



**Universitat de les
Illes Balears**



**Universidad Autónoma
de Nuevo León**

**TESIS DOCTORAL
2015**

**ESTUDIO DE LA ACUMULACIÓN Y ESPECIACIÓN
DE ARSÉNICO EN CULTIVOS DE MAÍZ Y SU
RIESGO POTENCIAL PARA LA SALUD HUMANA**

José Martín Rosas Castor

Doctor/a per la Universitat de les Illes Balears



**Universitat de les
Illes Balears**



**Universidad Autónoma
de Nuevo León**

**TESIS DOCTORAL
2015**

**Programa de Doctorado en Ciencia y Tecnología
Química**

**ESTUDIO DE LA ACUMULACIÓN Y ESPECIACIÓN
DE ARSÉNICO EN CULTIVOS DE MAÍZ Y SU
RIESGO POTENCIAL PARA LA SALUD HUMANA**

José Martín Rosas Castor

Director: Dr. Víctor Cerdà (UIB)

Directora: Dra. Laura Ferrer (UIB)

Director: Dra. Laura Hinojosa Reyes (UANL)

Directora: Dr. Jorge Luis Guzmán Mar (UANL)

Tutor: Dr. José Manuel Estela Ripoll (UIB)

ESTUDIO DE LA ACUMULACIÓN Y ESPECIACIÓN DE ARSÉNICO EN CULTIVOS DE
MAÍZ Y SU RIESGO POTENCIAL PARA LA SALUD HUMANA

José Martin Rosas Castor

Departamento de Química /Facultad de Ciencias / Universidad de las Islas Baleares

Fecha de defensa de la tesis doctoral: Julio, 2015

Número de páginas: 186 Programa de Doctorado: Doctor en Ciencia y
Tecnología Química

Área de Conocimiento: Química Analítica Ambiental

Aprobación de la tesis:

Dr. Víctor Cerdà

Director de Tesis, UIB

Dra. Laura Ferrer

Co-Director de Tesis, UIB

Laura Hinojosa Reyes

Director de Tesis, UANL

Dr. Jorge Luis Guzmán Mar

Co-Director de Tesis, UANL

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar la transferencia de arsénico (As) del campo agrícola hacia la planta de maíz y el ser humano, en este trabajo fueron estudiados: 1) los parámetros fisicoquímicos del suelo sobre la acumulación y translocación de As en el cultivo, 2) la distribución de las especies de As en el agua, suelo y planta, 3) la fitodisponibilidad de As en el suelo agrícola, y 4) la bioaccesibilidad de As en el grano para el ser humano. Para tal propósito, se caracterizaron fisicoquímicamente el agua, el suelo y el cultivo de maíz de tres zonas agrícolas de San Luis Potosí (denominadas A, B y C) y se determinó el contenido de As mediante espectrometría de fluorescencia atómica acoplado a un sistema de generación de hidruros (HG-AFS). Los datos experimentales fueron analizados mediante análisis de conglomerados (cluster) y de componentes principales. La implementación de la metodología de extracción de especies de As en las partes del cultivo de maíz fue evaluada mediante estudios de recuperación. Las metodologías desarrolladas para la determinación de As biodisponible en el suelo agrícola y de As bioaccesible en el grano fueron automatizadas mediante el sistema de análisis por inyección en flujo multijeringa utilizando HG-AFS como detector y optimizadas mediante un diseño Doehlert.

En general, la concentración de As total en el cultivo de maíz fue en el orden: raíz >> tallo y hoja > grano. El As(V) fue la forma predominante en los lixiviados de suelo y presentó una correlación estadísticamente significativa ($p > 0.05$) con el As total en raíz, tallo y hoja de maíz. El pH del suelo presentó una correlación negativa con el As acumulado en el cultivo de maíz. Parámetros como el Fe y Mn en los suelos agrícolas están fuertemente correlacionados con la translocación de As al tallo.

Un método automatizado para la extracción secuencial de As en flujo fue desarrollado para evaluar el As extraíble y potencialmente disponible para los cultivos. El As potencialmente disponible fue >50% para todos los suelos analizados. El contenido de As extraíble asociado a las fracciones más lábiles fue mayor en la zona A que en la zona B, indicando que el As presente en el suelo agrícola de la zona A puede ser más disponible para el cultivo de maíz.

Un procedimiento de extracción para la determinación de las especies del As en el cultivo de maíz fue implementado. El contenido de As(III), la especie más tóxica, varió de 33 a 65% dependiendo de la parte de la planta. En general, las especies inorgánicas de As fueron las formas predominantes encontradas en la parte comestible para el ganado, lo cual sugiere un riesgo de envenenamiento importante.

Asimismo, un nuevo método de determinación de As bioaccesible a niveles traza en grano de maíz basado en la preconcentración mediante extracción en punto nube fue desarrollado presentando un límite de detección bajo ($0.96 \mu\text{g kg}^{-1}$ y $1.36 \mu\text{g kg}^{-1}$ para arroz y maíz, respectivamente) y un amplio rango lineal de trabajo ($0.41\text{-}20$ y $0.55\text{-}20 \mu\text{g L}^{-1}$ para arroz y maíz, respectivamente). La fracción de As bioaccesible en el grano de maíz de la zona A fue 72-82%, indicando que una alta proporción de As puede acceder al torrente sanguíneo y representar un riesgo para la salud humana. La atención cuidadosa a los parámetros que afectan la transferencia de As a través de la cadena alimenticia puede derivar en programas de prevención para la reducción de la exposición humana al As por consumo de maíz.

ABSTRACT

In order to evaluate the transfer of arsenic (As) from the agricultural soil to plant corn and humans, in this work were studied: 1) the physicochemical soil parameters on the accumulation and translocation of As in corn crop 2) the distribution of As species in water, soil and plant system, 3) the As bioavailability in agricultural fields, and 4) the bioaccessibility of As in corn grain. The irrigation water, soil and corn crops of three agricultural zones of San Luis Potosi, Mexico (tagged as A, B and C) were physicochemically characterized and the total As content was determined by atomic fluorescence spectrometry coupled hydride generation (HG-AFS). The experimental data were analyzed by Cluster Analysis and Principal Component Analysis. The implementation of extraction methodology for As species in corn plant parts was evaluated by recovery studies. The methodologies for the determination of bioavailable As in soil and bioavailable As in corn grain were automated by the Multi-Syringe Flow Injection Analysis coupled to HG-AFS detector. The results indicated that the total As concentration in corn crop was in the order: root >> stem and leaf > grain. As(V) was the predominant form in soil and leachate soils and those parameters showed statistical significance correlation ($p = 0.05$) with the total As in root, stem and leaf of corn. Soil pH was negatively correlated with the accumulated As in maize. The iron and manganese concentration in agricultural soils were strongly correlated with As translocation the stem. The potentially available As was > 50% for all analyzed soils. The content of As(III), the more toxic As species, was from 33 to 65% depending on the plant part. In general, the inorganic As species were the predominant As form found in the edible part for livestock, which suggests a significant risk of poisoning. The bioaccessible As content in corn grain of Zone A was 72-82% indicating a high As proportion can access the bloodstream. Careful attention should be paid to the parameters that affect the As transfer through the food chain can lead methodologies to reduce the human exposure to As for corn consumption.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a quienes hicieron posible la realización de este trabajo:

A la Dra. Laura Hinojosa Reyes y al Dr. Jorge Luis Guzmán Mar, Directora y Co-Director de mi tesis respectivamente, por su apoyo incondicional en este trabajo, por su asesoría, por compartir sus conocimientos y por todas las atenciones que tuvieron para mi persona.

Al Dr. Víctor Cerdà y a la Dra. Laura Ferrer, Director y Co-Directora de la UIB, por sus significativas observaciones en el campo de la química analítica y los sistemas automatizados, por su hospitalidad y apoyo brindado en todo momento.

Al Dr. Juan Manuel Alfaro, al Dr. Ulrico López y a la Dra. Ma. Teresa Garza por formar parte del Comité de Tesis, por sus valiosas sugerencias e interés en la revisión del presente trabajo.

A la Dra. Aracely Hernández Ramírez, al Dr. Ivan Pérez Maldonado y al Dr. Adolfo Caballero Quintero, por su importante contribución y facilidades otorgadas en el desarrollo y culminación de este proyecto.

A Dr. Lindomar Portugal por compartir sus conocimientos en el ámbito de la optimización y su ingenioso y destacado aporte en el proyecto.

A Angélica M. Cervantes Corona por su apoyo moral, contribución y entusiasmo mostrado en todo momento.

