenic exposure and excretion of methylated arsenic compounds. *Environ. Health Perspect.* 19, 89–93.
72. Crecelius, E. A., 1977. Changes in the chemical speciation of arsenic following ingestion by man. *Environ. Health Perspect.* 19, 147–150.
73. Yamauchi, H., and Yamamura, Y. 1979. Dynamic changes of inorganic and methylarsenic compounds in human urine after oral intake of arsenic trioxide. *Indust. Hygiene* 17, 79–83
74. Cullen, W. R., McBride, B. C., and Reglinski, J., 1984. The reduction of trimethylarsine oxide to trimethylarsine by thiols: A mechanistic model for the biological reduction of arsenicals. *J. Inorg. Biochem.* 21, 45–60
75. Cullen, W. R., McBride, B. C., and Reglinski, J., 1984. The reaction of methylarsenicals with thiols: Some biological implications. *J. Inorg. Biochem.* 21, 179–194.
76. Thomas J.D., Styblo M., Lin S., 2001. The Cellular Metabolism and Systemic Toxicity of Arsenic. *Toxicology and Applied Pharmacology* 176, 127–144



77. Scott, N., Hatlelid, K. M., MacKenzie, N. E., and Carter, D. E. (1993). Reaction of arsenic(III) and arsenic(V) species with glutathione. *Chem. Res. Toxicol.* 6, 102–106.
78. Delnomdedieu, M., Basti, M. M., Otvos, J. D., and Thomas, D. J. 1994. Reduction and binding of arsenate and dimethylarsenate by glutathione: A multinuclear magnetic resonance study. *Chem.–Biol. Interact.* 90, 139–155.
79. Delnomdedieu, M., Basti, M. M., Styblo, M., Otvos, J. D., Thomas, D. J., 1994. Complexation of arsenic species in rabbit erythrocytes. *Chem. Res. Toxicol.* 7, 621–627.
80. Delnomdedieu, M., Styblo, M., Thomas, D. J., 1995. Time dependence of accumulation and binding of inorganic and organic arsenic species in rabbit erythrocytes. *Chem.–Biol. Interact.* 98, 69–83
81. Zakharyan R. A., and Aposhian H. V., 1999. Enzymatic reduction of arsenic compounds in mammalian systems: The rate-limiting enzyme of rabbit liver arsenic biotransformation is MMA(V) reductase. *Chem. Res. Toxicol.* 12, 1278–1283
82. Oden, K. L., Gladysheva, T. B., and Rosen, B. P., 1994. Arsenate reduction mediated by the plasmid-encoded ArsC protein is coupled to glutathione. *Mol. Microbiol.* 12, 301–306
83. Sampayo-Reyes, A., Zakharyan, R. A., Healy, S. M., and Aposhian, H. V., 2000. Monomethylarsonic acid reductase and monomethylarsonous acid in hamster tissue. *Chem. Res. Toxicol.* 13, 1181–1186
84. Smith, M. S., Jones, P. R., and Shirachi, D. Y., 1992. The biomethylation of sodium arsenate by rat liver cytosol determined by mass spectroscopy. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 35, 53–55.



85. Hirata, M., Mohri, T., Hisanaga, A., and Ishinishi, N., 1989. Conversion of arsenite and arsenate to methylarsenic and dimethylarsenic compounds by homogenates prepared from livers and kidneys of rats and mice. *Appl. Organomet. Chem.* 3, 335–341.
86. Buchet, J. P., and Lauwerys, R., 1985. Study of inorganic arsenic methylation by rat in vitro: Relevance for the interpretation of observations in man. *Arch. Toxicol.* 57, 125–129.
87. Buchet, J. P., and Lauwerys, R. (1988). Role of thiols in the in vitro methylation of inorganic arsenic by rat liver cytosol. *Biochem. Pharmacol.* 37, 3149–3153.
88. Benramdane, L., Accominotti, M., Fanton, L., Malicier, D., and Vallon, J. J., 1999. Arsenic speciation in human organs following fatal arsenic trioxide poisoning: A case report. *Clin. Chem.* 45, 301–306.
89. Suzuki, T.K., 2005. Metabolomics of arsenic based on speciation studies. *Analytica Chimica Acta* 540, 71–76
90. Hughes, M.F, Devesa, V., Adair B.M., Stybloc, M., Kenyon, E.M., Thomas D.J., 2005. Tissue dosimetry, metabolism and excretion of pentavalent and trivalent monomethylated arsenic in mice after oral administration. *Toxicology and Applied Pharmacology* 208 186– 197.
- 90.b Hughes, M.F., Devesa, V., Adair, B.M., Conklin, S.D., Creed J.T., Styblo M., Kenyon E.M., Thomas D.J. 2008. Tissue dosimetry, metabolism and excretion of pentavalent and trivalent dimethylated arsenic in mice after oral administration. *Toxicology and Applied Pharmacology* 227 26–35
91. Drobná Z., Walton F.S., Harmon A.W., Thomas D.J., Stýblo M., 2010. Interspecies differences in metabolism of arsenic by



