



Universidad de la República

Facultad de Ciencias

Programa de Posgrado en Ciencias Ambientales

Tesis para optar el título de Maestría en Ciencias Ambientales

# ESTUDIO DE LA OCURRENCIA DE METALES PESADOS EN EL AMBIENTE ARROCERO URUGUAYO

MELISSA VERGER

(mverger@latu.org.uy)

Tutor. Dr. Carlos Perdomo

Departamento de Suelos Y Aguas

Facultad de Agronomía

Montevideo, Uruguay

2015.

PÁGINA DE APROBACIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS

El tribunal docente integrado por los abajo firmantes aprueba la Tesis de Investigación:

Título: ESTUDIO DE LA OCURRENCIA DE METALES PESADOS EN EL AMBIENTE ARROCERO URUGUAYO.

Autor: Melissa Verger

Tutor: Dr. Carlos Perdomo

Carrera: Maestría en Ciencias Ambientales.

Puntaje:.....

Tribunal:

Profesor:.....(Nombre y firma)

Profesor:.....(Nombre y firma)

Profesor:.....(Nombre y firma)

Fecha

## RESUMEN:

El arroz es un alimento básico y a nivel mundial es el segundo cereal más producido luego del trigo. Durante los últimos 5 años Uruguay ha oscilado entre el 6to y el 8vo puesto de los principales exportadores de arroz en el ranking mundial. Las exigencias comerciales de producción inocua han sido acompañadas por consumidores cada vez más atentos de los alimentos que consumen y las formas bajo las cuales estos se producen.

Diversos ejemplos de contaminación de arroz demuestran la importancia del monitoreo de la práctica arroceras respecto a metales pesados. Cabe citar, el arroz contaminado con Cadmio en China por la minería y la actividad industrial. Otro caso de relevancia es la contaminación por Arsénico en Bangladesh debido al riego con aguas subterráneas contaminadas y el crecimiento de la planta en suelos contaminados. El Arsénico, el Cadmio y el Plomo son los metales de mayor incidencia al evaluar la contaminación en las cadenas alimenticias.

Se realizó una evaluación nacional del contenido de Arsénico, Cadmio y Plomo en las matrices suelo, agua y grano de forma de obtener una visión global del ambiente arroceras durante una zafra de arroz. No se detectaron contenidos de Cadmio y Plomo fuera de especificación en ninguna de las matrices analizadas (suelo, agua y grano). Dados los resultados para Arsénico en grano, con valores desde 0,10 a 0,43 mg/kg, valor medio de 0,17 mg/kg, se estudió la biodisponibilidad del As en el suelo bajo condiciones de inundación para establecer posibles causas de lo observado en grano y desarrollar estrategias tendientes a mejorar las prácticas de cultivo. Se evaluó la utilización de fosfato de amonio ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ) como extractante para la determinación del As biodisponible en suelo.

Para la determinación de As en grano se trabajó sobre una hibridación de técnicas mediante el acoplamiento de un generador de hidruros para el tratamiento de la muestra a un horno de grafito como sistema detector, Espectrometría de Absorción Atómica con generación de Hidruros y Atomización Electrotermica.

**Palabras claves:** arroz, agua, suelo, grano, arsénico, plomo, cadmio, espectrometría atómica, generación de hidruros, inyección en flujo.

## SUMMARY:

Rice is a basic food and the second cereal most produced worldwide, after the wheat. Over the last 5 years Uruguay has oscillated between the 6th and 8th position among the main rice exporters at the world ranking. The commercial requirements for innocuous production have been accompanied by gradually more observant customers of the products they consume and the way under which those products are made.

Several examples of rice contamination prove the importance of monitoring the rice cultivation for heavy metals. For instance, the rice contaminated with Cadmium in China due to the industry and mining practice. Another relevant case is the Arsenic contamination in Bangladesh because the irrigation of rice with underground polluted water, and the plant growth in contaminated soil. Arsenic, Cadmium and Lead are the heavy metals with greater impact that should be considered when the contaminations of the food chains are evaluated.

A national evaluation of Arsenic, Cadmium and Lead content in soil, water and grain samples was made so as to obtain a comprehensive vision of the rice environment during one rice cultivation. Cadmium and Lead were below the legal specification in the analyzed matrices. Because the results for Arsenic in grain were between 0,10 to 0,43 mg/kg with a mean of 0,17 mg/kg, the Arsenic bioavailability in soils during flooding was studied for lay down what causes the Arsenic accumulation in grain and develop strategies tending towards improving the cultivation practices. Ammonium phosphatase was evaluated as a extractant solution to the analysis of the bioavailable Arsenic in the soil to the plant.

To analyze Arsenic in grain an hybridation of techniques was pursued by the coupling of an hydride generator for the treatment of the sample using a graphite furnace as a detector system, Flow Injection, Hydride Generation Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry.

**Key words: rice, water, soil, grain, arsenic, lead, cadmium, atomic spectrometry, hydride generation, Flow Injection.**

Esta tesis está dedicada a mi Viejo, por enseñarme a perseguir los sueños cueste lo que cueste y siempre estar a mi lado aún a 340 km de distancia.

Quiero agradecer a muchas personas que a lo largo de estos ya casi 5 años me han ayudado, alentado y acompañado para que siga adelante. En primer lugar quisiera agradecer a mi familia. Muy especialmente a mis viejos que hicieron un gran esfuerzo durante toda su vida para brindarnos a mí hermana y a mí la posibilidad de estudiar, lo cual viniendo del “interior”, nunca es tarea fácil y al José, mi gran compañero y amigo, por su eterno apoyo y comprensión. Va un agradecimiento especial a mi hermana por sus clases intensivas de idioma español y la traducción al inglés del resumen.

Ya en un ámbito más formal a mi tutor, el Dr. Carlos Perdomo, por todos sus aportes que me permitieron aprender a pensar de una manera más agronómica y menos analítica y por confiar en que no abandonaría después de tanto tiempo.

A mi jefa Raquel Huertas por confiar en mí para este proyecto y brindarme el espacio para realizar la tesis, por todos sus aportes y sobre todo por las ya incontables veces que me corrigió la tesis y el proyecto de tesis. A Santiago Viera por todo lo que aprendí de estadística con él, tema en el cual ahora soy un poco menos ignorante, y por todo el tiempo que dedico a ayudarme. A Elena Darré por brindarme su lugar en el tema análisis de arroz para permitirme realizar este proyecto. Al resto de mis compañeros, los que han pasado y los que aún continúan luego de estos cinco años, por acompañarme, apoyarme y permitir que pudiese realizar la tesis muchas veces cargando sobre sus hombros con actividades que me correspondían.

A la Asociación de Cultivadores de Arroz y a todas las instituciones por esta nucleadas que trabajaron para que el proyecto en el cual se enmarca esta tesis fuese llevado a cabo con éxito.

Al Laboratorio Tecnológico del Uruguay por brindarme el espacio para realizar el trabajo experimental. Dentro de este en particular al Laboratorio de Aguas y Productos Químicos, al Laboratorio de Proyectos Forestales, y al Laboratorio de Cereales, Oleaginosos y derivados.

## TABLA DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN.	1
Introducción General.	1
Descripción del problema.	2
<b>CAPÍTULO 1. DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO EN GRANO POR ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON GENERACIÓN DE HIDRUROS Y ATOMIZACIÓN ELECTROTERMICA.</b>	<b>6</b>
INTRODUCCIÓN.	6
OBJETIVO.	8
MATERIALES Y MÉTODOS.	8
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	9
Optimización de las condiciones de prereducción	9
Optimización de las condiciones instrumentales	13
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.	14
<b>CAPÍTULO 2. ESTUDIO DEL CONTENIDO DE METALES PESADOS EN EL AMBIENTE ARROCERO URUGUAYO EN UNA ZAFRA DE CULTIVO.</b>	<b>16</b>
INTRODUCCIÓN.	16
OBJETIVOS.	18
Objetivo general.	18
Objetivos específicos.	18
MATERIALES Y MÉTODOS.	18
Plan de muestreo.	18
Metodología Analítica.	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	24
Agua, suelo y grano en chacra.	24
Estudio de biodisponibilidad del arsénico en el suelo bajo condiciones de inundación.	34
Ocurrencia de metales pesados en la cuenca hidrográfica asociada al ambiente arrocero.	38
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.	40
BIBLIOGRAFÍA.	43
ANEXO I: ESPECIES DE ARSÉNICO PRESENTES EN LOS ALIMENTOS:	50
ANEXO II. EQUIPAMIENTO Y REACTIVOS UTILIZADOS EN EL TRABAJO EXPERIMENTAL.	52

ANEXO III: MARCO LEGAL APLICABLE AL AMBIENTE ARROCERO.	54
Aguas.	54
Suelos.	55
Granos.	56
ANEXO IV. DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO EN LA SOLUCIÓN DEL SUELO EN PRESENCIA DE ALTAS CONCENTRACIONES DE FOSFATO.	58
INTRODUCCIÓN.	58
MATERIALES Y MÉTODOS.	58
RESULTADOS	58
Estudio de temperaturas de pirólisis	59
Estudio de temperaturas de atomización	59
DISCUSIÓN y CONCLUSIONES.	60
ANEXO V. RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ENSAYO DE BIODISPONIBILIDAD DE ARSÉNICO EN SUELOS INUNDADOS.	62

## ABREVIATURAS:

ACA: Asociación de Cultivadores de Arroz.

ANII: Agencia Nacional de Investigación e Innovación.

AOAC International: Asociación Oficial de Químicos Analíticos.

As: Arsénico.

Cd: Cadmio.

DER: Desviación estándar relativa.

EN: Estándar de Normalización elaborado por el Comité Europeo de Normalización.

FAAS: Flame Atomic Absorption Spectrometry, Espectrometría de Absorción Atómica con atomización por Llama.

Fe: Hierro

FI HG GFAAS: Flow Injection Hydride Generation Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry, Espectrometría de Absorción Atómica con generación de hidruros inyección en flujo y atomización por horno de grafito.

FPTA: Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria; creado por el artículo 18 de la ley 16065, Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Creación y Cometidos.

GFAAS: Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. Espectrometría de Absorción Atómica con Atomización por Horno de Grafito.

GMA: Gremial de Molinos Arroceros.

HPLC ICP-MS: High Pressure Liquid Chromatography Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry.

ICP-OES: Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry, Espectrometría de Emisión Atómica con Plasma Acoplado Inductivamente.

LATU: Laboratorio Tecnológico del Uruguay.

MGAP: Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca.

Mn: Manganeseo.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

P: Fósforo.

Pb: Plomo.

PH: Placa de Hierro.

S: Azufre.

STPF: Stabilized Temperature Platform Furnace.

Udelar: Universidad de la República.



## NOTA. USO DE SIGLAS EN ESPECTROMETRÍA ATÓMICA

En el presente trabajo se utilizaron varias técnicas de Espectrometría Atómica que se abreviaron mediante el uso de las siglas en inglés, a saber:

Técnica	Sigla Utilizada y significado
Espectrometría de Absorción Atómica con Atomización por Llama.	FAAS- Flame Atomic Absorption Spectrometry
Espectrometría de Absorción Atómica con Atomización por Horno de Gráfico.	<p style="text-align: center;">GFAAS- Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry.</p> <p style="text-align: center;">ETAAS- Electrothermal Atomization Atomic Absorption Spectrometry.</p> <p style="text-align: center;">Estas dos siglas habitualmente tienen uso indistinto en la literatura.</p>
Espectrometría de Absorción Atómica con Inyección en flujo, Generación de Hidruros y Atomización Electrotérmica.	<p style="text-align: center;">FI HG-GFAAS- Flow Injection Hydride Generation Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry.</p> <p style="text-align: center;">Esta sigla no tiene un uso tan convencional como las anteriores. Quizás sería más común el uso de HG- AAS (Hydride generation-Atomic Absorption Spectrometry) pero de esta manera no se indican ni el medio atomizador ni el modo de inyección en flujo por ello se eligió la primera opción.</p>
Espectrometría de Emisión Atómica con Ionización por Plasma Acoplado Inductivamente	ICP-OES- Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry.
Cromatografía Líquida de Alta Presión y Espectrometría de Masas con Ionización por Plasma Acoplado Inductivamente.	HPLC-ICP MS: High Pressure Liquid Chromatography and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry.

En esta especialidad analítica se acostumbra el uso de siglas en inglés.

## INDICE DE FIGURAS.

- Figura 1.** Exportación anual de arroz en millones de US\$ para el período 2008-2014, fuente Informe Sector Arrocerero, Uruguay XXI (2013). \_\_\_\_\_ 1
- Figura 2.** Esquema del sistema de inyección en flujo para la generación del hidruro de As previo a su introducción en el horno de grafito. \_\_\_\_\_ 7
- Figura 3.** Resultados obtenidos en la evaluación de 4 variantes de la prereducción de Ácido Málico, Tiourea, KI y ácido ascórbico, tratamientos según Tabla 3. \_\_\_\_\_ 12
- Figura 4.** Estudio de la temperatura optima de captura del hidruro para iguales condiciones de pre reducción. \_\_\_\_\_ 14
- Figura 5.** Distribución de los puntos de muestreo de ríos, cuenca de los ríos Cebollatí y Olimar. [www.mapasdeluruguay.eluruguayo.com/mapa-relieve.htm](http://www.mapasdeluruguay.eluruguayo.com/mapa-relieve.htm). \_\_\_\_\_ 20
- Figura 6.** Análisis de regresión que compara los contenidos de Pb en suelo en tiempo cero, previo a la instalación del cultivo y en cosecha. \_\_\_\_\_ 26
- Figura 7.** Boxplot de As total en arroz. En la parte superior arroz de mercado según su país de producción. Australia (11), Bangladesh (99), China (98), Egipto (109), Francia (33), Ghana (35), India (70), Italia (27), Japón (26), Nepal (12), Pakistan (14), España (50), Tailandia (49), USA (198). Reproducido con autorización de Meharg et al., 2012. En la parte inferior boxplot construido a partir de los datos de Uruguay (20). En ambas imágenes la línea negra solida es la media, los ejes exteriores son el percentil 25 y 75, y los “whiskers” son los percentiles 10 y 90. El n de cada país se indica entre paréntesis. \_\_\_\_\_ 32
- Figura 8.** Estudio de la biodisponibilidad de As en función del tiempo de incubación. \_\_\_\_\_ 34
- Figura 9.** Relación de pe+pH observado en las chacras durante el período de incubación. \_\_\_\_\_ 35
- Figura 10.** Análisis de regresión del % de materia orgánica en el suelo respecto a: a. As promedio liberado a la solución del suelo en el período de incubación, b. As máximo liberado a la solución del suelo en el período de incubación. \_\_\_\_\_ 36
- Figura 11.** Evaluación de fosfato de amonio como representativo de la lixiviación de As del suelo a la solución del suelo en condiciones de inundación. \_\_\_\_\_ 37
- Figura 12.** Gráficas sobre tiempo de muestreo versus contenidos de a.- As, b.- Cd y c.- Pb en los 5 puntos de muestreo en cuencas hidrográficas de los Ríos Cebollatí y Olimar. \_\_\_\_\_ 39

## INDICE DE TABLAS.

<b>Tabla 1.</b> Programa para la determinación de As en el sistema FI-HG-GFAAS según las condiciones recomendadas por el fabricante. _____	7
<b>Tabla 2.</b> Condiciones de prereducción para reducir As <sup>+5</sup> a As <sup>+3</sup> previo a la introducción de la muestra en el equipo. _____	10
<b>Tabla 3.</b> Condiciones de tratamiento con introducción de tratamiento térmico mediante microondas (MW) y aumento de la concentración del agente de prereducción. _____	11
<b>Tabla 4.</b> Resultados del ANOVA de 1 factor para evaluar la existencia de diferencias entre tratamientos debido a modificaciones de las concentraciones de prereductor y los tiempos de incubación. _____	11
<b>Tabla 5.</b> Descripción de las 20 chacras muestreadas con la fuente de agua, y el cultivo antecesor de cada predio y el uso histórico de la chacra en cuanto a carga de insumo. _____	19
<b>Tabla 6.</b> Esquema de muestreo de agua, suelo y grano en 20 chacras de arroz durante la Zafra 2011/2012. _____	21
<b>Tabla 7.</b> Resultados obtenidos para Plomo (Pb) en las tres matrices analizadas en chacra. (Los valores de 0,0010 y 0,0035 en agua, 1 y 4 en suelo y 0,010 y 0,030 en grano corresponden a la mitad del Límite de Detección –LD- y al valor medio entre el LD y el Límite de Cuantificación -LC- respectivamente). _____	24
<b>Tabla 8.</b> Resultados del ANOVA de 1 factor comparando los contenidos totales en suelo de Plomo (Pb) en tiempo cero, previo a la instalación del cultivo y en cosecha. _____	25
<b>Tabla 9.</b> Resultados obtenidos para Cadmio (Cd) en las tres matrices analizadas en chacra. (Los valores de 0,00013 mg/L en agua y 0,15 mg/kg en suelo corresponden a la mitad del Límite de Detección –LD- y en grano los valores de 0,0010 y 0,0060 mg/L corresponden a la mitad del LD y al valor medio entre el LD y el Límite de Cuantificación -LC- respectivamente). _____	27
<b>Tabla 10.</b> Resultados obtenidos para Arsénico (As) en las 3 matrices estudiadas. (Los valores de 0,00050 y 0,0020 mg/L en agua corresponden a la mitad del Límite de Detección-LD- y al valor medio entre el LD y el Límite de Cuantificación –LC- respectivamente. Los valores de 1,5 mg/kg en suelo, y 0,10 mg/kg en grano corresponden al valor medio entre el LD y el LC respectivamente). _____	29
<b>Tabla 11.</b> Resultados del ANOVA de efectos fijos que estudió si existían diferencias entre la acumulación de As en grano y el cultivo antecesor y la carga de insumo de cada Chacra. _____	33

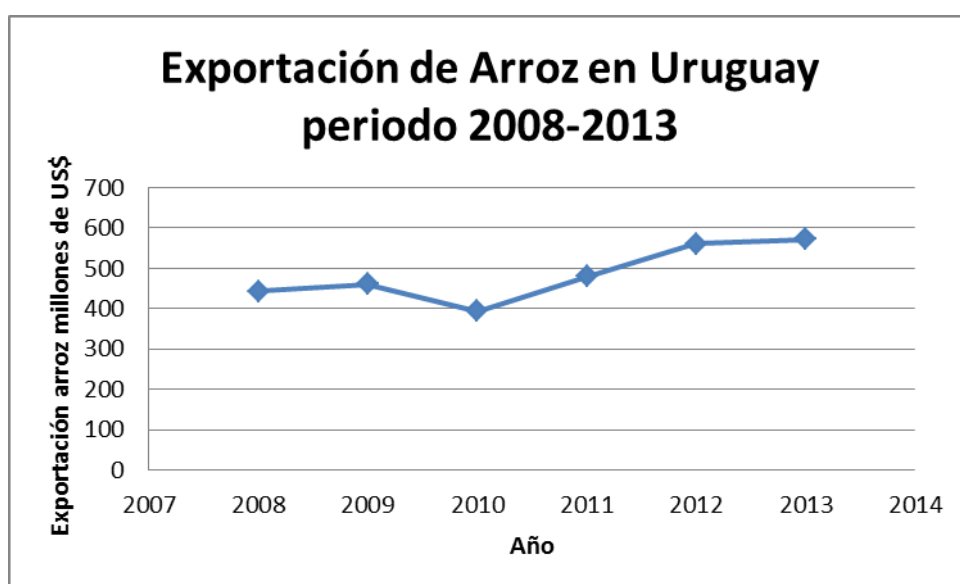
## INTRODUCCIÓN.

### INTRODUCCIÓN GENERAL.

Si bien al hablar de contaminación de un producto agrícola lo primero que se concibe es el agroquímico orgánico; la presencia de metales pesados en el ambiente ya sea de fuente natural o por aplicación de agroquímicos o contaminación exógena al cultivo ha ido tomando cada vez más relevancia a nivel país a lo largo de los años. El impacto de un metal pesado en la salud es acumulativo y, en la mayoría de los casos, los síntomas se ven a largo plazo. De todos modos, en una sociedad que apunta a más y mejor calidad de vida y a un desarrollo sostenible, el concepto de alimentación inocua cobra cada vez más relevancia.

El arroz es considerado un alimento básico y a nivel mundial es el segundo cereal más producido luego del trigo (Hu et al., 2013b). En nuestro país, el consumo interno de este cereal no es significativo en relación a su producción ya que más del 90% de lo cosechado se exporta y los mercados compradores son cada vez más exigentes en la calidad del producto y en la sustentabilidad ambiental del sistema de producción de los alimentos que consumen (INIA, 2010).

En el periodo de enero a agosto del año 2014, el arroz se ubicó en el 6to puesto dentro de los principales productos de exportación del Uruguay con un 6,4% del total de las exportaciones e ingresos por aproximadamente 400 millones de dólares (Uruguay XXI, 2014). En el periodo 2008-2013, los valores de las exportaciones de arroz han experimentado un incremento sostenido que han ubicado al país entre el 6to y el 8vo puesto en la lista de exportadores mundiales más importantes (Figura 1). Entre los principales destinos de exportación del arroz uruguayo se encuentran Irak e Irán. La calidad diferencial del producto uruguayo, posibilita su comercialización en éstos mercados, a precios 4 veces superiores que los precios de comercialización locales (El País Digital, 2013).



**Figura 1.** Exportación anual de arroz en millones de US\$ para el período 2008-2014, fuente Informe Sector Arrocero, Uruguay XXI (2013).

En comparación con otros países productores, incluso países de la región como Brasil, la producción nacional se caracteriza por el bajo uso de insecticidas, herbicidas

y fertilizantes. De todos modos, existe un gran interés de los productores, la industria y otros sectores de la sociedad en realizar un seguimiento a la calidad del grano, el estado de los suelos y del agua con el objetivo de que el producto final cumpla con los requisitos fitosanitarios y no dañe al medio ambiente (Uruguay XXI, 2013).

## DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA.

La contaminación por metales pesados en el ambiente puede tener origen natural o antropogénico. La fuente natural principal de metales pesados proviene de la meteorización de la roca madre o de afloramientos rocosos o mediante deposición o arrastre por el viento de cenizas volcánicas (Nagajyoti et al., 2010). En ambientes agrícolas, la fuente antropogénica principal de metales pesados proviene de los fertilizantes orgánicos e inorgánicos incluyendo el encalado, lodos de depuradoras, aguas de riego y plaguicidas (Nagajyoti et al., 2010). La aplicación repetitiva y excesiva de los mismos, junto con el tiempo de persistencia elevado de los metales en el ambiente, puede aumentar la concentración de estos últimos en los suelos (Gimeno García et al., 1996; Al-Faiyz et al., 2007). A su vez, la aplicación de los fertilizantes puede modificar la especiación y en consecuencia la biodisponibilidad de los metales ya presentes en el suelo (Chen et al., 2007). Es por esto, que la adición de fertilizantes y plaguicidas debe ajustarse a las necesidades reales del cultivo, dado que se puede producir la acumulación de metales pesados y, dependiendo de las condiciones de crecimiento (proceso de anaerobiosis, características del suelo, inundaciones estacionales, etc), favorecer la disponibilidad de dichos elementos para la planta.

El arroz acumula mayores niveles de arsénico -As- en grano comparado con otros cereales (trigo, cebada, maíz) debido a la mayor biodisponibilidad del As en los suelos inundados en los cuales crece. Su acumulación en suelos arroceros y su transferencia al grano depende de las propiedades fisicoquímicas del suelo (textura, tamaño de partícula, contenido de minerales), el patrón de cultivo, los niveles de As en el agua de riego y de la profundidad y duración del periodo de inundación. Por ejemplo, en un suelo arenoso el As es más móvil y biodisponible que en uno arcilloso. Por todo lo mencionado, es muy importante la realización de estudios sitio específicos (Abedin et al., 2002; Azizur Rahman et al., 2008; Hossain et al., 2008).

La preocupación sobre el As en el medio arrocerero tiene carácter histórico y es de interés mundial. Si bien este año se cumplen 100 años de la detección del hidroarsenicismo crónico regional endémico (HACRE) en América Latina; fueron necesarios muchos años de avance en la tecnología analítica para permitir detectar este elemento en bajas concentraciones y así poder evaluar la contribución del arroz en la ingesta de As. La importancia mundial y la actualidad de este tema quedan evidenciadas en la revisión que realiza actualmente la Comisión del Codex Alimentarius sobre la necesidad de establecer límites máximos para As en arroz. Para esta comisión, es un tema de agenda desde al menos 4 años y plantea, entre otros aspectos, la necesidad de tomar medidas prácticas urgentes para disminuir la transferencia de As desde el suelo al grano y coleccionar información de más países respecto a la ocurrencia natural de As en arroz. (Codex, CX/CF 11/5/10, 2011; Rep 14/CF, 2014; ALINORM 10/33/41, 2011).

Un caso histórico de contaminación por As como el de Bangladesh demuestra la necesidad de monitoreo y evaluación de las actividades agrícolas y domésticas. En aquel país, se produjo la contaminación microbiológica de las aguas superficiales lo que determinó un alto riesgo de epidemia de cólera y fiebre tifoidea. Por ende, se fomentó la realización de pozos de agua caseros para consumo y riego. En los últimos 30 años, el crecimiento expansivo en el número de pozos favoreció, bajo condiciones

reductoras, la liberación de As de sedimentos enterrados (Smith et al., 2000). El agua subterránea que estaba contaminada con dicho elemento, al ser usada para riego, aumentó los niveles de As en suelos y, como resultado, también en los productos agrícolas, entre ellos el arroz. Dato de relevancia ya que este producto constituye el 73% del aporte calórico de la población.