A la Facultad de Ciencias Químicas (FCQ) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), así como al Departamento de Química de la Universidad de

Islas Baleares (UIB) por permitirme el uso de sus equipos e instalaciones, y su invaluable ayuda en el desarrollo de este estudio.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y UANL por el apoyo económico para la realización de mis estudios (proyecto: UANL-PAICyT-CN885-11 y CONACYT/CB/167372; beca de manutención: CONACYT/247646).

A mi familia y amigos por el apoyo moral que siempre me han brindado, a todas las personas que contribuyeron de una forma u otra en la realización de este trabajo y a Dios nuestro señor por llevarme siempre de la mano.

A todos muchas gracias!

DEDICATORIA

A mis padres

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
RESUMEN	i
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA	v
TABLA DE CONTENIDO	vi
LISTA DE TABLAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xv
ACRÓNIMOS	xviii
1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1. Impacto de la acumulación de arsénico en maíz	4
1.2. Fuentes de contaminación de arsénico para el cultivo de maíz	6
1.3. Fitodisponibilidad del arsénico en suelo agrícola para el cultivo de maíz	9
1.4. Translocación de arsénico en la planta de maíz	10
1.5. Fitotoxicidad de arsénico en los cultivos de maíz	12
1.6. Arsénico en la cadena trófica y sus efectos en la salud humana	15
1.7. Exposición al arsénico en México por del consumo de maíz	18
2. ANTECEDENTES.	22
2.1. Evaluación de la transferencia de arsénico en el sistema agua-suelo-cultivo	22
2.2. Determinación de As(V), As(III), MMA y DMA de arsénico en cultivos	23

2.3. Fraccionamiento de arsénico en suelo agrícola	27
2.4. Biodisponibilidad de arsénico en grano de maíz	30
2.5 Alcance del proyecto	33
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	35
4. MATERIALES Y MÉTODOS	37
4.1. Ubicación y características de la muestra	37
4.2. Preparación de la muestra	39
4.3. Reactivos	40
4.4. Digestión de muestras agrícolas	43
4.5. Caracterización química de suelo agrícola, agua de riego y raíz de la planta de maíz	44
4.6. Análisis de especiación y del contenido de arsénico total en el sistema agua-suelo-planta de maíz	45
4.7. Parámetros de acumulación y translocación de arsénico	49
4.8. Fraccionamiento de arsénico en suelo agrícola	49
4.8.1. Preparación del suelo de enriquecido	49
4.8.2. Sistema automatizado de extracción secuencial BCR de tres etapas en flujo	50
4.8.3. Procedimiento analítico para el fraccionamiento de arsénico en suelo	53
4.9. Determinación de arsénico bioaccesible en maíz	58
4.9.1. Caracterización química de grano de maíz	58
4.9.2. Procedimientos de nixtamalización de maíz	58
4.9.3. Digestión gastrointestinal in vitro	59
4.9.4. Preconcentración de arsénico mediante extracción en punto nube	60
4.9.5. Estudios de recuperación	61

4.9.6. Sistema MSFIA-HG-AFS para la determinación de arsénico en extractos CPE	61
4.9.7. Procedimiento analítico para la determinación de arsénico bioaccesible en maíz	62
4.10. Análisis estadístico	65
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
5.1. Caracterización de agua en el suelo y el riego	67
5.2. Concentración de arsénico en el cultivo de maíz	71
5.3. Efecto de los parámetros químicos de la rizosfera en la acumulación de arsénico por el cultivo de maíz	75
5.4. Efecto del agua de riego en la distribución de arsénico en el campo de maíz	79
5.5. Translocación arsénico en el cultivo de maíz	84
5.6. Fraccionamiento de arsénico en el suelo agrícola	86
5.6.1. Fotoxidación de las especies de arsénico	87
5.6.2. Efecto del tratamiento por ultrasonidos en la extracción	88
5.6.3. Influencia de los flujos de Ar, H ₂ y N ₂	89
5.6.4. Efecto del flujo de eluente y la masa de la muestra	90
5.6.5. Estudio de los parámetros críticos	91
5.6.6. Parámetros analíticos	93
5.6.7. Validación del método	95
5.6.8. Aplicación del método automatizado para la extracción secuencial de arsénico en muestras de suelo agrícola	98
5.7. Especiación de arsénico en la planta de maíz	101
5.8. Determinación de arsénico bioaccesible en grano de maíz	108
5.8.1 Estudio de parámetros críticos	108
5.8.2. Estudio de recuperación y fotoxidación UV de las especies de arsénico.	115

5.8.3. Parámetros analíticos	116
5.8.4. Validación del método propuesto	119
5.8.5. Determinación de arsénico bioaccesible en muestras de maíz	119
6. CONCLUSIONES	123
BIBLIOGRAFÍA	127
APÉNDICES	138
A. Caracterización in situ del agua de riego	139
B. Metodologías para caracterización de suelo agrícola	140
C. Rango lineal de trabajo de las técnicas analíticas empleadas en la caracterización del sistema agua-suelo-planta de maíz	142
D. Secciones de la planta de maíz	143
E. Características de columna de intercambio aniónico Hamilton PRP-X100	144
F. Efecto del pH en la separación cromatográfica de As(III), DMA, MMA y As(V) por IC-HG-AFS	145
G. Señales analíticas de As(III), DMA, MMA y As(V) en estudios de recuperación	146
H. Análisis por Inyección en Flujo Multijeringa (MSFIA)	147
I. Autoanalysis v 5.0	149
J. Diseño Doehlert	151
K. Sistema de clasificación de texturas	152
L. Análisis de componente principal de parámetros en suelo agrícola	153
M. Análisis de conglomerados (cluster) de muestras de suelo agrícola	155
N. Optimización de la generación hidruros en el sistema MSFIA-HG-AFS para el fraccionamiento de arsénico en suelo agrícola	156
O. Intensidad de fluorescencia de arsénico en diferentes agentes extractantes evaluados	161

P. Optimización de la extracción en punto nube de arsénico mediante diseño factorial Doehlert	163
Q. Caracterización proximal de maíz y arroz	165
R. Efecto de la extracción en punto nube sobre la señal analítica de arsénico	166
S. Caracterización química de microelementos en maíz y arroz	168

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. ESTRUCTURA, TOXICIDAD Y PROPIEDADES QUÍMICAS DE ALGUNAS ESPECIES DE ARSÉNICO DE IMPORTANCIA AMBIENTAL	2
II. CONCENTRACIÓN DE ARSÉNICO EN SUELO Y AGUA DE RIEGO EN ZONAS AGRÍCOLAS CONTAMINADAS Y CONSUMIDORAS DE MAÍZ	8
III. CONCENTRACIÓN DE ARSÉNICO EN GRANO Y DERIVADOS DE MAÍZ	18
IV. PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN DE ARSÉNICO EN CEREALES	26
V. ESPECIACIÓN DE ARSÉNICO EN MUESTRAS DE CEREALES Y DERIVADOS (LAS CONCENTRACIONES SE PRESENTAN COMO VALORES PROMEDIO (MÍNIMO-MÁXIMO))	27
VI. COORDENADAS DE LOS PUNTOS DE MUESTREO DE SUELO AGRÍCOLA, MAÍZ Y AGUA DE RIEGO	39
VII. REACTIVOS Y CONDICIONES DE OPERACIÓN UTILIZADAS EN EL MÉTODO BCR CONVENCIONAL Y EL MÉTODO BCR EN FLUJO AUTOMATIZADO	42
VIII. CONDICIONES INSTRUMENTALES UTILIZADAS EN HG-AFS Y IC-HG-AFS	46
IX. DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO TOTAL EN LOS MATERIALES DE REFERENCIA CERTIFICADO DE LA COMISIÓN EUROPEA (IRMM)	47
X. PROCEDIMIENTO ANALÍTICO PARA LA EXTRACCIÓN SECUENCIAL DE ARSÉNICO EN SUELO AGRÍCOLA	57
XI. CONDICIONES DE OPERACIÓN UTILIZADAS EN EL ICP-AES	58

