

**DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO EN DIFERENTES VARIEDADES DE ARROCES
UTILIZANDO ICP-MS Y LA EVALUACIÓN DE UN MÉTODO PARA REDUCIR TAL
CONTAMINANTE**

Por
Christine M. Jusino Olivencia

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN

CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO,
Recinto Universitario de Mayagüez
Facultad de Ciencias Agrícolas
2018

Aprobado por:

Félix R. Román Velázquez, PhD
Presidente, Comité Graduado

Fecha

María L. Plaza, PhD
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Diana Sánchez Rivera, PhD
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Fernando Pérez, PhD
Coordinador del Programa CITA

Fecha

Oscar J. Perales, PhD
Representante de Estudios Graduados

Fecha

ABSTRACT

Arsenic is an element of interest, in the food industry, due to its accumulation in the food and later in the human body, which may lead to further complications in health. This study of arsenic in rice was conducted using an Inductive Coupled Plasma – Mass Spectrometry instrument and microwave acid digestion to determine the total concentration of the element. The determination of arsenic was made before and after the selected treatment. The method selected to reduce the arsenic was a water boiling process in which the rice was submerged periodically from 30 seconds to 3 minutes and then rinsed, and dried out in an oven at 395° F from a range of 30 minutes to 2 hours. The total concentration of arsenic was reduced from 18 to 58%, depending on the sample. The treatment developed has great potential to be used to reduce arsenic in rice with high levels of this toxic element.

RESUMEN

El arsénico es un elemento de interés en la industria de alimentos, debido a su acumulación en los alimentos y más tarde en el cuerpo humano, lo que puede conducir a más complicaciones en la salud. El estudio de arsénico en el arroz se llevó a cabo utilizando el instrumento de Plasma Inductivo Acoplado a Espectrometría de Masas y la digestión ácida de muestras en microondas para determinar la concentración total del elemento. La determinación de arsénico total se realizó antes y después del tratamiento seleccionado. El método seleccionado para reducir el arsénico fue un proceso de ebullición en agua en el que el arroz fue sumergido por períodos de 30 segundos a 3 minutos y luego se enjuagó, y se secó en un horno a 395° F en un rango de 30 minutos a 2 horas. La concentración total de arsénico se redujo de 18 a 58%, dependiendo de la muestra. El tratamiento desarrollado tiene un gran potencial para ser utilizado para reducir el arsénico en el arroz con altos niveles de este elemento tóxico.

DEDICATORIA

A Dios

Quien me ha dado el don del entendimiento, la comprensión y la sabiduría para aplicarla en el campo de las ciencias, y por darme la fuerza física para alcanzar la meta trazada.

A mi familia

A mis padres Jarvis Jusino Méndez y Migdalia Olivencia Quiles quienes dieron el todo por el todo para llegar hasta aquí conmigo.

A mi esposo Rey Wilfredo Dieppa Ríos quien confió en mí desde el inicio de esta meta y quien me apoyó día y noche, sin importar las circunstancias de la vida, para lograr alcanzarla.

A ellos quienes conocieron mis lágrimas de esfuerzo y lágrimas de triunfo; a ellos les dedico este trabajo.

¡Con amor, humildad y agradecimiento!

AGRADECIMIENTOS

A Dios doy gracias por darme la vida y la salud para completar esta etapa de la vida.

A mis padres agradezco el apoyo y la confianza depositada en mí para alcanzar la meta, por encaminarme a ser una profesional, por los consejos y la motivación para lograr mis sueños, por el ejemplo de superación y optimismo para triunfar en la vida.

A mi esposo le doy gracias por el apoyo, por confiar en mí, por la aportación de ideas para desarrollar el trabajo y culminarlo, por la motivación diaria para lograr la meta, por ser mi pilar y mi regalo de vida.

Al programa graduado de Ciencia y Tecnología de alimentos por darme la oportunidad de crecer profesionalmente.

Al comité graduado compuesto por el Dr. Félix R. Román Velázquez, la Dra. María L. Plaza, y la Dra. Diana Sánchez Rivera le doy gracias por confiar este proyecto en mí, por aportar ideas y conocimiento, por prestarme las facilidades de sus laboratorios para llevar a cabo el proyecto, por ayudarme a crecer de manera profesional, por la atención, por la diligencia, por proceder con respeto ante cada situación ocurrida y por dar el máximo en su poder para ayudarme a alcanzar esta meta.

A mi mejor amiga, Ivelisse M. Lugo Pérez, por su apoyo y confianza en mi esfuerzo, y por la corrección ortográfica del trabajo aquí presentado.

A mis compañeros de estudio, a mis compañeros de laboratorio y a los técnicos de equipos les doy las gracias por aportar de su conocimiento hacia mi proyecto, por aportar ideas, por ayudarme a resolver cada situación inesperada, por respetar mi trabajo y mantener un ambiente agradable en el laboratorio y finalmente por su apoyo y ayuda a mi trabajo.

A mis amigos y familia les doy gracias por el apoyo, por sus oraciones, por su atención, por su ayuda y por darme la motivación para culminar la meta.

En fin quiero agradecer a todas las personas que aportaron su granito de arena para hacer de mi profesión una playa llena de conocimiento, profesionalismo y respeto.

¡Muchas gracias!

© Christine Marie Jusino Olivencia
2018

TABLA DE CONTENIDO

1	CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	1
2	CAPÍTULO II: REVISIÓN LITERARIA.....	2
2.1	El arroz: descripción, variedades, propiedades y nutrientes.....	2
2.2	El arsénico: elemento, formas existentes, infiltración y niveles permisibles	3
2.3	Equipos utilizados	5
2.4	Origen y selección de métodos	6
3	CAPÍTULO III: METODOLOGÍA	8
3.1	Determinar y reducir el contenido de arsénico total en diferentes arroces	8
3.2	Lavado de equipos	8
3.3	Digestión ácida asistida con horno microondas.....	9
3.4	Preparación de muestras para determinación de la cantidad de arsénico	9
3.5	Uso de "Inductive Coupled Plasma - Mass Spectrometry" para la detección y cuantificación de arsénico total	10
3.6	Evaluación de un método de hervido en agua para la reducción del arsénico total en el arroz	10
3.7	Análisis de pérdida de propiedades	11
4	CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
4.1	Determinación de arsénico pre-tratamiento en diferentes muestras de arroz comercial	12
4.2	Determinación de arsénico post-tratamiento en diferentes muestras de arroz comercial.....	16
4.3	Comparación de propiedades pre y post tratamiento en diferentes muestras de arroz comercial	25
5	CAPÍTULO V: CONCLUSIÓN	44
6	CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES	46
	REFERENCIAS.....	48
	APÉNDICE	51

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Nombre, fórmula y estructura de las diferentes formas de arsénico	3
Tabla 2: Resultados obtenidos para la cantidad de arsénico total en SRM-1568b de NIST®	15
Tabla 3: Datos obtenidos para las muestras del Lote #1 luego del tratamiento	16
Tabla 4: Datos obtenidos para validación del Lote #1	18
Tabla 5: Datos obtenidos para las muestras del Lote #2 luego del tratamiento	19
Tabla 6: Datos obtenidos para validación del Lote #2	21
Tabla 7: Datos obtenidos para las muestras del Lote #3 luego del tratamiento	21
Tabla 8: Datos obtenidos para validación del Lote #3	23
Tabla 9: Resultados obtenidos para la actividad de agua de las muestras para el Lote #1 sin tratamiento	25
Tabla 10: Resultados obtenidos para la actividad de agua de las muestras para el Lote #1 con tratamiento	26
Tabla 11: Resultados obtenidos para la actividad de agua de las muestras para el Lote #1 pre y post-tratamiento a 30 s	27
Tabla 12: Resultados obtenidos para la actividad de agua de las muestras para el Lote #2 sin tratamiento	28
Tabla 13: Resultados obtenidos para la actividad de agua de las muestras para el Lote #2 con tratamiento	29
Tabla 14: Resultados obtenidos para la actividad de agua de las muestras para el Lote #2 pre y post-tratamiento a 30 s	30
Tabla 15: Resultados obtenidos para la actividad de agua de las muestras para el Lote #3 sin tratamiento	31
Tabla 16: Resultados obtenidos para la actividad de agua de las muestras para el Lote #3 con tratamiento	32
Tabla 17: Resultados obtenidos para la actividad de agua de las muestras para el Lote #3 pre y post-tratamiento a 30 s	33
Tabla 18: Resultados obtenidos para la actividad de agua de las muestras para los 3 lotes pre y post-tratamiento a 30 s	34
Tabla 19: Resultados obtenidos para las longitudes de los arroces antes del tratamiento	43
Tabla 20: Resultados obtenidos para las longitudes de los arroces después del tratamiento	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Comparación de As total en diferentes variedades de arroz para 3 lotes estudiados	13
Figura 2: Resultados obtenidos en promedio para la cantidad de arsénico total en las muestras de arroz original para los 3 lotes	14
Figura 3: Comparación de la cantidad de arsénico total en diferentes variedades de arroz, antes y después del tratamiento, y el % de reducción para las muestras de lote #1	17
Figura 4: Comparación de la cantidad de arsénico total en diferentes variedades de arroz, antes y después del tratamiento, y el % de reducción para las muestras de lote #2	20
Figura 5: Comparación de la cantidad de arsénico total en diferentes variedades de arroz, antes y después del tratamiento, y el % de reducción para las muestras de lote #3	22
Figura 6: Comparación de la cantidad promedio de arsénico total en diferentes variedades de arroz, antes y después del tratamiento, y el % de reducción para los tres lotes	24
Figura 7: Comparación visual para el arroz grano mediano: a) sin tratamiento, b) 30 segundos, c) 1 minuto, d) 2 minutos y e) 3 minutos de tratamiento	36
Figura 8: Comparación visual para el arroz grano largo: a) sin tratamiento, b) 30 segundos, c) 1 minuto, d) 2 minutos y e) 3 minutos de tratamiento	37
Figura 9: Comparación visual para el arroz integral: a) sin tratamiento, b) 30 segundos, c) 1 minuto, d) 2 minutos y e) 3 minutos de tratamiento	38
Figura 10: Comparación visual para el arroz Jazmín: a) sin tratamiento, b) 30 segundos, c) 1 minuto, d) 2 minutos y e) 3 minutos de tratamiento	39
Figura 11: Comparación visual para el arroz Basmati: a) sin tratamiento, b) 30 segundos, c) 1 minuto, d) 2 minutos y e) 3 minutos de tratamiento	40
Figura 12: Comparación visual para el arroz parbolizado: a) sin tratamiento, b) 30 segundos, c) 1 minuto, d) 2 minutos y e) 3 minutos de tratamiento	41
Figura 13: Longitud de los arroces antes del tratamiento	42
Figura 14: Longitud de los arroces luego del tratamiento	42

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

Se han realizado recientemente varios estudios, en distintas partes del mundo, para determinar la cantidad de arsénico en arroz. Dichos estudios han emergido dada la contaminación mundial que existe por la actividad humana. El arsénico es un elemento tóxico, que existe en varias formas y se ha vinculado con la incidencia de cáncer en los consumidores (Nookabkaew *et al.*, 2013). La mayoría de los arroces consumidos en la Isla son productos importados y no fue hasta hace unos años atrás que el arroz comenzó a cultivarse y distribuirse en Puerto Rico. El arroz producido en la Isla es un producto que apenas comienza. Es por esto que es de vital importancia estudiar los arroces que se consumen en la Isla ya que la mayoría provienen de otros países. Por tal razón, en este proyecto, se desarrolló un método para determinar y reducir la cantidad de arsénico total en diferentes variedades de arroces obtenidos de manera comercial en Puerto Rico.

El arroz es uno de los alimentos principales en la dieta puertorriqueña, según se informó para el 17 de noviembre del 2013 en uno de los periódicos principales de la Isla (El Nuevo Día, 2013). La Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus sigla en inglés), en el más reciente estudio publicado para el 2012, sitúa al cáncer entre las primeras cuatro causas de muerte alrededor del mundo. Además, en sus datos estadísticos revelan que el cáncer, la segunda causa de muerte en el mundo, constituyó 8.2 millones de muertes o un 22% del total de muertes para ese año (WHO, 2012). En Puerto Rico se ha declarado el cáncer como la primera causa de muerte, según se establece en el más reciente informe del Departamento de Salud (Sánchez *et al.*, 2015). Dada la alta incidencia de muertes con cáncer en la Isla y el consumo elevado de arroz y la ocurrencia de cáncer en el consumidor, es de gran impacto social poder determinar la cantidad de arsénico que tienen los arroces que se consumen en Puerto Rico. No tan solo es importante determinar la cantidad de arsénico en algunos de los arroces que se consumen en la Isla, sino que también es importante desarrollar un método para poder reducir el arsénico total sin alterar las propiedades básicas o nutrientes esenciales del arroz.

CAPÍTULO II: REVISIÓN LITERARIA

A continuación se presenta un resumen de la revisión literaria realizada para dar base y fundamento a cada una de las partes del proyecto realizado. Los conceptos esenciales discutidos más adelante son: el arroz, arsénico, equipos utilizados, origen y selección de métodos.

2.1 El arroz: descripción, variedades, propiedades y nutrientes

La dieta puertorriqueña se basa mayormente en el consumo de arroz y/o de sus productos derivados. El arroz es un tipo de gramínea, es decir, es un tipo de hierba nativa del suroeste de Asia y es cultivada desde hace unos 7,000 años en terrenos calurosos (Encarta, 2005). Muchos de los arroces son cultivados por el método de inundación. Este método de cultivo es llevado a cabo en charcas, o terrenos de cultivo de arroz los cuales son inundados con agua para luego obtener el producto. Existen diferentes clasificaciones de arroz. Según se establece en el Codex Alimentarius, estas clasificaciones pueden ser arroz grano largo, grano mediano o grano corto (Codex Alimentarius, 1995). A su vez, los arroces pueden sub-dividirse en arroz integral, blanco, Basmati, Jazmín, parbolizado, entre otros. Las diferentes clases de arroces varían por sus cualidades, ya sea por su aroma, color, sabor, nutrientes, entre otras características (Sik *et al.*, 2008). Todos los arroces se componen de los mismos nutrientes, pero estos no están presentes en las mismas cantidades entre una clase y otra. Los nutrientes son: agua, carbohidratos, proteínas, lípidos, fibra, azúcares, vitaminas y minerales. El arroz integral es un producto poco procesado. Este, conserva su cáscara y el germen del trigo, por tanto, el arroz integral es considerado un arroz más nutritivo que los que han sido pulidos o procesados. Durante el proceso de pulido los arroces pierden sustancialmente muchos de los nutrientes presentes en el producto. Es por esto que, a menudo los arroces pulidos son fortificados o enriquecidos con diferentes nutrientes, para reponer aquellos nutrientes perdidos durante el proceso. Un ejemplo de arroces pulidos son el arroz blanco grano corto, mediano o largo. Los cuales componen mayormente de carbohidratos aunque en cantidades más bajas que el arroz integral. Por tal razón, el arroz es considerado una fuente rica de energía. Por ejemplo, para el arroz crudo integral grano largo está establecido que posee 76.25g

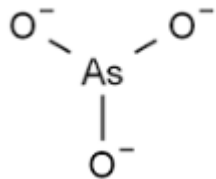
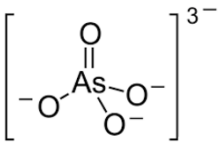
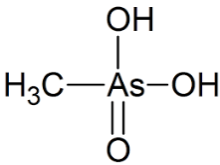
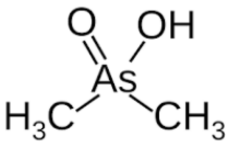
carbohidratos por cada 100g de muestra (USDA, 2016). Este valor constituye aproximadamente un 70% de su composición y el carbohidrato más comúnmente encontrado en el arroz es el almidón. Por consiguiente, este producto se compone en su mayoría de carbohidratos. El arroz, al tener una composición tan alta de carbohidratos y por su fácil preparación y acceso, puede ser utilizado comúnmente para abastecer al ser humano. Otros tipos de arroces pulidos son los arroces Jasmín o Basmati. Estos, a diferencia del arroz blanco, son aromáticos, es decir, son arroces que tienen un aroma propio. Estos aromas tienden a ser florales y se mantienen presentes en el producto aun después de procesados o incluso cocidos.