- cultured primary hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 245, 47–56.
92. Naranmandura H, Ogra Y, Iwata K, Lee J, Suzuki KT, Weinfeld M, et al. 2009. Evidence for toxicity differences between inorganic arsenite and thioarsenicals in human bladder cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 238,133–40.
93. Marchiset-Ferlay N, Savanovitch C, Marie-Pierre Sauvant-Rochat. (2012) What is the best biomarker to assess arsenic exposure via drinking water? *Environment International* 39 150–171
94. Raber G., Stock N., Pia Hanel a, Murko M., Navratilova J., Francesconi K.A., 2012. An improved HPLC–ICPMS method for determining inorganic arsenic in food: Application to rice, wheat and tuna fish. *Food Chemistry.* 134, 1524–532.
95. Tice, R. R., Yager, J. W., Andrews, P., and Crecelius, E., 1997. Effect of hepatic methyl donor status on urinary excretion and DNA damage in B6C3F1 mice treated with sodium arsenite. *Mutat. Res.* 386, 315–334.
96. Kenyon, E. M., Hughes, M. F., and Levander, O. A. 1997. Influence of dietary selenium on the disposition of arsenate in the female B6C3F1 mouse. *J. Toxicol. Environ. Health* 51, 279–299.
97. Biswas, S., Talukder, G., and Sharma, A.,1999. Prevention of cytotoxic effects of arsenic by short-term dietary supplementation with selenium in mice in vivo. *Mutat. Res.* 441, 155–160.
98. Ueda, H., Kuroda, K., and Endo, G., 1997. The inhibitory effect of selenium on induction of tetraploidy by dimethylarsinic acid in Chinese hamster cells. *Anticancer Res.* 17, 1939–1943.



99. Hsueh, Y.-M., Chiou, H.-Y., Huang, Y.-L., Wu, W.L., Huang, C.-C., Yang, M.-H., Lue, L.-C., Chen, G.-S., and Chen, C.-J., 1997. Serum b carotene level, arsenic methylation capability, and increase in skin cancer. *Cancer Epid. Biomarkers Prevention* 6, 589–596.
100. Hsueh, Y. M., Wu, W. L., Huang, Y. L., Chiou, H. Y., Tseng, C. H., and Chen, C. J., 1998. Low serum carotene level and increased risk of ischemic heart disease related to long-term arsenic exposure. *Atherosclerosis* 141, 249–257.
101. Marchiset-Ferlay N., Savanovitch C., Marie-Pierre Sauvant-Rochat. 2012. What is the best biomarker to assess arsenic exposure via drinking water? *Environment International* 39 150–171.
102. Chin-Hsiao Tseng, 2009. A review on environmental factors regulating arsenic methylation in humans. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 235, 338–350.
103. Hsueh, Y.-M., Cheng, G.-S., Wu, M.-M., Yu, H.-S., Kuo, T.-L., and Chen, C. J., 1995. Multiple risk factors associated with arsenic-induced skin cancer: Effects of chronic liver disease and malnutrition. *Br. J. Cancer* 71, 109–114.
104. Smith, A. H., Arroyo, A. P., Mazumder, D. N. G., Kosnett, M. J., Hernandez, A. L., Beeris, M., Smith, M. M., and Moore, L. E. (2000). Arsenic-induced skin lesions among Atacamen~o people in Northern Chile despite good nutrition and centuries of exposure. *Environ. Health Perspect.* 108, 617–620.
105. Gomez-Rubio P., Roberge J., Arendell L., Harris R.B, O'Rourke M.K., Chen Z., Cantu-Soto E., Meza-Montenegro M.M., Billheimer D., Lu Z., Klimecki W.T., 2011. Association between body mass index and arsenic methylation efficiency in adult women from southwest U.S. and northwest Mexico. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 252, 176–182.



106. Vahter, M., 2000. Genetic polymorphism in the biotransformation of inorganic arsenic and its role in toxicity. *Toxicol. Lett.* 112–113, 209–217.
107. Cuzick, J., Sasieni, P., and Evans, S., 1992. Ingested arsenic, keratoses, and bladder cancer. *Am. J. Epidemiol.* 136, 417–421.
108. Styblo, M., Del Razo, L. M., LeCluyse, E. L., Hamilton, G. A., Wang, C., Cullen, W. R., and Thomas, D. J., 1999. Metabolism of arsenic in primary cultures of human and rat hepatocytes. *Chem. Res. Toxicol.* 12, 560–565.
109. Hopenhayn, C., Huang, B., Christian, J., Peralta, C., Ferreccio, C., Atallah, R., Kalman, D., 2003. Profile of urinary arsenic metabolites during pregnancy. *Environ. Health Perspect.* 111, 1888–1891
110. WHO (World Health Organisation), 2001. Air Quality Guidelines for Europe, 2nd ed. WHO Regional Publications, Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark.
111. Cullen, W.R., Reimer, K. J., 1989. Arsenic especiation in the environment. *Chem. Rev.* 89, 713–764.
112. Bissen, M., Frimmel, F.H, 2003. Arsenic: A review. Part I: occurrence, toxicity, speciation, and mobility. *Acta Hydrochim Hydrobiol.* 31, 9–18.
113. Bissen, M, Frimmel, FH 2003. Arsenic: A review. Part II: oxidation of arsenic and its removal in water treatment. *Acta Hydrochim Hydrobiol.* 31, 97–107.
114. Mandal, B., Suzuki, K., 2002: Arsenic round the world: a review. *Talanta.* 58, 201–235.