XII	PROCEDIMIENTO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO EN EL EXTRACTO DE CPE POR MSFIA-HG-AFS	64
XIII	CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL AGUA DE IRRIGACIÓN Y EL SUELO AGRÍCOLA	69
XIV	CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL SUELO AGRÍCOLA Y LA PLANTA DE MAÍZ	70
XV	CONCENTRACIÓN DE ARSÉNICO TOTAL EN CULTIVO DE MAÍZ	72
XVI	EFFECTO DE LOS PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS DE LA RIZOSFERA SOBRE LA ACUMULACIÓN DE ARSÉNICO POR EL CULTIVO DE MAÍZ (COMPONENTES PRINCIPALES DE LAS CONDICIONES DEL SUELO AGRÍCOLA DEL CAMPO DE MAÍZ)	79
XVII	EFFECTO DE LOS PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS DE LA RIZOSFERA SOBRE LA TRANSLOCACIÓN DE ARSÉNICO EN EL CULTIVO DE MAÍZ (COMPONENTES PRINCIPALES DE LAS CONDICIONES DEL SUELO AGRÍCOLA DEL CAMPO DE MAÍZ)	86
XVIII	CONCENTRACIONES DE LOS REACTIVOS UTILIZADAS PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LA SEÑAL	93
XIX	PARÁMETROS ANALÍTICOS PARA CADA FRACCIÓN DEL MÉTODO AUTOMATIZADO BCR	95
XX	FRACCIONAMIENTO DE ARSÉNICO EN SUELO AGRÍCOLA UTILIZANDO LOS MÉTODOS AUTOMATIZADO Y CONVENCIONAL DE EXTRACCIÓN SECUENCIAL BCR (n = 3)	97
XXI	PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN DE ARSÉNICO EN HOJA, TALLO Y RAÍZ DE LA PLANTA DE MAÍZ	105
XXII	RECUPERACIÓN DE ESPECIES DE ARSÉNICO EN RAÍZ, TALLO Y HOJA DE MAÍZ UTILIZANDO ÁCIDO NÍTRICO 0.15 M COMO AGENTE EXTRACTANTE	104
XXIII	RECUPERACIÓN DE LAS ESPECIES DE ARSÉNICO EN GRANO DE MAÍZ UTILIZANDO DIFERENTES AGENTES EXTRACTANTES	105
XXIV	PARÁMETROS EN LA OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN EN PUNTO NUBE.	110

XXV	DESEABILIDAD GLOBAL DE LAS SEÑALES ANALÍTICAS OBTENIDA PARA ARROZ Y MAÍZ	112
XXVI	ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN DE LAS ESPECIES DE ARSÉNICO EN ARROZ Y MAÍZ (ADICIÓN DE 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ DE DIGERIDO GÁSTRICO)	115
XXVII	PARÁMETROS ANALÍTICOS EN LA DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO BIODISPONIBLE	117
XXVIII	VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO BIODISPONIBLE	119
XXIX	ARSÉNICO BIOACCESIBLE EN MUESTRAS DE MAÍZ DE ZONA A (MATEHUALA, S. L. P.)	121
XXX	COEFICIENTES DE CORRELACIÓN DE PEARSON DE PARÁMETROS EN EL GRANO DE MAÍZ	122
A.I	RANGO DE TRABAJO DE LAS METODOLOGÍAS PARA LA DETERMINACIÓN DE ANALITOS	142
A.II	DIMENSIONES Y PARÁMETROS DE LA COLUMNA HAMILTON PRP-X100	144
A.III	MATRIZ DE CORRELACIÓN DE ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES	153
A.IV	VARIANZA TOTAL EXPLICADA DE ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES	154
A.V	HISTORIAL DE CONGLOMERACIÓN	155
A.VI	ANOVA DEL DISEÑO $2^{k+3}C$ PARA LAS FRACCIONES BCR	157
A.VII	ANOVA DE LA SEÑAL ANALÍTICA DE ARSÉNICO UTILIZANDO EL DISEÑO DOEHLERT	159
A.VIII	EECTO DE LA AGENTE EXTRACTANTE SOBRE LA SEÑAL ANALÍTICA DE ARSÉNICO	164
A.IX	TABLA DE ANOVA DE LA OPTIMIZACIÓN DE ARROZ Y MAÍZ	167

A.X	ANÁLISIS PROXIMAL PARA MAÍZ Y ARROZ	120
A.XI	FACTORES DE PRECONCENTRACIÓN DE ARSÉNICO (1-5 $\mu\text{g L}^{-1}$)	166
A.XII	DETERMINACIÓN MULTIELEMENTAL EN GRANO DE MAÍZ POR ICP-OES DESPUÉS DE DIGESTIÓN ÁCIDA	168

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Diagrama de potencial redox-pH de especies de arsénico en medio acuoso (25°C y 1 bar).	4
2. Tasa de consumo per cápita de maíz.	5
3. Fuentes de contaminación de arsénico para el cultivo de maíz.	7
4. La ingesta de arsénico por el consumo de alimentos y bebidas típicas de poblaciones rurales mexicanas: a) Los Ángeles, Durango y b) Lagos de Moreno, Coahuila.	21
5. Distribución de las zonas de muestreo.	39
6. Efecto del gradiente de concentración de buffer de fosfatos sobre los tiempos de retención de las especies de arsénico por HPLC-HG/AFS.	50
7. Sistema en flujo de extracción secuencial BCR de tres etapas.	53
8. Representación esquemática de extracción secuencial de arsénico por el sistema MSFIA-HG-AFS.	57
9. Sistema MSFIA-HG-AFS para la determinación de arsénico en digerido enzimático de maíz.	63
10. Efecto de As_{TWE} y $As(V)_{WE}$ en el factor de bioacumulación (BAF_{WE}).	74
11. Distribución de arsénico en la zona A de San Luis Potosí ($mg\ kg^{-1}$).	81
12. Puntajes de los componentes principales por punto de muestreo: CP1, CP2 y CP3.	82
13. a) Distribución de los puntos de muestreo y b) dendrograma para las muestras de suelo agrícola de un campo de maíz utilizando la agrupación "nearest neighbor" y la distancia Euclídea.	83
14. Señal analítica de las especies de arsénico antes ($As(V)$ y DMA) y después ($As(V)$ -F y DMA-F) del proceso de fotooxidación.	88
15. Efecto del tratamiento por ultrasonidos sobre la cinética de extracción de arsénico ($n = 3$).	89

16.	Efecto del caudal de extracción sobre la concentración de arsénico en la primera subfracción de F1.	92
17.	Cinética de la extracción secuencial de As de la muestra de suelo agrícola MTA-1 usando el método automatizado de extracción secuencial BCR (n = 3).	98
18.	Cinética de extracción secuencial de As en tres fracciones de las muestras de suelos agrícolas de la zona A y B utilizando el método automatizado de extracción secuencial BCR (n = 3).	100
19.	Concentración de arsénico de las fracciones (F1, F2 y F3) de las muestras de suelo agrícolas de las zonas A y B, utilizando el método automatizado de extracción secuencial BCR (n = 3).	101
20.	Diagrama de la evaluación de la metodología de extracción utilizada para la determinación de las especies de arsénico.	103
21.	Contenido de las especies de arsénico en las muestras de maíz de Matehuala, San Luis Potosí, México, ($LOD_{As(V)} 55 \mu\text{g kg}^{-1}$, $LOD_{As(III)} 90 \mu\text{g kg}^{-1}$, $LOD_{MMA} 310 \mu\text{g kg}^{-1}$, $LOD_{DMA} 250 \mu\text{g kg}^{-1}$).	107
22.	Transferencia de arsénico en el cultivo de maíz.	108
23.	Efecto del Tritón X-114 sobre la señal analítica del As(V) determinado por MSFIA-HG-AFS.	111
24.	Efecto de la concentración de DDTP y Tritón X-114 sobre señales analíticas de arsénico en digeridos de arroz (a) y maíz (b).	111
25.	Gráficos de superficie de respuesta y deseabilidad de la etapa de extracción en punto nube.	113
26.	Estudio de robustez al 10% de los parámetros críticos de la etapa de extracción de As en punto nube en digeridos de arroz (a) y maíz (b).	114
27.	Efecto del tiempo de fotooxidación UV sobre la intensidad de fluorescencia para los estándares de As(V) y DMA de $5 \mu\text{g L}^{-1}$.	116
A.1.	Imágenes de la caracterización <i>in situ</i> del agua de riego del municipio de Matehuala, San Luis Potosí, zona B.	139
A.2.	Hidrómetro utilizado en la determinación de las fracciones de arena, limo y arcilla en suelo agrícola.	141
A.3.	Imagen de una planta de maíz seccionada procedente de la Matehuala, San Luis Potosí (zona A).	143
A.4.	Efecto del pH sobre la resolución cromatográfica, fase móvil buffer de fosfatos 5 mmol L^{-1} .	145
A.5.	Cromatograma de las especies de As en la raíz del cultivo de maíz por IC-HG-AFS.	146