El arroz es un alimento seco, pero aun así tiene moléculas de agua, libres o disponibles en su interior, de la cual los microorganismos se aprovechan para alojarse y crecer causando deterioro. Esto se conoce como actividad de agua (a_w) en el alimento. Para el arroz está establecido que la actividad de agua es aproximadamente entre 0.600 y 0.500, por tanto, no hay proliferación bacteriana en dicho alimento, ya que por debajo de 0.600 las bacterias no pueden proliferarse (Beuchat, 1981). Es por esto que el arroz es catalogado un producto altamente estable y duradero.

2.2 El arsénico: elemento, formas existentes, infiltración, afección y niveles permisibles

El arsénico es un elemento tóxico el cual existe en forma orgánica e inorgánica (Nookabkaew *et al.*, 2013). Las formas de arsénico que se han encontrado en el arroz son: arsenito, arsenato, ácido monometilarsónico y ácido dimetilarsínico (Narukawa y Chiba, 2010).

Tabla 1: Nombre, fórmula y estructura de las diferentes formas de arsénico

Nombre	Arsenito [As(III)]	Arsenato [As(V)]	Ácido monometilarsónico (MMAA)	Ácido dimetilarsínico (DMAA)
Fórmula	AsO_3	AsO_4^{3-}	CH_3AsO_3	$\text{C}_2\text{H}_7\text{AsO}_2$
Estructura				

La especie más tóxica de todos es el arsenito [As(III)]. Las diferentes formas de arsénico pueden estar presentes en cualquier tipo de arroz. El arsénico puede llegar al arroz de diferentes fuentes, ya sea, del sistema de riego, pesticidas, deposición atmosférica, desperdicios desechados de manera inadecuada, entre otros (Azizur *et al.*, 2014). En efecto, se han realizado estudios basados solamente en el análisis del arsénico en el arroz y el agua de irrigación. Uno de estos experimentos fue llevado a cabo en un invernadero, en el cual se examinaba el efecto de aguas de irrigación contaminadas con arsénico en el crecimiento y cosecha del arroz, también se hizo especiación de arsénico (Abedin *et al.* 2002). Por tanto es importante reconocer todas las vías de contaminación con arsénico en el arroz y los tipos de arsénicos que se pueden encontrar en el mismo.

Además de conocer las vías de infiltración del arsénico en el arroz, también es importante saber dónde este se almacena dentro del arroz y los efectos que provoca al consumirlo, así como regulaciones y niveles permitidos para consumo humano. Algunos analistas se han dado a la tarea de hacer diferentes estudios relacionados al almacenaje del arsénico en el arroz y los efectos que estos causan. Entre los estudios realizados se ha encontrado que el arroz contiene cantidades significativas de almidón y que este varía según el tipo de arroz que se analiza. Además, se ha encontrado cierta relación entre el almidón y el arsénico presente en el arroz, ya que el arsénico se une a proteínas, formando moléculas que se almacenan dentro del gránulo de almidón (Narukawa y Chiba, 2010). Por otro lado, entre algunos de los experimentos que envuelven la especiación de arsénico en arroz se ha encontrado que, de todas las formas de arsénico, la más que predomina es el inorgánico. Esto se ha demostrado en estudios como el de Abedin y compañeros en el 2012, Azizur y compañeros en el 2014, entre otros. El arsénico inorgánico es el más tóxico de todos, y es el que se vincula con el cáncer en los humanos (Nookabkaew *et al.*, 2013). Entre la revisión de literatura, la mayoría de los estudios demuestran que el arsénico total está entre 10 y 400ppb. Se ha encontrado que del arsénico total presente en el arroz, un 86 – 99% es arsénico inorgánico (Azizur *et al.*, 2014). La Administración de Medicamentos y Alimentos, o FDA por sus siglas en inglés, ha realizado varios estudios con diferentes tipos de arroces para establecer los niveles máximos aceptables de arsénico inorgánico en arroces, los cuales son de 2.6 a 7.2mg/servicio para granos y de 0.1 a 6.6mg/servicio para subproductos de arroz (FDA, 2013). La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) junto a la WHO también han establecido límites para la ingesta de arsénico inorgánico de no más de 2.1ppb

según peso del cuerpo/día (JECFA, 2012). Otro límite establecido para arsénico inorgánico ha sido de no más de 15ppb según peso del cuerpo/semana (Kohlmeyer *et al.*, 2003). Hay estudios previos que demuestran que la cantidad de arsénico total en arroz va de 22 a 375ppb, mientras que para el arsénico inorgánico va de 13 a 232ppb (Nookabkaew *et al.*, 2013). En otros estudios para productos derivados de arroz, por ejemplo; cereales de arroz para bebés, se ha encontrado de 7 a 14ppb de arsénico total (Juskelis y Cappozzo, 2013). Las cantidades de arsénico pueden variar en los diferentes tipos de arroces y entre regiones (Narukawa y Chiba, 2010).

2.3 Equipos utilizados

Dado el problema emergente de contaminación y la ingesta elevada de arsénico a través del arroz, es importante poder determinar la cantidad de arsénico y evaluar un método de reducción del mismo en el alimento. El equipo más adecuado para llevar a cabo la determinación de dicho elemento es el “Inductive Coupled Plasma – Mass Spectrometry” (ICP-MS) usando digestión ácida asistida con microondas previo al análisis. La selección de digestión ácida asistida con microondas para la preparación de muestra se basa en el uso del método EPA 3052, el cual indica que se puede usar tal proceso para la detección de arsénico en matrices orgánicas (EPA, 1996). Por otro lado, el ICP – MS es seleccionado para llevar a cabo el experimento según se sugiere en el método de la EPA 200.8. El ICP-MS es un instrumento considerado fundamental para el análisis elemental dado su bajo límite de detección para una variedad de elementos, su alto grado de selectividad para gran variedad de elementos y su buena precisión y exactitud (Skoog *et al.*, 2007). Tal equipo tiene un detector cuadru-polo y un multiplicador de electrones, lo cual provoca una separación en razón masa-carga, asegurando así mayor selectividad.

Otros instrumentos importantes para llevar a cabo el experimento lo son el medidor de actividad de agua y horno de secado. AquaLab® es el instrumento más utilizado para medir la actividad de agua de los alimentos. Este instrumento mide la presión de vapor del alimento en relación a la presión de vapor de agua pura a la misma temperatura. El valor obtenido no tiene unidades y los valores van de 0 a 1, siendo 1 el valor de A_w para agua pura. De 1 a 0.600 es posible la proliferación bacteriana, mientras que por debajo de 0.600 no es posible este fenómeno. El AquaLab® utiliza estándares de calibración ofrecidos por la compañía. Los estándares vienen en diferentes cantidades de actividad de agua con el propósito de que el analista seleccione el más

adecuado para su experimento. En cuanto al horno de secado se debe utilizar un equipo que alcance temperaturas altas. De este modo el secado de muestra puede ser rápido y efectivo sin perjudicar la muestra.

2.4 Origen y selección de métodos

El procedimiento seleccionado para la determinación del arsénico en el arroz, según se mencionó en la sección anterior, es basado en los métodos EPA 200.8 y EPA 3052. Una vez se determine la cantidad de arsénico total, el objetivo es evaluar el método de hervido para reducir el arsénico sin perder las propiedades básicas o nutrientes esenciales del arroz. Dicho método tiene la limitación que solo puede medir el arsénico total y no provee información de las especies presentes. La especiación del arsénico es un procedimiento complicado que necesita el acoplamiento del ICP-MS a un sistema de separación y no está disponible actualmente en Puerto Rico. El tiempo del tratamiento de hervido puede variar de 30 segundos a 3 minutos para evaluar su efecto. Esta evaluación de hervido para la reducción se da en base a un estudio realizado en el cual se sugirió romper la estructura del almidón por medio de aplicación de calor para así poder detectar eficientemente el arsénico presente en el arroz (Narukawa y Chiba, 2010). Además de esta sugerencia, hay otros estudios que hablan de la solubilidad de especies de arsénico en agua. Un ejemplo de esto es el estudio de Magalhaes en el 2002, donde estudian diferentes especies de arsénico y la solubilidad de estos en agua. En el estudio se encontró que la especie más soluble es el arsenito. Es por tales hallazgos científicos que se determinó hacer el estudio que se les presenta.

No tan solo es importante demostrar una reducción efectiva del arsénico en el arroz, sino también validar el método utilizado. Esta es la razón por la cual es importante utilizar un Material Estándar de Referencia, o SRM por sus siglas en inglés, adecuado y así cubrir todas las bases del experimento. El material estándar de referencia más adecuado es el SRM-1568b del NIST® (National Institute of Standard and Technology). Este producto se obtiene comercialmente con un certificado de análisis. El SRM-1568b es una harina de arroz elaborada a partir de un lote de arroz de río 100% grano largo, cultivado en Arkansas. Dicho producto se obtiene en una botella que contiene aproximadamente 50g del material, la botella a su vez se obtiene de manera sellada en una bolsa aluminada. Según establecido por el certificado, el SRM-1568b contiene $0.285 \pm$

0.014mg/kg de arsénico total. Tal SRM fue utilizado para validar los análisis realizados durante el estudio.

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

3.1 Determinar y reducir el contenido de arsénico total en diferentes arroces

Los arroces obtenidos de manera comercial fueron seleccionados de modo tal que no se repitieran los números de lotes de cada tipo de arroz escogido para el análisis. Por ende, se obtuvieron arroces producidos en un mismo lugar pero con diferentes fechas y lotes de producción. Esto se hizo para observar el comportamiento de arsénico total entre un lote y otro. En total se obtuvieron tres lotes diferentes para cada tipo de arroz seleccionado para el estudio. Además, con el uso de un equipo ICP-MS se pudo detectar el contenido de arsénico total en el arroz antes y después del tratamiento para cada uno de los lotes. El tratamiento constó en pasar el arroz por un proceso de hervor para reducir el arsénico total del alimento. Una vez cuantificado el arsénico en el arroz, se procedió a realizar una comparación antes y después del tratamiento para determinar la efectividad del mismo y el por ciento de reducción de arsénico total en el producto.

3.2 Lavado de Equipos

Toda cristalería u otros utensilios de laboratorio fueron lavados con un procedimiento especial. Primero, se lavaron los utensilios con una solución sobresaturada de Alconox[®] y agua destilada. Seguido por un enjuague con agua corriente y tres enjuagues consecutivos de agua destilada. Luego de un secado parcial, los utensilios fueron sumergidos en ácido nítrico al 10% por un período de 12h o más, en envases de cristal apropiado. Por razones de seguridad, el reposo de 12h se realizó bajo un extractor de gases y los envases fueron sellados con parafina. Luego del período de reposo se realizó un enjuague final con agua destilada tres veces consecutivas, seguido de tres enjuagues sucesivos con agua de-ionizada. Este lavado fue una modificación del proceso de lavado del Método 200.8 de la EPA de la revisión 5.4 del 1994. El lavado mencionado en el método señalado anteriormente sugiere que el mismo debe hacerse con una solución de ácido nítrico al 20% en inmersión por 4 horas o más en lugar de hacerse al 10% de ácido nítrico e inmersión por 12 horas o más. Otro cambio realizado al lavado sugerido fue el enjuague luego de la inmersión en ácido nítrico. Se hizo un enjuague con agua destilada, seguido de agua de-ionizada

en lugar de utilizar agua específica para lavado. Dicho lavado utilizado aseguró que no hubiese contaminación con arsénico a niveles trazas que pudiesen interferir con el análisis. Además, tal lavado ha sido utilizado múltiples veces, demostrando una y otra vez 0% de contaminación.

3.3 Digestión ácida asistida con horno microondas

Para la digestión se siguió el método establecido en diciembre de 1996, EPA 3052. Este es un método de digestión ácida asistida con horno microondas para matrices basadas en compuestos silíceos u orgánicos. La digestión ácida se hizo en un horno microondas Mars 5 con envases Mars X-Press. Estos son contruidos con teflón y son tubos apropiados para digestión ácida. Se pesaron 0.5g de muestra, seguido de la adición de 10mL de ácido nítrico de calidad para el análisis de metales a nivel trazas al 65-70%. Las condiciones del microondas se ajustaron a una temperatura de 180° C, con una rampa de temperatura de 5.5 minutos, tiempo de corrida de 9.5 minutos y un potencial de trabajo de 1600W para 6 tubos o más. Las muestras se dejaron reposar durante 10 minutos o hasta que el microondas llegó a temperatura ambiente para evitar salpicaduras, pérdida de muestra o quemaduras.

3.4 Preparación de muestras para determinación de la cantidad de arsénico

Todas las muestras fueron preparadas utilizando agua de-ionizada.

En primer lugar se preparó una curva de calibración a partir de una solución intermedia de 5ppm de arsénico. La solución intermedia fue preparada, a su vez de una solución multi-elemental 2A 10µg/mL As en 5% HNO₃ de Spex CertiPrep®. Para ello se utilizaron tubos plásticos con tapa pequeños o tubos de centrifuga. Las soluciones para la curva de calibración variaron entre 0 y 15ppb de arsénico. Una curva de calibración debe contener por lo menos 5 puntos para obtener datos confiables. Se preparó un blanco conteniendo agua de-ionizada y ácido nítrico para control de experimento.

Las muestras a analizar y los controles de experimento se diluyeron al 5% de ácido nítrico para asegurar que el arsénico permanecía en solución. Para preparar las muestras de arroz y los

controles de experimento, se tomó 1mL de la muestra digerida y se transfirió a un envase de plástico con tapa o tubo de centrífuga. Finalmente se completó al volumen deseado (20mL) para llevar muestras al 5% de ácido nítrico. El mismo proceso fue repetido para cada una de las muestras y controles utilizados durante el experimento.

Para validar el método se utilizó el material de referencia estándar SRM-1568b de NIST[®]. Esta muestra se preparó siguiendo el mismo método de digestión y preparación de muestra que se realizó con cada una de las muestras de arroz.

3.5 Uso de “Inductive Coupled Plasma-Mass Spectrometry”- (ICP-MS) para la detección y cuantificación de arsénico total

A través del uso de un ICP-MS Agilent[®] 7500 se analizaron los estándares, las muestras, los controles y el SRM de acuerdo al método EPA 200.8. Para llevar a cabo el proceso se utilizó gas de argón Linde[®] y helio, Linde[®], como gas de colisión. Luego de cada 10 muestras estudiadas se analizó el SRM como control de calidad y validación del método.

3.6 Evaluación de un método de hervido en agua para la reducción del arsénico total en el arroz

El método desarrollado para la reducción del arsénico total en el alimento fue hervir el arroz entre 30 segundos y 3 minutos. Se escogió una temperatura de 100° C, ya que esta es la temperatura a la que hierve el agua y se mantiene constante una vez comienza el proceso de hervor. Luego se hizo un enjuague con agua regular y secado en horno a aproximadamente 395° F entre 30 min a 2 horas. Las muestras de arroz luego fueron sometidas al mismo proceso de digestión y preparación para finalmente ser analizadas y determinar la efectividad del método.

3.7 Análisis de pérdida de propiedades

Es importante mantener las propiedades básicas o nutrientes esenciales en el arroz para que el consumidor siga obteniendo el producto con la calidad esperada. Para ello se evaluó el arroz, bajo comparación antes y después del tratamiento. Las muestras se compararon utilizando fotografías de alta magnificación y una regla capaz de medir en centímetros para determinar la longitud de los granos antes y después del tratamiento aplicado. Además se hizo la comparación de la actividad de agua presente en alimento antes y después del tratamiento aplicado. Para esto se utilizó el AquaLab® y los estándares de referencia ofrecidos por la misma compañía.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados y discusión obtenidos para cada una de las partes del experimento se expresan en este capítulo. El procedimiento experimental fue dividido en tres partes principales, las cuales permiten analizar e interpretar mejor los resultados obtenidos. Dichas partes se agrupan en determinación de arsénico total en arroz pre-tratamiento, determinación de arsénico en arroz post-tratamiento y finalmente, pero no menos importante, comparación de propiedades pre y post-tratamiento.

4.1 Determinación de arsénico pre-tratamiento en diferentes muestras de arroz comercial

Para poder determinar si efectivamente se redujo la cantidad de arsénico en diferentes muestras de arroz comercial es necesario determinar la cantidad inicial de arsénico en cada muestra. Entre los resultados se encontró que, el arroz obtenido de manera comercial en Puerto Rico contiene niveles de arsénico total. Por otra parte, para el arroz cultivado en Puerto Rico no se encontró niveles detectables de arsénico total. Por tanto, los resultados presentados más adelante son solamente para aquellas muestras de arroz a las que se le pudo aplicar el tratamiento desarrollado, ya que contenían arsénico total.