A nivel de salud, algunos de los síntomas de exposición crónica a As incluyen: debilidad, lasitud, pérdida de cabello, ronquera y pérdida de peso. La Agencia Internacional de Investigaciones en Cáncer (IARC) ha clasificado el As inorgánico como carcinógeno humano grupo I (Codex Stan 193-1995). Según un estudio realizado por la Unión Europea, la exposición a As a través de cereales y derivados representa como máximo entre un 10-15% de la ingesta diaria de As (European Union, Scientific cooperation scoop 3.2.11, 2004).

El As en arroz se encuentra mayoritariamente en las formas inorgánicas (arsenito, arsenáto) y sus formas metiladas; todas ellas tóxicas y asimilables por el hombre (Meharg et al., 2003, Anexo I). La toxicidad para humanos de dichas especies de As siguen el orden  $AsH_3 > As^{+3} > As^{+5} > \text{monometilarsenato-MMA} > \text{dimetilarsenato-DMA}$  (Abedin et al., 2002, Patel et al., 2005). Contrario a esta afirmación, basados en escasos datos de estudios in vivo e in vitro se ha visto que MMA y DMA son más tóxicos que las especies inorgánicas y presentan alta afinidad por proteínas celulares y tioles (WHO, 2011; Feldmann et al., 2011). Además, aunque en el arroz se estima se encuentra en una concentración menor al 1 %, recientemente se ha clasificado a los arsenoazúcares como potencialmente tóxicos (Feldmann et al., 2011, Anexo I).

En un estudio realizado sobre variedades de arroz de Europa, Bangladesh, India y Estados Unidos, se observó que en los tres primeros grupos de muestras entre el 60-80% del As era inorgánico, en cambio, en el último, la forma predominante era DMA con solo un 42% de As inorgánico. Por consiguiente, las proporciones de As orgánico e inorgánico varían entre muestras; y mientras no haya información robusta en especiación de As como para predecir el riesgo asociado al consumo de arroz se debe asumir que el valor de As total representa el valor de As inorgánico (Williams et al., 2005).

Desde el punto de vista analítico, la determinación de As en arroz es una metodología desafiante. Las técnicas más habituales para la determinación de As en grano son Espectrometría de Emisión Atómica con detección por Masas, u Óptica (ICP-MS e ICP-OES respectivamente), Espectrometría de Absorción Atómica o de Fluorescencia Atómica con generación de hidruros (HG-AAS e HG-AFS respectivamente) y Espectrometría de Absorción Atómica con Atomización Electrotermica (GFAAS) (Codex, CX/CF 11/5/10, 2011; Meharg et al., 2012; WHO., 2011). Las primeras son técnicas costosas debido al elevado costo de reactivos y la necesidad de equipamientos caros. ICP-MS se presenta como la técnica con mejores límites de detección pero, se trata una tecnología muy reciente en el país habiendo únicamente algunos equipos dedicados en su mayoría al análisis geológico. En el presente trabajo se propuso validar una hibridación de técnicas mediante el acoplamiento de un generador de hidruros para el tratamiento de la muestra a un horno de grafito como sistema detector (FI HG GFAAS, Espectrometría de Absorción Atómica con Generación de Hidruros y Atomización Electrotermica). Consiste en una metodología novedosa para Uruguay que permite alcanzar buenos límites de detección, presenta bajo costo de equipamiento y de insumos.

Otro de los metales con incidencia en la contaminación del arroz el cadmio - Cd-, se destaca por ser uno de los metales pesados más peligrosos por su alta movilidad y

su habilidad para acumularse en las plantas en altas cantidades sin ningún signo visible (Al-Faiyz et al., 2007). Este metal como catión divalente puede competir con otros cationes (incluyendo  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{2+}$ ) en su transporte a través de las membranas y es de alto riesgo para la salud de humanos y animales en concentraciones que en los tejidos vegetales en general no son fitotóxicas. En consecuencia, el Cd es uno de los metales más importantes al evaluar contaminación en las cadenas alimenticias (Liu et al., 2007). A su vez, el Cd es más fácilmente acumulable en las plantas de arroz que el plomo-Pb- (Liu et al., 2007). Esto último podría explicarse porque en la interacción entre esos dos metales, el Pb compite con gran habilidad por los sitios de adsorción del Cd en el suelo y prefiere fijarse formando compuestos estables resultando en una movilidad baja. El Cd desplazado por el Pb del suelo aumenta su fitodisponibilidad, por lo que el Pb siempre está en desventaja con este; y disminuye su fitodisponibilidad en presencia de Cd (Chen et al., 2007).

Los cereales, frutas y verduras, carnes y pescado son la fuente principal de Cd en la dieta porque son de gran consumo, a pesar de que en general presentan bajas concentraciones del elemento. Este metal se acumula en los riñones y puede inducir disfunciones renales, cambios en el sistema esquelético y deficiencias reproductivas. La IARC clasificó al Cd y sus compuestos en cancerígeno humano Grupo I. Según el mismo estudio cooperativo realizado para el As, de once países de la Unión Europea, cuatro de ellos (Dinamarca, Finlandia, Noruega y Suecia) recibían de entre un 47-70% de la ingesta diaria de Cd proveniente de los cereales y productos derivados, siendo estos países los que más g/día de Cd ingerían proveniente de este tipo de productos. Las concentraciones promedio de Cd en este tipo de alimentos fueron comparables para los once países (European Union, Scientific cooperation scoop 3.2.11, 2004).

Producto de la reinstalación de la mina Kamioka en el distrito de Toyama en Japón a fines del siglo XIX, se produjo uno de los casos de contaminación ambiental por Cd más severa en la región. El relave de la refinería de minerales de Cinc, que contenía elevados niveles de Cd, era vertido al río Jinzu y luego precipitaba en los arrozales del distrito. El agua del río utilizada para riego contaminaba los suelos y se acumulaba en los granos de arroz. Por este motivo, los habitantes de la región comenzaron a ingerir Cd principalmente por esta vía. La llamada enfermedad Itai-Itai (del japonés Duele-Duele), cuyos primeros casos registrados datan de 1912, afectaba principalmente a las mujeres que habían sido madres de muchos hijos y genera debilitamiento óseo, osteomalacia, producto de una disfunción renal generada por la acumulación de Cd en el riñón lo que favorecía la liberación de fosfato y calcio en la orina. A partir de 1972 las autoridades los afectados y los científicos anualmente realizan inspecciones a la mina. La aplicación de diversas medidas permitió prevenir una futura contaminación. Cabe citar: la inspección, recolección y divulgación de información acerca del tipo de materiales involucrados en el proceso, la actualización de reportes sobre la calidad del agua de proceso y las condiciones de vertido y emisión, el estado del suelo, las aguas subterráneas y los productos secundarios. Actualmente, el 50% de los vertidos de la mina al río Jinzu se reciclan y la descarga de Cd pasó de 35 kg/mes en 1972 a 5 kg/mes en 1997 (Yoshida et al., 1999).

Análogamente, antecedentes internacionales recientes indican la contaminación con Cd del 10 % del arroz producido y comercializado en China debido a la minería y la actividad industrial (Mahrs., 2011). En este país el 65% de la población consume arroz como alimento fundamental. También se demostró altos niveles de contaminación de Cd en suelos agrícolas y en el arroz en ellos producido en la provincia de Hunan en China. En el punto de muestreo más contaminado se obtuvieron niveles de dicho metal en grano de 2,72 a 4,36 mg/kg, 14 a 22 veces superior al estándar establecido por el Ministerio de Salud de aquel país (0,20 mg/kg). En esta región del Hunan, se observa que la contaminación proviene en su mayoría de

deposición aérea proveniente de fundiciones y del vertido de efluentes con altos niveles de Cd (Brigden et al., 2014).

El tercer y último metal que se trató en este estudio – el Pb-, se encuentra en bajas concentraciones en la mayoría de los alimentos. Sin embargo, debido al elevado consumo de cereales, el impacto en la ingesta total de Pb es considerable lo cual justifica su estudio. Algunos de los efectos crónicos de envenenamiento por Pb incluyen: cólicos, constipación y anemia. En adultos puede producir aumento de presión y enfermedades cardiovasculares; y en niños problemas en el aprendizaje y en el desarrollo neurológico del feto. En el estudio anteriormente mencionado realizado por la Unión Europea se observó que en la situación más comprometida los contenidos de Pb en cereales y derivados representaban un 17% de la ingesta diaria del metal (European Union, Scientific cooperation scoop 3.2.11, 2004).

En la naturaleza el Pb ocurre en los estados monovalente ( $Pb^{+1}$ ), divalente ( $Pb^{+2}$ ) y tetravalente ( $Pb^{+4}$ ); siendo más común el estado divalente. También puede formar compuestos organometálicos como el tetraetilo de plomo que fue la fuente principal de contaminación por Pb en Uruguay en la atmósfera hasta enero del 2004, debido a su uso como aditivo en las gasolineras (Rivero et al., 2006). Los compuestos orgánicos del Pb son considerados mucho más tóxicos para los humanos que el Pb inorgánico. La toxicidad de las especies orgánicas disminuye en el orden  $R_4Pb > R_3Pb^+ > R_2Pb^{2+} > Pb^{2+}$  siendo R un grupo alquilo (Muñoz-Olivas et al., 2001). La introducción de sistemas de control de calidad ha favorecido la detección de problemas analíticos, permitiendo la reducción de los niveles sobreestimados de Pb en el análisis de alimentos. Por ende, hay menos Pb en las muestras analizadas ahora que en las muestras analizadas en el pasado (Jorhem et al., 2007). Por otra parte, a medida que se descubre que a dosis más bajas aún el Pb tiene efectos sobre la salud, aumenta la lucha por la obtención de buenos resultados analíticos a menores concentraciones.

Los aspectos mencionados demuestran la necesidad de evaluar el impacto ambiental de la aplicación de fertilizantes y plaguicidas y de estudiar la ocurrencia natural y contaminación antrópica de las fuentes de agua y los suelos involucrados en la producción de arroz respecto a metales pesados. A su vez, se destaca la necesidad de generar información sobre la ocurrencia natural de metales pesados en el arroz. Esto permitirá definir un alimento lo más “inocuo” posible considerando los contenidos naturales y, en base a esto, realizar prácticas de producción ambientalmente más sustentables.

Desde hace ya varios años, un grupo de instituciones, entre las cuales se incluyen la ACA, la GMA, la UdelaR con la participación de Facultad de Ciencias, de Química y de Agronomía, el LATU y el MGAP; vienen desarrollando diversos proyectos de investigación con el fin de estudiar el impacto ambiental de la producción de arroz en Uruguay. Esta tesis se encuentra enmarcada dentro de uno de estos proyectos, específicamente en el titulado “Determinación de indicadores de sustentabilidad ambiental asociados a distintos usos y manejos en arroz que orienten buenas prácticas agrícolas” financiado por la ANII, Fondo Sectorial Innovagro, PE\_FSA\_2009\_1\_1630. El objetivo del mismo fue certificar la sustentabilidad ambiental de la producción de arroz en Uruguay y, de esa manera, potenciar el mantenimiento de los actuales mercados mundiales, así como la apertura de nuevos mercados y/o nichos de mercados. Los resultados del proyecto antes mencionado fueron presentados oralmente el 2 de octubre del 2013 en Torre Ejecutiva y el resumen ejecutivo fue publicado en la Revista Arroz N°. 76 de diciembre del 2013.



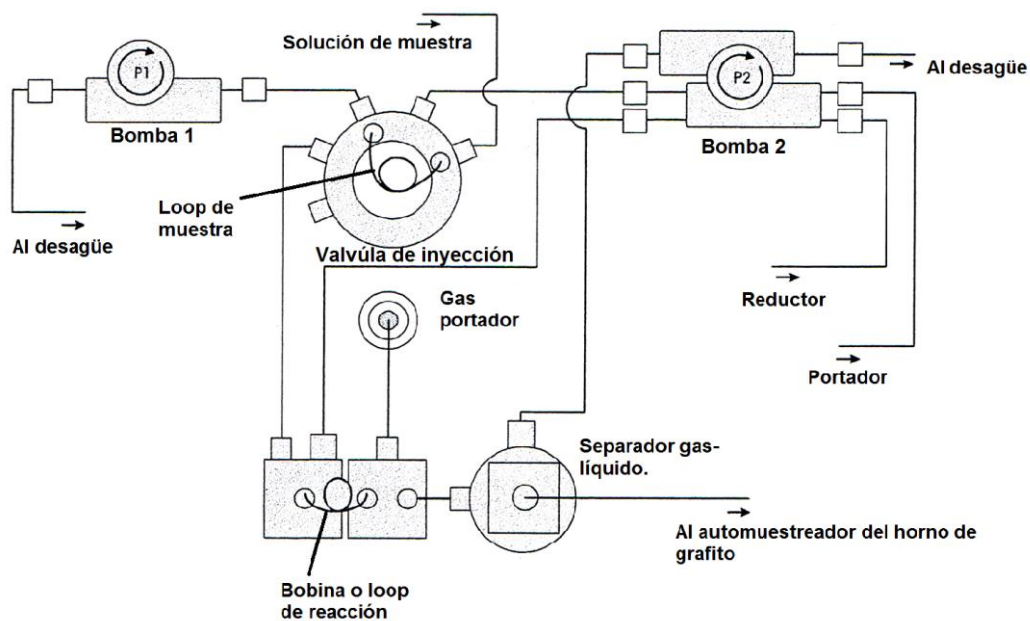
## CAPÍTULO 1. DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO EN GRANO POR ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON GENERACIÓN DE HIDRUROS Y ATOMIZACIÓN ELECTROTÉRMICA.

### INTRODUCCIÓN.

La determinación de As total en grano en el Departamento de Espectrometría Atómica de Alimentos y Medio Ambiente del LATU habitualmente se realiza por Espectrometría de Absorción Atómica con Atomización Electrotérmica (GFAAS). Esta técnica presenta buenos límites de detección para cumplir con las especificaciones legales vigentes cuando se utiliza digestión por vía seca. Por vía húmeda la dilución generada por la digestión en teoría aumentaría los límites de detección y no sería adecuada para el análisis de As en arroz.

En el Laboratorio se adquirió el instrumental necesario para desarrollar la técnica Espectrofotometría de Absorción Atómica con generación de hidruros y atomización electrotérmica (FI HG-GFAAS). Esta última se presenta como una técnica innovadora que permite lograr la sensibilidad y selectividad de la GFAAS en matrices complejas mediante la generación de compuestos volátiles. En vez de introducir en el horno de grafito el elemento a analizar junto con su matriz, como ocurre en GFAAS, se forma el hidruro de As-  $\text{AsH}_3$ - que es atrapado en la superficie inerte de un tubo de grafito. La atomización se puede realizar en línea, con introducción directa del hidruro al horno calentado a temperatura de atomización, o se captura el hidruro en el tubo de grafito y luego se atomiza. Este último es uno de los métodos de atomización más convenientes y populares para todos los hidruros analíticamente importantes. La interfaz más adecuada entre el generador de hidruros y el horno de grafito es un capilar, usualmente de cuarzo, insertado en el puerto de muestreo del horno. Para lograr una adecuada automatización, se recomienda trabajar con modificadores de matriz “permanentes” para no requerir cada vez del brazo del automuestreador para inyectar la solución de modificador (Dedina., 2007).

Se trata de un sistema comercial donde se acoplan dos equipos, un Espectrofotómetro de Absorción Atómica con Atomización Electrotérmica con un Espectrofotómetro de Absorción Atómica con generación de hidruros mediante una interfaz de cuarzo, Figura 2. Mediante un único software se controlan ambos equipos simultáneamente, Tabla 1.



**Figura 2.** Esquema del sistema de inyección en flujo para la generación del hidruro de As previo a su introducción en el horno de grafito.

**Tabla 1.** Programa para la determinación de As en el sistema FI-HG-GFAAS según las condiciones recomendadas por el fabricante.

<b>a. Programa del sistema de inyección en flujo (FIAS)</b>				
Paso	Tiempo (s)	Velocidad de bomba 1	Velocidad de bomba 2	Posición de la válvula de inyección
Prellenado	15	100	0	Llenar
1	10	100	0	Llenar
2	5	100	80	Llenar
3	30	0	80	Inyectar
<b>b. Programa del horno de grafito.</b>				
Paso	Temp (°C)	Rampa (s)	Tiempo (s)	Flujo interno de argón (mL/min)
1.	400	1	50	0
2	400	1	20	250
3	2100	0	5	0
4	2300	1	3	250
<b>c. Secuencia de trabajo.</b>				
Paso	Acciones y parámetros			
A	Realice el paso 1 a 1 del FIAS			
B	Realice el paso 1 del horno con el paso 2 del FIAS			
C	Pare las bombas del FIAS			
D	Mueva el brazo del automuestreador dentro del horno de grafito para el paso 3 de 3 del FIAS			
E	Mueva el brazo del automuestreador fuera del horno de grafito			
F	Realice los pasos 2 a 4 del horno de grafito			

El horno de grafito presenta ventajas sobre otros atomizadores como la celda de cuarzo con llama debido a que la atomización se independiza de mínimos cambios en la superficie de atomización y en la composición del medio gaseoso usado para el transporte del hidruro hacia el atomizador. Estos factores en la celda de cuarzo generan baja reproducibilidad día a día y mucho trabajo en el reacondicionamiento de la superficie de atomización (Vereda et al., 2001). A su vez, la colecta in situ del hidruro previo a la atomización y el bajo ruido del horno de grafito mejoran significativamente la sensibilidad. Dado que en teoría las condiciones instrumentales están dadas, lograr límites de detección buenos y reproducibles requerirá un arduo control de la contaminación en los pasos de preparación de muestra y generación del hidruro. Los mejores límites de detección reportados para As van desde 3 a 28  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ( $\mu\text{g} = 10^{-6}$  g), y estas diferencias seguramente sean debidas no tanto a la habilidad del método sino a distintos niveles de contaminación (Dedina., 2007).

En la determinación de As por generación de hidruros se utiliza Borohidruro de Sodio en medio Ácido Clorhídrico. Previamente se realiza una prerreducción de la muestra para que todo el  $\text{As}^{+5}$  se reduzca a  $\text{As}^{+3}$ , ya que el primero reacciona más lento y da una señal menor al segundo. De esta manera, se determina el contenido de As total como  $\text{As}^{+3}$ . Las condiciones de prerreducción más habituales en literatura son Ioduro de Potasio/ Ácido Ascórbico en concentraciones variables según distintos autores 50%/10% (Cava-Montesinos et al., 2004), 1%/0,5% (Meharg et al., 2003).

Por lo tanto en el presente trabajo se propuso optimizar las condiciones instrumentales para la determinación de As total en grano de arroz mediante la obtención de recuperaciones aceptables del material de referencia NIST 1568a. Harina de Arroz, de aquí en más NIST 1568a. Luego se propuso realizar la validación analítica de la técnica para cumplir con los requisitos de la norma ISO 17025:2005, "General requirements for the competence of testing and calibration laboratories". Esto implica el estudio de los parámetros linealidad, límite de detección, robustez, exactitud y precisión.

## OBJETIVO.

- Validar la técnica Espectrometría de Absorción Atómica con Generación de Hidruros y Atomización Electrotermica.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

Se digirió la muestra por vía húmeda en sistema cerrado a alta presión y microondas según el Método AOAC 999.10:2005 (AOAC, 2010)- Anexo II, Tabla 1.

Para la determinación de As se utilizó un Espectrofotómetro de Absorción Atómica con un generador de hidruros con inyección en flujo acoplado mediante una interfaz de cuarzo a un Espectrofotómetro de Absorción Atómica con atomización electrotermica y corrección de fondo por efecto Zeeman - Anexo II, Tabla 1.

Los reactivos y soluciones estándar utilizadas se describen en la Tabla 2 del Anexo II.

### OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE PREREDUCCIÓN

En primera instancia, se trabajó sobre el paso de preredución de la muestra donde se lleva el As a su forma más reducida ( $\text{As}^{+3}$ ). Se utilizó el material de referencia NIST 1568a. debido a que presenta un contenido certificado de As de  $0,29 \pm 0,030$  mg/kg, a nivel de la especificación para arroz y derivados del Reglamento Mercosur para Contaminantes Inorgánicos en Alimentos (Anexo III, Tabla 3), y un estándar acuoso de  $\text{As}^{+5}$ .

El estado de oxidación del As en la muestra tiene un gran efecto en la señal analítica y en la mayoría de los casos se requiere preredución a  $\text{As}^{+3}$  pero esta etapa no es siempre tan completa y tan rápida como se espera, sobre todo en presencia de matrices reales. La velocidad de formación del hidruro de  $\text{As}^{+3}$  es mayor a la del  $\text{As}^{+5}$  por lo cual la señal analítica de este último puede llegar a ser hasta diez veces menor a la del primero (Dedina et al., 1995).

Se evaluaron distintos sistemas de preredución para reducir todo el  $\text{As}^{+5}$  presente en la muestra a  $\text{As}^{+3}$  previo a su introducción en el equipo (Tabla 2).

Para todas las pruebas realizadas se utilizó Borohidruro de Sodio al 0,2% (m/v) en 0,05% de Hidróxido de Sodio como agente reductor del  $\text{As}^{+3}$  a  $\text{AsH}_3$ . Si bien se recomienda optimizar experimentalmente la concentración de reductor para cada sistema generador de hidruros en particular, esto no se considera un punto crítico (Dedina et al., 1995). La concentración típica de Borohidruro de Sodio en sistemas en flujo es de 0,2-1% (m/v) para la determinación de  $\text{As}^{+3}$ . Como medio de reacción se utilizó Ácido Clorhídrico (HCl) al 10 % (v/v). Es interesante destacar que concentraciones por encima de 5-6 M HCl mejorarían la preredución en Ioduro y aumentarían la tolerancia a interferencias de fase líquida pero son imprácticos porque aumentan la corrosión en el equipo. Se utilizó Iridio como modificador permanente según lo recomendado por el fabricante del equipo y por Dedina., (2007).

**Tabla 2.** Condiciones de prereducción para reducir  $As^{+5}$  a  $As^{+3}$  previo a la introducción de la muestra en el equipo.

Agente prereductor	Temp. de incubación	Tiempo de incubación	% de recuperación de NIST 1568a.	N	Pendiente calibración acuosa	Características destacadas	Fuente bibliográfica
HCl 3% (v/v), Ioduro de potasio (KI) 5% (m/v) y ácido ascórbico 5% (m/v)	Ambiente	45'	38 - 49 %	5	53,7	KI agente reductor principal y ácido ascórbico enmascarante de interferencia de I3-.	Manual del equipo.
0,6 % (m/v) Tiourea , 2 % m/v KI, 1,2 % (m/v) Ácido Ascórbico, y 0,25 M HCl	Ambiente	45'	27-39%	5	56,9	Introducción de solución enmascarante para eliminar la interferencia del ácido nítrico.	Dedina et al., 1995.
0,4 % (m/v) Tiourea, 0,8 % (m/v) KI, 0,4 % (m/v) Ácido Ascórbico y 5% (m/v) Ácido málico	Ambiente	45'	85-94%	5	28,7		
			53-58%	2	53,5		
HCl 3% (v/v), Ioduro de potasio (KI) 5% (m/v) , Ácido Ascórbico 5% (m/v), Ácido Sulfámico 10% (m/v)	Ambiente	45'	39-63%	5	41,8		De Moraes et al., 2001

La muestra a analizar provino de una digestión vía húmeda y poseía una concentración final de Ácido Nítrico del 50% (v/v). Esta alta concentración de ácido se esperaba que fuese un interferente de matriz que afectase en la fase líquida de formación del hidruro. Por una parte, la digestión llevaba al analito a su forma más oxidada,  $As^{+5}$ , lo que resultaba en baja eficiencia de generación del hidruro y por otra parte, el Ácido Nítrico podía producir óxidos de nitrógeno volátiles residuales ( $NO_2$ ,  $NO$ ,  $N_2O_4$ ) que interferirían severamente durante la atomización. La adición de Ácido Sulfámico, Urea o mezcla de prereductores con soluciones enmascarantes, Tabla 2, favorecería la eliminación de los óxidos de nitrógeno volátiles previo a la atomización (Kumar et al., 2010; Lopes et al., 2005; De Moraes et al., 2001; Dedina et al., 1995). Si bien en una oportunidad se obtuvieron recuperaciones adecuadas del material de referencia, la repetición de estas condiciones derivó en resultados similares a los demás. Cabe señalar que estos resultados no son adecuados para la determinación de As en grano a nivel de las especificaciones legales vigentes, Anexo III, Tabla 3.

Avanzando en este razonamiento, se agregó un tratamiento térmico por microondas que disminuye los tiempos de incubación (De Moraes et al., 2001) y se aumentó la concentración de los agentes de prereducción (Tabla 3).

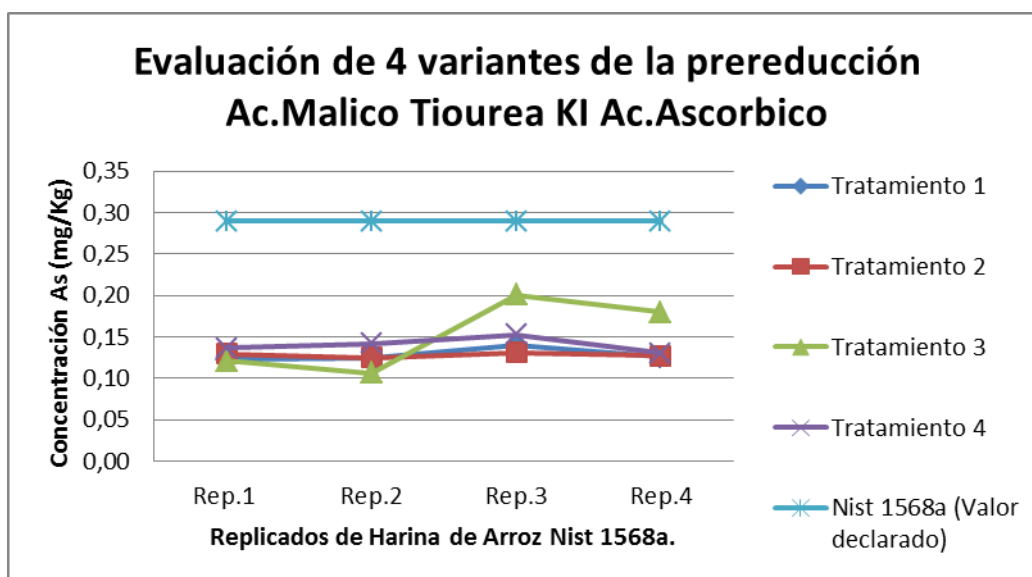
**Tabla 3.** Condiciones de tratamiento con introducción de tratamiento térmico mediante microondas (MW) y aumento de la concentración del agente de preredución.