A.6.	Fotografía del módulo multijeringa.	148
A.7.	Fotografía del sistema de extracción secuencial automatizada de As en suelo agrícola.	148
A.8.	MSFIA-grama obtenido con el programa AutoAnalysis aplicando a estándares de F1 (ácido acético 0.11 mmol L ⁻¹).	149
A.9.	Interface del programa AutoAnalysis utilizado en programación de las etapas del fraccionamiento de suelo por el sistema MSFIA-HG-AFS.	150
A.10.	Representación esquemática del diseño Doehlert.	151
A.11.	Sistema de clasificación de texturas propuesto por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura (FAO).	152
A.12.	Gráfico de sedimentación.	154
A.13.	Diagramas de Pareto del efecto de la concentración de NaBH ₄ , HCl y agente reductor (tiourea-ácido ascórbico o cloruro de hidroxilamina) sobre la señal analítica de arsénico en fracción BCR (F1, F2 y F3).	156
A.14.	Gráfico de superficie de respuesta de la señal analítica de arsénico en F1 y F2.	158
A.15.	Valores observados vs valores calculados a partir del modelo de la optimización de la señal analítica de arsénico en F1 (Error puro: 9373) y F2 (Error puro: 61205).	160
A.16.	Curvas de calibración de arsénico en agentes extractante del metaloide en el grano de maíz.	161
A.17.	Valores predichos a partir de los modelos de interacción de 2 vías de la extracción en punto nube para arroz (a) y de 3 vías para maíz (b).	163
A.18.	Superficie de respuesta de la optimización de la extracción en punto nube para arroz (a) y de 3 vías para maíz (b).	163
A.19.	Efecto de la matriz sobre la señal analítica de arsénico con (a) y sin (b) empleo de la extracción en punto nube.	167

ACRÓNIMOS

AAS	Espectroscopia de absorción atómica
AC	Análisis de Conglomerados (cluster)
ACP	Análisis de Componentes Principales
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AES	Espectroscopia de emisión atómica
AFS	Espectrometría de fluorescencia atómica
ANOVA	Análisis de la varianza
As(III)	Arsenito
As(V)	Arseniato
B	Bureta
BAF	Factor de bioacumulación
BCR	Procedimiento de Referencia de la Comunidad Europea
C	Cámara de ultrasonido
Co	Concentración
CP	Componente principal
CPE	Extracción en punto nube
CR	Coefficiente de riesgo
CRM	Material de referencia certificado
D	Detector de fluorescencia atómica
d_A/d_M	Deseabilidad individual
DDTP	o,o-dietilditiofosfato
DE	Desviaciones estándar
D_G	Deseabilidad Global
DMA	Ácido monometilarsónico
EPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos
Ex	Válvulas solenoides de tres vías
F	Cámara de separación de fases
F1/F2/F3	Agentes extractantes BCR
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la alimentación
FIA	Análisis por inyección de flujo
F_o	Flujo
FP	Factor de preconcentración
FR	Factor de recuperación
G	Grano
GSH	Fitoquelatina ascórbico-glutación
HC	Bucle de carga
HG	Sistema de generación de hidruros
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
IC	Cromatografía iónica
ICP	Plasma acoplado inductivamente

IF	Intensidad de fluorescencia
IRMM	Instituto de materiales de referencia certificados
ISTP	Ingesta Semanal Provisional Tolerable
IT	Índice de tolerancia
JECFA	Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios
LD₅₀	Dosis letal 50
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
MMA	Ácido dimetilarsínico
MP	Microbomba
MTA	Puntos de muestreo de Matehuala , zona A
MTB	Puntos de muestreo de Matehuala , zona B
MS	Espectrometría de masas
MSFIA	Análisis por inyección en flujo multijeringa
n	Numero de replias
NIST	Instituto Nacional de Estándares y Tecnología de los Estados Unidos
OMS	Organización Mundial de la Salud
p	Valor de probabilidad
PC	Fitoquelatinas
PEEK	Polieteretercetona
PTFE	Politetrafluoroetileno
ps	Peso seco
r	Coefficiente de correlación de Pearson
R	Recuperación
RC	Bucle de reacción
RSD	Desviación estándar relativa
S	Columna de suelo
SIA	Sistema de inyección secuencial
ST	Semolina de trigo
Sx	Jeringa
T	Temperatura
TFA	Ácido trifluoroacético
TOC	Carbono orgánico total
Tx	Tanque de homogenización
VA/VB	Válvulas de conmutación
UV	Ultra violeta
VR	Puntos de muestreo de Villa de Ramos, zona C
W	Desecho

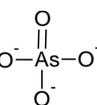
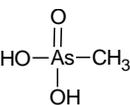
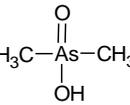
CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

El arsénico (As) es altamente tóxico y representa una amenaza para la salud humana y el medio ambiente. La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés) clasifica al As como carcinógeno humano [1]. La exposición crónica a As puede presentar efectos neurológicos, cardiovasculares, respiratorios, gastrointestinales, y hematopoyéticos [2]; y manifestarse en condiciones tales como lesiones en la piel, carcinoma, queratosis y la enfermedad del pie negro [3].

Este elemento se encuentra ampliamente distribuido en la superficie terrestre, ya sea como especies inorgánicas (arsenito, As(III) y arseniato, As(V)) u orgánicas (ácido dimetilarsínico DMA y ácido monometilarsónico, MMA). La fitodisponibilidad, movilidad en suelo, toxicidad y biodisponibilidad del As son afectadas por la forma química que este presenta [2]. En general, las especies inorgánicas se consideran más tóxicas que las especies orgánicas (Tabla I). La forma oxidada, As(V), es la más abundante en la naturaleza y se encuentra normalmente en depósitos sedimentarios ya que está fuertemente enlazada a los minerales del suelo, particularmente a los óxidos e hidróxidos metálicos coloidales, mediante enlaces iónicos [4]. El As(III), especie estable en condiciones reductoras (Figura 1), presenta una mayor movilidad en suelo que As(V). Las especies orgánicas, MMA y DMA, presentan una movilidad similar a su análogo inorgánico, As(V), y se encuentran presentes en el medioambiente frecuentemente como subproducto de la acción microbiana.

TABLA I
ESTRUCTURA, TOXICIDAD Y PROPIEDADES QUÍMICAS DE ALGUNAS
ESPECIES DE ARSÉNICO DE IMPORTANCIA AMBIENTAL

Espece de arsénico	Estructura química	pK _a ^a	LD ₅₀ (g kg ⁻¹)	Respuesta genotóxica (µg mL ⁻¹)	Genotoxicidad <i>in vitro</i> (mmol L ⁻¹)
As(III)		9.3	0.014 ^b , 0.034 ^c	1-2	>300
As(V)		2.2	0.020 ^b , 0.041 ^c	10-14	>1,000
		7.0			
MMA		3.6	0.7-1.8 ^b , 0.7 ^c	2,500-5,000	>3,000
		8.2			
DMA		1.8	0.7-2.6 ^b , 3.3 ^c	10,000	>300
		6.1			

^a, [5]; ^b, [6]; ^c, [7], DL₅₀, Dosis Letal 50

Las concentraciones de As en suelos no contaminados oscilan entre 0.1 y 40 mg kg⁻¹ con 10 mg kg⁻¹ como valor promedio [8]. Existen fuentes naturales y antropogénicas de As que pueden contribuir al incremento de los niveles de este metaloide. Las fuentes más comunes de As en el medio natural son las rocas volcánicas, las rocas sedimentarias marinas, los yacimientos hidrotermales minerales y los combustibles fósiles incluyendo el carbón y el petróleo [9, 10]. De manera similar, contenidos superiores al valor promedio de arsénico en suelo han sido asociados con suelos ricos en uranio, selenio, oro y antimonio [11, 12]. Las actividades antropogénicas como la minería, actividades industriales y uso de pesticidas, han contribuido también al incremento de la

concentración de As en el ambiente [13, 14]. Altas concentraciones de As han sido detectadas en diversas partes del mundo [2, 9, 15].