La **Figura 1** es una representación de la cantidad promedio de μg de As/kg de arroz que se encuentra en cada uno de los tipos de arroces para cada lote analizado. Los valores obtenidos están aproximadamente entre 30 y 310 μg de As/kg de arroz. De manera general se observa que los arroces, integral y parbolizado son los que más contienen arsénico total, seguido por los arroces pulidos grano largo y mediano, seguido finalmente de arroces como Basmati y el Jazmín.

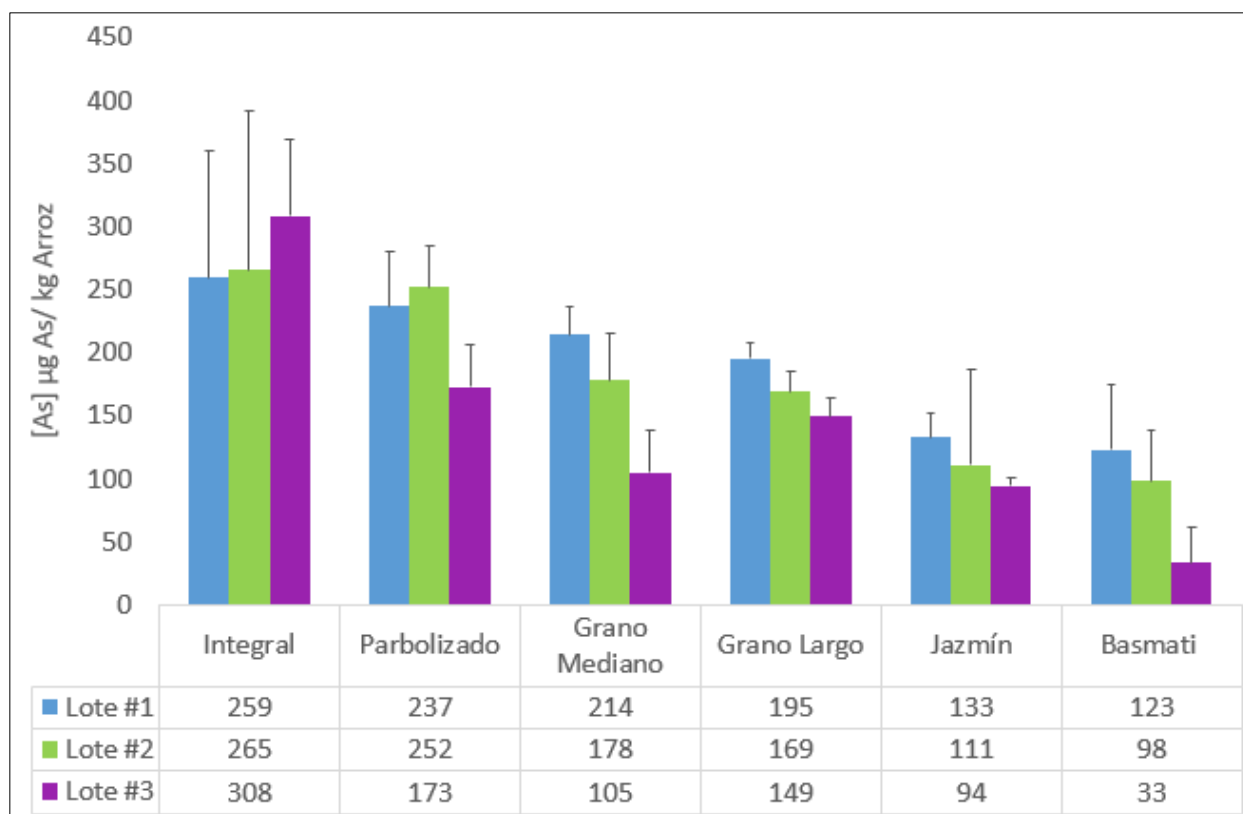


Figura 1: Concentración de As total en diferentes variedades de arroz para 3 lotes estudiados

Para el primer lote, en el arroz integral se encontró que el arsénico total está presente en 259 ± 101 ppb. En el arroz parbolizado se encontró que el mismo tiene en promedio 237 ± 43 ppb de arsénico total. Para el arroz tipo grano mediano se halló que el arsénico tiene un valor promedio de 214 ± 23 ppb, mientras que en el arroz grano largo se obtuvo 195 ± 12 ppb de arsénico total en las muestras. En arroces como el Jazmín y el Basmati se obtuvo un promedio de 133 ± 19 ppb y 123 ± 52 ppb de arsénico respectivamente. Así que, ordenando los tipos de arroces de manera descendente, en cuanto a la cantidad de arsénico presente, se obtiene que el arroz integral tiene más arsénico, seguido de arroz parbolizado, arroz grano mediano, arroz grano largo, Jazmín y Basmati. La **Figura 1** también muestra la desviación estándar para cada tipo de arroz. La desviación estándar es la cuantificación del grado de dispersión en una medida (Yu et al., 2016). Es decir, es una representación de cuán cerca o alejada está una muestra con respecto al promedio. Estos valores típicamente deben ser lo más cercano a cero posible, pero este fenómeno no se observa con frecuencia a través del experimento. Esto se debe a que las muestras analizadas contenían cantidades variantes de arsénico, que dependen del origen y contaminación del medio

en el cual se cultivaron. Las muestras analizadas no tenían el mismo lugar de procedencia o eran mezclas de diferentes lugares de procedencia a pesar que se analizaba el mismo tipo de arroz. Esto introduce variabilidad en los datos obtenidos. Aun así, esto no es un factor limitante para demostrar el objetivo del experimento; reducir la cantidad de arsénico en el arroz luego de aplicar el tratamiento.

Para corroborar lo obtenido en el primer bloque de muestras se analizaron dos bloques o lotes adicionales. Esto permite poder hacer una comparación efectiva entre los resultados. Para el segundo y tercer lote de muestras también se obtuvo presencia de arsénico total y los resultados son reportados en la **Figura 1**, con sus respectivas barras de error. Los resultados son muy similares en comparación con los datos del lote 1. El orden descendente de la cantidad de arsénico total en el lote 2 es el mismo que para el primer lote; arroz integral, seguido de arroz parbolizado, arroz grano mediano, arroz grano largo, Jazmín y Basmati. Las cantidades presentes de arsénico total en las muestras de arroces varían un poco en comparación con las del primer lote. Por último, para el tercer lote los datos cambian un poco ya que para estas muestras el orden descendente de la cantidad de arsénico total es: arroz integral, arroz parbolizado, arroz grano largo, arroz grano mediano, Jazmín y Basmati. En este caso solo se intercambian de posición los arroces grano largo y grano mediano. Los valores entre un lote y otro cambian, pero aun así son parecidos entre sí.

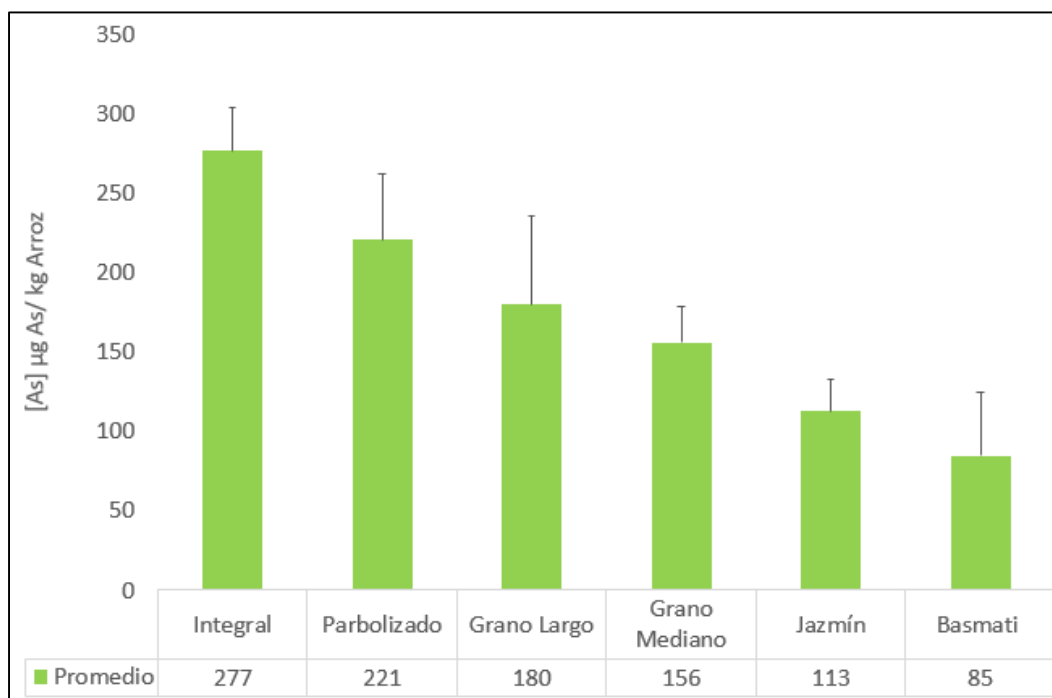


Figura 2: Resultados obtenidos en promedio para la cantidad de arsénico total en las muestras de arroz original para los 3 lotes

La **Figura 2** muestra los resultados obtenidos en promedio para los tres lotes. Esta es una comparación entre los tres lotes estudiados. Se puede observar que el orden descendente de las muestras es: arroz integral, parbolizado, grano largo, grano mediano, Jazmín y Basmati. Este orden se había observado anteriormente y aun así siguen predominando los arroces integral y parbolizado como los que tienen mayor cantidad de arsénico total. Los arroces grano largo y mediano son igualmente tratados y procesados, por lo que las cantidades en estos varían de acuerdo al lugar de procedencia. Es por esto que muy continuamente estos dos tipos de arroces son intercambiados de posición.

Por último se analizó el material estándar de referencia, SRM-1568b de NIST[®], para validar el trabajo realizado.

Tabla 2: Resultados obtenidos para la cantidad de arsénico total en SRM-1568b de NIST[®]

Lote	Muestra	n*	Promedio ($\mu\text{g As/kg Arroz}$) (ppb)	Promedio (mg As/kg Arroz) (ppm)	Desv. Est.*	CV*
#1	SRM	5	285	0.285	8	2.8
#2		5	294	0.294	12	4.1
#3		5	290	0.290	5	1.7

*n = número de muestras analizadas, Desv. Est. = Desviación Estándar, CV = Coeficiente de Variación

La **Tabla 2** presenta los resultados obtenidos para el control y validación de los análisis de arsénico en la primera parte del experimento, para las muestras del SRM. Según el certificado del SRM-1568b de NIST[®], la cantidad de arsénico total reportada es $0.285 \pm 0.014 \text{mg As/kg}$ de arroz. Por tal razón los valores obtenidos se consideran como aceptables ya que caen en el rango específico dado por el NIST (National Institute of Standard and Technology). Los valores promedio obtenidos para las muestras de SRM fueron 0.285, 0.294 y 0.290mg As/kg de arroz para los lotes 1, 2 y 3 respectivamente. A su vez se observa que cada valor promedio es considerado aceptable dado que el coeficiente de variación es menor de 5% para cada grupo de muestras, según expresado en el libro de “*Food Analysis*” (Nielsen, 2010).

Según los estudios antes mencionados, la especie de arsénico que más frecuentemente se encuentra en el arroz, cuando se hace especiación, es el arsenito. Por tanto, a pesar no haberse

realizado especiación para el estudio presentado, se entiende que la mayor parte del arsénico total en el arroz está compuesta por arsenito.

4.2 Determinación de arsénico post tratamiento en diferentes muestras de arroz comercial

La reducción de arsénico en el arroz es vital para disminuir la incidencia de cáncer entre las poblaciones de alta ingesta de dicho alimento. Las siguientes tablas muestran los resultados obtenidos para las muestras de arroz comercial luego de ser tratadas. De igual manera que para la primera parte, se analizaron tres lotes de muestras. Además, para el análisis, se utilizaron las muestras con concentraciones más altas en cada lote y para cada tipo de arroz.

Tabla 3: Datos obtenidos para las muestras del Lote #1 luego del tratamiento

Tiempo/ Muestra	Grano Mediano	Grano Largo	Integral	Jazmín	Basmati	Parbolizado
0 s	248	203	330	146	123	286
30 s	115	120	147	57	52	171
1 min	84	109	282	61	56	124
2 min	67	83	283	5	4	93
3 min	84	52	281	13	89	126

*Las concentraciones promedio de arsénico son expresadas en ($\mu\text{g As/kg Arroz}$)

La **Tabla 3** muestra los promedios obtenidos para la cantidad de arsénico total a tiempo cero y a diferentes tiempos luego de la aplicación del tratamiento, en cada tipo de arroz analizado. No se observa un patrón predecible a medida que aumenta el tiempo de hervido en agua para las muestras analizadas. Por otro lado, sí se puede observar que entre un tiempo y otro hay variación en la cantidad de arsénico presente en el arroz. Esto muestra que en efecto hay cierta reducción en la cantidad de arsénico presente, pero no se puede establecer una relación inversamente proporcional entre el tiempo de hervido y la cantidad de arsénico. El hecho de no observar un patrón predecible a medida que se aumenta el tiempo de hervido o tratamiento al arroz puede deberse a re-adsorción de arsénico en el arroz. Este fenómeno es simplemente que el arsénico removido se adhiere a la superficie del grano nuevamente. Como se mencionó anteriormente, el arsénico se encuentra dentro del gránulo de almidón. Una vez el arroz se calienta el almidón sale del arroz pero no entra nuevamente al arroz, por lo que se adhiere a su superficie. El arsénico se comporta de igual manera ya que este se contiene dentro del almidón. Otra causa de no observar un patrón de disminución de arsénico se puede deber a la estructura interna del arroz y como esta

se afecta durante el tratamiento. Este caso se explicará más adelante en la sección 4.3 del Capítulo 4.

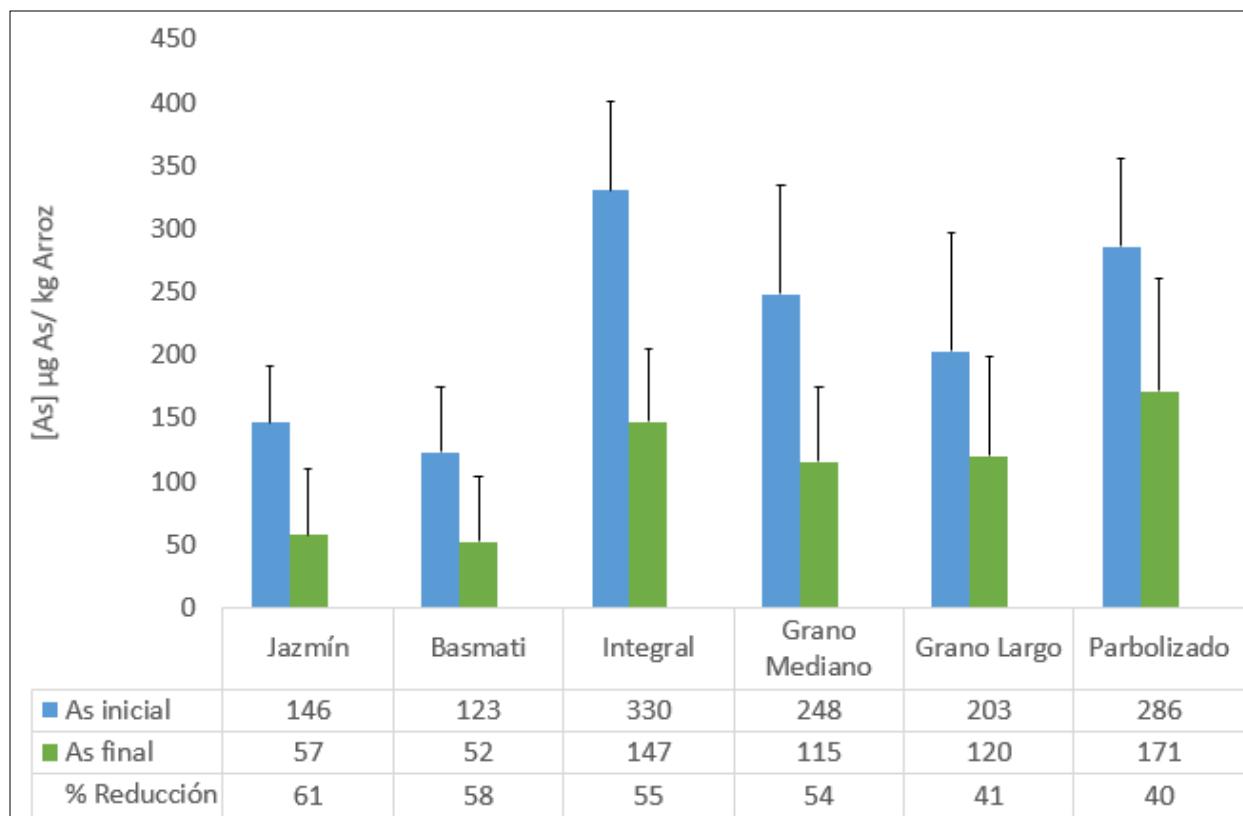


Figura 3: Comparación de la cantidad de arsénico total en diferentes variedades de arroz, antes y después del tratamiento, y el % de reducción para las muestras del lote #1

Dada la situación de re-adsorción de arsénico total en el arroz, solo se tomaron los datos de los primeros 30 segundos de tratamiento para establecer una comparación clara de los resultados. En la **Figura 3** se presenta la cantidad o concentración inicial de arsénico total en el arroz y la concentración final de arsénico total para el arroz en los primeros 30 segundos de tratamiento. Se observa que, para cada uno de los tipos de arroces, en efecto hay una reducción de un 40 a un 61% de arsénico luego del tratamiento aplicado. No todas las muestras tienen el mismo porcentaje de reducción, pues eso depende del tipo de arroz analizado. Arroces como el parbolizado, que son procesados de manera especial, muestran menos reducción que los demás arroces pulidos. Los arroces pulidos que muestran un por ciento de reducción mayor son aquellos que inicialmente contenían menos arsénico que los demás. Esto no significa que todas las muestras en todos los

lotes se comportarán de igual manera dado que hay ciertos factores adicionales que pueden influir en la reducción efectiva o negativa del arsénico en el arroz. Algunos de estos factores pueden ser: el enjuague del arroz con agua regular luego del tratamiento, cambio de la estructura interna del grano de arroz durante el tratamiento o re-adsorción del arsénico durante el tratamiento. Por esto es que se deben validar los resultados obtenidos con parámetros de control.