Tratamiento N°.	Agente Enmascarante	Condiciones de incubación	Agente prereducor	Condiciones de incubación
1	Ácido Málico 5% (m/v), Tiourea 0,4 % (m/v)	MW, 20", 800 W, sistema cerrado	KI/ ácido Ascórbico 2% (m/v)	1 h, temp. Ambiente
2	Ácido Málico 5% (m/v), Tiourea 0,4 % (m/v)	MW, 20", 800 W, sistema cerrado	KI/ ácido Ascórbico 2% (m/v)	30', temp. Ambiente
3	Ácido Málico 5% (m/v), Tiourea 0,8 % (m/v)	MW, 20", 800 W, sistema abierto	KI/ ácido Ascórbico 4% (m/v)	30', temp. Ambiente.
4	Ácido Málico 5% (m/v), Tiourea 0,8 % (m/v)	MW, 20", 800 W, sistema abierto	KI/ ácido Ascórbico 4% (m/v)	1 h , temp. Ambiente.

Los cuatro tratamientos se comportaron de igual forma, con recuperación de NIST 1568a en todos los casos inferiores al 70% (Figura 3). A sí mismo la recuperación del material de referencia no dependió del tipo de tratamiento realizado (Tabla 4). A pesar de que, se observó falta de homogeneidad de varianzas cuando los tamaños de las muestras son iguales no se considera crítico cumplir con los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad (Hammer., 2013).

**Tabla 4.** Resultados del ANOVA de 1 factor para evaluar la existencia de diferencias entre tratamientos debido a modificaciones de las concentraciones de prereducor y los tiempos de incubación.

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	p (igualdad)
Entre muestras	0,00154924	3	0,000516	0,9303	0,456
Dentro de las muestras	0,00666159	12	0,000555		
Total	0,00821083	15			



**Figura 3.** Resultados obtenidos en la evaluación de 4 variantes de la prereducción de Ácido Málico, Tiourea, KI y ácido ascórbico, tratamientos según Tabla 3.

Ya que se utilizaron distintos agentes enmascarantes que se esperaba eliminasen satisfactoriamente la interferencia del Ácido Nítrico, se supuso que la ineficiencia en la formación del hidruro en el material de referencia no estuvo dada por una interferencia de matriz, sino que por la forma en la cual se encontraba el As en el digesto. Por añadidura, si bien la digestión vía húmeda propuesta se encuentra normalizada por AOAC International para el análisis de Pb y Cd en alimentos, en esta digestión se ha reportado la descomposición incompleta de compuestos organoarsenicales los cuales tienen distinta eficiencia de formación de hidruro que el  $As^{+3}$  (Dedina et al., 1995).

Es por esto que se modificó el reductor principal de KI a L-Cisteína, el que permitiría obtener la misma respuesta para las cuatro especies principales de As ( $As^{+3}$ ,  $As^{+5}$ , MMA y DMA) bajo las mismas condiciones de pH (Anawar., 2012). Se trabajó según lo propuesto por De Moraes et al., (2001). Se obtuvo un sesgo positivo con recuperaciones de NIST 1568a de 300%. Se observó una sensibilidad al menos 10 veces inferior para los estándares acuosos respecto a la obtenida utilizando KI como prereductor. En cambio la señal para el material de referencia disminuyó a la mitad en la mayoría de los casos; con picos bien definidos, adecuada sensibilidad y muy similares entre ellos. No se recuperó bien la adición prereducción dando un pico similar a los de las muestras sin adicionar.

Se prosiguió analizando el comportamiento del estándar acuoso prereducido con L-Cisteína y con KI/ Ácido Ascórbico. A iguales condiciones instrumentales con el segundo prereductor se obtenía una excelente señal para el estándar acuoso, pero con el primero no se lograba detectar. De donde se infirió que luego de la prereducción en la matriz el As se encontraba en un alto porcentaje bajo la forma de  $As^{+3}$  o formas con buena eficiencia generadora de hidruros y distintas a la presente en el estándar acuoso,  $As^{+5}$ . Con el Ácido Sulfámico se logró eliminar la interferencia de los  $NO_x$ , pero con el agente prereductor L-Cisteína se logró una prereducción diferencial en los estándares acuosos respecto al digesto.

Para finalizar se construyó una curva adicionada en matriz NIST 1568a. y se compararon los resultados con muestras analizadas por GF AAS (n=2). Se observó un

sesgo positivo entre las muestras analizadas por FI HG GF AAS (muestra 1:  $0,52 \pm 0,10$ ; muestra 2:  $0,42 \pm 0,08$ ) respecto a las analizadas por GF AAS (muestra 1:  $0,28 \pm 0,08$ ; muestra 2:  $0,31 \pm 0,03$ ) de todos modos con sus incertidumbres los resultados eran bastante cercanos.

En esta última determinación se observó que las muestras de arroz, a diferencia de la escala y el blanco de digestión, generaban mucha espuma en el sistema de reacción y separación gas-líquido del generador de hidruros. En una futura prueba se debería de incluir un antiespumante en el sistema, por ejemplo etanol. De todos modos esto no mejoraría la falta de sensibilidad que se observó para los estándares acuosos. Por lo tanto mediante la optimización de las condiciones de reducción, se logró determinar As en matriz harina de arroz mediante la utilización del método de adiciones estándar pre digestión con un sesgo positivo respecto a la técnica GFAAS. Los resultados no cumplieron con las mínimas ventajas esperadas para el uso de la técnica FI HG-GF AAS entre las que se destacan la sensibilidad y la separación del analito de su matriz previo a la detección.

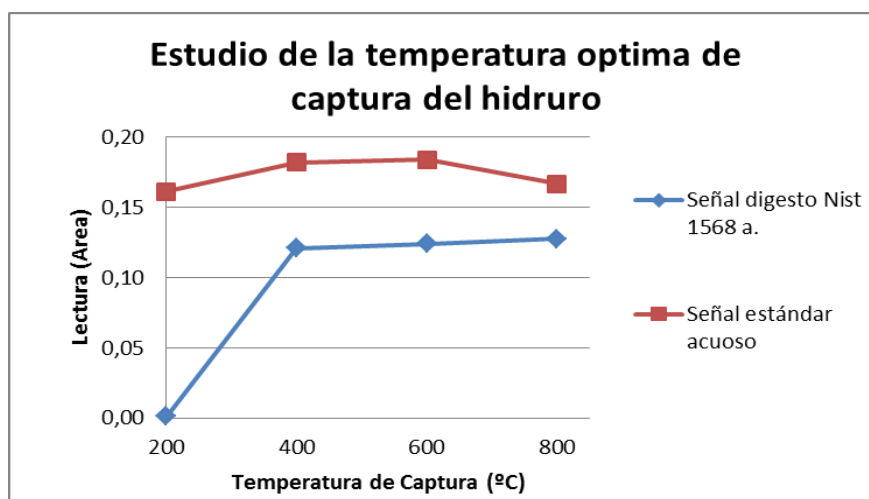
---

## OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES INSTRUMENTALES

Se estudió la influencia de la temperatura de captura del hidruro en el medio atomizador. Para superficies modificadas con Iridio, dependiendo de la calidad del tratamiento del tubo, el rango óptimo de temperaturas de atomización es amplio comenzando a temperaturas próximas al ambiente. De todos modos la temperatura óptima de captura del hidruro en el tubo de grafito puede estar influenciada por las condiciones actuales durante el proceso, ya sea la composición de la fase gaseosa, el equipo utilizado el cual se espera que evite la penetración de oxígeno desde el ambiente al atomizador en el paso de captura, el diseño del horno de grafito, entre otros. Por otra parte a temperaturas muy elevadas pueden ocurrir pérdidas de elementos volátiles, o complicaciones con la interfaz que implicarían por ejemplo la captura del hidruro en la interfaz de cuarzo (Dedina., 2007). Se trabajó a partir del programa de temperaturas del horno de grafito recomendado por el fabricante, Tabla 1.

Los resultados obtenidos revelan que el rango de temperatura óptimo de captura del hidruro estuvo entre 400 y 600 °C (Figura 4). A temperaturas inferiores se observó una captura ineficiente tanto del estándar acuoso como del digesto de NIST 1568a y a temperaturas superiores se observó una leve disminución en la señal del estándar acuoso. En todos los estudios descriptos anteriormente se trabajó con temperatura de captura a 400 °C.





**Figura 4.** Estudio de la temperatura óptima de captura del hidruro para iguales condiciones de pre reducción.

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

El tratamiento de muestra recomendado por el fabricante no fue adecuado para la determinación de As en arroz digerido. La utilización de agentes enmascarantes o distintos agentes prereductores no logró solucionar los problemas observados de falta de sensibilidad en la determinación. La preredución con L- Cisteína si bien dio resultados interesantes requirió del uso de escala adicionada, similar a lo utilizado por Azizur Rahman et al. (2007, 2008). El uso del método de adiciones estándar vuelve a la técnica poco atractiva. Una de sus ventajas principales -por la que se consideró para este análisis- era que el sistema generador de hidruros independizaba el analito de la matriz.

El estudio de robustez de los parámetros instrumentales- temperatura de captura del hidruro en el medio atomizador- mostró resultados en concordancia con lo recomendado por el fabricante del equipo. Se ha utilizado un paso de pirolisis previo a la atomización en la determinación de As en gasolina luego de digestión microondas y sería interesante evaluar su pertinencia para la determinación en arroz (Becker et al., 2012). No obstante, debido a las altas temperaturas del horno de grafito se consideran inexistentes las interferencias en el paso de atomización (Dedina et al., 2007).

Variables como la concentración del Ácido Clorhídrico o Borohidruro de Sodio en literatura no se consideran determinantes para el análisis (Dedina et al., 1995).

Para continuar con este estudio se podría trabajar sobre diversos aspectos entre los que se destacan:

- *Modificar la digestión por vía húmeda para disminuir la acidez residual y la concentración de gases disueltos luego de la digestión:*

La digestión microondas asistida por oxígeno logra disminuir 2,3 veces la cantidad de Ácido Nítrico concentrado en la digestión sin la necesidad de reactivos auxiliares como peróxido de hidrogeno. Además genera hasta un 60% menos de acidez residual luego de la digestión lo cual representa un mínimo de Ácido Nítrico no utilizado durante el proceso de oxidación de la materia orgánica. Esta digestión genera una fase gaseosa incolora en las bombas de digestión se presume debido a la ausencia de  $\text{NO}_2^-$  compuesto altamente interferente en la generación de hidruros- probablemente

debido al proceso de regeneración del Ácido Nítrico favorecido por el oxígeno (Bizzi et al., 2011).

La evaporación de los digestos a sequedad y disolución en agua previa al análisis por generación de hidruros eliminaría los ácidos de la digestión pero se vuelve tedioso para un laboratorio con alto flujo de muestras para analizar (Abedin et al., 2002).

Recientemente se desarrolló un método de digestión para eliminar los efectos de matriz en las medidas por ICP-MS e ICP-OES donde digiere 0,5 g de muestra con 1 mol/L de Ácido Nítrico y 30% m/m de peróxido de hidrogeno, típicamente 1.5 y 2,5 mL respectivamente. De esta forma mediante el aumento en la concentración de peróxido de hidrogeno se logró obviar la necesidad de usar oxígeno presurizado con iguales eficiencias de digestión. A su vez se vio que aumentaba la acidez residual por lo cual se pudo disminuir la concentración de Ácido Nítrico asumiendo la regeneración del mismo durante la digestión debido al oxígeno producido in situ durante la descomposición del peróxido de hidrogeno (Taylor et al., 2015).

- *Evitar el paso de pre reducción realizando la determinación como As<sup>+5</sup>:*

Se puede lograr la completa volatilización del arsenato en ausencia de un paso de preredución mediante el uso de concentraciones mayores de Ácido Clorhídrico y Borohidruro de Sodio y el aumento del tiempo de reacción (Anawar., 2014). Para este último punto existe la posibilidad de aumentar el tamaño del loop de reacción previo al ingreso al separador gas líquido. Ahora bien esta modificación puede favorecer la aparición de interferencias, aumenta los tiempos de análisis y resulta en picos más bajos y anchos.

- *Estudiar la influencia de la cinética de formación y captura del hidruro:*

En esta etapa son determinantes el flujo de argón, la velocidad de introducción del Ácido Clorhídrico y el Borohidruro de Sodio así como del desagüe del separador gas líquido. En el presente trabajo se utilizaron las condiciones recomendadas por el fabricante.

Otro aspecto importante es la distancia entre el capilar interfaz de cuarzo y la superficie del tubo de grafito. Un capilar demasiado inmerso en el tubo de grafito a temperaturas de captura muy elevadas puede determinar la captura del hidruro en la interfaz de cuarzo y disminuir la eficiencia de captura del hidruro (Dedina., 2007).

- *Estudiar el uso de otros modificadores permanentes:*

Aunque el Iridio es el modificador más popular (Dedina., 2007) se ha observado buena eficiencia de captura del hidruro de As en tubos de grafito modificados con Zirconio-Iridio (Serafimovski et al., 2006; Petrov et al., 2006).

Puesto que los resultados obtenidos para FI HG GFAAS fueron insatisfactorios, en el presente trabajo para la determinación de As en grano - Capítulo 2- se utilizó la técnica GFAAS.

## CAPÍTULO 2. ESTUDIO DEL CONTENIDO DE METALES PESADOS EN EL AMBIENTE ARROCERO URUGUAYO EN UNA ZAFRA DE CULTIVO.

### INTRODUCCIÓN.

En Uruguay se distinguen 3 zonas arroceras, Este, Centro y Norte- Litoral Oeste en las cuales en la zafra 2009-2010 se sembraron el 70,7, 8,2 y 21,1 % respectivamente del total sembrado de arroz. La Zona Este del país presenta las zonas topográficas que se consideran más adecuadas (planicies) y los suelos más aptos para el cultivo de arroz. El agua se obtiene por bombeo desde las proximidades de los principales ríos de la cuenca de la Laguna Merín; Ríos Cebollatí, Olimar y Tacuarí; con cantidades ilimitadas de agua para el cultivo. Esta zona abarca los departamentos de Cerro Largo, Treinta y Tres, Lavalleja y Rocha (DIEA, 2014). Al crecer el área sembrada mediante la construcción de presas de riego, el cultivo se ha ido extendiendo hasta zonas de bañados antes consideradas improductivas. La zona Norte- Litoral Oeste abarca los departamentos de Artigas, Salto, Paysandú, Río Negro y Soriano y se caracteriza por una topografía variada con zonas onduladas con pendientes moderadas a fuertes. Las fuentes principales de agua son los ríos Cuareim y Uruguay y las represas. Por último la Zona Centro con un 8,2 % del área total sembrada abarca los departamentos de Durazno, Tacuarembó y Rivera y, se caracteriza por una topografía variada con zonas onduladas de pendientes moderadas. El agua se obtiene principalmente de represas. En estas dos últimas zonas cuando el agua se obtiene de represas el área de riego depende de las precipitaciones anuales previas al cultivo. (Durán et al., 1998; Tommasino et al., 2003; DIEA., 2010; DIEA., 2014).

En nuestro país, la siembra del arroz se realiza predominantemente en seco de setiembre a noviembre en forma mecanizada. En el ciclo de cultivo se distinguen 2 fases bien diferenciadas; en la primera fase el suelo permanece seco desde la siembra hasta los 20-30 días posteriores a la emergencia y luego se realiza la inundación hasta los 15-20 días anteriores a la cosecha, o hasta completar la madurez fisiológica del cultivo. Por lo cual, la mayor parte del ciclo se desarrolla en suelo inundado, aproximadamente 100 días en un régimen de riego continuo, condición en la cual aumenta la disponibilidad de nutrientes para las plantas disminuyendo las necesidades de fertilización. Los nutrientes principales que se agregan al suelo como fertilizantes son: a. nitrógeno (N) en formas amoniacales y amídicas (Urea) en la siembra y en las etapas de macollaje y diferenciación del primordio floral; b. P en la siembra como fosfatos solubles monoamónicos o diamónicos; c. potasio (K) en la siembra como cloruro de potasio y d. cinc (Zn) ocasionalmente y restringido a suelos alcalinos con pH alto (Battello et al., 2009).

Datos estadísticos de las últimas zafras indican que en 2006/2007 se fertilizó con fosfato de amonio en el 58,7 % y urea en el 94,9% del área sembrada. También se aplicó glifosato en el 82,5% del área sembrada. En la zafra 2008/2009, en el 95,3 % del área sembrada se utilizaron herbicidas post siembra, y en el 26,8% insecticidas para gorgojo. En la zafra 2009/2010, se debió realizar tratamiento para Brusone (*Pyricularia oryzae*) en el 45 % del área sembrada con aplicación de fungicidas. (DIEA., 2007, 2009 y 2010).

En su gran mayoría, el cultivo de arroz se realiza en rotación con praderas (mezclas de gramíneas y leguminosas) e integración de ganadería que, además de mejorar las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, disminuye en promedio la aplicación de agroquímicos, ya que estos no se aplican en la etapa de pasturas. Según la encuesta de arroz, zafra 2013-2014, la actividad principal asociada

al arroz es la ganadería de carne. Sin embargo, en los últimos años se ha incorporado en forma creciente la siembra de cultivos de secano de verano (maíz, sorgo, soja). La distribución del cultivo respecto al tipo de chacra varía a lo largo del país. En una visión global el 58% del cultivo de arroz se lleva a cabo sobre campo nuevo o retornos de otras actividades en la fase de recuperación de la chacra y, el 42% ocurre sobre rastrojos de arroz. Al mirar cada zona en particular existen variaciones que se han mantenido a lo largo de los años. Por ejemplo, las Zonas Norte-Litoral Oeste y Centro siembran mayoritariamente arroz sobre rastrojo, 50,4 y 67,5 % respectivamente. En cambio la Zona Este presenta aproximadamente dos tercios del área sembrada con arroz sobre campo nuevo o diversas modalidades de retorno, 64% del área sembrada (DIEA., 2014).

En la línea de este trabajo, Rivero et al., (2006) estudiaron los contenidos de As, Cd y Pb en 49 muestras de arroz comercial (*Oryza sativa L*) cultivados en Uruguay en las formas integral, parbolizado sin pulir, parbolizado pulido y blanco. Concluyeron que los niveles de Cd y Pb estaban en concentraciones muy inferiores a los límites establecidos en el Codex Alimentarius; y para el As los valores eran muy inferiores a los definidos como límite en la Legislación Uruguaya vigente (As < 2,0 mg/kg; Reglamento Bromatológico Nacional, Dec 315/994). En esa fecha, el Codex Alimentarius no incluía especificaciones para el contenido de As en arroz, las primeras menciones a ese tema en la agenda de trabajo de dicho organismo datan del año 2010.

Otro antecedente importante en el país es el proyecto FPTA 171 “*Determinación de residuos de agroquímicos en grano, agua y suelo en distintos sistemas de producción de arroz*” llevado a cabo por el mismo grupo de trabajo del proyecto ANII anteriormente mencionado (Hill et al., 2008). En esta oportunidad, se analizó Cd y Pb en grano, suelo y agua en las zonas Norte y Este. Se eligieron 7 sitios con manejos de rastrojo, retorno y campo nuevo. En todos los casos, se encontraron valores por debajo de los límites de detección analíticos; salvo para el caso del Cd en agua en el cual se detectaron niveles por encima del límite permitido (Anexo III, Tabla 1). Como resultado de este trabajo, se sugirió la necesidad de un estudio de mayor alcance que involucrase otras regiones del país y distintos sistemas de producción al haber sido detectados estos niveles elevados dentro y fuera de la cuenca arroceras.

En este trabajo de tesis se buscó caracterizar el contenido de algunos metales pesados –As, Cd, Pb- en arroz bajo las condiciones de cultivo en Uruguay para evaluar su impacto ambiental y su grado de presencia en el producto final. Por una parte, se estudió cómo afectan las condiciones de cultivo más habituales, campo nuevo, rastrojo y retorno, al contenido de estos metales pesados en el ambiente arroceras (agua, grano y suelo). Se trabajó sobre 20 chacras distribuidas en las 3 zonas arroceras del país, Norte, Centro y Este, durante una zafra de cultivo, 2011-2012. Por otra parte, se evaluó la calidad del arroz uruguayo respecto a la presencia de los mismos para cumplir con las exigencias de seguridad alimentaria del mercado Europeo, uno de los principales mercados objetivo de exportación de la ACA. La definición de presencia o ausencia de impacto ambiental se realizó en comparación con el marco legal vigente aplicable al ambiente en estudio (Anexo III).

## OBJETIVOS.

### OBJETIVO GENERAL.

Estudiar el contenido de As, Cd y Pb en el ambiente arrocero uruguayo (suelo, agua y grano) durante una zafra de cultivo.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Evaluar las distintas formas de cultivo de arroz en Uruguay respecto al contenido de As, Cd y Pb en el ambiente arrocero y su cuenca hidrográfica asociada.
- Seguridad alimentaria: evaluar la calidad del arroz uruguayo respecto a la presencia de As, Cd y Pb para cumplir con las exigencias de seguridad alimentaria del mercado Europeo.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

### PLAN DE MUESTREO.

Se planificó un muestreo no probabilístico donde se seleccionaron chacras representativas de zonas y manejos de arroz diferenciales, considerando la frecuencia del cultivo en los últimos 30 años, distintas topografías y formas de riego asociadas (ej., inundación, riego continuo, encharcado), suelos con texturas diferentes, y momentos de la rotación (ej., primer cultivo, tercer cultivo). Se evaluó 1 ciclo de cultivo de arroz, zafra 2011-2012.

En cada zona se trabajó sobre chacras de arroz de primer año ya sea con campo nuevo (sin cultivo previo de arroz) o diversos retornos y, sobre chacras de arroz sobre rastrojo que vienen de cultivos de arroz en los años anteriores. Se eligieron 20 chacras de las cuales 4 pertenecieron a campos nuevos, 8 a manejos de retorno y 8 a manejos de rastrojo. Según cada tipo de cultivo antecesor, la mitad de las chacras se ubicaron en la Zona Norte-Litoral y Centro y el resto en la Zona Este. A su vez, dentro de las modalidades de cultivo sobre retorno y rastrojo, de las 8 chacras elegidas 4 correspondieron al manejo bajo insumo y las otras 4 al alto insumo. Así se abarcaron diferentes suelos e intensidad en la rotación arroz – pasturas; cultivos tradicionales con muchos años de arroz, usos intensivos y otros sitios de menor historia arrocera (Tabla 5).

**Tabla 5.** Descripción de las 20 chacras muestreadas con la fuente de agua, y el cultivo antecesor de cada predio y el uso histórico de la chacra en cuanto a carga de insumo.

Nº de Chacra	Departamento	Fuente de agua	Cultivo antecesor	Carga de insumo
1	Artigas	Represa	Campo nuevo	NC
2	Artigas	Arroyo Guaviyu con influencia del lago	Rastrojo	bajo insumo
3	Artigas	Represa	Rastrojo	bajo insumo
4	Artigas	Represa Río Cuareim	Retorno	alto insumo
5	Artigas	Represa Río Cuareim	Rastrojo	alto insumo
6	Artigas	Represa	Campo nuevo	NC
7	Artigas	Represa	Retorno	alto insumo
8	Artigas	Represa	Rastrojo	alto insumo
9	Artigas	Represa	Retorno	bajo insumo
10	Artigas	Represa	Retorno	bajo insumo
11	Tacuarembó	Represa	Retorno	bajo insumo
12	Cerro Largo	Represa con influencia del Tacuarí	Rastrojo	alto insumo
13	Treinta y Tres	Laguna Merín	Retorno	alto insumo
14	Treinta y Tres	Río Cebollatí	Retorno	bajo insumo
15	Treinta y Tres	Represa	Campo nuevo	NC
16	Treinta y Tres	Represa	Rastrojo	bajo insumo
17	Treinta y Tres	Represa	Retorno	alto insumo
18	Rocha	Represa	Rastrojo	bajo insumo
19	Rocha	Represa India Muerta	Campo nuevo	NC
20	Rocha	Laguna Negra	Rastrojo	alto insumo
NC: No corresponde dato.				

En la matriz suelo se realizaron muestreos a tiempo cero, previo a la realización del cultivo correspondiente al mes de agosto, y en la cosecha. Se tomó 1 muestra compuesta a partir de 3 puntos por chacra lo cual en los dos tiempos de muestreo en 1 ciclo de arroz totalizan 40 muestras- Tabla 6. El muestreo se realizó con calador de

mano. En primer lugar se eliminó la capa vegetal superior y luego se muestreó en la capa de suelo de 0 a 30 cm; abarcando la región donde se concentra la mayor masa radicular del arroz. El muestreo de suelos se realizó según los lineamientos de la norma ISO 10381-4, Soil Quality-Sampling- Part 4: Guidance on the procedure for investigation of natural, near-natural and cultivated sites. El muestreo de metales requiriere el uso de recipientes nuevos, o previamente lavados con Ácido Nítrico, en esta oportunidad se utilizaron bolsas de nylon de primer uso. Las muestras se mantuvieron refrigeradas hasta su procesamiento en el laboratorio.