Algunas regiones en México presentan problemas serios de contaminación por As en agua subterránea y suelo presentando niveles de As que exceden los límites máximos permitidos por la EPA para uso agrícola ($1000 \mu\text{g L}^{-1}$ y 20 mg kg^{-1} [16], respectivamente). En México, la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 [17] establece la concentración máxima de As total en suelo de uso agrícola en 22 mg As kg^{-1} . Los problemas de contaminación por As son especialmente relevantes en un distrito minero en San Luis Potosí, donde cuerpos minerales de sulfuro de Ag-Pb-Zn y Au-Cu han sido extraídos durante más de 200 años reportando concentraciones de As de 6765 mg L^{-1} y 1932 mg kg^{-1} en el agua y el suelo, respectivamente [18-20]. La presencia de As en zonas agrícolas destinadas al cultivo de alimentos de alto consumo como el maíz es motivo de preocupación. Estudios realizados por Su *et al.* [21] reportaron que cultivos de cereales como arroz, trigo y cebada presentan una considerable capacidad de translocación de As; 84, 45 y 63%, respectivamente. Algunos estudios reportan contenidos As total en granos y derivados de cereales como arroz (*Oryza sativa*) y trigo (*Triticum aestivum*), de $60\text{-}780 \mu\text{g kg}^{-1}$ [22-26] y $14\text{-}17 \mu\text{g kg}^{-1}$ [27], respectivamente, lo cual revela el alto contenido del metaloide en alimentos de alto consumo como los cereales.

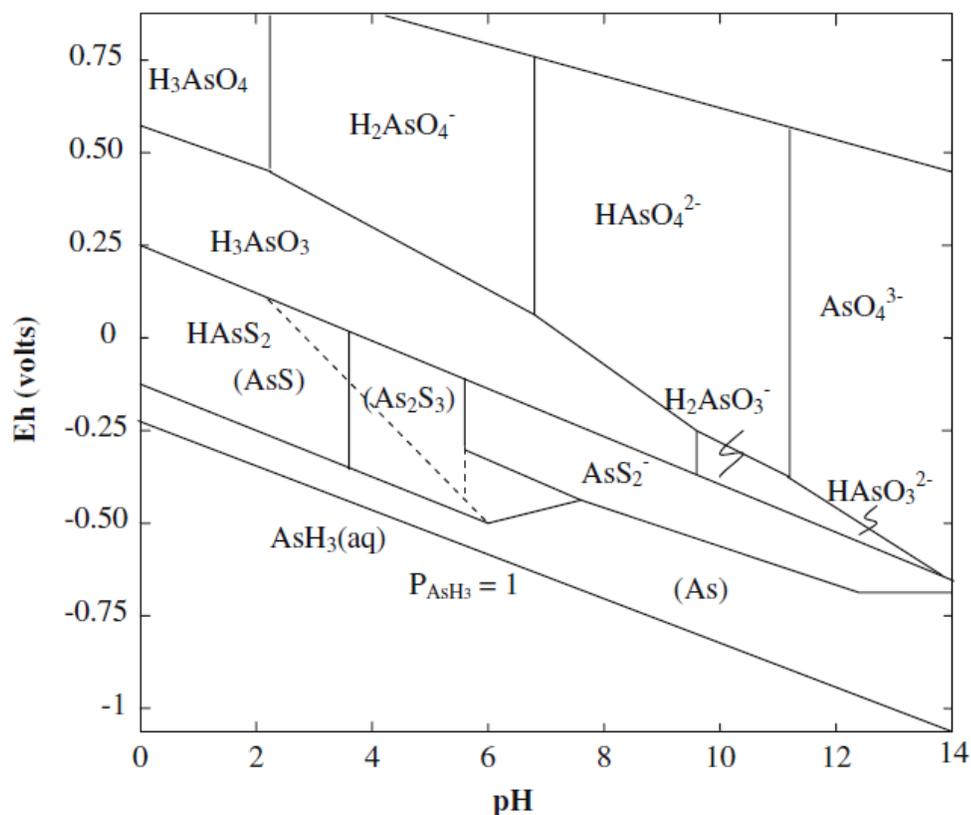


Figura 1. Diagrama de potencial redox-pH de especies de arsénico en medio acuoso (25°C y 1 bar) [28].

1.1. Impacto de la acumulación de arsénico en maíz

El maíz es un alimento básico para más de 200 millones de personas en muchas regiones como América Latina, África subsahariana y el sureste de Asia, que han sido descritas como zonas contaminadas con As [29]. El consumo per cápita de los principales países consumidores de maíz se muestra en la Figura 2. La producción mundial de maíz en el 2011 alcanzó los 883 millones de toneladas, cifra mayor que la reportada para trigo (704 millones de toneladas), cebada (134

millones de toneladas) y arroz (723 millones de toneladas) [30]. Este cereal tiene múltiples usos y un alto valor nutritivo, rico en aminoácidos como metionina y cisteína, proporcionando un estimado del 15% y 20% de la ingesta mundial de proteínas y calorías, respectivamente [29]. Este cereal es procesado en más de 600 productos, incluyendo tortillas, bebidas y una amplia gama de productos tradicionales y especialidades. En países con alto consumo de maíz, una alta concentración de As en grano puede representar un riesgo para los consumidores locales.

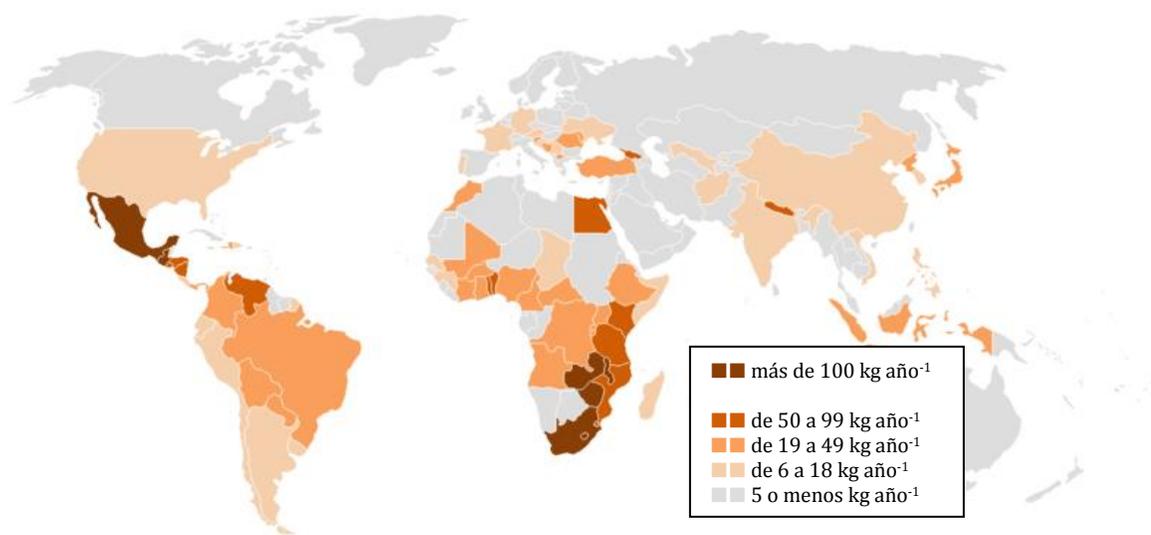


Figura 2. Tasa de consumo per cápita de maíz [31].

1.2. Fuentes de contaminación de arsénico para el cultivo de maíz

Las plantas de maíz pueden estar expuestas al As a través de diversas fuentes. Las plantas toman el As presente naturalmente en el suelo agrícola o el As añadido a través del riego procedente de aguas subterráneas o aditivos agrícolas contaminados (Figura 3). Diversos estudios han mostrado que los países con alta producción de maíz, por ejemplo, China, Argentina, India y México (11.6, 2.8, 2.6 y 0.8 millones de toneladas en 2011, respectivamente) [30], presentan regiones donde se supera la concentración promedio mundial de fondo de As en suelo (10.0 mg kg^{-1}) y el límite máximo permisible para el suelo agrícola de 20.0 mg kg^{-1} recomendado por la EPA [1]., los resultados se muestran en la Tabla II. Asimismo, la concentración de As en el agua subterránea de estas áreas presenta valores superiores al límite máximo permisible recomendado para el agua de riego (1.0 mg L^{-1}) [1]. Diversos estudios han reportado una correlación significativa entre la concentración de As en agua de riego o en suelo agrícola y el contenido de As total acumulado por el cultivo de maíz. Por ejemplo, Prabpai *et al.* [32] encontraron que la concentración de As acumulado en la planta de maíz correlacionó significativamente ($p < 0.03$) con el As total presente en el suelo agrícola de una región de Tailandia fertilizada con diferentes proporciones (20-80%) de residuos sólidos urbanos (2 mg As kg^{-1}). La concentración de As en el suelo agrícola modificado varió en el intervalo de $194\text{-}1055 \text{ } \mu\text{g As kg}^{-1}$ peso seco (ps) y en el grano de maíz de $23\text{-}32 \text{ } \mu\text{g As kg}^{-1}$ ps. Del mismo modo, Gulz *et al.* [33] reportaron una

relación lineal entre la concentración de As total en el suelo y la absorción de As por la raíz del maíz en suelos calcáreos y arenosos. En el mismo estudio, un alto coeficiente de correlación entre el As soluble en el suelo y la acumulación de As por las raíces fue calculado. El agua subterránea ha sido también identificada como la fuente principal de contaminación de As en algunas regiones agrícolas. Por ejemplo, en la Comarca Lagunera, México, Rosas *et al.* [16] encontraron que el contenido de As(V), As(III) y la suma de estas especies inorgánicas en el agua subterránea se correlacionaron significativamente con el contenido de As extraíble en el suelo agrícola a una profundidad de 0-30 cm ($p < 0.01$).