Tabla 4: Datos obtenidos para validación del Lote #1

Muestra	n*	Promedio ($\mu\text{g As/kg}$ muestra)	Desv. Est.*	CV (%)*
H ₂ O R*	3	0	0	-
H ₂ O DI*	3	0	0	-
HNO ₃ *	3	0	0	-
SRM	7	284	13	4.5

n = número de muestras analizadas, Desv. Est. = Desviación Estándar, CV = Coeficiente de Variación, H₂O R = Agua regular, H₂O DI* = Agua de-ionizada, HNO₃* = Ácido nítrico

Para validar que el experimento es efectivo, se utilizaron ciertos parámetros de control. Tales parámetros son: el análisis de agua regular, el agua de-ionizada, ácido nítrico y el material estándar de referencia. Sus valores se presentan en la **Tabla 4**. Se escogieron estos parámetros como control para verificar que no alteran los valores obtenidos para el arsénico en cada una de las muestras, debido a que con estas sustancias se prepararon, enjuagaron muestras o simplemente se verificó que el equipo estuviese funcionando de manera correcta y haciendo las medidas de manera reproducible. El agua regular se utilizó para el enjuague del arroz luego del tratamiento y no se obtuvo valores cuantificables o detectables para arsénico en dicha muestra. Esto muestra que el agua regular no introduce arsénico a la muestra de estudio. Para el agua de-ionizada y el ácido nítrico, que se utilizaron para preparar las muestras del análisis, tampoco se pudo cuantificar o detectar una cantidad sustancial de arsénico. Así que, dichas sustancias no introducen arsénico en la muestra de estudio. El material estándar de referencia solo se utilizó para determinar que los valores obtenidos por el equipo estaban siendo repetitivos o reproducibles ya que en el certificado del SRM-1568b de NIST[®], la cantidad de arsénico total reportada es $0.285 \pm 0.014\text{mg As/kg}$ de arroz. Los datos para el SRM se reportan en promedio como $284\mu\text{g As/kg}$ arroz. Llevando este número a las unidades dadas en el certificado del SRM-1568b de NIST[®], se obtiene 0.284mg As/kg de arroz. Por tanto los valores del SRM son aceptables y su coeficiente de variación (4.5%) no

sobrepasa el 5%. De modo que, para el Lote #1, los datos obtenidos son aceptables, esto se debe a que las sustancias utilizadas no introducen cantidades significativas de arsénico y el equipo estuvo en buen funcionamiento constante.

Tabla 5: Datos obtenidos para las muestras del Lote #2 luego del tratamiento

Tiempo/ Muestra	Grano Mediano	Grano Largo	Integral	Jazmín	Basmati	Parabolizado
0 s	214	180	355	91	98	289
30 s	63	167	232	78	61	144
1 min	120	78	270	53	31	139
2 min	117	109	322	28	23	84
3 min	152	80	278	33	36	134

*Las concentraciones promedio de arsénico son expresadas en ($\mu\text{g As/kg Arroz}$)

La **Tabla 5**, al igual que la **Tabla 3**, muestra los promedios obtenidos para la cantidad de arsénico a tiempo cero y a diferentes tiempos luego de la aplicación del tratamiento, en cada tipo de arroz analizado, para el Lote #2. En este caso tampoco se observa un patrón inversamente proporcional entre el tiempo de tratamiento y la cantidad de arsénico. En comparación con el primer lote, los valores obtenidos para el segundo lote difieren, pero aun así se observa que hay disminución en la cantidad de arsénico total entre un tiempo y otro para cada muestra analizada. Por consiguiente, se puede decir que hay cierta reducción en la cantidad de arsénico presente, lo cual se puede observar más claramente en la **Figura 4**.

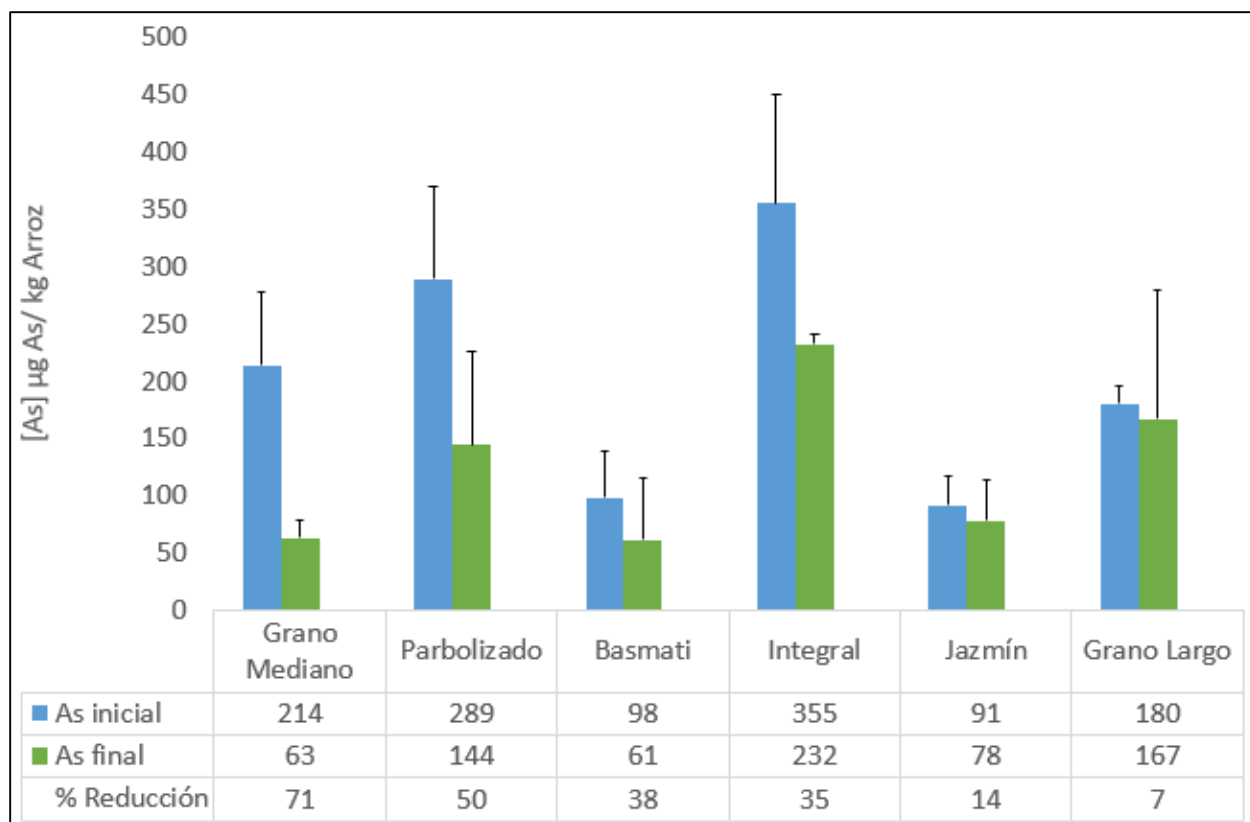


Figura 4: Comparación de la cantidad de arsénico total en diferentes variedades de arroz, antes y después del tratamiento, y el % de reducción para las muestras del lote #2

En la **Figura 4** se presenta la concentración inicial de arsénico total en el arroz y la concentración final de arsénico total para el arroz en los primeros 30 segundos de tratamiento para el Lote #2. Para este lote se observa una reducción de arsénico entre 7 y 71 % luego de aplicar el hervido por 30 segundos. En esta ocasión los por cientos de reducción también son diferentes entre una muestra y otra, pero no son iguales que para el primer lote. El arroz grano mediano es el que presenta una mejor reducción de arsénico, seguido por el arroz parbolizado, Basmati, integral, Jazmín y finalmente el arroz grano largo, pero no hay una tendencia de reducción en los diferentes tipos de arroces estudiados en comparación con el Lote #1. A pesar de eso, para las muestras de arroz grano mediano y parbolizado se muestran mejores por cientos de reducción de arsénico que para el primer lote. Un detalle a recalcar es que se debe ser consistente con el enjuague luego de la aplicación del tratamiento. Por lo que, es importante siempre hacer el enjuague la misma cantidad de tiempo y asegurarse que el agua recorra por toda la superficie del grano. Esto reduce la probabilidad que el agua de hervido se quede adherida a la superficie del grano y altere los

resultados. Para validar los resultados obtenidos también se hizo un estudio de control, presentado en la siguiente tabla.

Tabla 6: Datos obtenidos para validación del Lote #2

Muestra	n *	Promedio ($\mu\text{g As/kg}$ muestra)	Desv. Est.*	CV (%) *
H ₂ O R *	3	0	0	-
H ₂ O DI*	3	0	0	-
HNO ₃ *	3	0	0	-
SRM	7	298	15	4.9

n = número de muestras analizadas, Desv. Est. = Desviación Estándar, CV = Coeficiente de Variación, H₂O R = Agua regular, H₂O DI* = Agua de-ionizada, HNO₃* = Ácido nítrico

En la **Tabla 6** se muestran los parámetros de control para verificar que los valores obtenidos para el Lote #2 son aceptables. Para el agua regular, el agua de-ionizada y el ácido nítrico no se obtuvieron valores cuantificables o detectables para arsénico, por lo que se entiende que dichas sustancias no alteraron los valores obtenidos. En cuanto al material estándar de referencia se obtuvo 298 $\mu\text{g As/kg}$ arroz. Según las unidades apropiadas en el certificado del SRM-1568b de NIST[®], la cantidad de arsénico debe ser reportada como 0.298mg As/kg de arroz. Por tanto los valores obtenidos son aceptables ya que no se excede de la incertidumbre reportada como aceptable para el SRM. El coeficiente de variación está cerca, pero no pasa del 5%, el valor obtenido fue 4.9 %, por tanto, para el Lote #2 los datos obtenidos son considerados aceptables. Las sustancias utilizadas no introducen cantidades significativas o cuantificables de arsénico a las muestras y el equipo tuvo un buen funcionamiento constante.

Tabla 7: Datos obtenidos para las muestras del Lote #3 luego del tratamiento

Tiempo/ Muestra	Grano Mediano	Grano Largo	Integral	Jazmín	Basmati	Parbolizado
0 s	143	159	351	101	33	208
30 s	102	158	58	28	8	194
1 min	94	127	279	80	0	179
2 min	121	159	321	68	22	176
3 min	119	147	309	84	4	178

*Las concentraciones promedio de arsénico son expresadas en ($\mu\text{g As/kg}$ Arroz)

La **Tabla 7** muestra los promedios obtenidos para la cantidad de arsénico en el Lote #3, a tiempo cero y a diferentes tiempos luego de la aplicación del tratamiento para cada uno de los tipos de arroz analizado. Es evidente que no se puede establecer una relación inversamente proporcional en este caso nuevamente. Por tanto, el tratamiento no mantiene una relación predecible entre el tiempo de hervido y la reducción de arsénico, pero si se puede demostrar que hay cierta reducción en la concentración de arsénico. En uno de los casos, para el arroz Basmati a un minuto, no fue posible cuantificar la cantidad de arsénico en esa muestra. Esto significa que al menos para una de las muestras se logró reducir sustancialmente el arsénico del arroz. El arroz parbolizado es el único que muestra una reducción gradual a medida que se aumenta el tiempo de hervido. Se observa también, que para el mismo arroz, la reducción de arsénico en los lapsos de 1 a 3 minutos, no es tan significativa. Esto sería un comportamiento ideal esperado para todas las muestras analizadas, pero no fue así. Esto puede deberse a los diferentes factores antes mencionados como el cambio de la estructura interna del grano o re-adsorción de arsénico total.

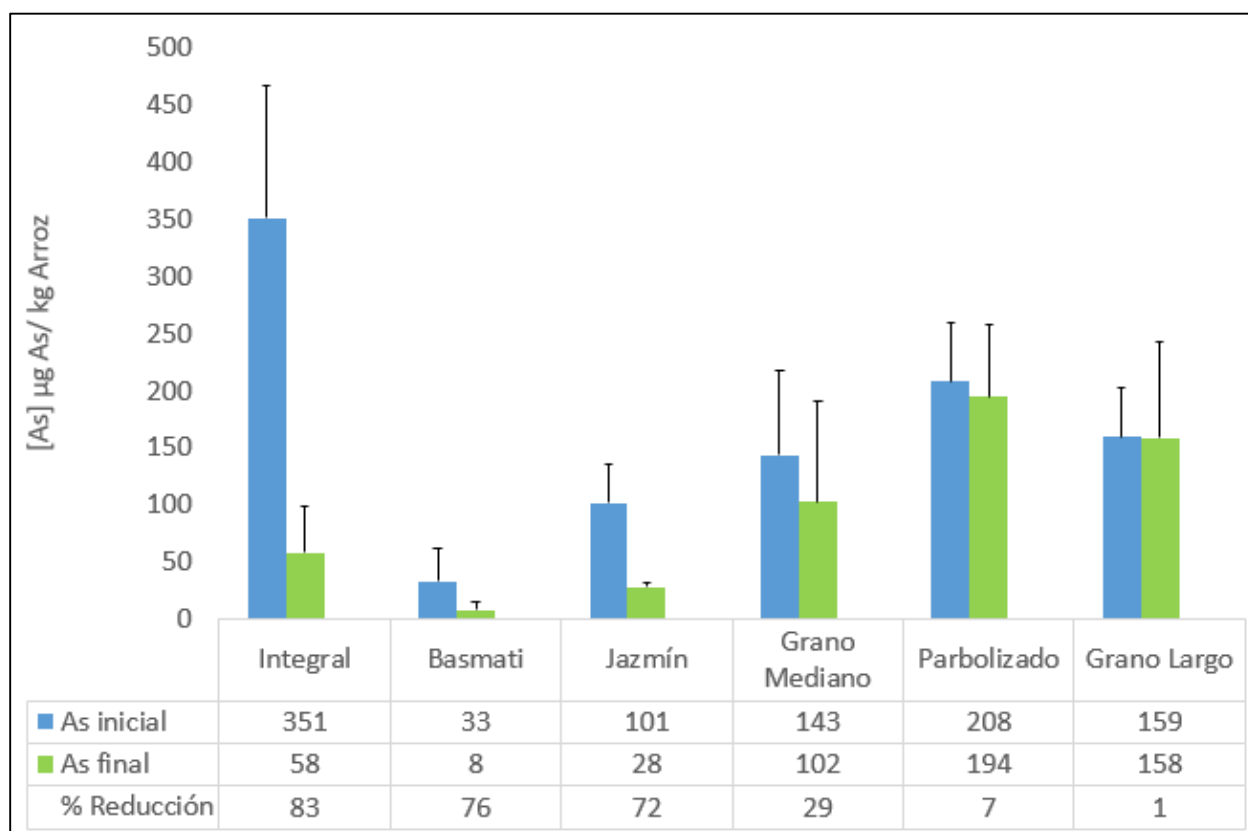


Figura 5: Comparación de la cantidad de arsénico total en diferentes variedades de arroz, antes y después del tratamiento, y el % de reducción para las muestras del lote #3

La **Figura 5** presenta la concentración inicial de arsénico total en el arroz y la concentración final de arsénico total para el arroz en los primeros 30 segundos de tratamiento. Para este lote se observa un por ciento de reducción de entre 1 y 83%. El orden descendente de reducción es diferente en cada uno de los lotes. En este caso el orden descendente de reducción es integral, Basmati, Jazmín, grano mediano, parbolizado y por último el arroz grano largo. No hay ninguna predicción en los por cientos de reducción, por tanto cada una de las muestras actúa de manera individual y su reducción no es reproducible. Sí se logra hacer una reducción, pero no se puede establecer claramente un patrón.