115. WHO Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark, 2000, Chapter 6.1
116. Shraim A., et al 2003. Toxicology Letters. 137, 35-48.
117. Moore, J.W., Ramamoorthy, S., 1984. Arsenic, in Heavy metals in natural waters. Applied monitoring and impact assessment. Springer Verlag, New York, 4-22.
118. Thomaidis, N.S., Bakeas, E.B., Siskos, P.A., 2003. Characterization of lead, arsenic and nickel in PM_{2.5} particles in the Athens atmosphere, Greece. Chemosphere. 52 (6), 959-966.
119. Farinha, M.M., Slejkovec, Z., Van eltern, J.T., Wloterbeek, H. Th., Freitas, M.C., 2004. Arsenic speciation in coarse and fine airborne particle, Journal of Atmospheric Chemistry. 49, 343-353.
120. Yang G., Maa L., Xu D., Jie Li , He T., Liu L., Jia H., Zhang Y., Chen Y., Chai Z., 2012. Levels and speciation of arsenic in the atmosphere in Beijing, China. Chemosphere. 87, 845–850.
121. Pinel-Raffaitin, P., Hecho, I.Le., Amouroux, D., Potin-Gautier, M., 2007. Distribution and fate of inorganic and organic arsenic species in landfill leachates and biogases. Environ. Sci. Technol. 41, 4536–4541.
122. Li, Y., Low G. K.-C., Scott J.A, Amal R., 2010. Arsenic speciation in municipal landfill leachate. Chemosphere. 79, 794–801.
123. Smedley, P.L., Kinniburgh, D.G., 2002. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. Appl. Geochem. 17, 517–568.



124. Azcue, J., Nriagu, J., 1995. Impact of abandoned mine tailings on the arsenic concentrations in Moira Lake, Ontario. *J. Geochem. Explor.* 52, 81–89.
125. Ashley, P.M., Lottermoser, B.G., 1999. Arsenic contamination at the Mole River mine, northern New South Wales. *Aust. J. Earth Sci.* 46, 861–874.
126. Azcue, J.M., et al., 1994. Effects of abandoned gold mine tailings on the arsenic concentrations in water and sediments of Jack of Clubs Lake, BC. *Environ. Technol.* 15, 669–678
127. [Hasegawa, H., et al., 2009. Effect of eutrophication on the distribution of arsenic species in eutrophic and mesotrophic lakes. *Sci. Total Environ.* 407, 1418–1425.
128. Hasegawa, H., et al., 2010. Seasonal changes of arsenic speciation in lake waters in relation to eutrophication. *Sci. Total Environ.* 408, 1684–1690.
129. WHO. Environmental health criteria 224, arsenic and arsenic compounds. Inter-organization programme for the sound management of chemicals. Geneva; 2001.
130. Bhattacharya P., Jacks G., Ahmed K.M., Routh J., Khan A.A., 2002 a. Arsenic in groundwater of the Bengal delta plain aquifers in Bangladesh. *Bull Environ Contam Toxicol.* 69, 538–45.
131. Bhattacharya P., Jacks G., Nordqvist S., Mukherjee A.B., 2002b. Metal contamination at a wood preservation site: characterisation and experimental studies on remediation. *Sci Total Environ.* 290 (1–3), 165–80.
132. BGS and DPHE (British Geological Survey and Department of Public Health Engineering). Arsenic contamination of groundwater in Bangladesh. Technical report WC/00/19. UK: Keyworth; 2001.



133. Welch A.H., Stollenwerk K.G., 2003. Arsenic in ground water: geochemistry and occurrence. Norwell, Massachusetts: Kluwer Academic Publishers. P. 475.
134. Naidu R., Bhattacharya P., 2006. Management and remediation of arsenic from contaminated water. In: Naidu R, Smith E, Owens G, Bhattacharya P, Nadebaum P, editors. Managing arsenic in the environment: from soil to human health. Melbourne: CSIRO Publishing. p. 327–50.
135. Bundschuh J., Bhattacharya P., Chandrasekharam D., 2005. Natural arsenic in groundwater: occurrence, remediation and management. London: A.A. Balkema; p. 339].
136. Bhattacharya P., Welch A.H., Stollenwerk K.G., McLaughlin M.J., Bundschuh J., G. Panaullah G., 2007. Arsenic in the environment: Biology and Chemistry. Science of the Total Environment. 379, 109–120.
137. Litter M.I., Armienta M.A., Farías S.S., 2009. IBEROARSEN. Metodologías analíticas para la determinación y especiación de arsénico en aguas y suelos. p 15.
138. Neff, J.M., 1997. Ecotoxicology of arsenic in the marine environment. Environ. Toxicol. Chem. 16, 917–927.
139. Seyler, P., Martin, J.M., 1991. Arsenic and selenium in a pristine river-estuarine system: the Krka (Yugoslavia). Mar. Chem. 34, 137–151.
140. Hasegawa, H., 1996. Seasonal changes in methylarsenic distribution in Tosa Bay and Uranouchi Inlet. Appl. Organometal. Chem. 10, 733–740.
141. Larsen E.H., Quézel C.R., Muñoz R., Fiala-Medioni A., Donard O.F.X., 1997. Arsenic speciation in shrimp and mussel from



- the Mid-Atlantic hydrothermal vents. *Marine Chemistry* 57, 341-346.
142. Irgolic K.J., Goessler W., Kuehnelt D., 1999. Arsenic Compounds in Terrestrial Biota. *Arsenic Exposure and Health Effects III*. 61-68.
143. [158] Kuehnelt D, Goessler W, Irgolic K.J. 1997. Arsenic compounds in terrestrial organisms I: *Collybia maculata*, *Collybia butyracea* and *Amanita muscaria* from arsenic smelter sites in Austria. *Appl Organomet Chem*; 11, 289–96.
144. Larsen E.H., Hansen M., Goessler W., 1998. Speciation and health risk considerations of arsenic in the edible mushroom *Laccaria amethystina* collected from contaminated and uncontaminated locations. *Appl Organomet Chem*; 12, 285–91.
145. Zhao R., Zhao M., Wang H., Taneike Y., Zhang X., 2006. Arsenic speciation in moso bamboo shoot — A terrestrial plant that contains organoarsenic species. *Science of the Total Environment*. 371, 293–303
146. Jedynak L., Kowalska J., Harasimowicz J., Golimowski J., 2009. Speciation analysis of arsenic in terrestrial plants from arsenic contaminated area. *Science of the total environment*. 407, 945-952.
147. Abedin MJ, Cresser MS, Meharg AA, Feldmann J, Cotter-Howells J. 2002. Arsenic accumulation and metabolism in rice (*Oryza sativa* L.). *Environ Sci Technol*. 36, 962–8.
148. Yuan CG, Jiang GB, He B. 2005. Evaluation of the extraction methods for arsenic speciation in rice straw, *Oryza sativa* L., and analysis by HPLC-HG-AFS. *J Anal At Spectrom*. 20, 103–10.