En aguas se trabajó en dos escalas espaciales: cuenca hidrográfica (Ríos Cebollatí y Olimar), y chacra. Se consideraron las cuencas hidrográficas de los Ríos Olimar y Cebollatí; las cuales son influenciadas por la actividad arrocera de la Zona Este recibiendo el escurrimiento de aproximadamente 10.000 ha de cultivo de arroz. Es destacable el valor de estudiar la cuenca hidrográfica debido a que esta constituye una unidad espacial natural, en la cual los diversos componentes interactúan entre sí mediante flujos de materia y energía. En este sentido Achkar et al., (2004), visualizan a la cuenca como un "operador sistémico" en el cual cualquier alteración producida en alguno de sus componentes, en un sitio dado, incidirá en el funcionamiento de los otros componentes. Por ser la cuenca una unidad natural de funcionamiento, resulta sumamente adecuada para el análisis de procesos así como de impactos y alteraciones. El muestreo de aguas se realizó según los lineamientos de la norma ISO 5667-3:2003, Water Quality-Sampling-Part 3: Preservation and handling of water samples. Las muestras se recolectaron en recipientes de plástico, previamente lavados con Ácido Nítrico y se mantuvieron refrigeradas hasta su preservación en el laboratorio. La misma se realizó con Ácido Nítrico hasta pH menor a 2.

A nivel cuenca se realizaron 7 muestreos en diferentes etapas del proceso a modo de cubrir el período de aplicaciones de agroquímicos al cultivo. El primer muestreo fue realizado en el mes de agosto previo a la realización del cultivo. Luego, con el cultivo ya instalado, se realizó un muestreo por mes en el período de noviembre a abril, este último mes corresponde a la cosecha (Tabla 6). Se realizaron 3 tomas de muestra por río, en cada muestreo, con un punto en común en la cuenca baja de ambos ríos, lo cual da un total de 35 muestras en el período de estudio (Figura 5).



**Figura 5.** Distribución de los puntos de muestreo de ríos, cuenca de los ríos Cebollatí y Olimar. [www.mapasdeluruguay.eluruguayo.com/mapa-relieve.htm](http://www.mapasdeluruguay.eluruguayo.com/mapa-relieve.htm).

Las muestras de agua en las chacras se tomaron en 3 momentos. El primero fue realizado en el mes de agosto previo a la realización del cultivo. A continuación, se muestreó al inicio del riego y por último al finalizar el riego. Al inicio del riego, se utilizó el concepto de chacra calzada donde la chacra presenta una lámina de agua de entre 5 y 15 cm de profundidad estabilizada en su superficie. En consecuencia se obtuvieron muestras del agua de entrada y de salida de la chacra, las cuales se consideraron representativas de la situación en campo. El muestreo de agua en chacra totaliza 80 muestras (Tabla 6).

En la cosecha se recolectó 1 muestra compuesta de grano por chacra, 20 muestras en total (Tabla 6), en bolsas de nylon de primer uso.

Los muestreos de suelos, aguas y granos fueron realizados por la Unidad de Análisis de Aguas de Facultad de Química. El diseño de muestreo fue definido previamente por el equipo de trabajo del proyecto *“Determinación de indicadores de sustentabilidad ambiental asociados a distintos usos y manejos en arroz que orienten buenas prácticas agrícolas”* ya mencionado anteriormente.

**Tabla 6.** Esquema de muestreo de agua, suelo y grano en 20 chacras de arroz durante la Zafra 2011/2012.

Estado Hídrico del suelo	Momento de muestreo	Matriz a muestrear	Nº de muestras
No inundado	Tiempo cero, Condiciones previas a la instalación del cultivo.	Agua en chacra	20
		Suelo	20
		Agua en cuenca hidrográfica	5
No inundado	Noviembre	Agua en cuenca hidrográfica	5
Inundado	Diciembre, inicio del riego	Agua en chacra	40
		Agua en cuenca hidrográfica	5
Inundado	Enero	Agua en cuenca hidrográfica	5
Inundado	Febrero	Agua en cuenca hidrográfica	5
Inundado	Marzo, Finalización del riego	Agua en cuenca hidrográfica	5
		Agua en Chacra	20
No inundado	Abril/ Cosecha	Agua en cuenca hidrográfica	5
		Grano	20
		Suelo	20
<b>Nº total de muestras en la zafra</b>		<b>Agua en Chacra</b>	80
		<b>Suelos</b>	40
		<b>Agua en cuenca hidrográfica</b>	35



	<b>Granos</b>	20
--	---------------	----

El plan de muestreo estipulado se llevó a cabo casi en su totalidad, exceptuando 2 muestras de agua que no pudieron ser recolectadas por problemas climáticos. Estas muestras correspondieron al agua de salida en la finalización del riego de las Chacras Nº 6 y 7 en Artigas.

#### METODOLOGÍA ANALÍTICA.

Todos los análisis que se describen a continuación se realizaron gravimétricamente; esto representa una gran ventaja ya que se obtiene mayor exactitud y precisión que con el uso de material volumétrico aforado y es la técnica más adecuada para el análisis de trazas. También se utilizó material plástico descartable, muy importante en este tipo de análisis dado que evita las contaminaciones cruzadas.

Para la realización de los análisis estadísticos se utilizó el software estadístico Past 3.0 (<http://folk.uio.no/ohammer/past>). Se realizó una verificación de funcionamiento del software con los valores certificados proporcionados por la base de datos estadísticos de referencia del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología de Estados Unidos (National Institute of Standards and Technology, NIST). Para realizar esta verificación se utilizó el diseño SiRstv que corresponde a un ANOVA de un factor balanceado, con 5 replicados por muestra y 5 tratamientos. (<http://www.itl.nist.gov/div898/strd/>). Se obtuvieron resultados del ANOVA de 1 factor concordantes con los valores certificados.

#### SUELOS.

El tratamiento de muestra para determinar contenidos totales en suelo se realizó según la norma ASTM D3976-92(2010) "*Standard Practice for Preparation of Sediment Samples for Chemical Analysis*" y posterior digestión por vía húmeda en sistema cerrado a alta presión y microondas según método EPA 3051A "*Microwave assisted Digestion of Sediments, Sludges, Soils and Oils*" (EPA, 2007). En el digesto obtenido se determinó As, Cd y Pb por Espectrometría de Emisión de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-OES)– Anexo II ,Tabla 1.

#### AGUAS.

La determinación de As, Cd y Pb en agua se realizó por GF AAS- Anexo II, Tabla 1. Se trata de una técnica muy sensible dado que toda la muestra se atomiza en un período muy breve y el tiempo promedio de residencia de los átomos en el camino óptico es de un segundo o más; muy superior a la atomización por llama ( $10^{-4}$ s). Esto último permite obtener límites de detección adecuados para cumplir con los requerimientos legales de las normas nacionales e internacionales (Anexo III, Tabla 1). Para solucionar problemas de interferencias de la matriz en GF AAS, se cuenta con los métodos de corrección con fuente continua, lámpara de deuterio, y corrección basado en efecto Zeeman.

La determinación de As y Cd por GF AAS en aguas con corrección de línea de base por lámpara de deuterio se encuentra acreditada según la norma ISO 17025:2005 "*General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*" por el organismo de acreditación de Inglaterra (UKAS: United Kingdom

Accreditation Service: [www.ukas.com](http://www.ukas.com)) basado en la norma ISO 15586:2003: “*Water quality - Determination of trace elements using atomic absorption spectrometry with graphite furnace*”. [www.iso.org](http://www.iso.org) para el equipo Espectrofotómetro de Absorción Atómica Perkin Elmer AA 200 con horno de grafito HGA 900- Anexo II, Tabla 1-. Este nivel de acreditación asegura la calidad y trazabilidad analítica de los resultados obtenidos.

## GRANOS.

Las muestras de grano fueron descascarilladas en descascarilladora SATAKE provista por el Departamento de Cereales y Productos Oleaginosos del LATU. A continuación se molió el grano para homogenización en molino de cuchillas Retsch ZM 200 y se tamizó por malla > 1,0 mm. Después se digirió la muestra por vía húmeda en sistema cerrado a alta presión y microondas según el Método AOAC 999.10:2005 (AOAC, 2010)- Anexo II, Tabla 1-.

Para la determinación del contenido de As, Cd y Pb en grano se utilizó GF AAS con la aplicación del método de la adición estándar para contrarrestar las interferencias químicas y espectrales introducidas por la matriz de la muestra; junto con el uso de los métodos de corrección instrumentales ya mencionados para el análisis de aguas- Anexo II, Tabla 1-. Para resolver las interferencias analíticas se utilizaron condiciones de trabajo STPF (Stabilized Temperature Platform Furnace) que incluyen corrección de fondo por efecto Zeeman y uso de tubos con plataforma de L'vov, (Beaty et al., 1993). Para la determinación de As se trabajó según lo propuesto por Davidowski et al., (2009) adicionando Iridio como modificador permanente según lo propuesto por Volynsky., (2004).

## ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD DEL ARSÉNICO EN EL SUELO BAJO CONDICIONES DE INUNDACIÓN.

Se realizó un estudio de disponibilidad de As bajo condiciones de inundación en ausencia de planta de arroz. El diseño estadístico utilizado fue el de Tratamiento Totalmente Aleatorizado con tres repeticiones. Las muestras de suelo permanecieron refrigeradas y húmedas desde su extracción hasta el momento del ensayo. Previo a comenzar el ensayo se secaron a 40°C hasta peso constante y luego se molieron. En tubo de 50 mL, tapa rosca, se pesó 5 g de suelo seco y se adicionó 20 mL de agua desionizada, calidad ASTM tipo II. Los suelos así tratados se incubaron a temperatura controlada ( $25 \pm 2$  °C), en sala provista por el departamento de Aguas y Productos Químicos del LATU, tapados y sin agitación, durante 0, 5, 10, 15, 30 y 60 días (Yamaguchi et al., 2011; Stroud et al., 2011) . Culminado el tiempo de incubación, cada suelo se centrifugó a 4000 g y luego se determinó pH con un electrodo de vidrio combinado de Ag/AgCl y Eh con electrodo de platino y se separó el sobrenadante del suelo con filtración por 0,45 µm -Sartorius Ministart RC 25.

Para este ensayo se eligieron diez de las veinte chacras en estudio de manera de cubrir todos los niveles de As observados en grano. Se priorizaron aquellos sitios aledaños que a pesar de tener igual tipo de suelo presentaron distinto nivel de As en grano en cosecha por lo cual se infirió que esas diferencias podrían estar asociadas a diferencias en el cultivo antecesor, por ej Chacras N° 4 y 5 (Retorno/Rastrojo) y Chacra N° 15 y N° 16 (Campo nuevo/ Rastrojo), Tabla 5.

Para predecir mediante una extracción química en laboratorio la capacidad potencial del suelo de liberar As a la solución del suelo en condiciones de inundación, se realizó una extracción por triplicado con 0,05 M  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  (Stroud et al., 2011). Luego de la extracción, se procedió de igual forma que para los suelos incubados.

Se determinó As en la solución sobrenadante por GF AAS con corrección de fondo por efecto Zeeman- Anexo II, Tabla 1. La determinación de As en  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  requirió de ajustes metodológicos que se detallan en el Anexo IV.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### AGUA, SUELO Y GRANO EN CHACRA.

En el presente trabajo se estudiaron metales tóxicos para el ambiente y la salud por lo cual se utilizaron los siguientes criterios para la presentación de los resultados: *a.* Cuando un dato resultó menor al límite de detección analítico se sustituyó por la mitad de este último. *b.* Cuando un dato resultó superior al límite de detección pero inferior al límite de cuantificación analítico se sustituyó por el valor medio entre el límite de detección y de cuantificación (EPA., 2010).

### PLOMO.

Los contenidos totales de Pb en suelo analizados en tiempo cero, previo a la instalación del cultivo y en cosecha- Tabla 7- en ningún caso superaron la normativa internacional más exigente, Canadian Environmental Quality Guidelines, Pb: 70 mg/kg, (Anexo III, Tabla 2). De todos modos resulta interesante valorar si se produjo una modificación en el suelo respecto a este parámetro debido a la instalación del cultivo; para evaluar por ejemplo si el suelo vio afectado su nivel de Pb debido a la aplicación de agroquímicos.

**Tabla 7.** Resultados obtenidos para Plomo (Pb) en las tres matrices analizadas en chacra. ND: No detectado, SD: Se detecta.

Nº de Chacra	Agua en chacra Pb (mg/L)				Suelos		Granos
	Tiempo cero	Inicio del riego		Final del riego	Tiempo cero	Cosecha	Cosecha
	Agua Fuente	Entrada	Salida	Agua Salida	Pb (mg/kg) base seca		Pb (mg/kg)
1	SD < 0,0050	ND	ND	0,0057	8,6	8,6	ND
2	0,0060	ND	ND	0,0080	12	12	ND
3	ND	ND	ND	0,011	16	13	ND
4	ND	ND	ND	SD < 0,0050	13	SD < 6,0	ND
5	ND	ND	ND	0,015	8,2	7,9	ND
6	SD < 0,0050	ND	ND	no se muestreó	6,3	10	ND
7	ND	ND	ND	no se muestreó	15	7,4	ND
8	0,0079	ND	SD < 0,0050	0,020	16	10	ND

9	SD < 0,0050	ND	ND	0,0051	19	18	ND
10	ND	SD < 0,0050	ND	0,014	17	16	ND
11	SD < 0,0050	SD < 0,0050	ND	0,0066	6,8	SD < 6,0	ND
12	0,014	0,019	0,0081	0,011	6,7	7,3	ND
13	SD < 0,0050	0,014	0,016	SD < 0,0050	ND	SD < 6,0	ND
14	ND	SD < 0,0050	0,0010	0,012	8,7	6,7	ND
15	ND	0,010	0,025	0,0060	9,0	6,9	ND
16	ND	0,0070	0,012	0,034	8,2	10	ND
17	0,0066	0,015	0,012	0,0085	8,5	SD < 6,0	ND
18	ND	ND	0,012	SD < 0,0050	8,3	7,8	ND
19	0,0063	ND	ND	SD < 0,0050	9,6	7,3	ND
20	0,0062	ND	ND	SD < 0,0050	9,2	7,6	ND
LD/LC	0,0020/0,0050				2,0/6,0		0,020/ 0,040

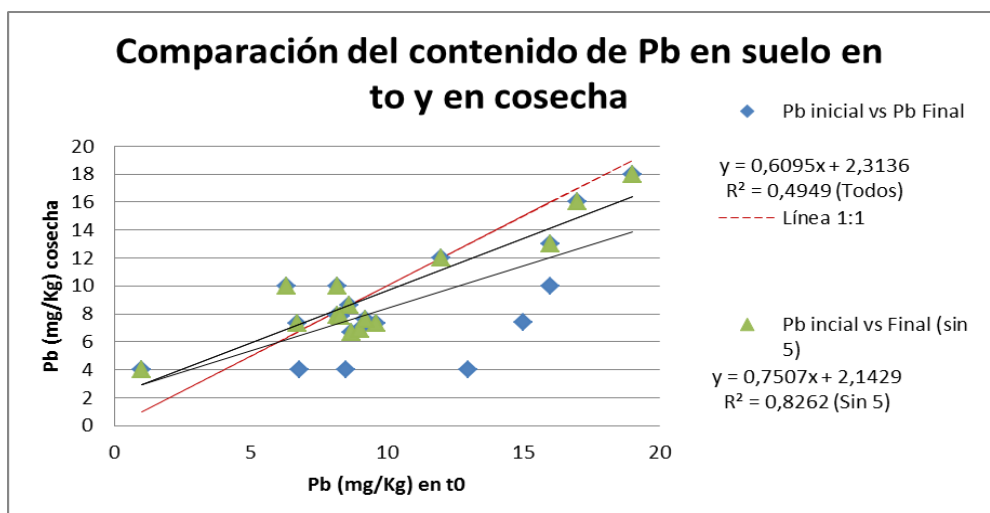
Se realizó un ANOVA de 1 factor y se comprobó que los contenidos de Pb en el suelo en los dos tiempos de muestreo evaluados no difirieron significativamente ( $p(F)$  0,16; Tabla 8)

**Tabla 8.** Resultados del ANOVA de 1 factor comparando los contenidos totales en suelo de Plomo (Pb) en tiempo cero, previo a la instalación del cultivo y en cosecha.

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	p (igualdad)
Entre muestras	29,929	1	29,929	1,754	0,1933
Dentro de las muestras	648,367	38	17,0623		
Total	678,296	39			

Sumado a esto se realizó un análisis de regresión para la relación entre Pb en tiempo cero y en cosecha en suelo, Figura 6, donde se distinguieron 5 Sitios que se apartaban de la tendencia general debido a que dieron menor valor de Pb en el suelo en cosecha que en tiempo cero. Si estos Sitios se eliminan del análisis de regresión, el resto del grupo tienden a estar sobre la línea 1:1 ( $r^2$  0,83;  $p < 0,001$ ). Observando características generales de este grupo de suelos en su mayoría se trata de campos

donde se sembró arroz sobre retornos de pradera, campo u otros retornos con suelos de texturas y contenidos de materia orgánica variados. Dada la amplitud de características observadas en estas Chacras, no se pudo diferenciar ninguna variable de manejo que explique estos resultados.



**Figura 6.** Análisis de regresión que compara los contenidos de Pb en suelo en tiempo cero, previo a la instalación del cultivo y en cosecha.

De las 80 muestras de agua tomadas de las chacras en tiempo cero, al inicio y al final del riego el 43% resultó inferior al límite de detección analítico (0,0020 mg/L) y el 18% arrojó resultados detectables pero no cuantificables, superiores al límite de detección pero inferiores al límite de cuantificación analítico (0,0050 mg/L). Las 32 muestras restantes presentaron diversos valores cuantificables pero únicamente en un caso se superó la especificación legal nacional, 0,034 mg/L de Pb al final del riego en el agua de salida de una de las chacras, (Anexo III, Tabla 1). Este valor tiene asociada una incertidumbre del 15% (0,034±0,005) por lo cual aún podría considerarse aceptable (Tabla 7).

En grano todas las muestras estuvieron por debajo del límite de detección analítico (0,020 mg/kg) (Tabla 7), resultado que coincide con lo reportado por los otros dos trabajos previos realizados en Uruguay (Hill et al., 2008; Rivero et al., 2006). A pesar de que se encontraron niveles de Pb en suelo esto no implicó su acumulación en el grano acorde a lo observado por Chen et al. (2007). Por otra parte según el análisis realizado la presencia del cultivo no modificó los contenidos de Pb en el suelo. Por lo cual como se describió anteriormente se trata de un elemento que se encuentra muy fijado al suelo en formas de baja fitodisponibilidad (Chen et al., 2007).

Bajos niveles de Pb en suelo estimularon la actividad microbiana mejorando las condiciones nutricionales y promoviendo el crecimiento del arroz, aún hasta 300 mg/kg no se detectaron modificaciones significativas en el rendimiento del cultivo. Recién encima de 500 mg/kg se observó riesgo ecológico para las plantas y el suelo (Zeng et al., 2007). En la misma línea 100 mg/kg de Pb en suelo fueron evaluados como moderadamente tóxicos, y 200 mg/kg altamente tóxicos para el crecimiento del arroz (Verma et al., 2003). En el presente trabajo se detectaron niveles de Pb en suelo muy inferiores a los descriptos por lo cual no sería esperable riesgo ecológico para el suelo ni para los productos en este cultivados.

## CADMIO.

Para el Cd en el sistema en estudio todos los resultados obtenidos en las matrices suelo en tiempo cero y en cosecha y agua en chacra en tiempo cero, inicio y final del riego - Tabla 9- resultaron inferiores al límite de detección analítico ( 0,00025 mg/L y 0,30 mg/kg respectivamente). Es importante destacar que los límites de detección y cuantificación obtenidos fueron adecuados para cumplir con las especificaciones legales más exigentes (Anexo III : Agua, Tabla 1, 1 µg/L, Suelo, Tabla 2, 0,8 mg/kg). La determinación de Cd en suelo se realizó con límites de detección 3 veces inferiores a la especificación legal más exigente, anteriormente mencionada, siendo la situación analítica más comprometida. Si hubiesen aparecido muestras con contenidos próximos a ese valor se habría utilizado una segunda técnica confirmatoria más sensible como GF AAS.

**Tabla 9.** Resultados obtenidos para Cadmio (Cd) en las tres matrices analizadas en chacra. ND: No detectado, SD: Se detecta.

Nº de Chacra	Agua en chacra Cd (mg/L)				Suelos		Granos
	Tiempo cero	Inicio del riego		Final del riego	Tiempo cero	Cosecha	Cosecha
	Agua Fuente	Entrada	Salida	Agua Salida	Cd (mg/kg) base seca		Cd (mg/kg)
1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	SD < 0,010
2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	SD < 0,010
3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,011
5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,012
6	ND	ND	ND	no se muestreó	ND	ND	ND
7	ND	ND	ND	no se muestreó	ND	ND	SD < 0,010
8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,012
9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	SD < 0,010
10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	SD < 0,010
11	ND	ND	ND	ND	ND	ND	SD < 0,010
12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,025
13	ND	ND	ND	ND	ND	ND	SD < 0,010
14	ND	ND	ND	ND	ND	ND	SD < 0,010
15	ND	ND	ND	ND	ND	ND	SD < 0,010

16	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,018
17	ND	ND	ND	ND	ND	ND	SD < 0,010
18	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
19	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
20	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,013
LD/LC	0,00025/0,00050			0,30/0,60			0,0020/0,010

En grano se obtuvieron datos cuantificables en 6 muestras con contenidos entre 0,011 y 0,025 mg/kg - Tabla 9-. Este valor máximo es 8 veces inferior al límite máximo para Reglamento (CE) nº 1881/2006 y 20 veces inferior al límite máximo fijado por la Reglamentación Mercosur GMC N°12/11 (Anexo III, Tabla 3). Las recuperaciones del material de referencia harina de arroz fueron en promedio de 115%, n=9, DER 18%.

Rivero et al., (2006) encontraron que el contenido de Cd en arroz integral en las 49 muestras analizadas fue de (3,43± 0,68) µg/kg, límite de detección 1 µg/kg. En el presente estudio se trabajó con un límite de detección de 2,0 µg/kg, y límite de cuantificación de 10 µg/kg por lo cual los resultados no son comparables a los obtenidos por Rivero et al., (2006). Estos autores si bien trabajaron con digestión por vía seca la cual al no diluir la muestra mejorarían los límites de detección en al menos 5 veces respecto a la vía húmeda, utilizaron un equipo con corrección de fondo por lámpara de deuterio. En el presente trabajo se utilizó corrección de fondo por efecto Zeeman lo cual al mejorar la precisión en el análisis de matrices complejas podría explicar el muy buen límite de detección obtenido (Beaty et al., 1993).

Se obtuvieron resultados similares a los reportados por el proyecto antecesor realizado a nivel país en las matrices agua en chacra y suelo (Hill et al., 2008). En grano, a diferencia de su antecesor que había reportado todas las muestras no detectadas, en esta oportunidad se cuantificaron un 30% de las muestras analizadas. Los niveles encontrados no son significativos y no afectan la seguridad alimentaria del producto ya que son muy inferiores a las normativas más exigentes respecto a inocuidad de alimentos (Anexo III, Tabla 3).

A nivel internacional se obtuvieron niveles de Cd de 0 a 0,371 mg/Kg, en promedio 0,086 mg/kg (n= 43) en granos cultivados en suelos con 1,75-1,85 mg/kg de Cd (Yu et al., 2006). En la misma línea para suelos con 0,43 mg/kg de Cd, en grano se obtuvieron niveles de Cd entre 0,08 y 0,45 mg/kg con una media de 0,24 mg/kg (n=5) (Diao et al., 2005). Cabe agregar que el mismo cultivar sembrado en suelos con bajos y altos contenidos de Cd, suelo control, 0,3- 0,6 y 1,2 mg/kg de Cd, acumulo en grano de 0,021 a 0,14, 0,07 a 0,27 y 0,12 a 0,33 mg/kg de Cd respectivamente (Ye et al., 2014). En suelos con niveles de Cd del orden de los de nuestro país, 0,062 mg/kg se observó una acumulación de Cd en grano de 0,005 mg/kg (n=3) (Moreno-Jiménez et al., 2014). En suma, la tendencia indica que al aumentar la concentración de Cd en el suelo también tiende a aumentar su acumulación en grano (Diao et al., 2005; Ye et al., 2014). Estos resultados son comparables con los obtenidos en el presente trabajo donde los bajos niveles de Cd obtenidos en suelo se ven reflejados en los resultados obtenidos en grano.

Cabe destacar que la acumulación de Cd en grano está fuertemente relacionada con la variedad de cultivar utilizado sobre todo en suelos con bajo contenido de Cd como

los mencionados por lo cual resultaría interesante estudiar el comportamiento de los cultivares en tal sentido (Yu et al., 2006; Diao et al., 2005).

Dadas las condiciones de anaerobiosis en las cuales se cultiva el arroz en el país era esperable que la acumulación de Cd en grano no fuese significativa. Bajo inundación el potencial redox del suelo es muy bajo, por lo cual el azufre puede reducirse a sulfuro ( $S^{-2}$ ) y fijar el Cd como sulfuro de Cd (CdS), compuesto de baja solubilidad acuosa (Hu et al., 2013a; Hu et al., 2013b; Moreno- Jimenez et al., 2014).