Tabla 8: Datos obtenidos para validación del Lote #3

Muestra	n*	Promedio ($\mu\text{g As/kg}$ muestra)	Desv. Est.*	CV (%)*
H ₂ O R*	3	0	0	-
H ₂ O DI*	3	0	0	-
HNO ₃ *	3	0	0	-
SRM	7	279	12	4.4

n = número de muestras analizadas, Desv. Est. = Desviación Estándar, CV = Coeficiente de Variación, H₂O R = Agua regular, H₂O DI* = Agua de-ionizada, HNO₃* = Ácido nítrico

Para demostrar que los valores obtenidos, para las muestras del Lote #3, son aceptables se hicieron las pruebas de control, cuyos resultado están presentados en la **Tabla 8**. En el agua regular no se pudo cuantificar o detectar cantidades significativas de arsénico total, por lo que se puede decir que el agua utilizada no contenía el arsénico suficiente como para alterar la concentración del elemento de estudio en las muestras analizadas. Lo mismo ocurrió con el agua de-ionizada y con el ácido nítrico, no se pudo cuantificar o detectar cantidades significativas de arsénico total que afectaran los valores obtenidos en las muestras. Para el material estándar de referencia se obtuvo en promedio 279 $\mu\text{g As/kg}$ arroz, lo que es el equivalente a representarlo como 0.279mg As/kg de arroz según las unidades del certificado del SRM-1568b de NIST®. Este valor obtenido se determina como aceptable, ya que la cantidad de arsénico total reportada en dicho certificado es $0.285 \pm 0.014\text{mg As/kg}$ de arroz y el valor obtenido (0.279mg As/kg de arroz) cae dentro de estas especificaciones. El coeficiente de variación en este caso es de 4.4% lo que es menor que 5%, por tanto, también demuestra que los valores son aceptables.

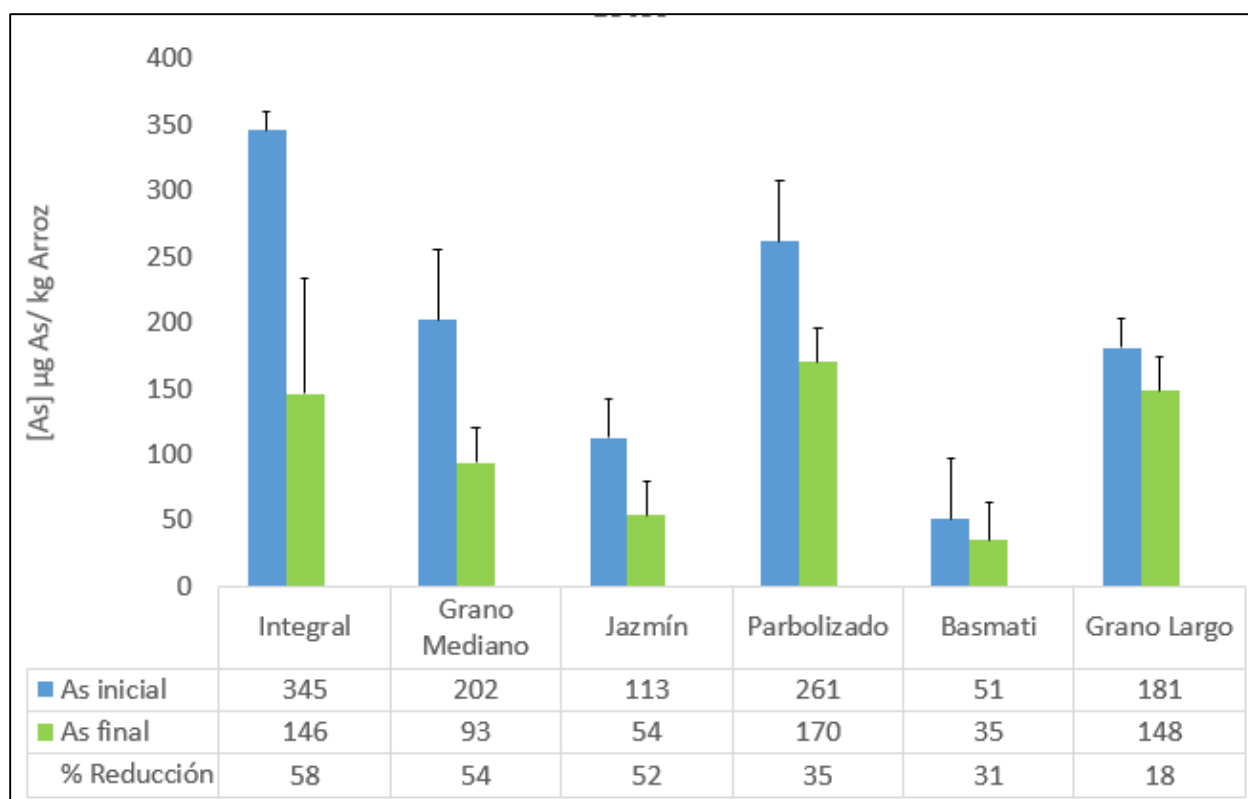


Figura 6: Comparación de la cantidad promedio de arsénico total en diferentes variedades de arroz, antes y después del tratamiento, y el % de reducción para los tres lotes

La **Figura 6** es un resumen de lo obtenido para los tres lotes. En esta figura se puede observar que en general hubo una reducción de 18 a 58%. Los valores obtenidos son diferentes que los de los lotes individuales, pero esto se debe a que las muestras analizadas proceden de diferentes lugares y las cantidades de arsénico en cada uno de ellos es diferente. Dada la alta afinidad de las diferentes especies de arsénico por el agua, es posible remover dichas cantidades de arsénico total. A pesar de no haber hecho especiación, se entiende que la especie mayormente removida es el arsenito, dado que esta es la especie con mayor afinidad por el agua. Tal fenómeno es de gran importancia para el experimento, ya que esta es la especie más tóxica y la que se vincula con el cáncer. Por consiguiente, esta es la especie que se pretende remover en mayor cantidad. Otro factor para explicar la remoción del arsénico es la solvatación. La solvatación es simplemente la unión entre un soluto y un disolvente. En este caso el soluto es la especie de arsénico y el disolvente es agua. El arsenito tiene más terminales activos para reaccionar con las moléculas de agua, que las demás especies existentes. Esto hace que se forme una disolución con enlaces de hidrógeno donde el oxígeno de arsenito tiene carga parcial negativa y el hidrógeno de la molécula

de agua tiene carga parcial positiva. Es por esto que se entiende, entonces, que la especie mayormente removida es el arsenito.

4.3 Comparación de propiedades pre y post tratamiento en diferentes muestras de arroz comercial

Una parte importante, del experimento llevado a cabo, es también el estudio de propiedades como la actividad de agua o la comparación antes y después de la aplicación del tratamiento. En esta sección se presentan los datos obtenidos para la actividad de agua de las muestras pre y post-tratamiento. Es importante recalcar que el arroz fue secado, luego del tratamiento, a temperaturas altas (395° F) solo para propósito de análisis. Al usar temperaturas altas para el secado de arroz, luego del tratamiento, se reducía la exposición del producto al calor, es decir, el tiempo del secado era menor utilizando temperaturas altas. El arroz debía estar totalmente seco para poder estudiarlo. Por otra parte, se presentan imágenes y medidas de cada uno de los tipos de arroces estudiados antes y después del tratamiento.

Tabla 9: Resultados obtenidos para la actividad de agua de las muestras para el Lote #1 sin tratamiento

Muestra	n*	Temperatura Promedio °C	A _w Promedio	Desv. Est.*	CV*
Grano Mediano	3	24.98	0.5747	0.0014	0.2
Grano Largo	3	24.99	0.5804	0.0011	0.2
Integral	3	25.02	0.6458	0.0010	0.2
Jazmín	3	25.01	0.6418	0.0014	0.2
Basmati	3	24.94	0.6242	0.0012	0.2
Parbolizado	3	25.05	0.4721	0.0023	0.5

*n = número de muestras analizadas, Desv. Est. = Desviación Estándar, CV = Coeficiente de Variación

Anteriormente se había mencionado que la actividad de agua en el arroz debe ser aproximadamente entre 0.600 y 0.500 (Beuchat, 1981). Por lo que es de esperarse que, para las muestras sin tratamiento, los valores obtenidos estén dentro de tal rango. En la **Tabla 9** se puede observar que los valores obtenidos para las muestras caen dentro del rango mencionado, con excepción del arroz parbolizado. El arroz parbolizado cae por debajo del rango. Esto puede deberse a exposición prolongada al ambiente durante el manejo de muestra, a causa del envasado incorrecto

desde el lugar de procedencia o daño al empaque de arroz en la cadena de manufacturero a consumidor. Este factor no afecta la muestra como tal, pues por debajo de 0.600 de actividad de agua no hay proliferación bacteriana, por tanto, estos valores pueden ser tomados como aceptables. El coeficiente de variabilidad es menor del 5% para cada una de las muestras, por lo que también se aceptan los valores obtenidos. Colocando las muestras en orden ascendente según su actividad de agua se obtiene lo siguiente: parbolizado, grano mediano, grano largo, Basmati, Jazmín e integral. Es importante denotar la temperatura a la cual las medidas fueron hechas dado que la actividad de agua es afectada por la temperatura. En este caso las medidas fueron hechas a temperatura normal de laboratorio ($\sim 25^{\circ}\text{C}$). Dada la temperatura a la que se secó el arroz, se espera que la actividad de agua en el producto sea menor que la inicial en cada uno de los arroces. Esto es lo que se observa en las **Tablas 10-11, 13-14 y 16-18**.

Tabla 10: Resultados obtenidos para la actividad de agua de las muestras para el Lote #1 con tratamiento

Muestra	Tiempo de tratamiento	n*	Temperatura Promedio $^{\circ}\text{C}$	A_w Promedio	Desv. Est.*	CV*
Grano Mediano	30 s	3	25.02	0.1908	0.0013	0.7
	1 min	3	24.99	0.2271	0.0048	2.1
	2 min	3	24.95	0.2558	0.0006	0.2
	3 min	3	24.94	0.2601	0.0004	0.2
Grano Largo	30 s	3	25.00	0.1719	0.0009	0.5
	1 min	3	24.94	0.2957	0.0003	0.1
	2 min	3	24.92	0.3309	0.0042	1.3
	3 min	3	24.93	0.3484	0.0023	0.6
Integral	30 s	3	25.02	0.2186	0.0005	0.2
	1 min	3	24.95	0.3462	0.0031	0.9
	2 min	3	24.94	0.4690	0.0015	0.3
	3 min	3	24.92	0.3283	0.0018	0.5
Jazmín	30 s	3	25.00	0.2039	0.0010	0.5
	1 min	3	24.90	0.2435	0.0011	0.4
	2 min	3	24.92	0.3905	0.0005	0.1
	3 min	3	24.93	0.2269	0.0016	0.7
Basmati	30 s	3	25.00	0.1520	0.0013	0.9
	1 min	3	25.07	0.3145	0.0013	0.4
	2 min	3	25.06	0.2269	0.0015	0.7
	3 min	3	25.03	0.2332	0.0011	0.5
Parbolizado	30 s	3	25.03	0.3952	0.0005	0.1
	1 min	3	25.02	0.3617	0.0010	0.3
	2 min	3	25.04	0.4284	0.0082	1.9
	3 min	3	25.07	0.3737	0.0013	0.3

*n = número de muestras analizadas, Desv. Est. = Desviación Estándar, CV = Coeficiente de Variación

En la **Tabla 10** se muestran los valores obtenidos de actividad de agua, a cierta temperatura, para cada una de las muestras luego de aplicar el tratamiento. En esta ocasión, se espera que los datos obtenidos sean menores a los iniciales. Los valores obtenidos van de aproximadamente 0.100 a 0.4700, lo que cae por debajo del rango para el arroz crudo seco (0.600 – 0.500). Esto se debe a que el arroz fue expuesto a altas temperaturas de horno para llevar a cabo el secado del arroz luego del tratamiento. Para ninguno de los arroces estudiados se observa un patrón de disminución de actividad de agua, por tanto no se puede establecer ninguna tendencia. Lo que sí se puede observar es que el arroz integral mantiene en efecto la actividad de agua más alta en comparación con los demás tipos de arroces. Los valores de actividad de agua para este tipo de arroz están entre 0.210 y 0.470. El que este tipo de arroz mantenga la actividad de agua más alta puede deberse a que dicho producto no es pulido, es decir, aún mantiene su salvado, lo que lo protege del ambiente que le rodea y lo mantiene más estable.

Tabla 11: Resultados obtenidos para la actividad de agua de las muestras para el Lote #1 pre y post-tratamiento a 30 segundos

Pre-tratamiento					
Muestra	n*	Temperatura Promedio	A _w Promedio	Desv. Est.*	CV*
Grano Mediano	3	24.98	0.5747	0.0014	0.2
Grano Largo	3	24.99	0.5804	0.0011	0.2
Integral	3	25.02	0.6458	0.0010	0.2
Jazmín	3	25.01	0.6418	0.0014	0.2
Basmati	3	24.94	0.6242	0.0012	0.2
Parbolizado	3	25.05	0.4721	0.0023	0.5
Post-tratamiento 30 s					
Muestra	n*	Temperatura Promedio	A _w Promedio	Desv. Est.*	CV*
Grano Mediano	3	25.02	0.1908	0.0013	0.7
Grano Largo	3	25.00	0.1719	0.0009	0.5
Integral	3	25.02	0.2186	0.0005	0.2
Jazmín	3	25.00	0.2039	0.0010	0.5
Basmati	3	25.00	0.1520	0.0013	0.9
Parbolizado	3	25.03	0.3952	0.0005	0.1

*n = número de muestras analizadas, Desv. Est. = Desviación Estándar, CV = Coeficiente de Variación

La **Tabla 11** es un resumen de los datos obtenidos antes del tratamiento y después del tratamiento, a los 30s, para establecer una comparación más directa. Esta tabla presenta lo descrito anteriormente.

Tabla 12: Resultados obtenidos para la actividad de agua de las muestras para el Lote #2 sin tratamiento

Muestra	n*	Temperatura Promedio °C	A _w Promedio	Desv. Est.*	CV*
Grano Mediano	3	24.69	0.6106	0.0004	0.1
Grano Largo	3	24.98	0.6254	0.0004	0.1
Integral	3	25.02	0.6521	0.0009	0.1
Jazmín	3	24.93	0.5695	0.0007	0.1
Basmati	3	24.98	0.5692	0.0024	0.4
Parbolizado	3	24.98	0.5375	0.0014	0.3

*n = número de muestras analizadas, Desv. Est. = Desviación Estándar, CV = Coeficiente de Variación

Para las muestras del Lote #2 (**Tabla 12**) sin tratamiento se obtuvieron resultados según lo esperado. La actividad de agua se mantiene entre 0.600 y 0.500. En este caso el orden ascendente de las actividades de agua para las muestras son: parbolizado, Basmati, Jazmín, grano mediano, grano largo e integral. No se mantiene el mismo orden, pero se puede observar que, al igual que el primer lote, la muestra con la actividad de agua mayor es el arroz integral. Los valores obtenidos se denominan como aceptables dado que el valor de los coeficientes de variación no excede el 5%.