149. Ma, L.Q., Komar, Tu C., Zhang W., Cai Y., Kennelley E.D., 2001. A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature* 409, 579.
150. Francesconi K.A., Visoottivesich P., Sridokchan W., Goessler W., 2002. Arsenic species in an arsenic hyperaccumulating fern, *Pytyrogramma calomelanos*. *Sci. Total Environ.* 1, 27-35.
151. Narukawa T., Hioki A., Chiba K., 2012. Speciation and Monitoring Test for Inorganic Arsenic in White Rice Flour. *J. Agric.Food Chem.* 60, 1122–1127.
152. de la Calle M.B., Emteborg H., Linsinger T.P.J., R. Montoro R., Sloth J.J., Rubio R., Baxter M.J., Feldmann J., Vermaercke P., Raber G., 2011. Does the determination of inorganic arsenic in rice depend on the method?, *Trends in Analytical Chemistry.* vol 30, 641-651.
153. Liao C.H., Lin T.L., Hsieh N.H., Chen W.Y., 2010. Assessing the arsenic-contaminated rice (*Oryza sativa*) associated children skin lesions. *Journal of Hazardous Materials* 176, 239–251.
154. Sun, G.X., Williams P.N., Zhu Y.G., Deacon C., Carey A.M., Raab A., Feldmann J., Meharg A.A. 2009. Survey of arsenic and its speciation in rice products such as breakfast cereals, rice crackers and Japanese rice condiments. *Environ Int.* 35, 473-475.
155. Nachman K.E., Raber G., Francesconi K.A., Navas-Acien A., Love D.C., 2012. Arsenic species in poultry feather meal. *Science of the Total Environment.* 417-418: 183–188.
156. Hasegawa, H., et al., 2001. Biosynthesis and release of methylarsenic compounds during the growth of freshwater algae. *Chemosphere* 43, 265–272.
157. Edmonds, J.S., et al., 1997. Arsenic transformations in short marine food chains studied by HPLC-ICP MS. *Appl. Organometal. Chem.* 11, 281–287.



158. Sharma, V.K., Sohn, M., 2009. Aquatic arsenic: Toxicity, speciation, transformations, and remediation. *Environ. Int.* 35, 743–759.
159. Maher, W.A., et al., 2011. Arsenic distribution and species in two *Zostera capricorni* seagrass ecosystems, New South Wales, Australia. *Environ. Chem.* 8, 9–18.
160. Yamaoka, Y., et al., 1999. Effect of glutathione on arsenic accumulation by *Dunaliella salina*. *Appl. Organometal. Chem.* 13, 89–94.
161. Levy, J.L., et al., 2005. Toxicity, biotransformation, and mode of action of arsenic in two freshwater microalgae (*Chlorella* sp. and *Monoraphidium arcuatum*). *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 2630–2639.
162. Takimura, O., et al., 1996. Uptake and reduction of arsenate by *Dunaliella* sp. *Appl. Organometal. Chem.* 10, 753–756.
163. Cullen, W.R., et al., 1994. Bioaccumulation and excretion of arsenic compounds by a marine unicellular alga, *polyphysa peniculus*. *Appl. Organometal. Chem.* 8, 313–324.
164. Pawlik-Skowronska, B., et al., 2004. Arsenic availability, toxicity and direct role of GSH and phytochelatins in As detoxification in the green alga *Stichococcus bacillaris*. *Aquat. Toxicol.* 70, 201–212.
165. Koch, I., et al., 2000. The predominance of inorganic arsenic species in plants from yellowknife, northwest territories, anada. *Environ. Sci. Technol.* 34, 22–26.
166. Reuther, R., 1992. Arsenic introduced into a littoral freshwater model ecosystem. *Sci. Total Environ.* 115, 219–237.



167. Milton, A., Johnson, M., 1999. Arsenic in the food chains of a revegetated metalliferous mine tailings pond. *Chemosphere* 39, 765–779.
168. Foster, S., et al., 2005. Distribution and speciation of arsenic in temperate marine saltmarsh ecosystems. *Environ. Chem.* 2, 177–189.
169. Lafabrie, C., et al., 2011. Arsenic and mercury bioaccumulation in the aquatic plant, *Vallisneria neotropicalis*. *Chemosphere* 82, 1393–1400.
170. Peng, K., et al., 2008. Bioaccumulation of heavy metals by the aquatic plants *Potamogeton pectinatus* L. and *Potamogeton malaianus* Miq. and their potential use for contamination indicators and in wastewater treatment. *Sci. Total Environ.* 392, 22–29.
171. Morita, M., Shibata, Y., 1990. Chemical form of arsenic in marine macroalgae. *Appl. Organometal. Chem.* 4, 181–190.
172. Andreae, M.O., 1978. Distribution and speciation of arsenic in natural waters and some marine algae. *Deep Sea Res.* 25, 391–402.
173. Thomson, D., et al., 2007. Arsenic and selected elements in inter-tidal and estuarine marine algae, south-east coast, NSW, Australia. *Appl. Organometal. Chem.* 21, 396–411.
174. Sanders, J.G., 1979. The concentration and speciation of arsenic in marine macro- algae. *Estuarine Coastal Mar. Sci.* 9, 95–99.
175. Vivian, W.M.L., et al., 1997. The characterization of arsenosugars in commercially available algal products including a *Nostoc* species of terrestrial origin. *Appl. Organometal. Chem.* 11, 797–803.