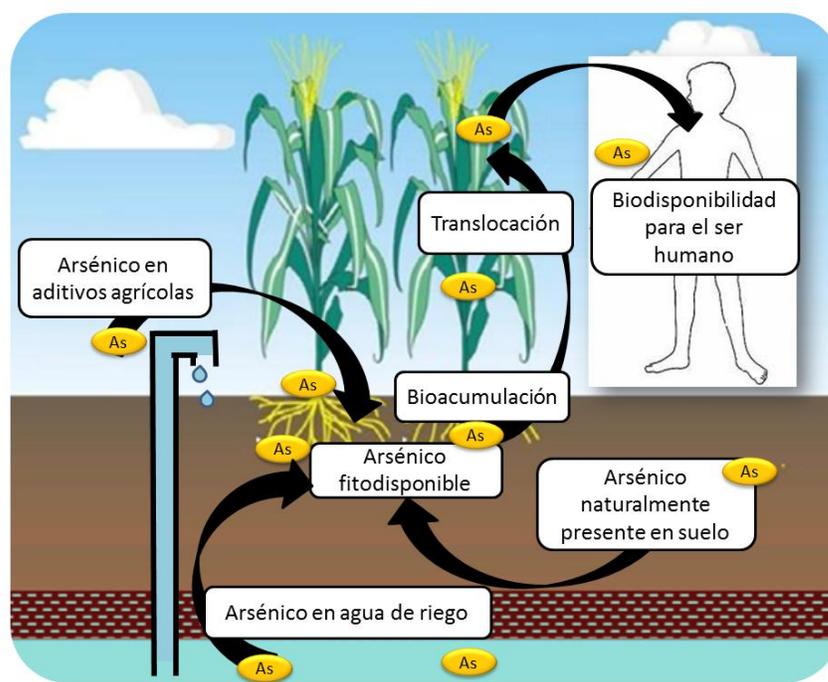


Figura 3. Fuentes de contaminación de arsénico para el cultivo de maíz.

TABLA II
 CONCENTRACIÓN DE ARSÉNICO EN SUELO Y AGUA DE RIEGO EN
 ZONAS AGRÍCOLAS CONTAMINADAS Y CONSUMIDORAS DE MAÍZ

Zona, país	Concentración de arsénico		Referencia
	Suelo agrícola (mg As kg ⁻¹)	Agua subterránea (µg As L ⁻¹)	
San Luis Potosí, México	1932	6765	[18, 19]
Comarca Lagunera, México	30	412	[16, 34]
Chihuahua, México	35.3	-	[35]
Hidalgo, México	97.3	1090	[16, 36]
Baja California, México	-	<410	[20]
Sonora, México	-	2-305	[20]
Tlahualilo, Durango, México	-	357	[16]
Gómez Palacio, Durango, México	-	42.7	[16]
Este de Bengal, India	-	170	[37]
Hetao Plain, Inner Mongolia, China	-	76-1093	[15]
La Pampa, Argentina	-	0.3-1326	[9]

La fitodisponibilidad de As en los suelos agrícolas para el cultivo de maíz fertilizados con estiércol de gallina ha sido evaluada en diversos estudios. La presencia de As en el estiércol de aves de corral puede ser atribuida al empleo de roxarsona (ácido 4-hidroxi-3-nitrobenzeno arsónico) como aditivo en la alimentación para pollos de engorda. La roxarsona sigue empleándose como aditivo en piensos para pollos en diversos países, como Argentina, Canadá, Brasil, Chile, México, Venezuela, Indonesia, Jordania, Malasia, Pakistán, Filipinas, Vietnam y Australia. D'Angelo *et al.* [38] estimaron la transferencia de As a la planta de maíz en suelo agrícola modificado con estiércol donde fueron reportados altos niveles de As en la viruta de los gallineros (0.6 a 43.4 mg As kg⁻¹); sin embargo, la concentración de As en los cultivos de maíz de suelos agrícolas convencionales no presentó una diferencia significativa con la concentración de los suelos fertilizados

con estiércol de gallina durante dos años. El efecto de la adición de estiércol de aves de gallineros con alto contenido de roxarsona en suelos agrícolas sobre la acumulación de As en el cultivo de maíz fue estudiado por Liebhardt *et al.* [39], quien reportó que la aplicación de excremento de ave no afectó significativamente la acumulación de As en el grano de maíz. La concentración de As en grano varió de 40 a 60 $\mu\text{g kg}^{-1}$ [39].

1.3. Fitodisponibilidad del arsénico en suelo agrícola para el cultivo de maíz

El As presente en el suelo agrícola y el agua de riego puede acceder a las plantas a través de las raíces produciendo efectos fitotóxicos para algunos cultivos. En general, las plantas son capaces de tolerar 2 mg kg^{-1} de As en el suelo [40]; sin embargo, una alta concentración de As es tóxica para los cultivos, causando necrosis, clorosis, inhibición de crecimiento y finalmente, la muerte [33]. La concentración de As en las partes comestibles de los cultivos dependen de la biodisponibilidad del As en el suelo. En general, la fitodisponibilidad de una sustancia depende de su abundancia, forma química y su grado de adsorción en las partículas del suelo [41], así como de la capacidad de la planta para absorberlo y trasladarlo a los órganos diana. Existen reportes donde el As fitodisponible presentó una mayor correlación con el As total soluble que el contenido total de As en suelo [33]. Sadiq *et al.* [42] reportaron que la concentración de As en maíz cultivado en suelos calcáreos correlacionó significativamente ($p < 0.05$) con el

contenido de As en el extracto acuoso, pero no con la concentración de As total y con la fracción extraíble en ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA). En estudios realizados por Gulz *et al.* [33], la correlación del As total acumulado entre la planta de maíz y la fracción de As soluble en agua fue mayor que con el contenido de As total en el suelo. Cabe destacar que numerosos estudios de absorción de As por las plantas han sido realizados considerando únicamente efecto de la dosis de As total aplicada a los suelos sin tener en cuenta su solubilidad. La solubilidad del As en suelo agrícola puede variar enormemente de un lugar a otro en función de las condiciones del suelo. Algunos parámetros fisicoquímicos del suelo, tales como pH, potencial redox, contenido de materia orgánica, textura, y concentraciones de algunos elementos (aluminio, hierro, manganeso y fósforo) pueden afectar dramáticamente la solubilidad de As [10, 16, 43]. La absorción de As por plantas comestibles es considerado un paso crítico en la transferencia de As en la cadena alimentaria y en el grado de exposición humana a este metaloide.

1.4. Translocación de arsénico en la planta de maíz

Una vez que el As es absorbido por las raíces, es transportado hasta la parte alta del cultivo. Los seres humanos y el ganado pueden estar expuestos al As a través del consumo de plantas y vegetales contaminados [44]. La transferencia de As dentro del cultivo varía con la especie. El arroz, el trigo, y la cebada, cultivadas en el mismo tipo de suelo mostraron eficiencias de translocación hacia el grano de 9, 6 y 2%, respectivamente [21]. Adicionalmente, la transferencia de As dentro de una misma especie puede ser afectada por la variedad y el estado temporal del

cultivo, así como por las propiedades del suelo agrícola incluyendo el contenido total y las especies de As. Después de tres días de crecimiento, los valores de translocación de raíz hacia las hojas en dos variedades de *Zea mays*, *Azad kamal* (AK) y *Azad uttam* (AU) fueron de 34.0, 23.3 y 28.7% (para AK) y 69.3, 38.5 y 26.0% (para AU) para niveles de 2.5, 7.5 y 12.5 mg As(V) mL⁻¹, respectivamente; eficiencias de translocación relativamente altas pueden ser atribuidas a las altas concentraciones de As y el corto período de crecimiento [21]. Zeng *et al.* [10] reportaron que el transporte y la distribución de As variaron con el estado de crecimiento de la planta. La concentración de As total en los tejidos vegetativos aumentó predominantemente durante las primeras dos semanas después de la fase de floración, y el As inorgánico fue transportado principalmente dentro de la cariósida durante el desarrollo del grano. Por otro lado, Gulz *et al.* [33] encontraron una menor translocación en el tallo y hoja de la planta de maíz cultivada en suelo franco limoso (0.4%) que en el suelo franco arenoso (4.7%) para una concentración de As soluble en ambos suelos de 2.8 mg kg⁻¹. Aunque la concentración de As en la raíz del maíz cultivado en suelo franco limoso fue 1.7 veces mayor que en suelo franco arenoso, la concentración de As determinada en el grano de este último fue mayor (0.100 ± 0.001 mg As kg⁻¹) debido a su mayor translocación. Un estudio realizado por Raab *et al.* [45] en condiciones hidropónicas con 46 especies de maíz mostró que el DMA fue más eficientemente translocado hacia el tallo que As(V) y MMA (3 y 10 veces, respectivamente).