En la **Tabla 13** se puede observar nuevamente que los valores de actividad de agua disminuyen en comparación con las muestras sin tratamiento. Para el arroz integral, en este caso, no se observa que tiene la actividad de agua más alta, quien tiene la actividad de agua más alta es el arroz parbolizado. No puede establecerse un patrón en cuanto a las muestras que tendrán mayor valor de actividad de agua. Esto puede deberse a que las muestras no secaron de igual manera entre un lote y otro luego del tratamiento o el cambio en la estructura del grano durante el proceso de secado no fue el mismo entre un lote y otro. Estas muestras también fueron analizadas en temperaturas cercanas a los 25° C y los valores del coeficiente de variación no sobrepasan el 5%, por tanto estos valores son considerados como aceptables.

Tabla 13: Resultados obtenidos para la actividad de agua de las muestras para el Lote #2 con tratamiento

Muestra	Tiempo de tratamiento	n*	Temperatura Promedio °C	A _w Promedio	Desv. Est.*	CV*
Grano Mediano	30 s	3	25.00	0.1610	0.0016	1.0
	1 min	3	25.04	0.2171	0.0017	0.8
	2 min	3	25.03	0.2032	0.0008	0.4
	3 min	3	25.00	0.2244	0.0013	0.6
Grano Largo	30 s	3	24.98	0.1463	0.0010	0.7
	1 min	3	25.01	0.2403	0.0007	0.3
	2 min	3	25.00	0.2461	0.0014	0.6
	3 min	3	25.04	0.2652	0.0014	0.5
Integral	30 s	3	25.00	0.2816	0.0010	0.4
	1 min	3	25.00	0.2694	0.0003	0.1
	2 min	3	25.01	0.2823	0.0011	0.4
	3 min	3	25.00	0.2950	0.0012	0.4
Jazmín	30 s	3	25.01	0.1995	0.0022	1.1
	1 min	3	25.00	0.1844	0.0009	0.5
	2 min	3	25.01	0.2509	0.0012	0.5
	3 min	3	25.04	0.3209	0.0010	0.3
Basmati	30 s	3	25.02	0.1800	0.0029	1.6
	1 min	3	25.04	0.2341	0.0010	0.4
	2 min	3	25.03	0.3115	0.0012	0.4
	3 min	3	25.01	0.3066	0.0012	0.4
Parbolizado	30 s	3	25.00	0.3288	0.0010	0.3
	1 min	3	25.02	0.4070	0.0019	0.5
	2 min	3	24.85	0.6299	0.0005	0.1
	3 min	3	25.03	0.4464	0.0021	0.5

*n = número de muestras analizadas, Desv. Est. = Desviación Estándar, CV = Coeficiente de Variación

Tabla 14: Resultados obtenidos para la actividad de agua de las muestras para el Lote #2 pre y post-tratamiento a 30 segundos

Pre-tratamiento					
Muestra	n*	Temperatura Promedio	A _w Promedio	Desv. Est.*	CV*
Grano Mediano	3	24.69	0.6106	0.0004	0.1
Grano Largo	3	24.98	0.6254	0.0004	0.1
Integral	3	25.02	0.6521	0.0009	0.1
Jazmín	3	24.93	0.5695	0.0007	0.1
Basmati	3	24.98	0.5692	0.0024	0.4
Parbolizado	3	24.98	0.5375	0.0014	0.3
Post-tratamiento 30 s					
Muestra	n*	Temperatura Promedio	A _w Promedio	Desv. Est.*	CV*
Grano Mediano	3	25.00	0.1610	0.0016	1.0
Grano Largo	3	24.98	0.1463	0.0010	0.7
Integral	3	25.00	0.2816	0.0010	0.4
Jazmín	3	25.01	0.1995	0.0022	1.1
Basmati	3	25.02	0.1800	0.0029	1.6
Parbolizado	3	25.00	0.3288	0.0010	0.3

*n = número de muestras analizadas, Desv. Est. = Desviación Estándar, CV = Coeficiente de Variación

La **Tabla 14** es un resumen de los datos obtenidos antes del tratamiento y después del tratamiento, a los 30s, para establecer una comparación más directa. Esta tabla presenta lo descrito anteriormente.

Tabla 15: Resultados obtenidos para la actividad de agua de las muestras para el Lote #3 sin tratamiento

Muestra	n*	Temperatura Promedio °C	A _w Promedio	Desv. Est.*	CV*
Grano Mediano	3	24.91	0.5773	0.0002	0.0
Grano Largo	3	24.94	0.5908	0.0008	0.1
Integral	3	25.02	0.6067	0.0001	0.0
Jazmín	3	24.91	0.5832	0.0005	0.1
Basmati	3	24.93	0.5982	0.0014	0.2
Parbolizado	3	24.73	0.5357	0.0008	0.2

*n = número de muestras analizadas, Desv. Est. = Desviación Estándar, CV = Coeficiente de Variación

En cuanto a las muestras del Lote #3 sin tratamiento se obtuvieron resultados parecidos a los lotes anteriores según se muestra en la **Tabla 15**. La actividad de agua se mantiene en el rango 0.600 y 0.500, pero el orden ascendente es diferente a los demás lotes. El orden ascendente para la actividad de agua es el siguiente: parbolizado, grano mediano, Jazmín, grano largo, Basmati e integral. Al igual que para el primer y segundo lote, la muestra con la actividad de agua mayor es el arroz integral. Las temperaturas de análisis se mantuvieron cerca de los 25° C. Los valores obtenidos se denominan como aceptables dado que el valor de los coeficientes de variación no excede el 5%.

En la **Tabla 16** también se observa que los valores de actividad de agua disminuyen en comparación con las muestras sin tratamiento. Tampoco se observa un patrón de disminución de la actividad de agua en los distintos arroces, por lo que no se puede predecir quien llevará el valor de mayor o menor actividad de agua. El arroz que muestra mayor actividad de agua es, nuevamente, el arroz parbolizado y la muestra de 2 minutos para el arroz Jazmín. Las temperaturas de análisis fueron en las temperaturas cercanas a los 25° C y los valores del coeficiente de variación no sobrepasan el 5 %. Se puede decir que los valores obtenidos para el Lote #3 son considerados como aceptables.

Tabla 16: Resultados obtenidos para la actividad de agua de las muestras para el Lote #3 con tratamiento

Muestra	Tiempo de tratamiento	n*	Temperatura Promedio °C	A _w Promedio	Desv. Est.*	CV*
Grano Mediano	30 s	3	25.02	0.2199	0.0021	1.0
	1 min	3	25.01	0.1939	0.0022	1.1
	2 min	3	25.00	0.1846	0.0012	0.7
	3 min	3	24.99	0.1764	0.0006	0.3
Grano Largo	30 s	3	25.01	0.1851	0.0009	0.5
	1 min	3	24.98	0.3077	0.0006	0.2
	2 min	3	24.98	0.2050	0.0013	0.6
	3 min	3	24.99	0.1946	0.0009	0.5
Integral	30 s	3	25.01	0.2453	0.0006	0.2
	1 min	3	25.06	0.3047	0.0012	0.4
	2 min	3	25.03	0.2817	0.0016	0.6
	3 min	3	25.04	0.2702	0.0003	0.1
Jazmín	30 s	3	25.02	0.2167	0.0003	0.1
	1 min	3	25.00	0.2168	0.0004	0.2
	2 min	3	24.99	0.4559	0.0006	0.1
	3 min	3	25.06	0.2879	0.0009	0.3
Basmati	30 s	3	25.03	0.1788	0.0005	0.3
	1 min	3	25.02	0.2408	0.0009	0.4
	2 min	3	25.03	0.2493	0.0008	0.3
	3 min	3	25.04	0.2750	0.0004	0.2
Parbolizado	30 s	3	25.03	0.3909	0.0009	0.2
	1 min	3	25.05	0.3760	0.0021	0.5
	2 min	3	25.02	0.3947	0.0009	0.2
	3 min	3	25.02	0.4316	0.0013	0.3

*n = número de muestras analizadas, Desv. Est. = Desviación Estándar, CV = Coeficiente de Variación

Tabla 17: Resultados obtenidos para la actividad de agua de las muestras para el Lote #3 pre y post-tratamiento a 30 segundos

Pre-tratamiento					
Muestra	n*	Temperatura Promedio	A _w Promedio	Desv. Est.*	CV*
Grano Mediano	3	24.91	0.5773	0.0002	0.0
Grano Largo	3	24.94	0.5908	0.0008	0.1
Integral	3	25.02	0.6067	0.0001	0.0
Jazmín	3	24.91	0.5832	0.0005	0.1
Basmati	3	24.93	0.5982	0.0014	0.2
Parbolizado	3	24.73	0.5357	0.0008	0.2
Post-tratamiento 30 s					
Muestra	n*	Temperatura Promedio	A _w Promedio	Desv. Est.*	CV*
Grano Mediano	3	25.02	0.2199	0.0021	1.0
Grano Largo	3	25.01	0.1851	0.0009	0.5
Integral	3	25.01	0.2453	0.0006	0.2
Jazmín	3	25.02	0.2167	0.0003	0.1
Basmati	3	25.03	0.1788	0.0005	0.3
Parbolizado	3	25.03	0.3909	0.0009	0.2

*n = número de muestras analizadas, Desv. Est. = Desviación Estándar, CV = Coeficiente de Variación

La **Tabla 17** es un resumen de los datos obtenidos antes del tratamiento y después del tratamiento, a los 30s, para establecer una comparación más directa. Esta tabla presenta lo descrito anteriormente.

Tabla 18: Resultados obtenidos para la actividad de agua de las muestras para los 3 lotes pre y post-tratamiento a 30 segundos

Pre-tratamiento					
Muestra	n*	Temperatura Promedio	A _w Promedio	Desv. Est.*	CV*
Grano Mediano	3	24.86	0.5875	0.020	3.4
Grano Largo	3	24.97	0.5988	0.024	3.9
Integral	3	25.02	0.6349	0.025	3.9
Jazmín	3	24.95	0.5982	0.038	6.4
Basmati	3	24.95	0.5972	0.028	4.6
Parbolizado	3	24.92	0.5151	0.037	7.2
Post-tratamiento 30 s					
Muestra	n*	Temperatura Promedio	A _w Promedio	Desv. Est.*	CV*
Grano Mediano	3	25.01	0.1906	0.029	15.5
Grano Largo	3	25.00	0.1678	0.020	11.8
Integral	3	25.01	0.2485	0.032	12.7
Jazmín	3	25.01	0.2067	0.009	4.3
Basmati	3	25.02	0.1703	0.016	9.3
Parbolizado	3	25.02	0.3716	0.037	10.0

*n = número de muestras analizadas, Desv. Est. = Desviación Estándar, CV = Coeficiente de Variación

La **Tabla 18** es una combinación de los resultados obtenidos para los tres lotes. En dicha tabla, se puede notar, que los datos son expresados para el contenido de actividad de agua antes del tratamiento y luego del tratamiento a los 30s. De igual manera se sigue observando, antes del tratamiento, que el arroz que mantiene mayor actividad de agua es el arroz integral. Este en promedio tiene 0.6349 de actividad de agua. Dicho valor se mantiene cercano al rango reportado en la literatura para arroces crudos y secos (0.600 - 0.500). Luego del tratamiento se observa que el que mantiene la mayor actividad de agua es el arroz parbolizado (0.3716), mientras que el arroz grano largo mantiene la menor actividad de agua (0.1678). En todos los lotes se observa que el arroz parbolizado es el que mantiene la actividad de agua más alta. Por tanto se entiende que el arroz más resistente a mantener una actividad de agua relativa es el parbolizado. Los altos valores para los coeficientes de variación se deben a que estos datos son un conjunto de los datos obtenidos

para los 3 lotes y no todos los arroces se comportan de igual manera en cada uno de los lotes, por tanto, esto introduce mayor variabilidad entre los resultados

Por otra parte, todos los tipos de arroces fueron estudiados bajo comparación antes y después del tratamiento aplicado. Para ello solo se utilizó la comparación visual, la cual fue capturada por medio de fotografías con magnificación y medida de longitud de los granos de arroces antes y después del tratamiento. Las fotografías son mostradas más adelante en forma de imágenes para que se pueda apreciar lo observado durante el estudio. Las medidas de la longitud de los granos de arroz se muestran más adelante en tablas o figuras. Solo se muestran los resultados para cada uno de los tipos de arroces estudiados del primer lote, ya que en cada lote analizado se observó el mismo efecto.

En las **Figuras 7 - 12** se observa como las estructuras de los diferentes arroces se quiebra en el interior. Dado a la alta temperatura de secado en horno luego del tratamiento la estructura del grano de arroz se quiebra significativamente en el interior. Además, a causa de esto el grano se vuelve más débil provocando que el mismo se parta durante el manejo. Los tipos de arroces más afectados son el Jazmín y el Basmati; luego, les siguen el arroz grano mediano y el arroz grano largo. Finalmente los arroces menos afectados por este fenómeno son el arroz parbolizado y el integral. Este fenómeno fue observado en cada una de las muestras analizadas. A pesar de que tal fenómeno fue observado en todos los arroces no se puede decir que esto ocurre con la misma intensidad en cada uno de los granos, ni entre el mismo tipo de arroz. No todos los arroces muestran la misma cantidad de grietas en el grano dado que no todas las muestras tardaron el mismo tiempo en secarse. Se determinó que los arroces estaban totalmente secos cuando las muestras llegaban a peso contante, por tanto, unas muestras estuvieron más expuestas al calor que otras. No obstante, los arroces más propensos a debilitarse durante el proceso son los que menos tiempo tardaron en secarse. Los arroces Jazmín, Basmati, grano mediano, grano largo y parbolizado tardaron 30 minutos en secarse completamente para 30 segundos de tratamiento, mientras que el arroz integral tardó una hora en secarse completamente. Para los minutos 1 y 2, los arroces Jazmín, Basmati, grano mediano y grano largo tardaron 1 hora y 30 minutos en secarse completamente; pero los arroces parbolizado e integral tardaron 2 horas en secarse. Los colores de los arroces no cambiaron, pero el quebrado en su interior les hace perder la apariencia cristalina. Todas las muestras analizadas presentaban las mismas características.