176. Kaise, T., et al., 1997. Biomethylation of arsenic in an arsenic-rich freshwater environment. *Appl. Organometal. Chem.* 11, 297–304.
177. Kaise, T., et al., 1997. Biomethylation of arsenic in an arsenic-rich freshwater environment. *Appl. Organometal. Chem.* 11, 297–304.]
178. Hansen, H.R., et al., 2003. Metabolism of arsenic by sheep chronically exposed to arsenosugars as a normal part of their diet. 1. Quantitative intake, uptake, and excretion. *Environ. Sci. Technol.* 37, 845–851.
179. Peshut, P.J., et al., 2008. Arsenic speciation in marine fish and shellfish from American Samoa. *Chemosphere* 71, 484–492.
180. Bright, D.A., et al., 1996. Arsenic in subarctic lakes influenced by gold mine effluent: the occurrence of organoarsenicals and ‘hidden’ arsenic. *Sci. Total Environ.* 180, 165–182.
181. De Bettencourt, A.M.M., Andreae, M.O., 1991. Refractory arsenic species in estuarine waters. *Appl. Organometal. Chem.* 5, 111–116.
182. Yang G., Xuan C., Jing-Jing Y., Sen-Chun Lee F., Xiao-Ru W. 2009. Determination of Arsenic and It's Species in Dry Seafood by High Performance Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Chin J Anal Chem*, 37(12), 1738–1742.
183. García-Salgado, S., Quijano, M.A., Bonilla M.M. 2012 .Arsenic speciation in edible alga samples by microwave-assisted extraction and high performance liquid chromatography coupled to atomic fluorescence spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 714 38–46.



184. Iejkovec Z.S., Kápolna E., Ipolyi I., van Elteren J.T. 2006. Arsenosugars and other arsenic compounds in littoral zone algae from the Adriatic Sea. *Chemosphere* 63 1098–1105.
185. Hirata S., Toshimitsu H. 2005. Determination of arsenic species and arsenosugars in marine samples by HPLC–ICP–MS. *Anal Bioanal Chem* 383: 454–460.
186. Fujihara, J. Kunito, T., Kubota, R., Tanabe, S. 2003. Arsenic accumulation in livers of pinnipeds, seabirds and sea turtles: subcellular distribution and interaction between arsenobetaine and glycine betaine. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 136 287–296.
187. Zhanga, W., Liangmin H., Wen-Xiong W. 2011. Arsenic bioaccumulation in a marine juvenile fish *Terapon jarbua*. *Aquatic Toxicology* 105 582– 588.
188. Ruiz-Chancho M.J., Price, R.E., Thomas Pichler, T. 2012. Arsenic occurrence and speciation in *Cyclope neritea*, a gastropod inhabiting the arsenic-rich marine shallow-water hydrothermal system off Milos Island, Greece. *Chemical Geology*.
189. Kunito, T., Kubota, R., Fujihara, J., Agusa, T., Tanabe, S. 2008. Arsenic in marine mammals, seabirds, and sea turtles. *Reviews of environmental contamination and toxicology* 195 , pp. 31-69.
190. Geiszingera, A.E., Walter Goesslerb, W., Francesconi K.A. 2002. The marine polychaete *Arenicola marina*: its unusual arsenic compound pattern and its uptake of arsenate from seawater. *Marine Environmental Research* 53, 37–50.
191. Lai V.W.-M., Cullen R.W., Ray, S. 1999. Arsenic speciation in scallops. *Marine Chemistry* 66, 81–89.



192. Whaley-Martin K.J., Koch, I., Reimer, K.J. 2012. Arsenic species extraction of biological marine samples (*Periwinkles*, *Littorina littorea*) from a highly contaminated site. *Talanta* 88, 187–192.
193. Maher, W., et al., 1999. Arsenic concentrations and speciation in the tissues and blood of sea mullet (*Mugil cephalus*) from Lake Macquarie NSW, Australia. *Mar. Chem.* 68, 169–182.
194. Huang Y-K., Lin K-H., Chen H-W., Chang Ch-Ch., Li Ch-W., Yang M.H., Hsueh Y-M. 2003. Arsenic species contents at aquaculture farm and in farmed mouthbreeder (*Oreochromis mossambicus*) in blackfoot disease hyperendemic areas. *Food and Chemical Toxicology* 41, 1491–1500.
195. Seyler, P., Martin, J.M., 1989. Biogeochemical processes affecting arsenic species distribution in a permanently stratified lake. *Environ. Sci. Technol.* 23, 1258–1263.
196. Kuhn, A., Sigg, L., 1993. Arsenic cycling in eutrophic Lake Greifen, Switzerland: Influence of seasonal redox processes. *Limnol. Oceanogr.* 38, 1052–1059.
197. Nriagu, J.O., 1983. Arsenic enrichment in lakes near the smelters at Sudbury, Ontario. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 47, 1523–1526.
198. Bright, D.A., et al., 1994. Arsenic transport in a watershed receiving gold mine effluent near Yellowknife, Northwest Territories, Canada. *Sci. Total Environ.* 155, 237–252.
199. Romero, L., et al., 2003. Arsenic enrichment in waters and sediments of the Rio Loa (Second Region, Chile). *Appl. Geochem.* 18, 1399–1416.