#### ARSÉNICO.

Para la determinación de As en la matriz suelo se obtuvieron algunos resultados cuantificables pero que en ningún caso superaron la normativa internacional más exigente, Canadian Environmental Quality Guidelines, Anexo III, Tabla 2, (Tabla 10). Los niveles de As encontrados en suelo se encuentran próximos a la concentración mundial natural de As en suelo, 5 mg/kg (Patel et al., 2005; Hossain et al., 2008)

De las 80 muestras de agua en Chacra analizadas el 30% resultó inferior al límite de detección analítico, 0,0010 mg/L y, el 29% se detectó pero no se pudo cuantificar, límite de cuantificación 0,0030 mg/L. Dentro del 40 % que correspondió a resultados cuantificables en un caso se superó la especificación más exigente, Norma UNIT 833:2008, Anexo III, Tabla 1 - 0,031 mg/L en el agua de entrada de una de las chacras en el muestreo Inicio del Riego- (Tabla 10).

**Tabla 10.** Resultados obtenidos para Arsénico (As) en las 3 matrices estudiadas. ND: No detectado, SD: Se detecta.

Nº de Chacra	Agua en chacra As (mg/L)				Suelos		Granos
	Tiempo cero	Inicio del riego		Final del riego	Tiempo cero	Cosecha	Cosecha
	Agua Fuente	Entrada	Salida	Agua Salida	As (mg/kg) base seca		As (mg/kg)
1	ND	0,0051	SD < 0,0030	SD < 0,0030	SD < 3,0	SD < 3,0	0,40± 0,11
2	ND	ND	SD < 0,0030	SD < 0,0030	SD < 3,0	SD < 3,0	SD < 0,15
3	ND	ND	ND	SD < 0,0030	SD < 3,0	SD < 3,0	SD < 0,15
4	ND	ND	ND	ND	SD < 3,0	SD < 3,0	0,24 ±0,07
5	ND	ND	SD < 0,0030	0,012	SD < 3,0	SD < 3,0	ND
6	ND	SD < 0,0030	SD < 0,0030	no se muestreó	SD < 3,0	SD < 3,0	0,16± 0,05
7	SD < 0,0030	0,0030	ND	no se muestreó	4,1	SD < 3,0	SD < 0,15



8	ND	ND	0,0030	0,0095	SD < 3,0	SD < 3,0	SD < 0,15
9	ND	ND	SD < 0,0030	ND	3,4	SD < 3,0	0,23± 0,07
10	ND	SD < 0,0030	SD < 0,0030	SD < 0,0030	3,4	5,4	SD < 0,15
11	SD < 0,0030	0,031	0,015	SD < 0,0030	SD < 3,0	SD < 3,0	SD < 0,15
12	0,0036	SD < 0,0030	0,0038	0,013	SD < 3,0	SD < 3,0	0,23 ± 0,06
13	ND	0,0047	0,0059	SD < 0,0030	SD < 3,0	SD < 3,0	0,18± 0,05
14	ND	0,0030	0,0036	0,0078	SD < 3,0	SD < 3,0	0,43± 0,12
15	SD < 0,0030	SD < 0,0030	0,0070	SD < 0,0030	SD < 3,0	SD < 3,0	0,15 ±0,04
16	SD < 0,0030	SD < 0,0030	0,010	0,010	SD < 3,0	SD < 3,0	0,29 ±0,08
17	ND	0,0049	0,0048	0,0049	3,3	SD < 3,0	0,16 ±0,04
18	ND	0,0038	0,013	SD < 0,0030	SD < 3,0	SD < 3,0	SD < 0,15
19	SD < 0,0030	0,0052	0,014	0,0032	SD < 3,0	SD < 3,0	SD < 0,15
20	0,0030	0,012	0,0093	SD < 0,0030	SD < 3,0	SD < 3,0	SD < 0,15
LD/LC	0,0010/0,0030			0,60/3,0		0,050/0,15	

En grano se trabajó sobre muestras de arroz integral, y se obtuvieron datos cuantificables en el 50% de las muestras analizadas -10- con contenidos entre (0,15 ± 0,04) y (0,43 ± 0,12) mg/kg. El contenido de As en arroz no se encuentra reglamentado por la UE. Sin embargo, a nivel Mercosur en el Reglamento Mercosur/GMC/Res.Nº12/11 se establece que el contenido máximo de As en arroz es de 0,30 mg/kg, Anexo III, Tabla 3. Únicamente 2 de ellos presentan valores superiores a la normativa más exigente - Tabla 10.

La técnica utilizada, GFAAS, presentó un límite de detección adecuado (LD: 0,050 mg/kg, LC: 0,15 mg/kg), 6 veces inferior a la especificación legal más exigente (0,30 mg/kg, Anexo III, Tabla 3), pero con una incertidumbre estimada en un 30%. Se trata de una técnica con gran cantidad de interferencias químicas provenientes de la matriz analizada. Se utilizaron modificadores químicos permanentes, y condiciones de trabajo STPF - Stabilized Temperature plataform furnace (Beaty et al., 1993). Esto último permitió alcanzar un LD igual al informado por Rivero et al., (2006) con digestión

por vía seca- mayor sensibilidad-; aun habiendo utilizado digestión por vía húmeda. Las recuperaciones de NIST 1568a. fueron en promedio de 104%, n=12, DER. 17%.

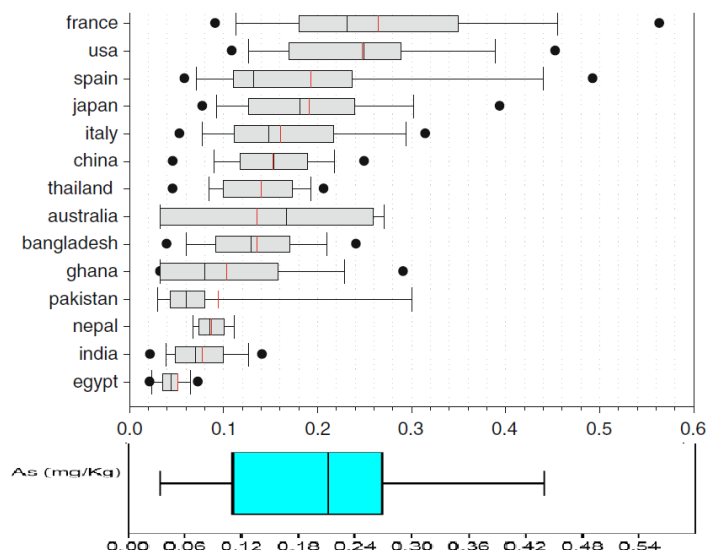
En esta oportunidad, a diferencia de Cd y Pb, se informó la incertidumbre analítica de las determinaciones de As en grano dado que se observaron valores límites y es muy determinante conocer la veracidad del dato informado. Para evaluar la idoneidad del método analítico se utilizó la norma EN 13804:2013 -Productos alimenticios. Determinación de elementos y sus especies químicas. Consideraciones generales y requisitos específicos-. A nivel del LC la incertidumbre máxima expandida de medida admisible es de un 37% por esta razón, la incertidumbre estimada en un 30% para esta técnica podría considerarse adecuada.

Los resultados obtenidos en este trabajo -donde se cuantificaron el 50% de las muestras analizadas- no concuerdan con los presentados por Rivero et al., (2006). Estos autores informaron que las 49 muestras de arroz analizadas, que incluían las variedades integral, parbolizado, parbolizado pulido y blanco resultaron inferiores al límite de detección analítico, 0,050 mg/kg. Dado que el As tiende a acumularse en la capa integral del arroz las variedades parbolizado > parbolizado pulido > blanco- en orden decreciente de contenido de As- deberían de tener menos As que la variedad integral (Zhu et al., 2008; Meharg et al., 2012). En el presente estudio solo se valoró arroz integral, pero Rivero et al., (2006) no detectaron As ni siquiera en arroz integral.

Debido a que estos autores analizaron el mismo material de referencia que en el presente trabajo, NIST 1568a. y no informaron dato de As ni de Cd se realizó una comunicación con los autores para conversar sobre este punto. Ellos mencionan que para metales contaminantes se realizó un análisis retrospectivo de las muestras recibidas en el laboratorio durante varios años. En esas instancias no se utilizaba de rutina un material de referencia sino que, se evaluaba la performance analítica de la técnica mediante adiciones de estándar previo a la digestión. El material de referencia fue incluido en los lotes de digestiones previstos para metales nutrientes -exclusivas para la investigación-. Los metales nutrientes analizados por estos autores fueron Calcio, Cinc, Cobre, Hierro, Potasio, Magnesio, Manganeso y Sodio. Es por esta razón que no reportan valores de recuperación ni para As ni para Cd de NIST 1568a.

En definitiva, se podría concluir que respecto al estudio realizado en el 2006 se ha observado un aumento de los valores de As en grano.

Al comparar los niveles de As en grano obtenidos en el presente trabajo para Uruguay con los obtenidos a nivel internacional se observaron similitudes tanto en el valor medio como en la variabilidad, Figura 7. Se utilizó esta referencia debido a que los resultados incluidos en la figura fueron obtenidos en iguales condiciones analíticas. Se analizaron en un mismo laboratorio 900 muestras de un amplio rango de países bajo condiciones de aseguramiento de la calidad consistente para todas las muestras. Uruguay presenta valores de As similares a los de los países industrializados – Francia, USA, España, Italia y Japón- pero con una salvedad. Si bien el autor del trabajo no lo menciona al tratarse de un estudio de mercado y dadas las tendencias internacionales de consumo es esperable que este estudio refiera en su mayoría a arroz blanco en cambio para Uruguay los datos representan arroz integral. Se ha visto que el arroz integral tiene mayores niveles de As que el arroz blanco debido a su localización en la capa integral (Zhu et al., 2008). Lo que quiere decir que, en esta comparación es probable que la posición de Uruguay este sobreestimada.



**Figura 7.** Boxplot de As total en arroz. En la parte superior arroz de mercado según su país de producción. Australia (11), Bangladesh (99), China (98), Egipto (109), Francia (33), Ghana (35), India (70), Italia (27), Japón (26), Nepal (12), Pakistan (14), España (50), Tailandia (49), USA (198). Reproducido con autorización de Meharg et al., 2012. En la parte inferior boxplot construido a partir de los datos de Uruguay (20). En ambas imágenes la línea negra sólida es la media, los ejes exteriores son el percentil 25 y 75, y los “whiskers” son los percentiles 10 y 90. El n de cada país se indica entre paréntesis.

En algunos de los países que se incluyen en la Figura 7 se ha podido establecer si la fuente de As es natural o antropogénica: *a.* En USA se planta arroz en campos con historia aldonera donde se aplicaron plaguicidas de base arsenical, *b.* En Bangladesh en el período de sequía se riegan los cultivos de arroz con aguas contaminadas con As, *c.* En China pequeñas áreas arroceras han recibido contaminación por actividad minera pero ello no ha impactado significativamente en el total de la producción (Meharg et al., 2012).

En nuestro país se buscó establecer el origen del As y si existe variabilidad entre las zonas donde se cultiva y las formas de cultivo. Mediante un ANOVA de efectos fijos se estudió si en los distintos establecimientos, según el cultivo antecesor y la carga de insumo, se acumulaba diferencialmente As en grano. Los Chacras se agruparon según el cultivo antecesor y la forma de manejo en 5 grupos- Campo Nuevo, Retorno Bajo Insumo, Retorno Alto Insumo, Rastrojo Bajo Insumo y Rastrojo Alto Insumo. No existió diferencia significativa en la acumulación de As en granos cultivados en sitios con distinta historia previa y distinta carga de insumo ( $p(F) = 0,712$ , Tabla 11).

**Tabla 11.** Resultados del ANOVA de efectos fijos que estudió si existían diferencias entre la acumulación de As en grano y el cultivo antecesor y la carga de insumo de cada Chacra.

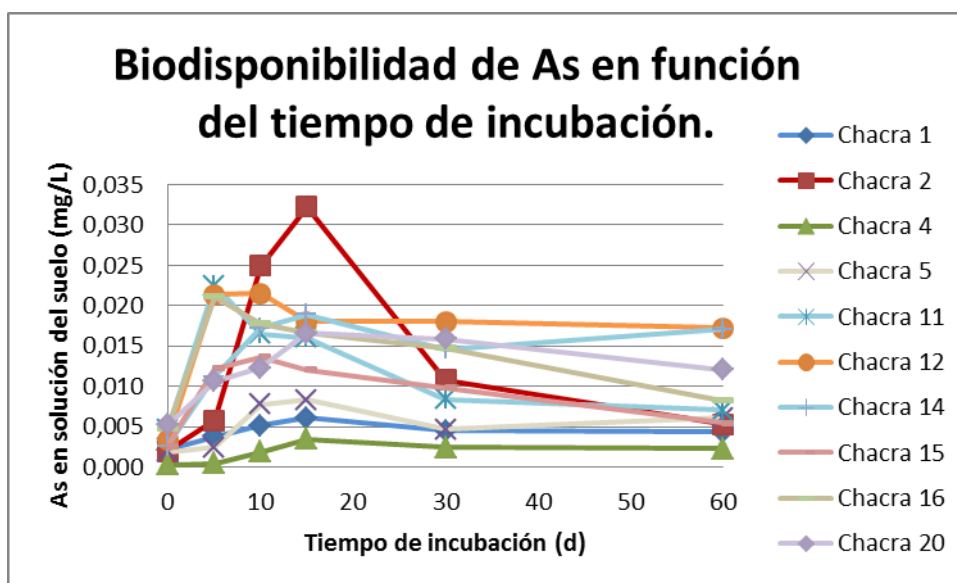
	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F</b>	<b>p (igualdad)</b>
<b>Entre muestras</b>	0,026571	4	0,006642	0,5346	0,7125
<b>Dentro de las muestras</b>	0,186397	15	0,0124265		
<b>Total</b>	0,212968	19			

No se evidenció una correlación directa entre los resultados obtenidos en las distintas matrices. Las muestras que presentaron valores elevados de As en el agua de riego no presentaron valores significativos en grano, ej. Chacra 11, Tabla 10. Por otra parte, los valores positivos en grano no dieron resultados positivos ni en el suelo ni en el agua de riego, ej. Chacras 1 y 14, Tabla 10. Tampoco se observó una relación entre aquellas chacras con usos más intensivos del campo y la acumulación de As en grano. Los niveles más elevados se obtuvieron en un campo nuevo y en un retorno bajo insumo.

Dado que las raíces toman el As mayoritariamente de la solución del suelo, la concentración de As en la misma debería de reflejar la biodisponibilidad de As para las raíces (Xu et al., 2008). Frente a esta situación se decidió estudiar cuales eran los niveles de As biodisponible para la planta en el suelo durante el ciclo de inundación del arroz.

## ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD DEL ARSÉNICO EN EL SUELO BAJO CONDICIONES DE INUNDACIÓN.

En términos generales se observó un aumento en la concentración de As en la solución del suelo hasta que luego de un máximo se estabilizó o presentó un leve descenso (Figura 8). El máximo se alcanzó entre los 5 y 15 días según la chacra considerada. El descenso posterior según Onken et al., (1996) puede explicarse debido a reacciones de adsorción en las partículas del suelo o precipitación. En la Tabla 1 del Anexo V se resumen los resultados del estudio de biodisponibilidad de As en suelos inundados.

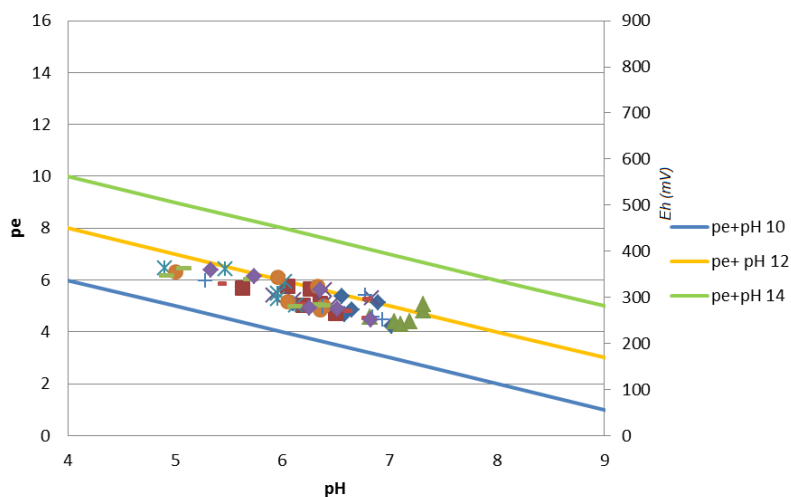


**Figura 8.** Estudio de la biodisponibilidad de As en función del tiempo de incubación.

En condiciones de suelo inundado pueden ocurrir dos mecanismos de movilización de As: a. reducción de arsenato a arsenito por intermedio de la desorción de las superficies de adsorción de los oxi hidróxidos de Fe hacia la solución de suelo o b. disolución reductiva de los oxi hidróxidos de Fe que libera el As adsorbido o coprecipitado a la solución de suelo. Se ha observado una rápida movilización de Fe hacia la solución del suelo luego de la inundación por lo que se considera más importante el segundo mecanismo (Xu et al., 2008). En condiciones de campo la planta de arroz presenta un mecanismo de adaptación que genera un sistema de aireación interna el cual facilita la difusión del oxígeno desde la atmósfera hasta las raíces; en consecuencia, mantiene potenciales redox relativamente altos en la rizosfera (Liu et al., 2007). La liberación de oxígeno permite la acumulación de oxi hidróxidos de hierro y la formación de la denominada placa de hierro (PH) que recubre las raíces. Este mecanismo determina que en suelos inundados sin planta de arroz la liberación de As a la solución del suelo sea mayor que en suelos inundados con planta de arroz.

Luego de la inundación se debió observar una rápida y marcada reducción del potencial redox, y por debajo de +250 mV a pH 7 (pe 4,2) debería de ocurrir la liberación de As (Meharg et al., 2012). En este trabajo, en cambio, luego del tiempo cero no se observó una modificación significativa del potencial redox (expresado como pe) con la incubación (Figura 9). Puede que la reducción del potencial redox haya sido previa a la primera lectura y por ello no se detectó un descenso en las determinaciones realizadas. De todas maneras, los valores de potencial redox

observados durante la incubación, fueron adecuados para que comenzara la desorción de arsenito (Eh + 300 mV, pe 5,1 a pH 7); la relación pe+pH se mantuvo en el rango de 10 a 12 y el pe entre 4,2 y 6,4 – 249 a 379 mV-(Figura 9, Anexo V, Tabla 1). Por otra parte también debería de ocurrir la reducción del arsenato a arsenito cuyo Eh ubica a esta semireacción luego de la reducción del nitrato (500-200 mV) y del manganeso (400-200 mV), y en condiciones de Eh similares a la reducción de los hidróxidos de hierro (300-100 mV) (Meharg et al., 2012). Estas condiciones de Eh adecuadas para la reducción de los hidróxidos de hierro podrían haber favorecido la ocurrencia del segundo mecanismo de liberación de As anteriormente mencionado (Xu et al., 2008).

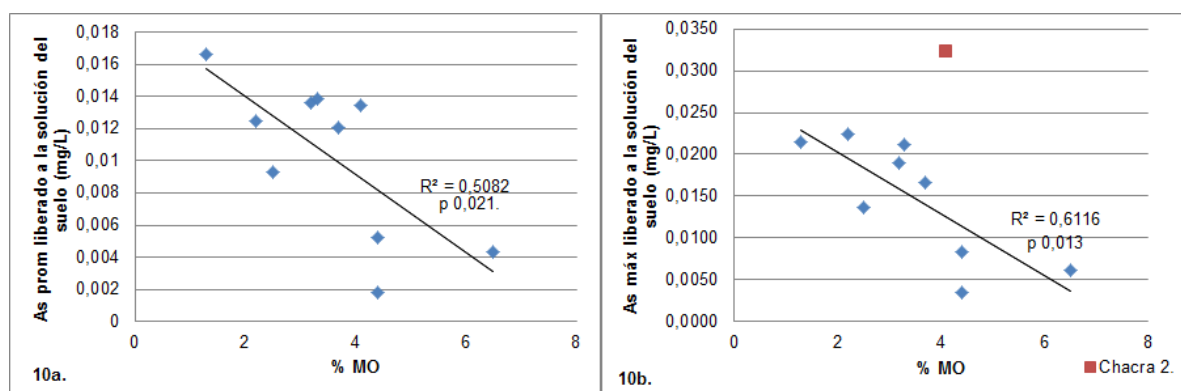


**Figura 9.** Relación de pe+pH observado en las chacras durante el período de incubación.

A continuación se estudió que otras variables del suelo además del pH y pe podían estar afectando la liberación de As a la solución del suelo y por otra parte como esto se correlacionaba con la acumulación de As en grano. Se consideraron las variables % de materia orgánica (MO), % de arcilla y contenido de P en tiempo cero respecto al promedio de As liberado al suelo durante la incubación. Se utilizó el dato a tiempo cero, salvo en los casos donde no fue evaluado, para los que se utilizó el valor en cosecha. Los datos de % de arcilla, P y MO fueron aportados por el equipo de trabajo del proyecto madre ya mencionado en el cual se enmarca esta tesis- Anexo V, Tabla 3.

Mediante análisis de regresión se obtuvo que la variable mejor correlacionada fue el % de MO-  $r^2$  0,51; p 0,021. Se observó que al aumentar el contenido de MO disminuía el nivel promedio de As biodisponible- Figura 10a. En suelos con alto contenido de MO se reduce la solubilidad del As dejándolo menos disponible debido a la formación de compuestos organoarsenicales ya sea directamente o a través de un puente metálico. Asimismo, al correlacionar el contenido de As máximo liberado a la solución del suelo respecto al % de MO -  $r^2$  0,61; p 0,013, Figura 10 b - se obtuvo la misma tendencia. Además, al aumentar el % de MO el suelo, este demoró más tiempo en alcanzar el máximo de As biodisponible-  $r^2$  0,51; p 0,031. Esta relación no fue observada por Stroud et al., (2011). Esto podría explicarse porque junto con el mecanismo ya descrito el aumento en el % MO del suelo puede favorecer la liberación de As de la fase sólida al aumentar la actividad microbiana resultando en un desarrollo más rápido de las condiciones de anaerobiosis (Meharg et al., 2012), lo cual favorece la

disolución de los oxi-hidroxidos de hierro. También, la MO contiene cargas negativas que pueden competir con el As en los sitios de adsorción del suelo favoreciendo la solubilidad de este último (Sahoo et al., 2013; Meharg et al., 2012).



**Figura 10.** Análisis de regresión del % de materia orgánica en el suelo respecto a: a. As promedio liberado a la solución del suelo en el período de incubación, b. As máximo liberado a la solución del suelo en el período de incubación.

Trabajando sobre el dato de As máximo liberado a la solución del suelo al incluir las diez chacras en el análisis de regresión una de ellas (Chacra 2) presentó un comportamiento diferencial respecto al resto del grupo- Figura 10 b. Este hecho se mantuvo constante para todas las variables consideradas- % MO, contenido de P y % de arcilla en el suelo en tiempo cero- en consecuencia, se decidió excluir esa chacra del análisis de regresión.

Las variables % MO, P y % arcilla presentaron una fuerte correlación entre ellas- %arcilla/%MO:  $r^2$  0,63;  $p$  0,006; contenido de P/ %MO:  $r^2$  0,69;  $p$  0,003; % arcilla/ contenido de P  $r^2$  0,86;  $p < 0,001$ . Por ende, como era de esperar también existió una buena correlación entre el % arcilla y el contenido de P en el suelo con el As liberado a la solución.

A mayor contenido de P aumentó la cantidad de As liberado a la solución del suelo (para As promedio:  $r^2$  0,37;  $p$  0,061; para As máximo  $r^2$  0,45;  $p$  0,047). Además, la disolución del As a la solución del suelo ocurría más rápido en aquellos suelos con más P inicial -  $r^2$  0,69;  $p$  0,0029.

Para explicar la influencia del P en la liberación de As se describen varios mecanismos. Por un lado el fosfato reemplazaría el As adsorbido en los oxi-hidroxidos de hierro, o en la placa de hierro aumentando la concentración de As en la solución del suelo, por lo cual no es recomendable realizar fertilizaciones excesivas con fertilizantes fosfatados (Meharg et al., 2012; Sahoo et al., 2013). Por otra parte a nivel de la planta el fosfato tiene un efecto inhibitorio compitiendo con el arsenato por el mismo transportador en la membrana plasmática y algunos estudios demuestran la disminución en la captura de arsenato por la planta en presencia de fosfato (Sahoo et al., 2013). El resultado final dependerá del equilibrio entre estos dos mecanismos (Tripathi et al., 2014, Meharg et al., 2012; Sahoo et al., 2013).

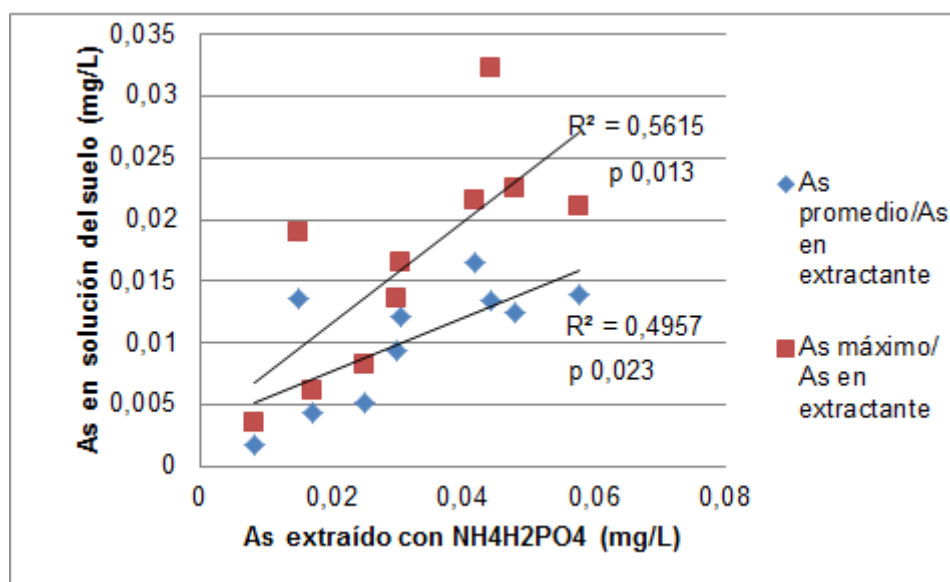
Se deberá de realizar un estudio detallado de la influencia del P en la competencia con el As por los sitios de adsorción de la placa de hierro y los oxi-hidroxidos de hierro presentes en el suelo, y también de la influencia del fosfato en la

absorción del arsenito por la planta en condiciones de inundación. Esto es, como afectan distintos niveles de P en un mismo suelo, cultivando una misma variedad y con idénticas condiciones de manejo del cultivo.