Figura 7: Comparación visual para el arroz grano mediano: a) sin tratamiento, b) 30 segundos, c) 1 minuto, d) 2 minutos y e) 3 minutos de tratamiento



Figura 8: Comparación visual para el arroz grano largo: a) sin tratamiento, b) 30 segundos, c) 1 minuto, d) 2 minutos y e) 3 minutos de tratamiento



Figura 9: Comparación visual para el arroz integral: a) sin tratamiento, b) 30 segundos, c) 1 minuto, d) 2 minutos y e) 3 minutos de tratamiento



Figura 10: Comparación visual para el arroz Jazmín: a) sin tratamiento, b) 30 segundos, c) 1 minuto, d) 2 minutos y e) 3 minutos de tratamiento



Figura 11: Comparación visual para el arroz Basmati: a) sin tratamiento, b) 30 segundos, c) 1 minuto, d) 2 minutos y e) 3 minutos de tratamiento

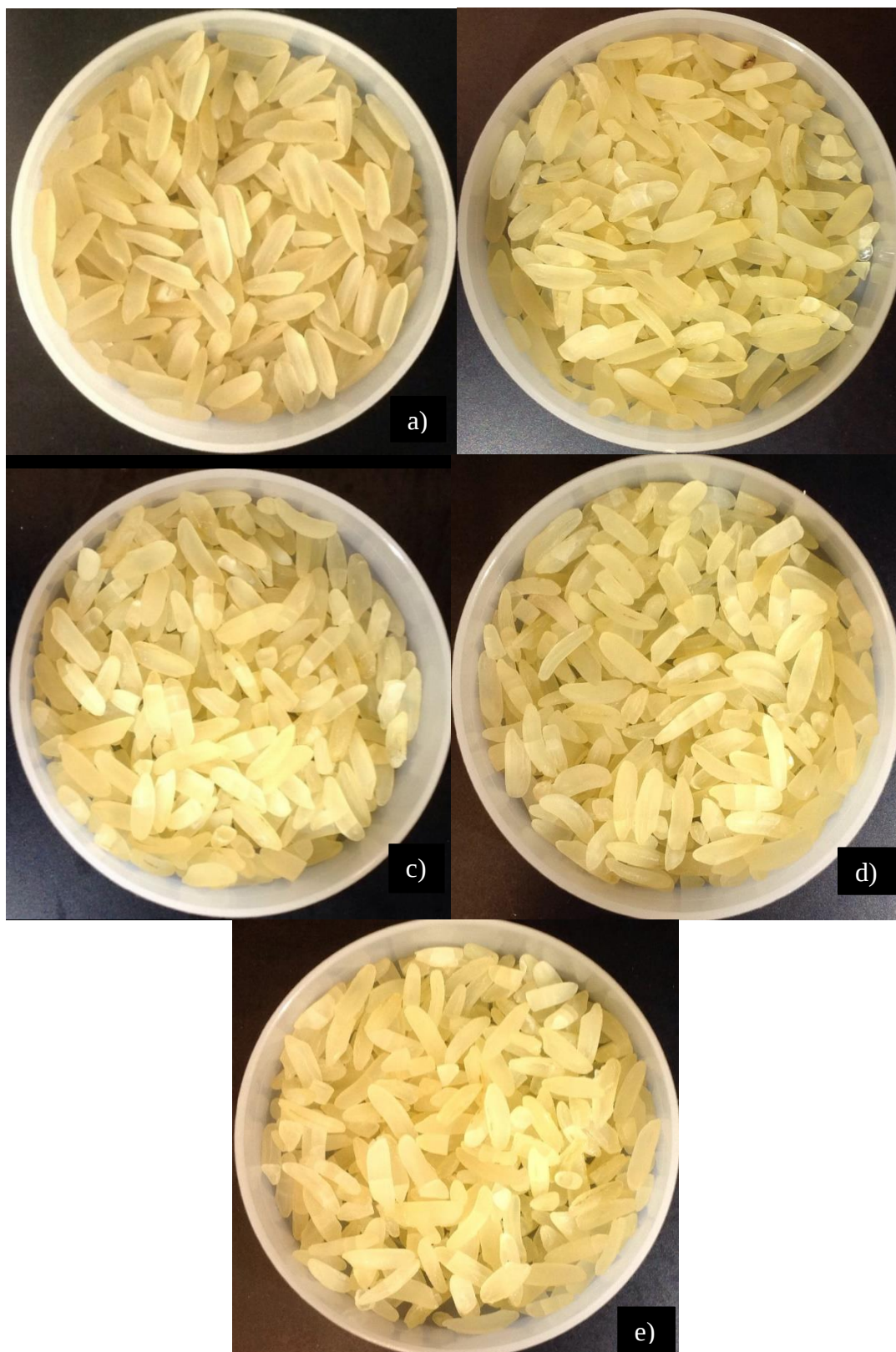


Figura 12: Comparación visual para el arroz parbolizado: a) sin tratamiento, b) 30 segundos, c) 1 minuto, d) 2 minutos y e) 3 minutos de tratamiento



Figura 13: Longitud de los arroces antes del tratamiento



Figura 14: Longitud de los arroces luego del tratamiento

Las **Figuras 13 – 14** muestran la manera en que fueron medidos los arroces. Esta representación es de forma general, pero la medida fue tomada de manera individual para 3 granos de cada uno de los arroces estudiados. Solo se utilizó el lote #1 y los arroces correspondientes para los primeros 30 segundos de tratamiento. Los arroces estudiados fueron (de arriba hacia abajo en cada una de las fotos anteriores) arroz integral, arroz parbolizado, grano mediano, grano largo, Jazmín y Basmati. En general, no se observa cambios drásticos en la apariencia de los granos de arroces. El color cambia un poco pero es debido al agrietado que ocurre en el interior del grano, como se mencionó anteriormente.

Tabla 19: Resultados obtenidos para las longitudes de los arroces antes del tratamiento

Pre-tratamiento					
Muestra	Longitud (cm)			Promedio	Desv. Est.
Grano Mediano	0.50	0.55	0.50	0.52	0.03
Grano Largo	0.65	0.60	0.65	0.63	0.03
Parbolizado	0.70	0.70	0.65	0.68	0.03
Integral	0.85	0.61	0.70	0.72	0.12
Jazmín	0.80	0.72	0.70	0.74	0.05
Basmati	0.80	0.70	0.74	0.75	0.05

Tabla 20: Resultados obtenidos para las longitudes de los arroces después del tratamiento

Post-tratamiento					
Muestra	Longitud (cm)			Promedio	Desv. Est.
Grano Mediano	0.51	0.45	0.50	0.49	0.03
Grano Largo	0.62	0.60	0.65	0.62	0.03
Parbolizado	0.70	0.70	0.60	0.67	0.06
Integral	0.73	0.65	0.70	0.69	0.04
Jazmín	0.75	0.70	0.62	0.69	0.07
Basmati	0.70	0.65	0.70	0.68	0.03

Las **Tablas 19 – 20** muestran los resultados obtenidos para cada una de las longitudes de los arroces estudiados. El orden ascendente en longitud para los arroces antes del tratamiento es: arroz grano mediano, grano largo, parbolizado, integral, Jazmín y Basmati. La longitud promedio de los arroces fluctúa entre 0.52 y 0.75cm. La longitud de los arroces luego del tratamiento disminuye un poco. En este caso el orden ascendente de los arroces es arroz grano mediano, grano largo, parbolizado, Basmati, integral y Jazmín, con una longitud promedio que fluctúa entre 0.49 y 0.69cm. La disminución en longitud se debe a la deshidratación excesiva de las muestras. Esto demuestra que la temperatura del horno utilizada para el secado de arroz fue muy alta o que las muestras estuvieron expuestas mucho tiempo al calor del horno. Este tipo de estudio solo permite hacer comparaciones a nivel físico. Por lo que, solo se puede comparar la apariencia antes y después del tratamiento, pero no permite ver otros cambios químicos que ocurran dentro del arroz. Esto podría ser corregido realizando otros estudios de tipo químico para ver como cambia el arroz.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

Con el estudio realizado se puede demostrar que el arroz obtenido de manera comercial en Puerto Rico contiene entre 85 y 277ppb de arsénico, lo que cae en el rango reportado en la literatura (10 – 400ppb). Según los datos obtenidos, el arroz integral es el que está en la posición número uno con mayor cantidad de arsénico total (277 ± 27 ppb en promedio para los tres lotes), seguido del arroz parbolizado (221 ± 42 ppb en promedio para los tres lotes). Se había mencionado anteriormente que el arsénico se une a proteínas formando complejos, los cuales se almacenan dentro del gránulo de almidón (Narukawa y Chiba, 2010). El hecho de que estos arroces tengan mayor cantidad de arsénico total puede deberse a que estos granos son poco procesados, lo que provocaría poca remoción de almidón en el producto final y por ende mayor cantidad de arsénico total. El arroz grano mediano y el arroz grano largo obtienen valores parecidos entre sí, esto puede deberse a que ambos tipos de arroces son pulidos de igual manera y solo cambia el tamaño del grano utilizado. La variación entre ellos puede deberse al lugar de procedencia o la contaminación relativa en el ambiente que se produce, así como el agua de riego utilizada. Entre los arroces con las cantidades más bajas de arsénico total, se encuentran el Jazmín y el Basmati. Esto puede deberse a que son variedades diferentes y las cantidades de arsénico varían entre tipos de arroces, así como de una región a otra (Narukawa y Chiba, 2010). Finalmente con el estudio del material estándar de referencia, SRM-1568b de NIST[®], se puede demostrar que el proceso utilizado para determinar la cantidad de arsénico total en el arroz es aceptable.

Dado que se pudo demostrar que el arroz que se consume en la Isla, contiene arsénico, se le aplicó el tratamiento a cada una de las muestras y se encontró que el arsénico se puede reducir entre un 18 y 58%. Luego de la aplicación del tratamiento, los valores de arsénico se encuentran entre 35 y 170ppb, lo que es más bajo que lo reportado inicialmente (85 - 277ppb de arsénico total). Los arroces muestran valores significativos de reducción de arsénico, pero la estructura del arroz se ve comprometida ya que se quiebra en el interior. El secado a altas temperaturas y por periodos largos de tiempo para el arroz, luego del tratamiento, se hizo meramente para cuestión de análisis, pero se considera un aspecto muy importante que debe ser corregido, puesto que esto es lo que provoca el daño en el grano. Los arroces ideales para aplicar el procedimiento de reducción de arsénico total son el arroz integral o el arroz parbolizado, esto es debido a que las estructuras

de estos son más resistentes y su interior no se afecta con facilidad. El objetivo principal del experimento se cumplió, pero se deben hacer algunos ajustes o correcciones experimentales para evitar comprometer la funcionalidad o apariencia del arroz y que el procedimiento pueda ser aplicado a la industria arrocera. Es importante que el consumidor siga obteniendo el producto con la misma calidad esperada y que el proceso de reducción de arsénico pueda ser implementado en la industria arrocera, para esto se hacen ciertas recomendaciones o trabajos futuros en la siguiente sección.

CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES

En base a la investigación realizada, se considera que para trabajos futuros se pueden implementar procesos diferentes para la reducción de arsénico total, tales como; menos aplicación de calor, tiempos más cortos de hervido o el estudio y desarrollo de diferentes procesos de reducción de arsénico.

- Para la aplicación de calor se sugiere que el uso del horno de secado se aplique a una temperatura más alta, pero por menos tiempo o con un cambio de temperatura gradual.
- El tiempo de hervido puede ser aplicado por 15 segundos o menos, en lugar de 30 segundos como se hace en el experimento presentado.
- El análisis de la estructura interna del producto luego del estudio es de suma importancia, por lo que se sugiere hacer diferentes tipos de análisis a nivel físico o químico. Por ejemplo, se podrían hacer estudios con microscopios específicos como el SEM (Scanning Electron Microscope).
- También se podrían utilizar diferentes agentes quelantes como ácido acético o cítrico y monitorear el efecto que este tendría en el sabor del producto final. O utilizar ácido ascórbico para el mismo propósito.
- Se recomienda hacer pruebas sensoriales luego de la aplicación de procesos para determinar la aceptabilidad del producto entre los consumidores.
- Otra alternativa para aplicar el estudio que se les presenta, es estudiar sub-productos o productos derivados del arroz, como por ejemplo cereales para bebés en base de arroz.
- Una recomendación importante al estudio es, realizar especiación de arsénico. Todos los tipos de arsénicos tienen diferentes niveles de toxicidad y se ha encontrado que entre ellos el arsénico inorgánico, específicamente el arsenito, es el más tóxico de todos (Amit *et al.*, 1995). Anteriormente se mencionó que se han encontrado diferentes variedades de arsénico, por tal razón sería interesante determinar cuál variedad está presente en los arroces estudiados y en qué cantidad.

- Otra recomendación es estudiar el agua de lavado para determinar si es más viable hacer el proceso a nivel industrial o si se podría convertir en un proceso casero a la hora de la cocción del producto.
- Evaluar la pérdida de vitaminas y minerales luego de la aplicación del tratamiento.
- Hacer el secado luego del tratamiento llevando las muestras al A_w establecido para arroz crudo en lugar de secar la muestra completamente.
- Y finalmente pero no menos importante, estudiar una manera de cómo generar desperdicios sin que afecte al ambiente.

Es importante mantener en equilibrio todos los aspectos en la cadena de la producción, comercialización y consumo de arroz, desde la finca hasta la mesa, para poder emplear el proceso de reducción de arsénico total en el arroz ya sea a nivel industrial o casero.

REFERENCIAS

- Abedin, J.; Creeser, M.; Meharg, A.; Feldmann, J.; Cotter-Howells, J. (2002). Arsenic Accumulation and Metabolism in Rice (*Oryza stiva* L.). *Environ. Sci. Technol.* 36, 962-968.
- Amit, C.; Das, D.; Mandal, B.; Chowdhury, T.; Samanta, G.; Chakraborti, D. (1995). Arsenic in Ground Water in Six Districts of West Bengal, India: The Biggest Arsenic Calamity in The World. Part I. Arsenic Species in Drinking Water and Urine of the Affected People. *Royal Society of Chemistry.* 7, 551.
- Anónimo. (2013). Lista la primera cosecha de arroz sembrado en la Isla. *El Nuevo Día*. <http://www.elnuevodia.com/noticias/locales/nota/listalaprimercosechadearrozsembradoenla-1646003/>
- Azizur, M.; Mahmudur, M.; Reichman, S.; Lim, R.; Naidu, R. (2014). Arsenic Speciation in Australian-Grown and Imported Rice on Sale in Australia: Implications for Human Health Risk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 6016-6024.
- Beuchat, L. (1981). Microbial Stability as affected by Water Activity. *Cereal Foods World.* 26, 345-349.
- Codex Alimentarius. (1995). Codex Standard: Standard for Rice 198-1995. http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/ru/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCODEX%2B198-1995%252FCXS_198e.pdf
- Encarta. (2005). Microsoft® Encyclopedia Arroz. Obtenido el 11 de marzo del 2016.
- EPA. (1994). Method 200.8: Determination of Trace Elements in Waters and Wastes by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry, Revision 5.4. <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-06/documents/epa-200.8.pdf>

EPA. (1996). Microwave Assited Acid Digestion of Siliceous and Organically Based Matrices. <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3052.pdf>

JECFA. *Report of the Sixth Session of the Codex Committee on Contaminants in Foods*; Joint FAO/WHO Food Standards Programme Codex Alimentaris Commission: Maastricht, The Netherlands, 2012; p 79.

Juskelis, R.; Cappozzo, J. (2013). Speciation of Inorganic Arsenic in Baby Rice Cereals Using HPLC-ICP-MS. *Agilent Technologies*.

Kohlmeyer, U.; Jantzen, E.; Kuballa, J.; Jakubik, S. Benefits of high resolution IC.ICP.MS for the routine analysis of inorganic and arsenic species in food products of marine and terrestrial origin. *Anal. Bioanal. Chem.* 2003, 377, 6–13.

Magalhaes, F. Arsenic. An environmental problem limited by solubility. *Pure Appl. Chem.* 2002. (74, 10). 1843-1850.

Narukawa, T.; Chiba, K. (2010). Heat-Assisted Aqueous Extraction of Rice Flour for Arsenic Speciation Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (14), 8183-8188.

National Institute of Standards and Technology. (2013). Certificate of Analysis: Standard Reference Material® 1568b. <https://www-s.nist.gov/srmors/certificates/1568b.pdf>

Nielsen, S.; Purdue University. (2010). Food Analysis. Fourth Ed. USA: Springer. (57).

Nookabkaew, S.; Rangkadilok, N.; Mahidol, C.; Promsuk, G.; Satayavivad, J. (2013). Determination of Arsenic Species in Rice from Thailand and Other Asian Countries Using Simple Extraction and HPLC-ICP-MS Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 6991-6998.

APÉNDICE



National Institute of Standards & Technology

Certificate of Analysis

Standard Reference Material[®] 1568b

Rice Flour

This Standard Reference Material (SRM) is intended primarily for validation of methods for determining elements in rice flour and similar materials. This SRM can also be used for quality assurance when assigning values to in-house reference materials. This SRM is rice flour prepared from a single lot of river rice by a commercial manufacturer. A unit of SRM 1568b consists of a single bottle containing approximately 50 g of material sealed inside an aluminized pouch.

Certified Mass Fraction Values: The certified mass fraction values of selected elements in SRM 1568b are provided in Tables 1 and 2. A NIST certified value is a value for which NIST has the highest confidence in its accuracy in that all known or suspected sources of bias have been investigated or taken into account [1]. Analyses for value assignment were performed by NIST and the National Metrology Institute of Japan (NMIJ). Values are reported on a dry-mass basis in mass fraction units [2].

Reference Mass Fraction Values: Reference mass fraction values are provided for additional elements (Table 3). A NIST reference value is a noncertified value that is the best estimate of the true value based on available data; however, the value does not meet the NIST criteria for certification [1] and is provided with associated uncertainties that may reflect only measurement reproducibility, may not include all sources of uncertainty, or may reflect a lack of sufficient statistical agreement among multiple analytical methods. The reference mass fraction values were derived from results reported by NIST. Values are reported on a dry-mass basis in mass fraction units [2].