200. Kaise, T., et al., 1988. Distribution of inorganic arsenic and methylated arsenic in marine organisms. *Appl. Organometal. Chem.* 2, 539–546.
201. Phillips, D.J.H., 1990. Arsenic in aquatic organisms: a review, emphasizing chemical speciation. *Aquat. Toxicol.* 16, 151–186.
202. Koch, I., et al., 1999. Arsenic in the Meager Creek hot springs environment, British Columbia, Canada. *Sci. Total Environ.* 236, 101–117.
203. Lai, V.W.M., et al., 1997. The characterization of arsenosugars in commercially available algal products including a *Nostoc* species of terrestrial origin. *Appl. Organometal. Chem.* 11, 797–803.
204. Schaeffer, R., et al., 2006. Arsenic speciation in freshwater organisms from the river Danube in Hungary. *Talanta* 69, 856–865.
205. Shiomi, K., et al., 1995. Arsenobetaine as the major arsenic compound in the muscle of two species of freshwater fish. *Appl. Organometal. Chem.* 9, 105–109.
206. Slejkovec, Z., et al., 2004. Arsenic speciation patterns in freshwater fish. *Talanta* 62, 931–936.
207. Zheng, J., Hintelmann, H., 2004. Hyphenation of high performance liquid chromatography with sector field inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of ultra-trace level anionic and cationic arsenic compounds in freshwater fish. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 19, 191–195.
208. Lawrence, J.F., et al., 1986. Identification of arsenobetaine and arsenocholine in Canadian fish and shellfish by high-performance liquid chromatography with atomic absorption



- detection and confirmation by fast atom bombardment mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 34, 315–319.
209. Koch, I., et al., 2001. Arsenic speciation in fresh-water fish and bivalves. In: Chappell, W.R., et al. (Eds.), *Arsenic Exposure and Health Effects IV*. Elsevier Science Ltd, Amsterdam, pp. 115–123.
210. Soeroes, C., et al., 2005. Thio arsenosugars in freshwater mussels from the Danube in Hungary. *J. Environ. Monit.* 7, 688–692.
211. Burger, J., et al., 2002. Metal levels in fish from the Savannah River: Potential hazards to fish and other receptors. *Environ. Res.* 89, 85–97.
212. Soeroes, C., et al., 2005a. Arsenic speciation in farmed Hungarian freshwater fish. *J. Agric. Food Chem.* 53, 9238–9243.
213. [*Anemonia sulcata* (TSN 204179). *Sistema Integrado de Información Taxonómica*.] [RAE]
214. **Zoología General**, Tracy I. Storer, Robert I. Usinger, Robert C. Stebbis, James W. Nybakken ed. Omega p 387-411;
215. Riedl, R. **Fauna y Flora del mar Mediterráneo**. Ed. Omega. Año 1986.
216. Göthel, Helmut. **Fauna marina del Mediterráneo**. Ed. Omega. Edición 2006.
217. Riedl, R. (2011) (en español). *Fauna y Flora del Mar Mediterráneo*. Barcelona, España: Ediciones Omega. pp. 904.
218. Fautin, D. 2012. World Register of Marine Species (ed.): *Anemonia sulcata* (Pennant, 1777)



219. Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino (2009). «[Boletín Oficial del Estado, Sec. III. Pág. 31694](#)». Consultado el 1 de marzo de 2012.
220. Hervé Rochat, Marie-France Martin-Eauclaire, (2000), «*Animal toxins*», Birkhäuser Basel, ISBN: 3764359838.
221. Calvin W. Schwabe, (1979), «*Unmentionable cuisine*», University Press of Virginia, pp-362.
222. Francesconi, K.A., Edmonds, J.S., 1997. Arsenic and marine organisms. *Adv. Organomet. Chem.* 44, 147–189.
223. Shiomi, K., 1994. Arsenic in marine organisms. In: Nriagu, J.O. (Ed.), *Arsenic in the Environments. Part II: Human Health and Ecosystem Effects*. John Wiley and Sons, New York, pp. 261–282.
224. Shiomi, K., Aoyama, M., Yamanaka, H., Kikuchi, T., 1988. Chemical forms of arsenic in sponges, sea anemones and sea hare. *Comp. Biochem. Physiol.* 90C, 361–365.
225. Dang Ninh, T. Nagashima, Y. Shiomi, K. 2008. Unusual arsenic speciation in sea anemones, *Chemosphere* 70, 1168–1174.
226. V. Devesa, D. Vélez, R. Montoro. 2008. Effect of thermal treatments on arsenic species contents in food. *Food and Chemical Toxicology* 46 (2008) 1–8.
227. Dabeka, R.W., McKenzie, A.D., Lacroix, G.M.A., Cleroux, C., Bowe, S., Graham, R.A., Conacher, H.B.S., Verdier, P., 1993. Survey of arsenic in total diet food composites and estimation of the dietary intake of arsenic by Canadian adults and children. *J. AOAC Int.* 76, 14–25.