1.5. Fitotoxicidad arsénico en los cultivos de maíz

Generalmente, el incremento de la concentración As produce efectos tóxicos para los cultivos como la necrosis, clorosis, inhibición de crecimiento y finalmente la muerte [33]. En estudios realizados por Ci *et al.* [46], las concentraciones de 12.5 y 25 mg As kg⁻¹ en el suelo promovieron el crecimiento del maíz y la mejor calidad nutricional del grano, mientras que concentraciones más altas (50 y 100 mg As kg⁻¹ de suelo) presentaron efectos tóxicos para el cultivo. La correlación negativa entre el contenido de As en los tejidos vegetales y el desarrollo de los cultivos ha sido ampliamente demostrada. Woolson *et al.* [47] observaron una correlación lineal significativa ($p < 0.05$) entre el logaritmo de la concentración de As en la fracción soluble del suelo y la reducción del crecimiento en el maíz. Las variedades *Zea mays* difieren en su capacidad para tolerar el As. Mallick *et al.* [48] evaluaron la resistencia a As de dos variedades de *Zea mays* y encontraron que el peso fresco y la longitud de la raíz fueron afectados en mayor grado para *Azad uttam* que para *Azad kamal*; y el contenido de clorofila total a los 7 días fue menor en *Azad uttam* que en *Azad kamal*. Estos resultados indicaron que la variedad *Azad kamal* presentó mayor tolerancia a As. El grado de la fitotoxicidad del As varía con su forma química y la variedad de maíz. La toxicidad relativa de acuerdo con el índice de tolerancia (IT, (tamaño de la raíz del tratamiento con adición de As)/(tamaño de la raíz control) x 100)) en condiciones hidropónicas ha sido reportado como As(V) > As(III) >> DMA [49].

La alta toxicidad As(V) en las plantas es atribuida principalmente a la contribución de dos factores. Concentraciones altas de As pueden reducir la absorción de fosfato del suelo agrícola ya que la presencia de As(V) en las plantas puede producir un estrés oxidativo a través de la alteración de la síntesis de trifosfato de adenosina y el contenido del grupo fosfato en el ADN. El As(V) también puede interactuar con los grupos sulfhidrilo y tioles de aminoácidos como la cisteína presente en enzimas antioxidantes tales como la superóxido dismutasa, y fitoquelatina ascórbico-glutación (GSH). Mallick *et al.* [48] reportaron que en un tratamiento hidropónico con As ($12.5 \mu\text{g As mL}^{-1}$, 3 días), la actividad de la superóxido dismutasa y GSH en la variedad de maíz *Azad kamal* aumentó considerablemente, y el incremento fue mayor que en la variedad *Azad uttam*. Superóxido dismutasa y GSH desempeñan un papel fundamental en la primera línea de defensa contra los radicales generados durante el estrés oxidativo [50]. El incremento de la producción de superóxido dismutasa resultante de la toxicidad de As ha sido reportado en plantas hiperacumuladoras y especies de helechos sensibles [51], los cultivos de *Holcus lanatus* [52] y de maíz [53]. Las fitoquelatinas (PC) juegan un papel importante en el proceso de desintoxicación de As en los cultivos. Bajo la exposición de As, las PC de diferentes longitudes de cadena ($n = 2-4$) pueden ser sintetizadas en la planta y complejar al As. Schulz *et al.* [54] reportaron la producción de PC en diferentes especies vegetales evaluadas y encontraron que en los cultivos de maíz, la PC 3 fue el componente mayoritario inducido por exposición a As ($248, 698, \text{ y } 210 \mu\text{g g}^{-1}$ para los PC 2, 3, y 4,

respectivamente). Resultados similares fueron reportados por plantas como *Leonurus marrubiastrum*, *Glechomona hederácea*, y *Urtica dioica*, en las que el PC 3 fue también la sustancia de mayor incremento después del tratamiento con As [54].

Durante el proceso de intoxicación por As, hay un cambio en el estado nutricional de la planta, especialmente en el contenido de los elementos, tales como Mg, K y Ca. Najmowicz *et al.* [55] reportaron que la concentración de Mg aumentó con el incremento de los niveles de As en la raíz y la parte aérea de la planta de maíz. El potasio, un macronutriente requerido en altas concentraciones, constituye hasta el 10% del peso seco de la planta, y su contenido se ve afectado significativamente en cultivos contaminados con As. Una disminución en un 60% del nivel de potasio en el maíz después del tratamiento con As ha sido descrito por Pearson *et al.* [56]. Esta disminución puede estar asociada a la aglomeración de placas en el interior del sistema de raíces que reduce la translocación de nutrientes [48]. Una concentración de potasio por debajo de 10 g kg^{-1} puede ser considerada como deficiente para ciertas plantas mostrando alteraciones funcionales y en casos severos, la muerte de los meristemos laterales y terminales [48]. Una concentración de calcio mayor en hojas en las dos variedades de maíz a los 7 días de la exposición a As en comparación con el experimento control ha sido reportada [48]. Los aumentos en los niveles de Ca han sido asociados con una respuesta de estrés oxidativo de los tejidos vegetales. Dentro de la función celular, el calcio actúa como un eliminador de radicales libres y como un segundo mensajero, y por lo tanto, juega un papel importante en la determinación de la estabilidad oxidativa

[48]. En lo referente a los niveles de P, Mallick *et al.* [48] reportaron que la concentración de P aumentó en las plantas a los 7 días de la exposición a As, que se atribuyó a la recolección ineficaz de nutrientes inmóviles bajo condiciones de estrés oxidativo [57]. Aunque los minerales, como Fe y Mg, presentan una participación en la formación de placas en la superficie de la raíz, estos minerales muestran un lento ascenso de las partes aéreas de maíz, y por lo tanto, el efecto que sobre sus concentraciones no es del todo claro [48].

1.6. Arsénico en la cadena trófica y sus efectos en la salud humana

Los seres humanos y el ganado pueden estar expuestos al As, entre otras vías, a través del consumo de plantas y vegetales contaminados [44]. El maíz es utilizado comúnmente como alimento para ganado, por lo que el As puede ser consumido por animales de granja a través del silaje de maíz, representando a su vez un riesgo para la salud humana a través del consumo de productos de origen animal contaminados. Diversos estudios de campo han reportado que el contenido total de As en el tallo y la hoja de los cultivos de maíz varían desde 640 hasta 3000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ [16, 32, 58-61]. En países como Suiza, el límite máximo permisible de As en piensos es de 4 mg kg^{-1} .

Para el ser humano, la exposición vía oral es considerada el modo de transferencia de As más importante [62], particularmente, la ingesta directa de agua y el consumo de productos agrícolas contaminados [44]. Ci *et al.* [46]

reportaron que la concentración de As en el grano cuando el maíz fue cultivado en concentraciones de As superiores a 50 mg As kg^{-1} de suelo, superó 0.7 mg kg^{-1} (límite máximo permisible en China). En el caso de toxicidad aguda, dosis orales tan bajas como $20\text{-}60 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ han sido reportadas como causante de efectos tóxicos en algunos individuos [63]. La dosis letal aguda para seres humanos ha sido estimada en aproximadamente $0.6 \text{ mg kg}^{-1}\text{día}^{-1}$ [63]. En un estudio, una dosis estimada en 3 mg día^{-1} durante un período de 1-2 meses fue fatal para el 1% de un grupo de niños que recibieron leche contaminada con As [64]. Concentraciones menores de As a estos valores pero en un periodo de exposición mayor también pueden afectar la salud humana. Tseng *et al.* [65] reportaron una tasa de incidencia del 18% para hiperpigmentación y 7% para hiperqueratosis en una población taiwanesa cuya agua potable contenía una concentración media de arsénico de $0.4\text{-}0.6 \text{ mg L}^{-1}$. También se reportaron anomalías cutáneas en el 40% de los pacientes que consumieron la disolución de Fowler (trióxido de arsénico al 1% m v^{-1}) durante un periodo de 6 a 26 años [66]. La enfermedad del pie negro (una condición causada por arteriosclerosis y tromboangitis obliterante), se produjo en el 0.9% de dicha población [65]. En Nagarparkar, Pakistán, la población local de 7-15 años de edad presentó riesgo de intoxicación crónica por ingesta de As asociado al consumo de agua y grano de maíz (el índice de riesgo que fue muy superior a la del valor de referencia indicando) [67]. De acuerdo a la EPA, la dosis de referencia de exposición oral a As para toxicidad subcrónica y crónica no carcinógenas es de $0.3 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ [1].