Respecto al % de arcilla hubo una tendencia a que al aumentar el % arcilla del suelo disminuía la disolución del As en la solución del suelo (para As promedio:  $r^2$  0,27;  $p$  0,13; para As máximo:  $r^2$  0,37;  $p$  0,081). Por lo tanto, los suelos arcillosos aumentaron la fijación del As y lo dejaron menos biodisponible; similar a lo observado por Onken et al., (1996) y Sahoo et al., (2013). A su vez, al disminuir el tamaño de partícula el suelo este demora más tiempo en liberar el máximo de As a la solución - $r^2$  0,67;  $p < 0,007$ .

Las Chacras 1, 4 y 5 presentaron un comportamiento diferencial, ya que tuvieron una liberación de As a la solución menor a las demás. Se trata de Chacras de la Zona Norte, la 4 y 5 corresponden al mismo predio. Presentaron suelos de textura fina, de tipo arcilloso en los 3 casos, y con contenidos de fósforo de entre 5 y 7 mg/kg y materia orgánica entre 4,4 y 6,5 %. Estas Chacras presentaron una combinación ideal de contenido de P bajo, MO alta y % de arcilla alto que contribuyeron a la menor liberación de As a la solución del suelo.

Como predictor de la liberación de As en condiciones de inundación se propuso utilizar  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  como extractante (Anexo V, Tabla 2). El extractante propuesto resultó representativo de la disolución máxima y de la disolución promedio de As en el tiempo de incubación del suelo - $r^2$  0,56;  $p$  0,013,  $r^2$  0,49;  $p$  0,023 respectivamente, Figura 11a.- acorde a lo observado por Stroud et al., (2011). Estos autores obtuvieron una correlación más significativa ( $r^2$  0,81) probablemente debido a que trabajan en un rango superior de concentraciones, entre 0,20 y 7,0 mg/L. Una coincidencia importante es que en ambos trabajos los valores de As obtenidos en el extractante fueron algo superiores a los obtenidos en la solución del suelo durante la incubación.



**Figura 11.** Evaluación de fosfato de amonio como representativo de la lixiviación de As del suelo a la solución del suelo en condiciones de inundación.

En el presente ensayo la concentración de As biodisponible ya sea evaluada en solución o mediante extracción con  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  no resultó un buen predictor de la acumulación de As en grano ( $r^2 < 0,15$ ;  $p > 0,30$ ). Otros estudios han obtenido tanto



resultados coincidentes con este trabajo como opuestos. Por ejemplo, Hossain et al., (2008) obtuvieron una buena correlación entre el As extraído del suelo con fosfato de amonio y el As en grano ( $r^2 = 0,82$ ;  $p < 0,01$ ). En cambio, otros autores no observaron que la concentración de As en el suelo afectase significativamente el contenido de As en grano (Azizur Rahman et al., 2008; Patel et al., 2005). Según Meharg et al., (2012) es muy difícil encontrar un método para predecir la acumulación de As en grano y ello es entendible debido a la gran cantidad de factores y las interacciones entre ellos que influyen la biodisponibilidad de As y su adsorción por la planta. Un factor clave es el potencial de óxido reducción del suelo el cual es difícil de cuantificar en una medida puntual debido a que puede fluctuar significativamente durante el ciclo de crecimiento del arroz. Además la toxicidad del As al ser absorbido por la planta puede disminuir su acumulación en el grano. Otro factor con gran influencia en la acumulación de As en grano es la variedad de planta cultivada pero, en este trabajo no se pudo considerar esta variable debido a que no fue relevada en el muestreo del proyecto madre.

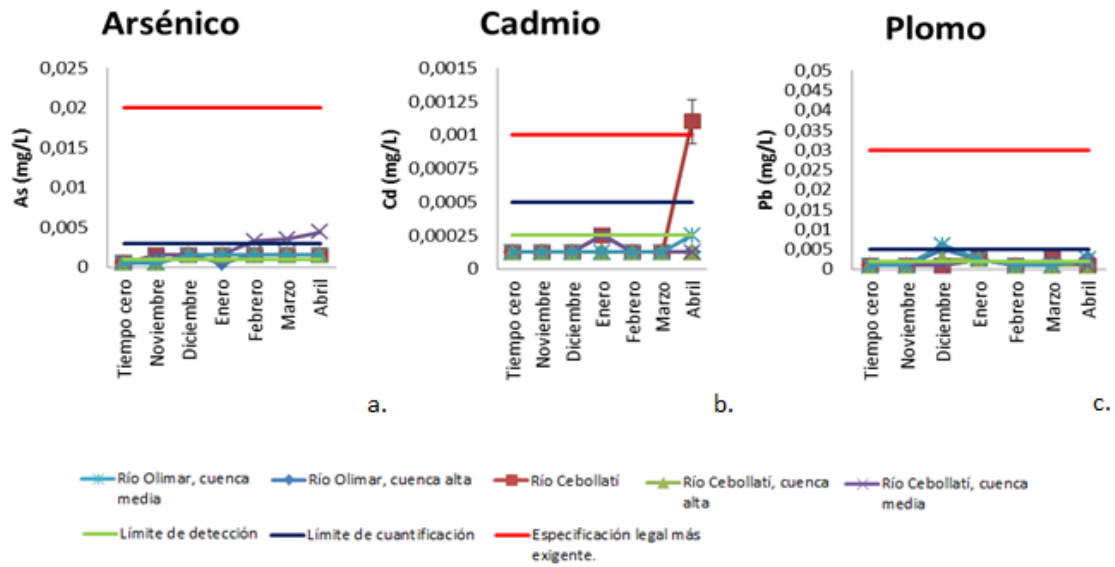
#### OCURRENCIA DE METALES PESADOS EN LA CUENCA HIDROGRÁFICA ASOCIADA AL AMBIENTE ARROCERO.

En la Zona Este se realizó un relevamiento del posible impacto del cultivo de arroz en su cuenca hidrográfica asociada.

En el período 1970-2000 el arroz fue el motor del crecimiento del riego en el país consumiendo el 90% del total de agua destinada a esta finalidad. Se estima un volumen de agua de 11000 a 14000 m<sup>3</sup>/ha para regar el cultivo durante aproximadamente 100 días. Aunque la disponibilidad de recursos hídricos no es una limitante determina la modalidad a emplear en la irrigación, embalsamiento en represas o extracción mediante bombeo de arroyos ríos o lagunas. En la Zona Este en la zafra 2013-2014 se regó el 55,3% del área sembrada con agua proveniente desde cauce superficial con bombeo eléctrico. Por lo cual el consumo de aguas superficiales destinadas al riego del arroz es muy importante en el balance hídrico nacional (Batello et al., 2013; Failde et al., 2013; DIEA 2014).

Al culminar el riego cuando se elimina la lámina de inundación se vierten a los cauces cantidades importantes de agua residual del cultivo; en la cual se han disuelto los agroquímicos utilizados en el ciclo del cultivo, así como también elementos como el nitrógeno, P, As, entre otros. En consecuencia el monitoreo de los ríos en la cuenca hidrográfica asociada a las chacras es de suma importancia para evaluar el impacto del cultivo en el ambiente.

En el período febrero a abril se detectaron niveles crecientes de As en el punto de muestreo Río Cebollatí Cuenca Media pero que en ningún caso superaron la especificación legal más exigente de 20 µg/L (Figura 12 a.). Para el Cd no se obtuvieron resultados cuantificables salvo para el muestreo de abril en el punto donde confluyen los Ríos Cebollatí y Olimar, Cd: 0,0011 mg/L. La incertidumbre asociada a este método es de 15%, (0,0011 ± 0,0002) mg/L, por lo cual este valor aún se podría considerar adecuado (Figura 12 b.). En la determinación de Pb no se obtuvieron resultados cuantificables para ninguno de los puntos de muestreo en el período de tiempo considerado (Figura 12 c.).



**Figura 12.** Gráficas sobre tiempo de muestreo versus contenidos de a.- As, b.- Cd y c.- Pb en los 5 puntos de muestreo en cuencas hidrográficas de los Ríos Cebollatí y Olimar.

En el proyecto antecesor se obtuvieron resultados positivos para Cd según la legislación vigente en un 33 % de las muestras analizadas dentro y fuera de la cuenca arrocera (Hill et al., 2008). En esa oportunidad se propuso continuar con el monitoreo con el fin de establecer una relación más directa entre estos datos positivos y el cultivo de arroz. En el presente trabajo no se confirmaron esos datos positivos.

En resumen, en la zafra considerada la ocurrencia de metales pesados en la cuenca hidrográfica no se vio afectada de manera significativa respecto a la legislación vigente- Anexo III, Tabla 1- por la presencia del cultivo de arroz.

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

No se estima necesario continuar con el monitoreo de Pb y Cd ya que junto con su proyecto antecesor – Hill et al., 2008-, se ha relevado información suficiente para determinar que estos metales no presentan una importancia significativa a la hora de evaluar el impacto del cultivo en el ambiente ni la seguridad alimentaria del producto en este cultivado. Es destacable que las metodologías analíticas planteadas para el análisis de Pb y Cd en granos fueron adecuados para los requerimientos analíticos de la Unión Europea, uno de los destinos de exportación que se persigue alcanzar por la ACA. Según el Diario Oficial de la Unión Europea el límite de detección (LD) analítico para alimentos deberá ser menos de una décima parte y el límite de cuantificación (LC) menos de una quinta parte del nivel máximo fijado en el Reglamento (CE) n° 1881/2006” y modificaciones, (Anexo III, Tabla 3, Reglamento (UE) N° 836/2011). Las técnicas utilizadas en la determinación de Cd y Pb se consideraron adecuadas; se lograron buenos resultados tanto para Cd, LD: 0,002 mg/kg y LC: 0,010 mg/kg, como para Pb, LD: 0,020 mg/kg y LC 0,040 mg/kg.

Es importante destacar que, aunque está en etapa de propuesta de modificación, la COTAMA evalúa disminuir en diez veces los límites hoy vigentes para agua superficial, Anexo III, Tabla 1. Frente a un panorama así la situación es muy distinta a la discutida en este trabajo.

Se debe de profundizar sobre la acumulación de As en grano. Respecto a la seguridad alimentaria algunos aspectos interesantes que se pueden concluir de este trabajo son:

- Los resultados de As total en grano son una alerta para los cultivadores que no debe de ser despreciada. El arroz es un alimento fundamental y, aunque fueron pocas, hubieron muestras que superaron la especificación nacional de As total en grano - Reglamento Mercosur/GMC/Res.N°12/11, Anexo III, Tabla 3-. En consecuencia, para poder seguir consumiendo este alimento de manera segura es importante que el país se aboque al camino de la especiación de As en grano. De esta manera al distinguir entre las especies orgánicas, no tóxicas, y las inorgánicas, tóxicas, se asegurará la inocuidad o no del alimento a un nivel de confianza muy superior al que otorga el dato de As total. A su vez a medida que la región comience a recolectar datos sobre la ocurrencia de As inorgánico se deberá considerar la revisión de la legislación al respecto. Por ejemplo, el Reglamento Mercosur para Contaminantes Inorgánicos en Alimentos, que especifica el límite de As total en arroz, deberá evaluar incluir un límite de As inorgánico.

- En este estudio se realizó el análisis de grano descascarillado, equivalente a arroz integral, pero la mayor parte de la comercialización tanto en el mercado externo como interno se realiza como arroz blanco de distintos tipos (Uruguay XXI, 2013). Esto es de suma importancia dado que no se consume todo el As que se encuentra en el arroz integral. Durante el procesamiento del arroz para consumo humano se remueven la cascara que contiene grandes cantidades de As. Aún el proceso de parbolizado favorece la eliminación del As (Azizur Rahman et al., 2007). De aquí en más, a la hora de evaluar la seguridad alimentaria del producto resulta conveniente monitorear el arroz blanco.

- Dada la ocurrencia de As total en el mundo, Figura 7, hay una necesidad de realizar un consumo seguro de arroz con As. Esto se logrará por un lado controlando los aspectos agrícolas de la producción tal que los niveles de As en grano no aumenten y por el otro realizando especiación.

En lo que respecta al ciclo del cultivo propiamente dicho, del ensayo de biodisponibilidad de As en suelos inundados se puede concluir que:

- Si bien la determinación de contenidos totales de As en suelo es necesaria para evaluar el estado del mismo respecto a los requerimientos legales de protección de la salud humana, a los efectos del cultivo no resultó un dato representativo. La legislación internacional, en línea con lo propuesto por la Ordenanza Federal Alemana debería de limitar la acumulación de metales en los suelos en función de la toxicidad que estos generen para las plantas – Anexo III, Tabla 2.

- Mediante la determinación de parámetros como el contenido de P, %MO, % de arcilla y la determinación de As en el extracto de fosfato de amonio se pudo tener una visión aproximada del comportamiento del suelo respecto a la liberación de As bajo condiciones de inundación. De todos modos varios autores mencionan que las condiciones de laboratorio en general no predicen correctamente la absorción de metales por el cultivo en las condiciones de campo por lo cual es muy importante estudiar la acumulación de metales en el ambiente natural (Liu et al., 2007; Azizur Rahman et al., 2007; Abedin et al., 2002).

- No se logró una correlación directa de los parámetros estudiados con la acumulación de As en grano. Sería interesante continuar en esta línea en la búsqueda de un modelo multicausal que contribuya a explicar la interacción entre el suelo y la planta respecto a la acumulación de As en grano.

Como estrategia de mitigación mediante crecimiento aerobio al menos en parte de la estación de crecimiento se puede reducir el contenido de As en grano (Zhu et al., 2008). Sin embargo, en estas condiciones, disminuyen los rendimientos del cultivo probablemente debido al aumento de patógenos y nematodos y a la menor biodisponibilidad de nutrientes, por ej. P (Meharg et al, 2012). Ahora bien, se ha visto que para ciertos cultivares no existen diferencias significativas entre el rendimiento del grano cultivado en aerobiosis y anaerobiosis (Xu et al., 2008).

Dado que el crecimiento aerobio favorece la acumulación de Cd en grano en los últimos años se ha estudiado el efecto del manejo del riego en la acumulación de As y Cd en grano a nivel de campo para ciertas zonas geográficas en particular. Por ejemplo en China se probaron 4 tratamientos de riego: aerobio, intermitente, riego convencional manteniendo inundación hasta macollaje y luego riego intermitente e inundación durante toda la estación de crecimiento comparando dos variedades de cultivar diferenciadas en su capacidad de absorción de Cd. Se concluyó que el riego convencional dio concentraciones moderadas de Cd y As en grano con altos rendimientos. Esto último se favorece porque en las etapas finales de crecimiento del cultivo el suelo está bajo riego intermitente lo cual aumenta el potencial redox y promueve el crecimiento de la planta (Hu et al., 2013a). Estos autores también evaluaron los mismos sistemas de riego en los siete cultivares principales que se cosechan en China concluyendo nuevamente que el riego convencional es la mejor opción para esa región. Además agregan que el sistema de riego y la variedad cultivada afectan las concentraciones de As y Cd en grano en direcciones opuestas por lo cual según el grado de contaminación por metales pesados del suelo se definirán estos factores para beneficiar los rendimientos y la seguridad alimentaria del grano cultivado (Hu et al., 2013b). En España se probaron dos sistemas de riego: aerobio con irrigación por aspersión o inundación continua concluyendo que el crecimiento aerobio tuvo un efecto positivo en seguridad alimentaria respecto a As y

no tuvo efecto negativo sobre el Cd probablemente debido al bajo nivel de Cd en el suelo (Moreno-Jiménez et al., 2014).

Por todo lo antedicho se deberá evaluar los sistemas de riego que se utilizan a nivel nacional y estudiar la posibilidad de disminuir el tiempo de anoxia del cultivo y de esta manera disminuir la biodisponibilidad de As para la planta. Se hace necesario obtener un equilibrio entre la acumulación admisible de As y Cd en grano y la calidad y rendimiento del arroz. Esto se podría lograr a través del control de los tiempos de inundación (Yamaguchi et al., 2011). El consumo de agua es uno de los insumos más importantes en la ecuación económica del arroz y disminuir los tiempos de inundación conllevaría a un ahorro económico.

Estrategias simples como el crecimiento de arroz en diseño de cama elevada (raised bed) contribuyen a disminuir los niveles de As en grano (Zhu et al., 2008). De esta forma todo el cultivo está aerobio, se aplica el agua necesaria para llenar los surcos, y durante la inundación la superficie del suelo no se inunda sino que se humedece por movimientos laterales del agua hacia el medio del cantero. Este sistema comparado con inundación continua hasta macollaje dio mejores rendimientos del cultivo y una disminución de al menos 3 veces en la acumulación de As en grano (Talukder et al., 2011).

Se deberá estudiar la variabilidad genética de las especies que se cultivan en el país respecto a la acumulación de As y también respecto a la capacidad de crecer en aerobiosis. La concentración de As en grano varía significativamente entre cultivares y se han observado ciertos genes asociados a la asimilación de As por la planta (Zhu et al., 2008).

Se manejan otras estrategias como la fertilización con azufre, P o silicio para modificar la acumulación de As en grano que deberán de ser evaluadas en campo. Respecto al P de los resultados obtenidos en el presente trabajo se concluye la necesidad de un estudio sitio específico donde manteniendo constantes el tipo de suelo, el sistema de riego y la variedad de arroz cultivada se estudie como afectan distintas concentraciones de P al nivel de As liberado a la solución del suelo.

Si bien se ha considerado la adición de P para disminuir la acumulación de As en grano esto no siempre ha sido exitoso debido a que, el P compite con el As no solo en la captación por la planta sino que también por los sitios de adsorción en la placa de hierro. Este hecho remarca la importancia de la realización de estudios sitio específicos sobre el impacto de la fertilización con P.

Según el grado de desarrollo de la placa de hierro (PH), podrá aumentar o disminuir la cantidad de metales y metaloides que son absorbidos por la planta. En *Oryza sativa* la PH es discontinua y se forma preferencialmente en raíces maduras gruesas cercanas a la interface suelo-agua-aire, siendo mínima en las raíces jóvenes. La formación de PH y la acumulación de As en grano presenta variabilidad genética entre los distintos cultivares de *Oryza sativa*. Es más, la formación de la PH es el principal factor limitante de la captación de As y el aumento de la primera puede ser utilizado para disminuir la captación de As por parte de la planta (Tripathi et al., 2014).

Sería conveniente estudiar la capacidad de formación de PH bajo condiciones de inundación de los cultivares de *Oryza sativa* que se plantan en el país. Asimismo, sería recomendable incluir ensayos de especiación de As en la rizofera de la planta. De esta manera se podría estimar el funcionamiento de la placa de hierro respecto a la adsorción de As, el impacto de la fertilización con P, análogo del  $As^{+5}$ , respecto a la acumulación de As en grano, entre otros.

## BIBLIOGRAFÍA.

- Abedin J., Cresser M., Meharg A., Feldmann J., Cotter-Howells J. (2002). Arsenic Accumulation and Metabolism in Rice (*Oryza sativa* L.). **Environmental Science & Technology**. 36, p. 962-968
- Achkar M., Cayssials R., Domínguez A., Pesce F. (2004). **Hacia un Uruguay Sustentable: gestión integrada de cuencas hidrográficas** [Internet], Programa Uruguay Sustentable. Disponible desde < [http://www.redes.org.uy/wp-content/uploads/2008/10/gestion\\_de\\_cuencas.pdf](http://www.redes.org.uy/wp-content/uploads/2008/10/gestion_de_cuencas.pdf)> [14/09/14]
- Ajtony Z., Szoboszlai N., Susko E.K., Mezei P., Gyorgy K., Bencs. L. (2008). Direct Sample Introduction of wines in graphite furnace atomic absorption spectrometry for the simultaneous determination of arsenic, cadmium, copper and lead content. **Talanta**. 76, p. 627-634.
- Al-Faiyz YS., El-Garawany M.M., Assubaie F.N., Al-Eed M.A. (2007). Impact of phosphate fertilizer on Cadmium accumulation in soil and vegetable crops. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. 78, p.358-362.
- Anawar H.M. (2012). Arsenic Speciation in environmental samples by hydride generation and electrothermal atomic absorption spectrometry. **Talanta**. 88, p. 30-42.
- AOAC (2010). Método 999.10:2005 Lead, Cadmium, Zinc, Copper, and Iron in Food Atomic Absorption Spectrometry after Microwave Digestion. **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 18<sup>th</sup> Edition, 9.1.08, 2005. Actualmente en revisión 3, USA.
- Asociación de Cultivadores de Arroz. (2013). Presentación de los resultados del proyecto ANII-ACA "Determinación de indicadores de sustentabilidad ambiental asociados a distintos usos y manejos del arroz, que orienten buenas prácticas agrícolas" [Internet]. **Arroz**. 76, p.30-38, Disponible desde [http://www.aca.com.uy/index.php?option=com\\_content&view=category&layout=blog&id=20&Itemid=7](http://www.aca.com.uy/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=20&Itemid=7), [14/09/14].
- Azizur Rahman M., Hasegawa H, Mahfuzur Rahman H., Mazid Miah MA., Tasmin A. (2008). Arsenic accumulation in rice (*Oryza sativa* L.): Human exposure through food chain. **Ecotoxicology and environmental safety**. 69, p.317-324.
- Azizur Rahman M.A., Hasegawa H., Mahfuzur Rahman M., Arifur Rahman M., Miah M.A.M. (2007). Accumulation of arsenic in tissues of rice plants (*Oryza sativa* L.) and its distribution in fractions of rice grain. **Chemosphere**, 69, p. 942-948
- Battello C., Queheille N., Uraga R., Gonnet D., Hill M., Roel A., Cantou G., Martinez I., Pippolo D. (2013). **Guía de buenas prácticas en el cultivo de arroz en Uruguay** [Internet] Montevideo, A.C.A., 2009, 32 p. Disponible desde: < [http://www.aca.com.uy/wp-content/uploads/2014/07/GUIA\\_DE\\_BUENAS\\_PRACTICAS\\_marzo\\_2013.pdf](http://www.aca.com.uy/wp-content/uploads/2014/07/GUIA_DE_BUENAS_PRACTICAS_marzo_2013.pdf)> [20/09/14].
- Beaty R.D., Kerber J.D. (1993). Cap. 6 Control of Furnace Interference. En. Beaty R.D., Kerber J.D. **Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry**. 2da ed.,USA, The Perkin Elmer Corporation, p. 6-15 a 6-17.
- Becker E.M, Dessuy M.B.; Boschetti W., Goreti R.Vale M., Ferreira S L.C., Welz B. (2012). Development of an analytical method for the determination of arsenic in gasoline samples by hydride generation-graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**. 71-72, p. 102-106.
- Bizzi C.A., Barin J.S., Müller E.I., Schmidt L., Nóbrega J.A., Moraes Flores E.M. (2011). Evaluation of oxygen pressurized microwave-assisted digestion of botanical materials using diluted nitric acid. **Talanta**. 83, p.1324-1328.

- Brigden K., Hetherington S., Santillo W & D. (2014). **Distribution of metals in soils from uncultivated land, soils from rice fields and in rice grown in the area of an industrial complex with metal smelting and processing facilities in Hunan Province, China, Greenpeace Research Laboratories, Technical Report 04/2014**, [Internet], Abril 2014 School of Biosciences, University of Exter, Reino Unido. Disponible desde <<http://www.greenpeace.org/eastasia/publications/reports/toxics/2014/cadmium-rice-heavy-metal/>> [07/09/2014].

- Cava- Montesinos P., Cervera M.L., Pastor A., de la Guardia M. (2004). Determination of As, Sb, Se, Te and Bi in milk by slurry sampling hydride generation atomic fluorescent spectrometry. **Talanta**. 62, p.175-184.

- Canadian Council of Ministers of the Environment, **Canadian Environmental Quality Guidelines** [Internet]. Disponible desde <http://ceqg-rcqe.ccme.ca/en/index.html>

- Chen S., Sun L., Sun T, Chao L., Guo G., (2007). Interaction between cadmium, lead and potassium fertilizer (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) in a soil plant system. **Environmental Geochemistry and Health**. 29, p. 435-446.

- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (2014). **JOINT FAO/WHO FOOD STANDARDS PROGRAMME CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION 37th Session, Geneva, Switzerland, 14-18 July 2014, Rep 14/CF**, FAO,WHO. Disponible desde <[ftp://ftp.fao.org/Codex/Reports/Reports\\_2014/REP14\\_CFe.pdf](ftp://ftp.fao.org/Codex/Reports/Reports_2014/REP14_CFe.pdf)> [14/09/14].

- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (2011). **Discussion paper on arsenic in rice March 2011 CX/CF 11/5/10**, FAO, WHO. Disponible desde <[ftp://ftp.fao.org/codex/meetings/cccf/cccf5/cf05\\_10e.pdf](ftp://ftp.fao.org/codex/meetings/cccf/cccf5/cf05_10e.pdf)> [14/09/14].

- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, **JOINT FAO/WHO FOOD STANDARDS PROGRAMME CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION 33th Session, Geneva, Switzerland, 5-9 July 2010, ALINORM 10/33/41**. Disponible desde <[http://www.codexalimentarius.org/input/download/report/739/al33\\_41e.pdf](http://www.codexalimentarius.org/input/download/report/739/al33_41e.pdf)> [14/09/14]

- CODEX STAN 193-1995 (Rev.4- 2009. Am 2-2010). **Codex General Standard for Contaminants and Toxins in food and feed**. Disponible desde <[http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/agns/pdf/CXS\\_193e.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/CXS_193e.pdf)> [14/09/14]

- Cole S., Jeffries J. (2009). **Using Soil Guideline Values, Better Regulation Science Programme Science report: SC050021/SGV Introduction** [Internet], Environment Agency, Rio House, Waterside Drive, Aztec West, Almondsbury, Bristol. Disponible desde [https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/297676/scho0309bpqm-e-e.pdf](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/297676/scho0309bpqm-e-e.pdf), [14/09/14].

- Comisión Europea (2006), **Reglamento (CE) nº 1881/2006**, [Internet], Diario Oficial de la Unión Europea. Disponible desde <<http://aesan.mssi.gob.es/AESAN/web/legislacion/subdetalle/micotoxinas.shtml>> [14/09/2014].

- Comisión Europea (2007), **Reglamento (CE) Nº 333/ 2007**, [Internet], Diario Oficial de la Unión Europea. Disponible desde <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:088:0029:0038:ES:PDF>, [20/09/14].

- Comisión Europea (2011), **Reglamento (UE) Nº 836/2011**, [Internet], Diario Oficial de la Unión Europea. Disponible desde <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:215:0009:0016:ES:PDF>>.

- COTAMA, Grupo de Estandarización Técnica de estándares de agua (2008), **PROPUESTA DE MODIFICACIÓN DEL DECRETO 253/79 “Normas reglamentarias para prevenir la contaminación ambiental mediante el control de las aguas”**, [Internet]. Montevideo, Setiembre de 2008. Disponible desde <[http://www.ute.com.uy/Novedades/Licitacion\\_DATA%20ROOM%20CENTRAL%20DE%20CICL](http://www.ute.com.uy/Novedades/Licitacion_DATA%20ROOM%20CENTRAL%20DE%20CICL)>.

O%20COMBINADO/Anexo%20Circular%203%20Propuesta%20modificaci%C3%B3n%20decreto%20253\_79.pdf >. [14/09/14]

- Davidowski L., Sarojam P. (2009), **Application Note: Determination of Arsenic in Baby Foods and Fruit Juices by GFAAS** [Internet]. PerkinElmer, Inc. Disponible desde [http://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-74085app\\_determinationofarsenicinbabyfoodsbygfaas.pdf](http://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-74085app_determinationofarsenicinbabyfoodsbygfaas.pdf) , [20/09/14].

- Dedina J., Tsalev D.L., Winefordner J.D., Kolthoff I.M., (1995) **Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry**. Vol. 130. Inglaterra, John Wiley & Sons Ltd.

- Dedina J. (2007). Atomization of volatile compounds for atomic absorption and atomic fluorescence spectrometry: On the way towards the ideal atomizer. **Spectrochimica Acta Part B**. 62, p. 846-872.

- De Moraes E., Cirne L., Smanioto B., Fleig A., Zanella R., Dressler V., Gottfried J. (2001). Minimization of volatile nitrogen oxides interference in the determination of arsenic by hydride generation atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**. 56, p.1883-1891.

- Diao W-P., Ni W-Z., Ma H-Y., Yang X-E. (2005). Cadmium Pollution in Paddy Soils as Affected by Different Rice (*Oryza sativa L.*) Cultivars. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. 75, p. 731-738.

- DIEA, Estadísticas Agropecuarias. (2007). **Encuesta de Arroz Zafra 2006/07** [Internet], Serie Encuestas N° 248. Disponible desde <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,diea,diea-pub-arroz,O,es,0>, [14/09/14].

- DIEA, Estadísticas Agropecuarias.(2009). **Encuesta de Arroz Zafra 2008/09** [Internet], Serie Encuestas N° 275. Disponible desde <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,diea,diea-pub-arroz,O,es,0>, [14/09/14].

- DIEA, Estadísticas Agropecuarias.(2010). **Encuesta de Arroz Zafra 2009/10** [Internet], Serie Encuestas N° 291. Disponible desde <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,diea,diea-pub-arroz,O,es,0> , [14/09/14].

- DIEA, Estadísticas Agropecuarias,(2014), **Encuesta de Arroz Zafra 2013/14**, [Internet], Serie Encuestas N° 322, Disponible desde <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,diea,diea-pub-arroz,O,es,0> ,[ 07/09/14].

- Durán A., Silva A., Ruiz A. (1998). Impacto productivo del cultivo de arroz sobre suelos de bañado: productividad y conservación. **Serie Documentos de Trabajo-N° 16**, Facultad de Agronomía, UdelaR.

- EFSA, European Food Safety Authority.(2010). **Scientific Opinion on Arsenic in Food, EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM)**, [Internet], Parma, Italia. Disponible desde <http://www.efsa.europa.eu/de/scdocs/doc/1351.pdf> , [29/03/2015]

- El País Digital. (2013). **Exportaciones de arroz uruguayo siguen tonificadas pese a competencia** [Internet]. Montevideo, Uruguay, El País S.A.. Disponible desde <http://www.elpais.com.uy/economia/rurales/exportaciones-arroz-uruguayo-siguen-tonificadas.html> , [14/09/14].

- EPA. (2007). **Método EPA 3051A Microwave assisted Digestion of Sediments, Sludges, Soils and Oils** [Internet], revisión 1, febrero 2007. Disponible desde <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3051a.pdf>, [20/09/14].

- EPA. (2010). **How does the EMC view analytical lab results that indicate nondetectable or below the detection limit values?** [Internet], Technology Transfer Network



Emission Measurement Center. Disponible desde <http://www.epa.gov/ttnemc01/facts.html#lab> , [02/11/2014].

- European Union, Scientific cooperation scoop 3.2.11. (2004). **Assessment of the dietary exposure to arsenic, cadmium, lead and mercury of the population of the EU Member States** [Internet]. Directorate-General Health and Consumer Protection. Disponible desde [http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/scoop\\_3-2-11\\_heavy\\_metals\\_report\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/scoop_3-2-11_heavy_metals_report_en.pdf) , [14/09/14].

- Failde A., Peixoto C., Estol E., Preve A.(2013). **Estudio sobre riesgo agropecuario en Uruguay** [Internet], Anuario OPYPA 2013. Disponible desde <http://www.mgap.gub.uy/opypa/ANUARIOS/Anuario2013/material/pdf/25.pdf> , [14/09/2014].

- Feldmann J., Krupp E. (2011). Critical review or scientific opinion paper: Arsenosugars-a class of benign arsenic species or justification for developing partly speciated arsenic fractionation in foodstuffs?. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**.399, p. 1735-1741.

- Gimeno-García E., Andreu V., Boluda R.(1996). Heavy Metals incidence in the application of inorganic fertilizers and pesticides to rice farming soils. **Environmental Pollution**. 92, (1),p. 19-25.

- Government of the People`s Republic of Bangladesh, Ministry of Environment and Forest (1997). **The Environment Conservation Rules**, [Internet], Disponible desde [http://www.moef.gov.bd/html/laws/env\\_law/178-189.pdf](http://www.moef.gov.bd/html/laws/env_law/178-189.pdf) , [13/12/2014].

- Hammer Ø. (1999-2013), **PAST , Paleontological Statistics Version 3.0 Reference manual**, [Internet] Disponible desde <http://folk.uio.no/ohammer/past/> [13/12/2014]

- Hill M., Clérico C. (2008). FPTA 171 Residualidad de agroquímicos en arroz, [Internet], **Arroz**, 53, Marzo 2008, p. 22-28, Disponible desde [http://www.aca.com.uy/\\_oldsite/revista/numero53/pdf/residualidad.pdf](http://www.aca.com.uy/_oldsite/revista/numero53/pdf/residualidad.pdf) , [14/09/2014].

- Hossain M.B, Jahiruddin M., Panaullah G.M, Loeppert R.H, Islam M.R, Duxbury J.M. (2008). Spatial variability of arsenic concentration in soils and plants, and its relationship with iron, manganese and phosphorus. **Environmental Pollution**. 156, p. 739-744.

- Hu P., Li Z., Yuan C., Ouyang Y. (2013) (a). Effect of water management on cadmium and arsenic accumulation by rice (*Oryza sativa* L.) with different metal accumulation capacities. **Journal of Soils and Sediments**.13,p. 916-924.

- Hu P., Huang J., Ouyang Y., Wu L., Song J., Wang S., Li Z., Han C., Zhou L., Huang Y., Luo Y., Christie P. (2013) (b). Water management affects arsenic and cadmium accumulation in different rice cultivars. **Environmental Geochemistry and Health**. 35, p. 767-778.

- Husa´kova ´L., Cernohorsky T., Sramkova J., Vavrusova´ L. (2007). Direct determination of arsenic in beer by electrothermal atomic absorption spectrometry with deuterium background correction (D2-ET-AAS). **Food Chemistry**. 105, p. 286-292.

- INIA (2010), **INIA en tu mesa**, [Internet]. Disponible desde [http://www.inia.uy/Documentos/Privados/INIA%20Contigo/Suplementos%20Expo%20Prado/ExpoPrado2010\\_UCTT\\_Recetas.pdf](http://www.inia.uy/Documentos/Privados/INIA%20Contigo/Suplementos%20Expo%20Prado/ExpoPrado2010_UCTT_Recetas.pdf). [28/03/2015].

- Jorhem L., Engman J. (2007). Chemical elements in food and the role of atomic and mass spectrometry. Advantages and drawbacks of the determination of selected trace elements in foodstuffs by atomic absorption spectrometry. En: Caroli S.. **The determination of Chemical Elements in Food**, New Jersey, John Wiley & Sons,Inc, p. 52-79.

- Korn M A., Andrade J.B., S. de Jesus D., Lemos V.A., Bandeira M., dos Santos W., Bezerra M., Amorim F., Souza A., Ferreira S.(2006). Separation and preconcentration

procedures for the determination of lead using spectrometric techniques: A review. **Talanta**. 69, p.16-24.

- Kumar A R., Riyazuddin P. (2010). Chemical interferences in hydride generation atomic spectrometry. **Trends in Analytical Chemistry**. 29, 2, p. 166-176.

- Liu W.-X., Shen L.-F., Wang J.-W., Li S.-R. (2007). Uptake of Toxic Heavy Metals by Rice (*Oryza sativa L.*) Cultivated in the Agricultural Soil near Zhengzhou City, People's Republic of China. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. 79, p. 209-213.

- Lopes D., Pereira dos Santos E., Smanioto J., Mortari S., Dressler V., De Moraes E..(2005). Interference of nitrite and nitrogen dioxide on mercury and selenium determination by chemical vapor generation atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**. 60, p. 731-736.

- Mahr K. (2011). **Heavy Metal: 12 Million Tons of Chinese Rice Contaminated**. [Internet], TIME. Disponible desde < <http://science.time.com/2011/02/23/heavy-metal-millions-of-tons-of-chinese-rice-contaminated/>> [14/09/14].

- Meharg A., Rahman M. (2003). Arsenic Contamination of Bangladesh Paddy Field Soils: Implications for Rice Contribution to Arsenic Consumption. **Environmental Science and Technology**. 37, p.229-234.

- Meharg A., Zhao F.-J. (2012). **Arsenic & Rice**, [Internet], Springer Science +Business Media B.V. Disponible desde < <http://timbo.org.uy/biblio/Arsenic+%26+Rice/71782>> [ 20/09/14].

- Michon J., Deluchat V., Shukry R.A., Dagot C., Bollinger J.-C. (2007). Optimization of a GFAAS method for determination of total inorganic arsenic in drinking water. **Talanta**. 71, p. 479-485.

- Ministerio de la Presidencia (2005). **Real Decreto 9/2005** [Internet], 14 de enero del 2005, Madrid. Disponible desde: < <http://www.boe.es/boe/dias/2005/01/18/pdfs/A01833-01843.pdf>>, [14/09/14].

- Moreno-Jiménez E., Meharg A., Smolders E., Manzano R., Becerra D., Sánchez-Llerena J., Albarrán A., López-Piñero A. (2014). Sprinkler irrigation of rice fields reduces grain arsenic but enhances cadmium. **Science of the Total Environment**. 485-486, p. 468-473.

- Muñoz-Olivas R., Cámara C.(2001). Speciation related to human health. En: Ebdon L., Pitts L., Cornelis R., Crews H., Donard OFX., Quevauviller P. **Trace Element Speciation for Environment, Food and Health** [Internet]. Royal Society of Chemistry, p. 342. Disponible desde <http://books.google.com.uy/books?hl=es&lr=&id=IAm5e1YVnm4C&oi=fnd&pg=PA331&dq=lead+speciation+human+toxicity&ots=RwDHKHwIHM&sig=U1vpy9yrYwrFc1U1CWNdM5bfP6k#v=onepage&q=lead%20speciation%20human%20toxicity&f=false>

- Nagajyoti P.C., Lee K.D., Sreekanth T.V.M. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. **Environmental Chemistry Letters** 8, p.199-216.

- Ni Z., Rao Z., Li M. (1996). Minimization of phosphate interference in the direct determination of arsenic in urine by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, 334, p. 177-182.

- OMS. (2008). Cap. 8 Aspectos Químicos. En: **OMS.,Guías para la calidad del agua potable**, 3era ed., [Internet]. Disponible desde [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/gdwq3rev/es/](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3rev/es/) [13/12/2014].

- Onken B.M., Hossner L.R.(1996). Determination of Arsenic Species in Soil Solution under Flooded Conditions. **Soil Science Society of America Journal**. 60,5, p.1385-1392.

- Patel K.S., Shrivastava K., Brandt R., Jakubowski N., Corns W., Hoffman P. (2005). Arsenic contamination in water, soil, sediment and rice of central India. **Environmental Geochemistry and Health**. 27, p. 131-145.
- Petrov P., Serafimovski I., Stafilov T., Tsalev D. (2006). Flow injection hydride generation electrothermal atomic absorption spectrometric determination of toxicologically relevant arsenic in urine. **Talanta**. 69, p.1112-1117.
- Poder Ejecutivo, Presidencia de la República, **Decreto 253/79 (Con las modificaciones de los Decretos 232/88, 698/89 y 195/91 incluidas)**, [Internet], Montevideo, 1979. Disponible desde < [http://www.ciu.com.uy/innovaportal/file/30555/1/Dec.%20253\\_79%20y%20modificativos%20VIGENTE.pdf](http://www.ciu.com.uy/innovaportal/file/30555/1/Dec.%20253_79%20y%20modificativos%20VIGENTE.pdf)> [14/09/14].
- Poder Ejecutivo, Presidencia de la República, **Decreto 375/011**, [Internet], Montevideo, noviembre de 2011. Disponible desde < [http://archivo.presidencia.gub.uy/sci/decretos/2011/11/msp\\_291.pdf](http://archivo.presidencia.gub.uy/sci/decretos/2011/11/msp_291.pdf)>. [14/09/14].
- Poder Ejecutivo, Presidencia de la República, **Decreto 14/013**, [Internet], Montevideo, enero de 2013. Disponible desde [http://archivo.presidencia.gub.uy/sci/decretos/2013/01/msp\\_1.pdf](http://archivo.presidencia.gub.uy/sci/decretos/2013/01/msp_1.pdf) [14/09/14].
- Poder Legislativo, Cámara de Senadores, (2010), **Código de Aguas**, [Internet], Montevideo. Disponible desde <http://www.parlamento.gub.uy/htmlstat/pl/codigos/estudioslegislativos/CodigoDeAguas2010-03.pdf> [13/12/2014].
- Rivero M., Huertas R., Francini L., Vila L., Darre E. (2006). Concentrations of As, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, and Zn in Uruguayan Rice Determined by Atomic Absorption Spectrometry. **Atomic Spectroscopy**. 27,(2), p.48-54.
- Sahoo K.P., Kim H. (2013). A review of the arsenic concentration in paddy rice from the perspective of geoscience. **Geosciences Journal**.17,1, p.107-122.
- Serafimovski I., Karadjova I., Stafilov T., Tsalev D. (2006). Determination of total arsenic and toxicologically relevant arsenic species in fish by using electrothermal and hydride generation atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**. 83, p.55-60.
- Smith A., Lingas E., Rahman M. (2000). Contamination of drinking-water by arsenic in Bangladesh: a public health emergency, [Internet], **Bulletin of the World Health Organization**. 78, (9). Disponible desde < <http://www.who.int/bulletin/archives/78%289%291093.pdf> [28/03/2015].
- Stroud J.L., Khan M.A., Norton G.J., Islam R.M., Dasgupta T., Zhu Y-G., Price A.H., Meharg A.A., Mc Grath S.P., Zhao F-J. (2011). Assessing the Labile Arsenic Pool in Contaminated Paddy Soils by Isotopic Dilution Techniques and Simple Extractions. **Environmental Science & Technology**, 45, p. 4262-4269.
- Talukder A.S.M.H.M., Meisner C.A., Sarkar M.A.R., Islam M.S. (2011). Effect of water management, tillage options and phosphorus status on arsenic uptake in rice. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 74, p. 834-839.
- Taylor A., Day M.P., Hill S., Marshall J., Patriarca M., White M. (2015). Atomic spectrometry update: review of advances in the analysis of clinical and biological materials foods and beverages. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. 30, p. 542-579.
- Tommasino H., Hernández A. (2003). **El cultivo de arroz en Uruguay, Contribución a su conocimiento** [Internet]. Montevideo, DIEA, MGAP. Disponible desde <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,diea,diea-pub-arroz,O,es,0,,> [14/09/14].

- Tripathi R.D., Tripathi P., Dwivedi S., Kumar A., Mishra A., Chauhan P.S., Norton G.J., Nautiyal C.S.(2014). Roles for root iron plaque in sequestration and uptake of heavy metals and metalloids in aquatic and wetland plants. **Metallomics**. 6, p. 1789-1800.

- Uruguay XXI, (2014) **Informe de comercio exterior Exportaciones e importaciones de Uruguay Agosto 2014**, [Internet], Uruguay, Uruguay XXI Instituto de Promoción de Inversiones y Exportaciones. Disponible desde <http://www.uruguayxxi.gub.uy/wp-content/uploads/2011/11/Informe-de-Comercio-Exterior-de-Uruguay-Agosto-2014.pdf>, [14/09/14].

- Uruguay XXI, (2013), **Sector Arrocero**, [Internet], Uruguay, Uruguay XXI Instituto de Promoción de Inversiones y Exportaciones. Disponible desde <http://www.aca.com.uy/datos-estadisticos>

- Vereda Alonso E., García de Torres A., Cano Pavón. J.M. (2001). Flow injection on-line electrothermal atomic absorption spectrometry, Review. **Talanta**. 55 p. 219-232.

- Verma S., Dubey R.S. (2003). Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. **Plant Science**, 164, p. 645-655.

- Volynsky A.B. (2000). Mechanisms of action of platinum group modifiers in electrothermal atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**. 55, p.103-150.

- Volynsky A.B. (2004). Comparative efficacy of platinum group metal modifiers in electrothermal atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**. 59, p. 1799-1821.

- WHO. (2011). Evaluation of certain contaminants in food: seventy-second report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO Technical Report Series [Internet], N° 959. Disponible desde [ [http://whqlibdoc.who.int/trs/who\\_trs\\_959\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/who_trs_959_eng.pdf) ]

- Yamaguchi N., Nakamura T., Dong D., Takahashi Y., Amachi S., Makino T. (2011). Arsenic release from flooded paddy soils is influence by speciation, Eh, pH and iron dissolution. **Chemosphere**. 83, p. 925-932.

- Ye X., Li H., Ma Y., Wu L., Sun B. (2014). The bioaccumulation of Cd in rice grains in paddy soils as affected and predicted by soil properties. **Journal of Soils and Sediments**. 14, p. 1407-1416.

- Yoshida F., Hata A., Tonegawa H. (1999). Itai-Itai disease and the countermeasures against cadmium pollution by the Kamioka mine. **Environmental Economics and Policy Studies**. 2(3), p. 215-229.

- Yu H., Wang J., Fang W., Yuan J., Yang Z. (2006). Cadmium accumulation in different rice cultivars and screening for pollution-safe cultivars of rice. **Science of the Total Environment**. 370, p. 302-309.

- Xu X., Mcgrath S., Meharg A., Zhao F. (2008). Growing rice aerobically markedly decreases arsenic accumulation. **Environmental Science & Technology**, 42, p. 5574-5579.

- Williams P.N., Price A.H., Raab A., Hossain S.A., Feldmann J., Meharg A. (2005). Variation in Arsenic Speciation and Concentration in Paddy Rice Related to Dietary Exposure. **Environmental Science & Technology**. 39, p. 5531-5540.

- Zeng L.S., Liao M., Chen C.L., Huang C.Y.(2007). Effects of lead contamination on soil enzymatic activities, microbial biomass, and rice physiological indices in soil-lead-rice (*Oryza sativa* L.) system. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 67,p. 67-74.

- Zhu Y-G, Williams P-N, Meharg A. (2008). Exposure to inorganic arsenic from rice: A global health issue?. **Environmental Pollution**. 154, p. 169-171.

## ANEXO I: ESPECIES DE ARSÉNICO PRESENTES EN LOS ALIMENTOS:

Arsénico es un metaloide ubicado en el grupo 15 de la tabla periódica junto con nitrógeno y fosforo, elementos esenciales con quienes el arsénico comparte características químicas. En condiciones ambientales normales el estado de oxidación más estable del As es +5, aunque bajo condiciones reductoras puede formar compuestos con los estados de oxidación +3 y -3.

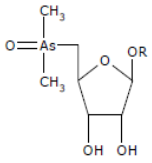
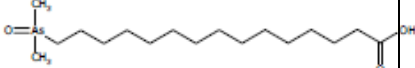
Las especies inorgánicas se encuentran bajo sus formas oxoanionicas arsenito y arsenato o formando complejos de coordinación con grupos tioles en péptidos o proteínas (Tabla 1). Los alimentos de origen terrestre en general presentan baja concentración de As inorgánico, salvo el arroz que presenta entre 0,1 y 0,4 mg/kg base seca y en ocasiones algo mayor. En el agua potable el As se encuentra en su mayoría como inorgánico. En las aguas superficiales, condiciones oxidantes, el As se encuentra en su mayoría como arsenato, en algunas aguas subterráneas en cambio las condiciones reductoras pueden favorecer la presencia de arsenito.

Las especies metiladas simples de arsénico- MMA, DMA, oxido de trimetilarsina y el ion tetrametilarsonio- pueden encontrarse en los alimentos pero en general en bajas concentraciones, < 0,5 mg/kg base seca (Tabla 1). Las dos primeras son importantes metabolitos humanos luego de la ingestión de especies de arsénico.

Las especies orgánicas de arsénico reportadas hasta la fecha, además de las especies metiladas, incluyen arsenobetaina, arsenoazucars, arsenolipidos entre otros (Tabla 1). Estas especies son habituales en los alimentos de origen marino, algas o animales que se alimentan de estas, presentándose en bajas concentraciones en alimentos de origen terrestre. Se requiere de mucha investigación en el estudio de la ocurrencia de las especies orgánicas de As. Por ejemplo, si bien la presencia de arsenolipidos en peces fue reportada en 1960, recién en 2008 se realizó la elucidación estructural de estas moléculas y se reconoce que quedan aún muchas estructuras moleculares por elucidar.

**Tabla 1.** Especies de arsénico presentes en alimentos. Fuente: EFSA, 2010.

Nombre	Estructura Química	Relevancia
Arsénico Inorgánico	iAs	Suma de As <sup>+3</sup> y As <sup>+5</sup>
Arsenito	As(O <sup>-</sup> ) <sub>3</sub>	Altamente toxico, baja concentración en la mayoría de los alimentos
Arsenato	O=As(O <sup>-</sup> ) <sub>3</sub>	Forma predominante en agua, baja concentración en la mayoría de los alimentos, altamente tóxico.
Arsenobetaina	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> As+CH <sub>2</sub> COO <sup>-</sup>	No tóxico. Especie mayoritaria en alimentos de origen marino.

Arsenoazucares	 <p>En su mayoría R= <math>\text{CH}_2\text{CHOHCH}_2\text{SO}_3\text{H}</math></p>	Mayoritariamente en alimentos de origen marino.
Arsenolipidos	<p>Ej.</p> 	Mayoritariamente en alimentos de origen marino.
Propionato de tetrametilarsonio (TMAP)	$(\text{CH}_3)_3\text{As}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$	Especie minoritaria presente en alimentos de origen marino.
Monometilarsonato (MMA)	$\text{CH}_3\text{ASO}(\text{O}^-)_2$	Especie minoritaria presente en algunos alimentos marinos y terrestres.
Dimetilarsinato (DMA)	$(\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{O}^-)$	Especie minoritaria presente en algunos alimentos marinos y terrestres.
Oxido de trimetilarsina (TMAO)	$(\text{CH}_3)_3\text{AsO}$	Especie minoritaria común en alimentos marinos.
Ion tetrametilarsonio (TETRA)	$(\text{CH}_3)_4\text{As}^+$	Especie minoritaria común en alimentos marinos.
Arsenocolina (AC)	$(\text{CH}_3)_3\text{As}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	Especie minoritaria común en alimentos marinos.