228. Ersoy, B., Yanar, Y., Küçükgülmez, A., Çelik, M., 2006. Effects of four cooking methods on the heavy metal concentrations of sea bass fillets (*Dicentrarchus labrax* Linne, 1785). *Food Chem.* 99, 748–751.
229. Devesa, V., Macho, M.L., Jalón, M., Urieta, I., Muñoz, O., Súañer, M.A., López, F., Vélez, D., Montoro, R., 2001. Arsenic in cooked seafood products: study on the effect of cooking on total and inorganic arsenic contents. *J. Agric. Food Chem.* 49, 4132–4140.
230. Hanaoka, K., Yosida, K., Tamano, M., Kuroiwa, T., Kaise, T., Maeda, S., 2001. Arsenic in the prepared edible brown alga hijiki, *Hizikia fusiforme*. *Appl. Organomet. Chem.* 15, 561–565.
231. Laparra, J.M., Vélez, D., Montoro, R., Barberá, R., Farré, R., 2003. Estimation of arsenic bioaccessibility in edible seaweed by an in vitro digestion method. *J. Agric. Food Chem.* 51, 6080–6085.
232. FSA, 2004. Food Standards Agency. Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment, United Kingdom
<http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/arsenicseaweed.pdf>.
233. Almela, C., Laparra, J.M., Vélez, D., Barberá, R., Farré, R., Montoro, R., 2005. Arsenosugars in raw and cooked edible seaweed: characterization and bioaccessibility. *J. Agric. Food Chem.* 53, 7344–7351.
234. Bae, M., Watanabe, C., Inaoka, T., Sekiyama, M., Sudo, N., Bokul, M.H., Ohtsuka, R., 2002. Arsenic in cooked rice in Bangladesh. *Lancet* 360, 1839–1840.
235. Van Elteren, J.T., Slejkovec, Z., 1997. Ion-exchange separation of eight arsenic compounds by high-performance liquid chromatography–UV decomposition–hydride generation–



- atomic fluorescence spectrometry and stability test for food treatment procedures. *J. Chromatogr.* 789, 339–340.
236. Devesa, V., Martínez, A., Súnier, M.A., Benito, V., Vélez, D., Montoro, R., 2001. Kinetic study of transformations of arsenic species during heat treatment. *J. Agric. Food Chem.* 49, 2267–2271.
237. Devesa, V., Súnier, M.A., Algora, S., Vélez, D., Montoro, R., Jalón, M., Urieta, I., Macho, M.L., 2005. Organoarsenical species contents in cooked seafood. *J. Agric. Food Chem.* 53, 8813–8819.
238. Shibata, Y., Jin, K., Morita, M., 1990. Arsenic compounds in the edible red alga, *Porphyra tenera*, and in nori and yakinori, food items produced from red algae. *Appl. Organomet. Chem.* 4, 255–260.
239. Vélez, D., Ybáñez, N., Montoro, R., 1997. Migration of arsenobetaina from canned seafood to brine. *J. Agric. Food Chem.* 45, 449–453.
240. FAO, 1998. Cambios post mortem en el pescado. In: Huss, H.H. (Ed.), *El pescado fresco: su calidad y cambios de su calidad*, Rome, pp. 35–67.
241. Devesa, V., Loos, A., Súnier, M.A., Vélez, D., Fera, A., Martínez, A., Montoro, R., Sanz, Y., 2005. Transformation of organoarsenical species by the microflora of freshwater crayfish. *J. Agric. Food Chem.* 53, 10297–10305.
242. Nierboer, E., Thomansen, Y., 1995. The Second International Symposium on Speciation of Elements in Toxicology.
243. Templeton, D.M., Ariese, F., Cornelis, R., Danielsson, L.G., Muntau, H., Van Leeuwen, H. and Lobinski, R. 2000. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches. *Pure appl. Chem.*, 72 1453-1470.



244. Donard, O.F.X., and Ritsema, R. 1993. Hyphenated techniques applied to the speciation of organometallic compounds in the environment. En D. Barceló (ed) *Environmental Analysis (Techniques, application and Quality Assurance)*(pp. 549-606), Amsterdam: Elsevier sci. pbl.
245. Lobinski, R. Pereiro, I. R., Chassaigne, H., Wasik, A., and Szpunar, J. 1998. Elemental speciation and coupled techniques-towards faster and reliable analyses: Plenary lecture. *J. Anal. At. Spectrom.* 13, 859-867.
246. Szpunar, J. 2004. Metallomics: a new frontier in analytical chemistry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 378, 54-56.
247. Lobinski, R. Becker, J.S., Haraguchi, H. and Sarkar, B. 2010. Metallomics: Guidelines for terminology and critical evaluation of analytical chemistry. *Pure Appl. Chem.* 82, 493-504.
248. Gómez-Ariza, J.L., García-Barrera, T., Lorenzo, F., Bernal, V., Villegas, M.J., and Oliveira, V., 2004. Use of mass spectrometry techniques for the characterization of metal bound to proteins (metallomics) in biological samples. *Anal. Chim. Acta.* 524, 15-22.
249. Brisbin J.A. and Caruso, J.A., 2002. Comparison of extraction procedures for the determination of arsenic and other elements in lobster tissue by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analyst*, 2002, 127, 921-929.
250. García-Salgado, S., Quijano Nieto, M.A., Bonilla-Simón, M.M., 2008. Assessment of total arsenic and arsenic species stability in alga samples and their aqueous extracts. *Talanta* 75, 897-903].
251. Sanchez-Rodas, D., Geiszinger, A, Gomez-Ariza J. L. and Francesconi K. A. 2002. Determination of an arsenosugar in