Expiration of Certification: The certification of **SRM 1568b** is valid, within the measurement uncertainty specified, until **20 June 2023**, provided the SRM is handled and stored in accordance with the instructions given in this certificate (see "Instructions for Storage and Use"). The certification is nullified if the SRM is damaged, contaminated, or otherwise modified.

Maintenance of SRM Certification: NIST will monitor this SRM over the period of its certification. If substantive technical changes occur that affect the certification before the expiration of this certificate, NIST will notify the purchaser. Registration (see attached sheet) will facilitate notification.

Coordination of the technical measurements leading to the certification of this SRM was performed by W.C. Davis, S.E. Long, and L.J. Wood of the NIST Chemical Sciences Division.

Analytical measurements at NIST were performed by B.M. Adair, S. Christopher, W.C. Davis, S.E. Long, A.F. Marlow, A.J. Moors, K.E. Murphy, R. Oflaz, J.R. Sieber, L.J. Wood, T.W. Vetter, and L.L. Yu of the NIST Chemical Sciences Division. Analyses for value assignment were also performed by T. Narukawa of the National Metrology Institute of Japan (NMIJ). Original analyses were performed by E.S. Beary, T.A. Butler, M.S. Epstein, J.D. Fassett, R.R. Greenberg, L.B. Jassie, W.R. Kelly, H.M. Kingston, J.R. Moody, P.J. Paulsen, T.C. Rains, T.A. Rush, S.F. Heller-Zeisler, R.L. Watters, Jr., and L.J. Wood.

Statistical analysis was provided by J.H. Yen of the NIST Statistical Engineering Division.

Support aspects involved in the issuance of this SRM were coordinated through the NIST Office of Reference Materials.

Carlos A. Gonzalez, Chief
Chemical Sciences Division

Gaithersburg, MD 20899
Certificate Issue Date: 23 October 2013
Certificate Revision History on Last Page
SRM 1568b

Robert L. Watters, Jr., Director
Office of Reference Materials

Page 1 of 6

NOTICE AND WARNING TO USERS

SRM 1568b IS INTENDED FOR LABORATORY USE ONLY, NOT FOR HUMAN CONSUMPTION.

INSTRUCTIONS FOR STORAGE AND USE

Storage: The SRM should be stored at controlled room temperature (20 °C to 25 °C) in the original unopened bottle. For elemental analyses, the bottle can be re-capped, stored at controlled room temperature (20 °C to 25 °C), and test portions removed and analyzed until the material reaches its expiration date.

Use: Before use, the contents of the bottle should be mixed thoroughly. Allow the contents to settle for one minute prior to opening to minimize the loss of fine particles. To relate analytical determinations to the certified values in this Certificate of Analysis, the sample test portion indicated in the description of each group of analytes below should be used. Results obtained in analyses should include their own estimates of uncertainty and can be compared to the certified values using procedures described in reference [3].

INSTRUCTIONS FOR DRYING

Residual moisture content should be determined on a separate sample for converting analytical results to a dry mass basis. The recommended drying methods are (1) freeze drying at 25 °C for 24 h; (2) oven drying at 90 °C for 2 h; or (3) desiccator drying over magnesium perchlorate for 28 days. The observed moisture content ranges from 6.1 % to 6.4 % (mass fraction).

SOURCE, PREPARATION, AND ANALYSIS⁽¹⁾

Source and Preparation: Material existing from production of SRM 1568a was used to produce SRM 1568b. SRM 1568b is rice flour produced from 100 % long grain river rice grown in Arkansas. The original rice flour was ground to pass through a 425 µm (40 mesh) sieve, blended, and bottled at NIST. The reprocessed material was dried for 24 h at 101 °C and then double blended using a ceramic-lined cone blender for 30 min. Using a Teflon-lined hopper and trough, 50 g quantities of material were placed in 4 oz amber bottles. The bottles were capped and individually sealed in aluminized bags. Prior to bottling, the rice flour was irradiated with 2.5 megarads of ⁶⁰Co by Neutron Products, Inc. (Dickerson, MD).

Analytical Approach for Determination of Elements: Assigned mass fraction values for the elements in SRM 1568b were based on the combination of measurements from two different analytical methods at NIST and NMII, where available. Where certified values from SRM 1568a were considered scientifically valid, the combined estimator is the mean of two methods, one from the new data and the other from the certified value from SRM 1568a. NIST provided measurements by using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES), inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry (ID-ICP-MS), instrumental neutron activation analysis (INAA), liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry (LC/MS/MS), ion exchange chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry (IC/ICP-MS), sector field inductively coupled plasma mass spectrometry (SF-ICP-MS), and wavelength dispersive X-ray fluorescence spectrometry (WDXRF).

NIST Analyses for Al, As, Cu, Mn, Mo, Rb, Se, and Na Using ICP-OES, SF-ICP-MS, and/or ICP-MS: Aluminum, arsenic, copper, manganese, molybdenum, rubidium, selenium, and sodium were measured by ICP-OES, SF-ICP-MS or ICP-MS using duplicate 0.5 g test portions taken from each of eight bottles of SRM 1568b. Samples were digested in nitric acid using a microwave sample preparation system. Quantification was based on the method of standard additions.

NIST Analyses for Pb Using Isotope Dilution ICP-MS: Lead was measured by ID-ICP-MS using duplicate 1.0 g test portions taken from each of six bottles of SRM 1568b. Samples were spiked with isotopically enriched ²⁰⁶Pb and were digested in nitric acid using a microwave sample preparation system. Sample digests were evaporated to near dryness and a portion was reconstituted in dilute nitric acid for Pb analysis.

⁽¹⁾ Certain commercial equipment, instruments or materials are identified in this certificate to adequately specify the experimental procedure. Such identification does not imply recommendation or endorsement by the National Institute of Standards and Technology, nor does it imply that the materials or equipment identified are necessarily the best available for the purpose.

NIST Analyses for Al, Br, Ca, Cl, Fe, Mg, Mn, P, K, Rb, S, and Zn Using WDXRF: Aluminum, bromine, calcium, chlorine, iron, magnesium, manganese, phosphorus, potassium, rubidium, sulfur, and zinc were measured by WDXRF using duplicate or triplicate 2.5 g test portions taken from each of 24 bottles of SRM 1568b. Briquettes were prepared for each sample. The K-L₂₃ characteristic X-ray lines of all elements were used for quantification.

NIST Analyses for Br, Mn, K, and Na Using INAA: Bromine, manganese, potassium, and sodium were measured by INAA using duplicate 0.25 g test portions taken from each of six bottles of SRM 1568b. Powders were pressed into cylindrical pellets and irradiated in the pneumatic tube RT-2 of the NIST reactor at a reactor power of 20 MW. Samples, standards, and controls were packaged individually in clean polyethylene bags for analysis using gamma-ray spectroscopy. The count was done after several hours decay at a sample-to-detector distance of 5 cm for 30 min counting time.

NIST Analyses for As Species Using LC/MS/MS and IC/ICP-MS: Dimethylarsinic acid (DMA), methylarsonic acid (MMA), and As(III) and As(V), reported as inorganic arsenic (iAs), were measured by IC/ICP-MS using duplicate 1 g test portions taken from each of eight total bottles of SRM 1568b. DMA was also analyzed by LC/MS/MS using duplicate 1 g test portions taken from each of six bottles of SRM 1568b. Samples were prepared in a methanol/water mixture using a microwave sample preparation system. Quantification was based on the method of standard additions. NMII reported individual results for DMA, MMA, As(III), and As(V) using IC/ICP-MS. For analytes that were measured by NIST and NMII, the combination of the mean results from analyses by NIST and the mean results provided by NMII were averaged, as appropriate.

Homogeneity Assessment: The homogeneity of elements was assessed at NIST from methods and test portion sizes described above. For the elements measured by NIST, analyses of variance with 5 % significance level did not show statistically significant heterogeneity with the exception of Pb. A pattern of heterogeneity in the Pb data was evident, so the uncertainty for Pb incorporates an uncertainty component for possible heterogeneity.

Value Assignment: The SRM 1568a material was re-examined and the original certified values were determined to be scientifically valid in some cases. Where the data were determined to be valid, new NIST values were combined with values from SRM 1568a. The combined estimator is the mean of the new NIST data and the certified value for SRM 1568a. In the case of cadmium and mercury, the data from the original SRM 1568a were considered valid and the combination of the mean of results from analyses by NIST for SRM 1568a were used for certification. Original SRM 1568a data were determined using the following methods: heated graphite atomizer (electrothermal) atomic absorption spectrometry (ETAAS), flame atomic absorption spectrometry (FAAS), flame emission spectrometry (FES), flow injection analysis cold vapor atomic absorption spectrometry (FIA-CV-AAS), hydride generation atomic absorption spectrometry (Hyd-AAS), inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES), thermal ionization mass spectrometry (TIMS), isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry (ID-ICP-MS), instrumental neutron activation analysis (INAA), radiochemical neutron activation analysis (RNAA), and spectrophotometry (SPECTRO).

Certified Mass Fraction Values for Selected Elements: Each certified mass fraction value is the mean from the combination of the mean of results from analyses by NIST or the combination of mean results from analyses by NIST and the certificate value from SRM 1568a treated as a method estimate, where appropriate. The uncertainty provided with each value is an expanded uncertainty about the mean to cover the measurand with approximately 95 % confidence. The expanded uncertainty is calculated as $U = ku_c$, where u_c incorporates the observed difference between the results from the methods and their respective uncertainties and an uncertainty component for moisture correction, consistent with the ISO/JCGM Guide and with its Supplement 1, and k is a coverage factor corresponding to approximately 95 % confidence [4–6].

Metrological Traceability: The measurand in each case is the total concentration of each analyte as described in the text. Metrological traceability is to the SI unit indicated for each analyte in Tables 1-3, respectively.

Table 1. Certified Mass Fraction Values (Dry-Mass Basis) for Selected Elements in SRM 1568b

Element	Mass Fraction (mg/kg)		Coverage Factor, <i>k</i>
Aluminum ^(a,b,c)	4.21	± 0.34	2.0
Arsenic ^(a,d)	0.285	± 0.014	2.0
Bromine ^(b,c)	8.31	± 0.61	2.0
Cadmium ^(f,g)	0.0224	± 0.0013	2.0
Calcium ^(b,h,i)	118.4	± 3.1	2.0
Chlorine ^(b,c)	301.1	± 3.8	2.0
Copper ^(a,c,g,h)	2.35	± 0.16	2.0
Iron ^(b,c,h,i)	7.42	± 0.44	2.0
Magnesium ^(b,c,h,i)	559	± 10	2.0
Manganese ^(b,c)	19.2	± 1.8	2.0
Mercury ^(e,l)	0.00591	± 0.00036	2.0
Molybdenum ^(a,c,k,m)	1.451	± 0.048	2.0
Phosphorus ^(b,i,m,n)	1530	± 40	2.0
Potassium ^(b,c)	1282	± 11	2.0
Rubidium ^(a,b)	6.198	± 0.026	2.0
Selenium ^(a,c,o)	0.365	± 0.029	2.0
Sodium ^(c,e,m)	6.74	± 0.19	2.0
Sulfur ^(b,i)	1200	± 10	2.0
Zinc ^(b,c,h)	19.42	± 0.26	2.0

^(a) NIST ICP-MS
^(b) NIST WDXRF
^(c) NIST SF ICP-MS
^(d) NIST IC-ICP-MS
^(e) NIST INAA
^(f) NIST ETAAS
^(g) NIST RNAA
^(h) NIST FAAS
⁽ⁱ⁾ NIST FES
^(j) NIST TIMS
^(k) NIST ID-ICP-MS
^(l) NIST FIA-CV-AAS
^(m) NIST ICP-OES
⁽ⁿ⁾ NIST SPECTRO
^(o) NIST Hyd-AAS

Certified Mass Fraction Values for Selected Arsenic Species: Each certified mass fraction value is the mean from the combination of the mean results from analyses by NIST and the mean results provided by NMJJ, where appropriate. The uncertainty provided with each value is an expanded uncertainty about the mean to cover the measurand with approximately 95 % confidence. The expanded uncertainty is calculated as $U = ku_c$, where u_c incorporates the observed difference between the results from the methods and their respective uncertainties and an uncertainty component for moisture correction, consistent with the ISO/JCGM Guide and with its Supplement 1, and k is a coverage factor corresponding to approximately 95 % confidence [4–6].

Table 2. Certified Mass Fraction Values (Dry-Mass Basis) for Selected Arsenic Species in SRM 1568b

Arsenic Species	Mass Fraction (mg/kg, as As)			Coverage Factor, k
Dimethylarsinic acid (DMA) ^(a,b,c)	0.180	±	0.012	2.0
Monomethylarsonic acid (MMA) ^(a,c)	0.0116	±	0.0035	2.0
Inorganic arsenic (iAs) ^(a,c,d)	0.092	±	0.010	2.0

^(a) NIST IC/ICP-MS

^(b) NIST LC/MS/MS

^(c) NMJJ IC/ICP-MS

^(d) As (III) and As (V), reported as total inorganic arsenic (iAs)

Reference Mass Fraction Values for Selected Elements: Each reference mass fraction value is the mean result of NIST analyses using one method. The uncertainty provided is an expanded uncertainty about the mean to cover the measurand with approximately 95 % confidence. The expanded uncertainty is calculated as $U = ku_c$, where u_c represents the combined uncertainty, incorporating an uncertainty component for moisture correction, consistent with the ISO/JCGM Guide [4–5], and k is a coverage factor corresponding to approximately 95 % confidence [4]. The uncertainty for lead incorporates an uncertainty component for possible heterogeneity.

Table 3. Reference Mass Fraction Values (Dry-Mass Basis) for Selected Elements in SRM 1568b

Element	Mass Fraction (mg/kg)			Coverage Factor, k
Cobalt ^(a)	0.0177	±	0.0005	2.6
Lead ^(b)	0.008	±	0.003	2.6
Tin ^(c)	0.005	±	0.001	2.8

^(a) NIST INAA

^(b) NIST ID-ICP-MS

^(c) NIST RNAA

REFERENCES

- [1] May, W.; Parris, R.; Beck II, C.; Fassett, J.; Greenberg, R.; Guenther, F.; Kramer, G.; Wise, S.; Gills, T.; Colbert, J.; Gettings, R.; MacDonald, B.; *Definition of Terms and Modes Used at NIST for Value-Assignment of Reference Materials for Chemical Measurements*; NIST Special Publication 260-136 (2000); available at <http://www.nist.gov/srm/upload/SP260-136.PDF> (accessed Oct 2013).
- [2] Thompson, A.; Taylor, B.N.; *Guide for the Use of the International System of Units (SI)*; NIST Special Publication 811; U.S. Government Printing Office: Washington, DC (2008); available at <http://www.nist.gov/pml/pubs/sp811/index.cfm> (accessed Oct 2013).
- [3] Sharpless, K.E.; Duewer, D.L.; *Standard Reference Materials for Analysis of Dietary Supplements*; J. AOAC Int., Vol. 91, pp. 1298–1302 (2008).
- [4] JCGM 100:2008; *Evaluation of Measurement Data — Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement* (GUM 1995 with Minor Corrections); Joint Committee for Guides in Metrology (2008); available at http://www.bipm.org/utls/common/documents/jcgm/JCGM_100_2008_E.pdf (accessed Oct 2013); see also Taylor, B.N.; Kuyatt, C.E.; *Guidelines for Evaluating and Expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results*; NIST Technical Note 1297; U.S. Government Printing Office: Washington, DC (1994); available at <http://www.nist.gov/pml/pubs/tn1297/index.cfm> (accessed Oct 2013).
- [5] JCGM 101:2008; *Evaluation of Measurement Data – Supplement 1 to the Guide to Expression of Uncertainty in Measurement - Propagation of Distributions Using a Monte Carlo Method*; JCGM (2008); available at http://www.bipm.org/utls/common/documents/jcgm/JCGM_101_2008_E.pdf (accessed Oct 2013).
- [6] Efron, B.; Tibshirani, R.J.; *An Introduction to the Bootstrap*; Chapman & Hall, London, UK (1993).

Certificate Revision History: 23 October 2013 (Analyst added; editorial changes); 07 August 2013 (Original certificate date).

Users of this SRM should ensure that the Certificate of Analysis in their possession is current. This can be accomplished by contacting the SRM Program: telephone (301) 975-2200; fax (301) 948-3730; e-mail srminfo@nist.gov; or via the Internet at <http://www.nist.gov/srm>.