**ANEXO II. EQUIPAMIENTO Y REACTIVOS UTILIZADOS EN EL TRABAJO EXPERIMENTAL.**

<b>Equipamiento</b>	
<b>Instrumento</b>	<b>Aplicación</b>
Microondas Milestone MLS 1200 Mega	Digestión vía húmeda de suelos y granos
Microondas Anton Paar Multiwave 3000.	Digestión vía húmeda de suelos y granos
Espectrofotómetro de Absorción Atómica Perkin Elmer AA 200 con corrección de línea de base por lámpara de Deuterio y horno de grafito HGA 900 y automuestreador AS800	Determinación de As, Cd y Pb en agua y de Cd y Pb en grano.
Espectrofotómetro de Absorción Atómica Perkin Elmer AA 800 con corrección de línea de base por Efecto Zeeman; con automuestreador AS-800	Determinación de As, Cd y Pb en agua y de As, Cd y Pb en grano.
AA 200 y AA 800 asociados a un generador de hidruros Perkin Elmer FIMS 400 adaptado para la determinación de As; con automuestreador AS-90	Determinación de As en grano
Espectrofotómetro de Emisión Atómica Perkin Elmer OPTIMA-4300 DV; con automuestreador AS-90	Determinación de As, Cd y Pb en suelo
Balanzas analíticas varias que trabajan a la décima de miligramo (0,0001 g)	Tratamiento de muestra, preparación de soluciones, entre otros.
pHmetro	pH 5 Acorn Series Meters, OAKTON
pHmetro para medición de potencial redox	Sension+ MM 374 GLP Laboratory PH/ISE/EC Multimeter Dual Channel.
Centrífuga	Damon /IEC Division

<b>Reactivos y soluciones estándar</b>	
Materiales de referencia certificado, trazable al sistema internacional de medidas	Cadmium Standard Solution, Standard Reference Material (SRM) 3108, National Institute of Standards and Technology (NIST).
	Trace Elements in Water (fresh water), SRM NIST 1643e.
	www-IPC-1, Solución Stock en 3,5 % HNO <sub>3</sub> , Inorganic Ventures, USA.
	Rice Flour, SRM 1568 a, National Bureau of Standards.
	Arsenic in 2% (v/v) HNO <sub>3</sub> , 1000 mg/L Inorganic Ventures, USA
	Cadmium in 3% (v/v) HNO <sub>3</sub> , 1000 mg/L Inorganic Ventures, USA
	Lead in 0.5 % (v/v) HNO <sub>3</sub> , 1000 mg/L Inorganic Ventures, USA
Otros Materiales de Control	AquaCheck Distribution 412 Group 5G, Metales tóxicos en agua subterránea con ácido nítrico 0.5 %. (AQ 412)
	AquaCheck Distribution 381 y 397, Suelo Agrícola. (AQ 381; AQ 397)
Reactivos:	Agua de calidad ASTM Tipo II según ASTM D 1193-06 "Standard Specifications for Reagent Water".
	Reactivos sólidos y líquidos de calidad pura para análisis de trazas.



## ANEXO III: MARCO LEGAL APLICABLE AL AMBIENTE ARROCERO.

### AGUAS.

A nivel nacional, el régimen jurídico de las aguas se centra en el Código de Aguas (Decreto Ley 14859, del 15 de diciembre de 1978) que fue reglamentado en primera instancia por el decreto 253/79 y luego modificado por los decretos 232/88, 698/89 y 195/91 (Tabla 1). Actualmente, se encuentra en discusión una propuesta de modificación del decreto 253/79 “Normas reglamentarias para prevenir la contaminación ambiental mediante el control de las aguas” del Grupo de Estandarización Técnica de Estándares de Agua (GESTA agua) de la Comisión Técnica Asesora en Medio Ambiente (COTAMA). A diferencia del decreto 253/79 que distinguía 4 tipos de aguas superficiales según sus usos preponderantes en esta propuesta de modificación, se establece un único estándar de calidad de aguas superficiales así como también se agrega un estándar de calidad para aguas subterráneas (Tabla 1). Si bien esta última aún no ha recibido andamiaje parlamentario, es destacable que desde la academia se propone una disminución sustantiva de los límites actualmente vigentes.

En lo referido a aguas potables, el marco legal vigente comprende el decreto 315/994 con su última modificación dada por el decreto 375/11 adoptando la norma UNIT 833/2008 reimpresión corregida del año 2010 para establecer los requisitos que debe cumplir este tipo de agua (Tabla 1).

**Tabla 1.** Límites máximos admisibles en agua para consumo humano y agua superficial según la Legislación Nacional (Decreto 253/79 y mod., Decreto 375/11, COTAMA, 2008).

Legislación →/ Elemento↓	Normativa vigente		Propuesta de Modificación COTAMA	
	Agua superficial destinada a riego  Clase 2a. Decreto 253/79 y sucesivas modificaciones	Agua destinada a consumo humano según UNIT 833/2008 internalizada por decreto 375/11	Objetivo de calidad. Agua superficial	Estándares de calidad de agua subterránea
Arsénico (µg/L)	50	20 (valor objetivo 10).	5	10
Cadmio(µg/L)	1	3	0,1	3
Plomo(µg/L)	30	30 (valor objetivo 10).	3	10

## SUELOS.

Uruguay no tiene legislación en lo referente a niveles de contaminación por metales en suelo. Por esta razón, se realizó un estudio de la normativa internacional al respecto.

En la Unión Europea no se encuentra legislación unificada de metales en suelos. De todos modos, varios países abordan el tema entre ellos: Alemania, Holanda y Reino Unido (Tabla 2). España establece una metodología para fijar valores límite.

**Tabla 2.** Normativa internacional para metales pesados en suelo.

Normativa	Fuente	Arsénico (mg/kg)	Cadmio (mg/kg)	Plomo (mg/kg)
Federal soil protection and contaminated sites ordinance. Alemania, Uso Infantil	<a href="http://www.elaw.org/node/1469">http://www.elaw.org/node/1469</a>	25	10	200
Circular on target values and intervention values for soil remediation; Holanda	<a href="http://www.pbl.nl">www.pbl.nl</a>	29	0,8	85
Soil Guideline Values For Arsenic and Cadmium Contamination in soils , Reino Unido	<a href="https://www.gov.uk/government/publications/land-contamination-soil-guideline-values-sgvs">https://www.gov.uk/government/publications/land-contamination-soil-guideline-values-sgvs</a>	43	1,8	-
Canadian Environmental Quality Guidelines, Uso Agrícola, Canadá.	<a href="http://www.ccme.ca">www.ccme.ca</a>	12	1,4	70
Assessment levels for Soil, Sediment and Water. Department of Environment and Conservation, Australia. Ecological Investigation Level	<a href="http://www.esdat.com.au/Environmental%20Standards/Australia/WA/Assessment%20Levels%20-%202010.pdf">http://www.esdat.com.au/Environmental%20Standards/Australia/WA/Assessment%20Levels%20-%202010.pdf</a>	20	3	600
New Zeland Soil Guideline Values, uso rural residencial.	<a href="http://www.mfe.govt.nz/publications/rma/proposed-nes-managing-contaminants-in-soil/page8.html">http://www.mfe.govt.nz/publications/rma/proposed-nes-managing-contaminants-in-soil/page8.html</a>	20	5	730
Decreto Nacional n ° 831/PEN/93, reglamentación de la Ley N°. 24051. Argentina, uso agrícola.	<a href="http://infoleg.mecon.gov.ar/infolegInternet/anexos/10000-14999/12830/norma.htm">http://infoleg.mecon.gov.ar/infolegInternet/anexos/10000-14999/12830/norma.htm</a>	20	3	375

Los valores de la Ordenanza Federal Alemana para la protección del suelo y sitios contaminados hacen referencia a toxicidad para humanos, más específicamente uso infantil del suelo, y son la especificación más exigente de la ley. Se consideran valores gatillo por encima de los cuales se debe investigar la posibilidad de daño

(Tabla 2). Es importante destacar que el gobierno alemán establece un límite de As capaz de generar deficiencias de crecimiento para plantas cultivadas en suelo agrícola en profundidad de 0-30 cm de 0,4 mg/kg base seca de As extraíble en el extracto de nitrato de amonio.

En la normativa holandesa, el valor especificado refiere a un promedio entre un valor objetivo de concentración de línea de base tal que no se afectan las propiedades del suelo y el valor de intervención definido como la concentración máxima tolerable encima de la cual el suelo requiere intervención. Reino Unido establece valores tolerables o con un mínimo riesgo para la salud de humanos en exposición a largo plazo (Cole et al., 2009), (Tabla 2).

El gobierno español en el anexo VII del Real decreto 9/2005 describe una metodología para el cálculo de niveles genéricos de referencia para la protección de la salud humana y de los ecosistemas. Específicamente para metales menciona que cuando no se disponga de niveles genéricos de referencia, se podrán adoptar los resultantes de sumar a la concentración media el doble de la desviación típica de las concentraciones existentes en suelos de zonas próximas no contaminadas y con sustratos geológicos de similares características. También menciona que a los efectos de evaluación de la contaminación del suelo, los valores así calculados serán únicos y, por tanto, aplicables a cualquier uso del suelo y atendiendo tanto a la protección de la salud humana como a la protección de los ecosistemas. (Ministerio de la Presidencia, 2009).

El Departamento de Medio Ambiente y Conservación de Australia establece estándares de calidad ecológicos y de protección de la salud humana adecuados para un monitoreo inicial y por encima de los cuales se debe realizar una evaluación de riesgo sitio específica. Nueva Zelanda establece valores guía por encima de los cuales el suelo debe considerarse contaminado (Tabla 2).

Para suelos se utilizó como referencia legal la guía canadiense de calidad ambiental debido a que los demás países que tratan el tema son menos exigentes que esta (Tabla 2).

## GRANOS.

En el año 2013 a través del decreto 14/013 Uruguay internalizó el Reglamento Técnico Mercosur sobre límites máximos de contaminantes inorgánicos en alimentos (MERCOSUR/GMC/RES.Nº. 12/11). Los límites establecidos en este reglamento coinciden con aquellos fijados por el Codex Alimentarius (CODEX), Tabla 3. Como ya se ha mencionado el límite de As en alimentos en el CODEX aún se encuentra en discusión y hace referencia a As inorgánico en arroz pulido. (Codex REP 14/CF). De todos modos, CODEX menciona que la determinación de As se realizará como As total. Se incluye además la reglamentación de la Unión Europea debido a que es uno de los destinos objetivo de la ACA.

**Tabla 3.** Normativa Nacional e Internacional, límites para metales pesados en arroz.

Legislación →/ Elemento ↓	Reglamento MERCOSUR/GMC/RES.Nº 12/11	Reglamento (CE) nº 1881/2006 y modificaciones	CODEX Standard 193-1995
	(mg/kg)	(mg/kg peso fresco)	(mg/kg)
Arsénico	0,30	-	0,20
Cadmio	0,40	0,20	0,40
Plomo	0,20	0,20	0,20

## ANEXO IV. DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO EN LA SOLUCIÓN DEL SUELO EN PRESENCIA DE ALTAS CONCENTRACIONES DE FOSFATO.

### INTRODUCCIÓN.

La determinación de As por GFAAS en presencia de fosfato es muy desafiante debido a que el fosfato es un interferente ampliamente descrito en la literatura (Ni et al, 1996; Husa'kova' et al, 2007; Michon et al, 2007).

Se consideraron 2 posibles explicaciones a esta interferencia:

- Interferencia espectral producida por la formación de PO (g) y P<sub>2</sub> (g) durante la atomización (Volynsky, 2000). Aún con el uso del horno de grafito según el paradigma STPF (Stabilized Temperature plataform furnace, Beaty R.D. et al 1993) se ha observado la presencia del PO (Husa'kova et al., 2007). Para solucionar esta interferencia se recomienda la utilización de Paladio o Paladio prereducido lo cual estabiliza la señal del PO (g) observándose su aparición a temperaturas muy superiores (Volynsky, 2000; Husa'kova et al., 2007; Ajtony et al., 2008).

- Interferencia no espectral debido al efecto estabilizador del fosfato sobre el As, se observan picos más anchos con modificador de Paladio en presencia de fosfato (Ni et al, 1996). Se propone la utilización de Rutenio como modificador.

A partir del método habitual del laboratorio (Davidowski et al., 2009) se optimizaron las temperaturas de pirolisis y atomización con el uso de Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> como modificador de matriz a tres concentraciones diferentes (20+12; 10+6; 5+3) µg de Pd+ Mg respectivamente.

### MATERIALES Y MÉTODOS.

En tubo de 50 mL, tapa rosca, se pesó 5 g de suelo seco por triplicado y se extrajo con 20 mL de 0,05 M NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Luego se centrifugó a 4000 g y se separó el sobrenadante del suelo con filtración por 0,45 µm -Sartorius Ministart RC 25-. En la optimización de las condiciones instrumentales se incluyó un estándar acuoso sin fosfato y 2 soluciones de suelo distintas producto de la extracción con NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

Se determinó As en la solución sobrenadante por GF AAS con corrección de fondo por efecto Zeeman – Tabla 1 Anexo II.

### RESULTADOS

La determinación de As en matrices complejas en el Departamento de Espectrometría Atómica de Alimentos y Medio Ambiente del LATU se realiza según lo propuesto por Davidowski et al., (2009). Para matrices nuevas se utiliza el método de adiciones estándar para valorar la influencia de la misma sobre la determinación del analito. En esta oportunidad se obtuvo una señal constante independientemente de la concentración de As en la muestra. El único elemento diferencial en la matriz analizada era el medio extractante por lo cual se sospechó de una interferencia de fosfato luego confirmada en la literatura. En consecuencia, se debió de realizar un estudio adicional de temperaturas de pirolisis, atomización y modificadores de matriz para optimizar la determinación As en presencia de altas concentraciones de fosfato.

Se propuso el uso de Paladio evaluando distintas concentraciones de modificador. Esto último se fijó basado en un estudio de varios metales en vino- matriz con alto contenido de fosfato- donde se observó que el uso de la mezcla universal Pd-Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> como modificador de matriz (5 µg de Pd y 3 µg de Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) no era adecuado para As y, se utilizó la relación a 20 µg de Pd y 12 µg de Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> con lo cual se pudo solucionar la interferencia mencionada (Ajtony et al, 2008).

---

#### ESTUDIO DE TEMPERATURAS DE PIROLISIS

Las muestras de extracto de suelo en fosfato de amonio presentaron un comportamiento similar frente al cambio de temperatura (Figura 1). Entre 1100 y 1400°C la señal se mantuvo invariable salvo para el modificador más concentrado, 20+12, donde ocurrió una disminución constante de la señal aún a partir de 1200°C. Para los otros dos modificadores se observó pérdida de la señal a partir de 1400°C.

Es destacable que solo en matriz fosfato al aumentar la concentración de modificador de 5+3 a 10+6 ocurre una notoria disminución de área la cual, se mantiene constante luego para el modificador 20+12 a 1100°C. El estándar acuoso se comporta de manera similar en las distintas temperaturas de pirolisis y con los distintos modificadores. Es probable que esto haya ocurrido debido a la disminución de la interferencia espectral mencionada.

La señal de fondo reveló que el modificador más concentrado presentó más señal en el estándar acuoso, seguramente aportado por el Pd. Por otra parte a partir de 1400°C se obtuvo una señal de fondo menor de 0,5 unidades de absorbancia, lo cual se considera bien resuelto por el instrumento (Beaty y Kerber, 1993).

En resumen en matriz fosfato de amonio se decidió trabajar a 1400°C de temperatura de pirolisis con el modificador 10+6.

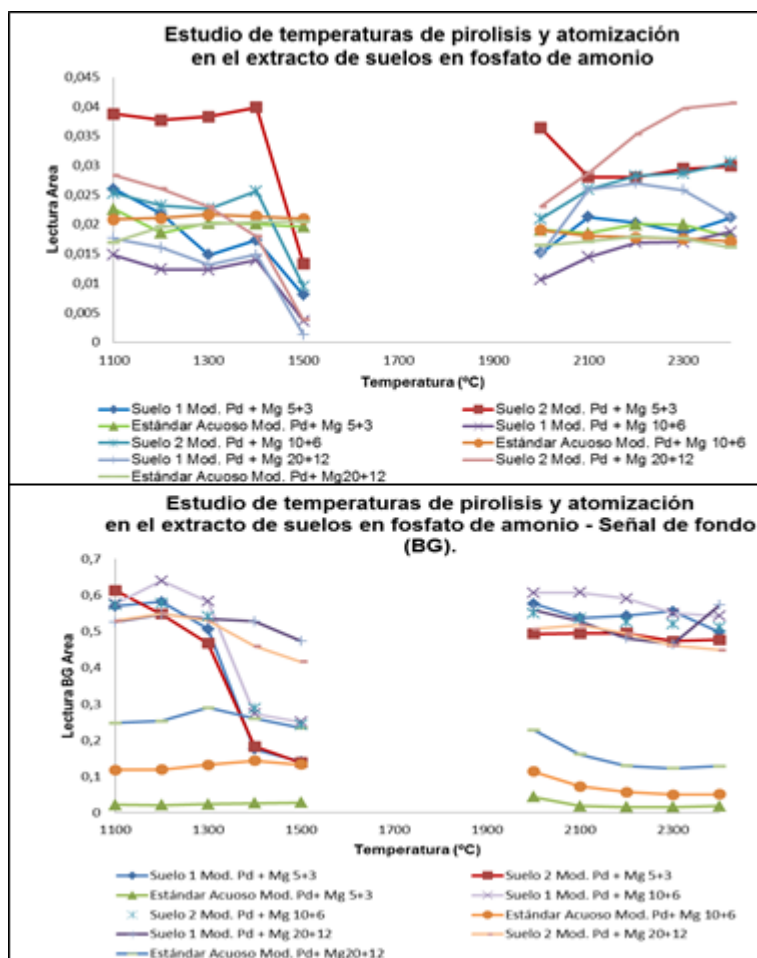
---

#### ESTUDIO DE TEMPERATURAS DE ATOMIZACIÓN

Al aumentar la concentración del modificador de 5+3 a 10+6 el área disminuyó notoriamente probablemente debido a las mismas razones que en el estudio de temperaturas de pirolisis (Figura 1). Para el modificador 10+6 se obtuvo una variación muy similar en los dos extractos de suelo en fosfato de amonio analizados, con un comportamiento en meseta entre 2200 y 2400 °C. Esto no ocurrió para el modificador más diluido, 5+3.

Con el uso del modificador más concentrado -20+12- al aumentar la temperatura de atomización aumentó la señal salvo para la matriz acuosa, al igual que sucedió con la temperatura de pirolisis. Sería esperable que se estuviera observando la atomización del fósforo dado que esto no aconteció en el estándar acuoso (Volonsky, 2000).

Por lo cual se decidió utilizar 2200 °C como temperatura de atomización y modificador Pd+Mg 10+6.



**Figura 1.** Estudio de temperaturas de pirolisis y atomización óptimas para la determinación de As en el extracto de suelo en fosfato de amonio. Se evaluaron 3 concentraciones del modificadores de matriz Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>- Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; (20+12; 10+6; 5+3).

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

Se optimizaron las condiciones instrumentales para la determinación de As en presencia de altas concentraciones de fosfato en un Espectrómetro de Absorción Atómica con horno de grafito con corrección de fondo por efecto Zeeman. En síntesis, las condiciones óptimas encontradas fueron 1400 °C de temperatura de pirolisis, 2200 °C de temperatura de atomización con el uso de Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>- Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> como modificador de matriz regular en concentración de 10+6 μg de Pd+Mg.

Se trabajó con una concentración de Pd inferior a la propuesta por Husáková et al.,(2007) y Ajtony et al, (2008), 20 μg de Pd. En el análisis de As en vino al aumentar la concentración de Pd se obtuvo una buena sensibilidad pero una señal de BG aún elevada para los demás analitos debido al aumento en la concentración de sales (Ajtony et al, 2008), similar a lo observado en el presente trabajo en la señal de fondo del estándar acuoso con 20 μg de Pd. Se obtuvo una temperatura optima de atomización de 2200 °C similar a lo propuesto por Ajtony et al.,(2008) pero con una temperatura optima de pirolisis superior, 1400°C, respecto a 700°C obtenidos por dicho autor.

Para el análisis de As en agua mineral con concentraciones de fosfato inferiores a 4 mg/L se optimizó el método de medida en 1200°C y 2400 °C de temperatura de pirolisis y atomización respectivamente con modificador de Pd+Mg en relación 1/5 en un Espectrómetro con corrección de fondo por efecto Zeeman (Michon et al., 2007). Estos resultados son similares a los obtenidos en el presente trabajo. Diferencias en los datos experimentales publicados por distintos autores puede estar causada por la influencia de las propiedades del grafito utilizado en la interacción As-Modificador de Matriz-Tubo de grafito (Volynsky, 2004).

La aplicación de modificadores de matriz del grupo del platino, donde se incluye el paladio, junto con la evaporación del analito de un tubo de grafito con plataforma aumentan los valores de temperatura de pirolisis máxima, especialmente para los semimetales altamente volátiles como es el caso del arsénico (Volynsky; 2000). Es esperable que este máximo coincida con la temperatura de fusión del modificador, para el caso del Pd es de 1555°C, debido a que los átomos del analito permanecen en la estructura cristalina del modificador hasta que la temperatura es suficientemente alta para romperla (Volynsky; 2000). Esta regla general se cumplió en el presente trabajo debido a que por encima de 1400°C se observó una caída de la señal del analito muy significativa.



**ANEXO V. RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ENSAYO DE BIODISPONIBILIDAD DE ARSÉNICO EN SUELOS INUNDADOS.**

**Tabla 1.** Resultados obtenidos de pH, pe y As (mg/L) en el ensayo de biodisponibilidad de As en función del tiempo de incubación.

<b>Tiempo</b>	<b>pH</b>	<b>pe</b>	<b>As (mg/L)</b>
<b>Chacra 1</b>			
0	7,05	4,38	0,0021
5	6,81	4,58	0,0038
10	7,19	4,39	0,0052
15	7,10	4,28	0,0061
30	7,31	4,83	0,0045
60	7,28	5,07	0,0044
<b>Chacra 2</b>			
0	5,33	6,38	0,0019
5	6,25	4,91	0,0058
10	6,51	4,90	0,0249
15	6,82	4,45	0,0322
30	6,36	5,62	0,0108
60	5,74	6,14	0,0053
<b>Chacra 4</b>			
0	5,28	5,98	0,0003
5	6,38	4,95	0,0005
10	6,84	4,58	0,0019
15	6,94	4,47	0,0035
30	9,26	5,16	0,0024
60	6,77	5,42	0,0023
<b>Chacra 5</b>			
0	5,41	5,85	0,0019
5	6,14	5,05	0,0025
10	6,58	4,83	0,0078

15	6,75	4,53	0,0083
30	6,76	5,28	0,0046
60	6,76	5,27	0,0061
<b>Chacra 11</b>			
0	6,10	5,08	0,0046
5	6,58	4,69	0,022
10	6,65	4,85	0,017
15	7,02	4,23	0,016
30	6,89	5,13	0,0084
60	6,55	5,37	0,0071
<b>Chacra 12</b>			
0	4,92	6,16	0,0033
5	6,11	5,00	0,021
10	6,38	5,04	0,022
15	6,32	5,05	0,018
30	5,71	6,02	0,018
60	5,08	6,47	0,017
<b>Chacra 14</b>			
0	5,63	5,69	0,0026
5	6,19	5,03	0,011
10	6,35	5,09	0,017
15	6,50	4,72	0,019
30	6,26	5,66	0,015
60	6,05	5,76	0,017
<b>Chacra 15</b>			
0	4,91	6,47	0,0026
5	5,96	5,26	0,012
10	5,95	5,48	0,014
15	6,12	5,01	0,012

30	6,03	5,93	0,0098
60	5,47	6,42	0,0055
<b>Chacra 16</b>			
0	5,00	6,32	0,0048
5	6,05	5,17	0,021
10	6,38	4,99	0,018
15	6,35	4,86	0,017
30	6,32	5,74	0,015
60	5,96	6,09	0,0082
<b>Chacra 20</b>			
0	5,92	5,39	0,0052
5	6,11	5,23	0,011
10	6,38	5,07	0,012
15	6,45	5,03	0,017
30	6,83	5,31	0,016
60	6,39	5,62	0,012

**Tabla 2.** Resultados de As en solución de extracción para el ensayo de extracción de los suelos con fosfato de amonio.

Chacra Nº.	As (mg/L) en NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1	0,017
2	0,045
4	0,009
5	0,025
11	0,048
12	0,042
14	0,015
15	0,030
16	0,058

20	0,031
----	-------

**Tabla 3.** Contenido de fósforo, materia orgánica y clasificación textural de las chacras en análisis. Datos aportados por el proyecto macro “Determinación de indicadores de sustentabilidad ambiental asociados a distintos usos y manejos en arroz que orienten buenas prácticas agrícolas”.

Nº de chacra	(%) MO	P grey en to (mg/kg)	Clasificación Textural
1	6,5	5	Arcilloso
2	4,1	10	Franco Arcilloso
4	4,4	7	Arcilloso
5	4,4	7	Arcilloso
11	2,2	13	Franco
12	1,3	14	Franco Arcilloso Arenoso
14	3,2	9	Franco Arcilloso
15	2,5	15	Franco Arcilloso
16	3,3	13	Franco
20	3,7	6	Arcilloso

**Tabla 4.** Análisis de regresión para evaluar la relación entre el extractante fosfato de amonio y la incubación con agua. En x As (mg/L) luego de extracción con  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , en y As (mg/L) para cada tiempo de incubación.

Tiempo	$r^2$	r	p. (no correlación)
0	0,45	0,67	0,034
5	0,57	0,76	0,011
10	0,53	0,72	0,018
15	0,35	0,59	0,072
30	0,26	0,51	0,13
60	0,0002	0,017	0,73