- oyster extracts by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry and liquid chromatography-ultraviolet photo-oxidation-hydride generation atomic fluorescence spectrometry *Analyst*, **127**, 60–65.
252. Tanner, S.D. Baranov, V.I. Bandura, D.R., 2002. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy. 7, 9. 1361-1452.
253. Hsu k.C., Sun C.C., Huang Y.L., 2011. *Arsenic speciation in biomedical sciences: Recent advances and applications. Kaohsiung Journal of Medical Sciences (2011) 27, 382-389.*
254. Morton J, Mason H. 2006. Speciation of arsenic compounds in urine from occupationally unexposed and exposed persons in the UK using a routine LC-ICP-MS method. *J Anal Toxicol*; 30 293-301.
255. Christian WJ, Hopenhavn C, Centeno JA, Todorov T., 2006. Distribution of urinary selenium and arsenic among pregnant women exposed to arsenic in drinking water. *Environ Res*; 100, 115-22.
256. Xu Y, Wang Y, Zheng Q, Li B, Li X, Jin Y, et al. 2008. Clinical manifestations and arsenic methylation after a rare subacute arsenic poisoning accident. *Toxicol Sci*; 103 278-84.
257. Raml R, Goessler W, Traar P, Ochi T, Francesconi KA., 2005. Novel thioarsenic metabolites in human urine after ingestion of an arsenosugar, 20,30-dihydroxypropyl 5-deoxy-5-dimethylarsinoyl-a-d-ribose. *Chem Res Toxicol*; 18,1444-50.
258. Schmeisser E, Goessler W, Francesconi KA. 2006. Human metabolism of arsenolipids present in cod liver. *Anal Bioanal Chem*; 385 367-76.
259. Hinwood, A. L., Sim, M. R., de Klerk, N., Drummer, O., Gerostamoulos J., and Bastone, E.B., 2002. Are 24-Hour Urine Samples and Creatinine Adjustment Required for Analysis of



- Inorganic Arsenic in Urine in Population Studies? Environmental Research Section A 88, 219-224.
260. Raab, A. and Feldmann, J., 2005. Arsenic speciation in hair extracts. *Anal Bioanal Chem* 381, 332-338.
261. Kintz P, Ginet M, Marques N, Cirimele V., 2007. Arsenic speciation of two specimens of Napoleon's hair. *Forensic Sci Int.* 170 204-206.
262. Yuan C, Lu X, Oro N, Wang Z, Xia Y, Wade TJ, et al. 2008. Arsenic speciation analysis in human saliva. *Clin Chem* 54, 163-171.
263. Mounicou, S., Szpunar, J. and Ryszard Lobinsk, R., 2009. Metallomics: the concept and methodology. *Chem Soc Rev.* 38, 1119-38.
264. Williams, R. J. P., 2001. Chemical selection of elements by cells. *Coord. Chem. Rev.*, 583 , 216–217.
265. Sanz-Medel A., 2010. ICP-MS for multiplex absolute determinations of proteins. *Anal Bioanal Chem*, 398: 1853–1859.
266. Li Y F, Chen C, Qu Y, et al. 2008. Metallomics, elementomics, and analytical techniques. *Pure Appl Chem*, 80, 2577–2594.
267. Szpunar, J., 2005 .Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics. *Analyst* 130, 442–465.
268. Salekdeh, G. H., Siopongco, J., Wade, L. J., Ghareyazie, B., Bennett, J., *Proteomics* 2002, 2, 1131–1145.



269. Salekdeh, G. H., Siopongco, J., Wade, L. J., Ghareyazie, B., Bennett, J., 2002. Proteomics analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics* 2002, 2, 1131–1145.
270. Pergantis, S. A., Cullen, W. R., Eigendorf, G. K., 1994 .Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry for the Analysis of Organoarsenic Compounds of Environmental Interest. *Biol. Mass Spectrom*, 23, 749–755.
271. Jack C., Juhasz, A. Smith, E., Naidu, R., 2013. Assessing the bioavailability and bioaccessibility of metals and metalloids. *Environ Sci Pollut Res*. DOI 10.1007/s 11356-013-1820-9.
272. Vahter M, Norin H. 1980. Metabolism of ⁷⁴As-labeled trivalent and pentavalent inorganic arsenic in mice. *Environ Res* 21, 446–457.
273. Odanaka Y, Matano O, Goto S. 1980. Biomethylation of inorganic arsenic by the rat and some laboratory animals. *Bull Environ Contam Toxicol* 24, 452–459.
274. Koch, I. Dee, J. House, K. Jie, K.S. Zhang, J. McKnight-Whitford, A. Reimer, K.J., 2013. Bioaccessibility and speciation of arsenic in country foods from contaminated sites in Canada. *Science of the Total Environment* 449, 1–8.
275. Raml, R., Raber, G., Rumpler, A., Bauernhofer, T., Goessler, W., Francesconi, K.A. 2009. Individual variability in the human metabolism of an arsenic-containing carbohydrate, 2',3'-dihydroxypropyl 5-deoxy-5-dimethylarsinoyl- β-D-ribose, a naturally occurring arsenical in seafood. *Chemical Research in Toxicology* 22 (9) , pp. 1534-1540.
276. Mounicou, S., Szpunar, J., Lobinski, R., Andrey, D., Blake, C.J. 2002. Bioavailability of cadmium and lead in cocoa: comparison of extraction procedures prior to size-exclusion fast-flow liquid chromatography with inductively



coupled plasma mass spectrometric detection (SEC-ICP-MS), J. Anal. At. Spectrom. 17, 880.

El arsénico es un elemento presente en la naturaleza que está en distintas formas químicas o especies. Su toxicidad es variable dependiendo de la especie, la matriz en la que se encuentre y el cocinado.

La importancia en el control de la calidad de los alimentos es vital, y por ello se han desarrollado y se sigue investigando metodologías de análisis, que nos permitan conocer las concentraciones de las distintas especies, su distribución en la cadena trófica, su biodisponibilidad y su comportamiento en el metabolismo humano.