Las especies inorgánicas, As(V) y As(III), presentan una mayor toxicidad que las especies orgánicas, por ej. MMA y DMA, y han sido asociadas con diversos tipos de cáncer [68]. La especie inorgánica oxidada, el As(V), es un análogo molecular del fosfato y puede inhibir la fosforilación oxidativa [3], y por otro lado, el As(III), considerado la especie más tóxica del As, puede enlazarse a los grupos sulfidrilo y afectar la función de una amplia gama de proteínas y enzimas [3]. En el cuerpo humano, el As inorgánico es metilado vía glutatión a las especies pentavalentes: MMA, DMA, y óxido de trimetilarsénico. Este proceso requiere de la reducción metabólica de As(V) a As(III), por lo cual, el ácido monometilarsónico [MMA(III)], el ácido dimetilarsónico [DMA(III)], y la trimetilarsina [TMA(III)] son los productos metabólicos generados [69]. Estudios recientes muestran que los metabolitos del As trivalente metilado son altamente tóxicos; el DMA(III) ha mostrado ser la causa de diversos efectos genotóxicos y/o clastogénicos tales como roturas en las cadenas de ADN, la formación de sitiosapurínicos/apirimidínicos, daño oxidativo al ADN, entrecruzamiento ADN-proteína, aberraciones cromosómicas y aneuploidía [70, 71]. Una Ingesta Semanal Tolerable Provisional (ISTP) de no más de 15 mg As inorgánico kg^{-1} peso corporal ha sido establecida por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/Organización Mundial de la Salud (FAO/OMS) y el Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) [72].

Para algunos países al nivel máximo permitido es de 300 $\mu\text{g As kg}^{-1}$ [33]. En países como Suiza, un contenido de As superior a 200 $\mu\text{g As kg}^{-1}$ se considera inseguro para el consumo humano [61]. La Tabla III presenta las concentraciones

de arsénico en grano y derivados de maíz que han sido reportados en diversos estudios. Las concentraciones de As total en grano han sido reportadas entre 40 y 1130 $\mu\text{g kg}^{-1}$, y la proporción de As inorgánico con respecto al total de As fue 50-73%.

TABLA III
CONCENTRACIÓN DE ARSÉNICO EN GRANO Y DERIVADOS DE MAÍZ

Alimento	Región	A_T (mg kg^{-1})	A_i (%)	Referencia
Grano de maíz	Delaware, Estados Unidos	0.04-0.06	-	[39]
Grano de maíz	Northern Chile	0.02-0.40	50-73	[73]
Grano de maíz	San Luis Potosi, México	0.05-0.55	-	[74]
Grano de maíz	Mongolia, China	0.06-0.02	-	[60]
Grano de maíz	Hidalgo, México	0.12-0.3	-	[59]
Tortilla	Durango, México	0.14 (0.05-0.82)	-	[34]
Tortilla	Coahuila, México	0.54 (0.16-1.13)	-	[34]

A_T arsénico total; A_i , arsénico inorgánico

1.7. Exposición al arsénico en México por consumo de maíz

La concentración de As es crítica en productos agrícolas de alto consumo ya que representa una mayor ingesta del metaloide. En países como México, donde el consumo de maíz *per cápita* ha sido reportado en 315.1 g día^{-1} (104 kg año^{-1}) [75] y en algunas regiones proporciona hasta el 70 y el 50% del consumo calórico e ingesta proteíca, respectivamente [76]. De acuerdo con el ISTP y el consumo mexicano, una concentración de As inorgánico superior a 0.476 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de grano maíz representaría un riesgo para la población (peso corporal de 70 kg);

concentración considerablemente menor que la máxima permisible en países como China (0.7 mg kg^{-1}). En dos poblaciones rurales de México, Los Ángeles, Durango y Lagos de Moreno, Coahuila, donde el agua subterránea es la principal fuente de exposición a As, Del Razo *et al.* [34] estimaron que el consumo de tortillas de maíz elaboradas con grano de maíz local, representa el 32 y el 7% de la ingesta total de As en la dieta típica de la región evaluada, respectivamente (Figura 4). La concentración de As en tortillas varió de 1.7 a $1130.2 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ ps y los respectivos valores promedio fueron 0.14 y $0.54 \text{ mg As kg}^{-1}$ ps en Los Ángeles y Lagos de Moreno. En la comunidad de Los Ángeles, la concentración de As en tortillas corresponde a una contribución del 13.3% ($19.9 \text{ } \mu\text{g día}^{-1}$) de la ISTP, considerando el As total como As inorgánico, y el consumo local de tortilla de maíz reportado de 221 g día^{-1} (peso corporal: 70 kg). En el mismo estudio, pero en Lagos de Moreno, la ingesta local diaria de As por consumo de tortillas de maíz alcanzó aproximadamente el 50% de la ISTP (75.1 g día^{-1}) [34]. En otras zonas mexicanas como Zimapán Hidalgo, las concentraciones de As en el grano de maíz alcanzó 0.55 mg kg^{-1} [77]. Estos valores demuestran la alta contribución del consumo de maíz en la ingesta total de As y la importancia del estudio del riesgo a la salud asociado con el efecto de la toxicidad crónica de As en los países donde el maíz constituye una parte importante de la dieta. La relación entre la ingesta de As y *diabetes mellitus*, una enfermedad predominante en México, ha sido estudiada. Coronado-González *et al.* [78] encontraron que las personas expuestas en Coahuila, México, con una concentración de As total en la orina que osciló entre 63.6 y $104 \text{ } \mu\text{g As g}^{-1}$ de

creatinina tuvieron mayor riesgo (2.16 veces más) de desarrollar diabetes tipo 2 que las personas con menores niveles de As ($p < 0.05$). Este resultado sugiere que este metaloide puede ser un factor de riesgo para el desarrollo de diabetes tipo 2.

Gamiño-Gutiérrez *et al.* [65] encontraron que casi el 50% de la población infantil tuvo valores de frecuencia MEC (biomarcador asociado a enfermedades crónicas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y trastornos neurodegenerativos) más altos que el nivel basal de la población no expuesta a sustancias genotóxicas en Villa de la Paz, San Luis Potosí, México. Esos resultados confirmaron que existe un daño genotóxico en la población infantil local asociado a la exposición de As. En Torreón, Coahuila, México, Rosado *et al.* [79] evaluaron la relación entre el As y rendimiento cognitivo en los niños expuestos a altos niveles de As en el medio ambiente ($n = 602$, 6-8 años, el 52% de los niños tuvo concentraciones de As en orina superiores a $50 \mu\text{g L}^{-1}$) encontrando una correlación negativa significativa ($p < 0.05$) entre los niveles de As y habilidades visuales-espaciales (evaluados mediante las pruebas cognitivas: Peabody Picture Vocabulary, diseño de figuras, WISC-RM Digit Span subescala, búsqueda visual, y análisis de secuenciación de letras) lo cual revela los efectos tóxicos del contaminante sobre las capacidades cognitivas.

En México, las concentraciones de As total en grano de maíz han sido reportadas entre 50 y $550 \mu\text{g kg}^{-1}$ [59, 80], siendo algunos de valores superiores al límite máximo establecido de $300 \mu\text{g As kg}^{-1}$ por algunos países [33]; y dado que la proporción de As inorgánico ha sido reportada en 50-73% [73], el consumo de

maíz procedente de zonas contaminadas puede representar un problema de salud pública. Esto revela la importancia de adquirir un mayor conocimiento, no sólo de la identificación y monitoreo de las zonas contaminadas por As, si no de los parámetros que afectan la absorción, distribución de especies y translocación de As por cultivos de alto consumo como el maíz.

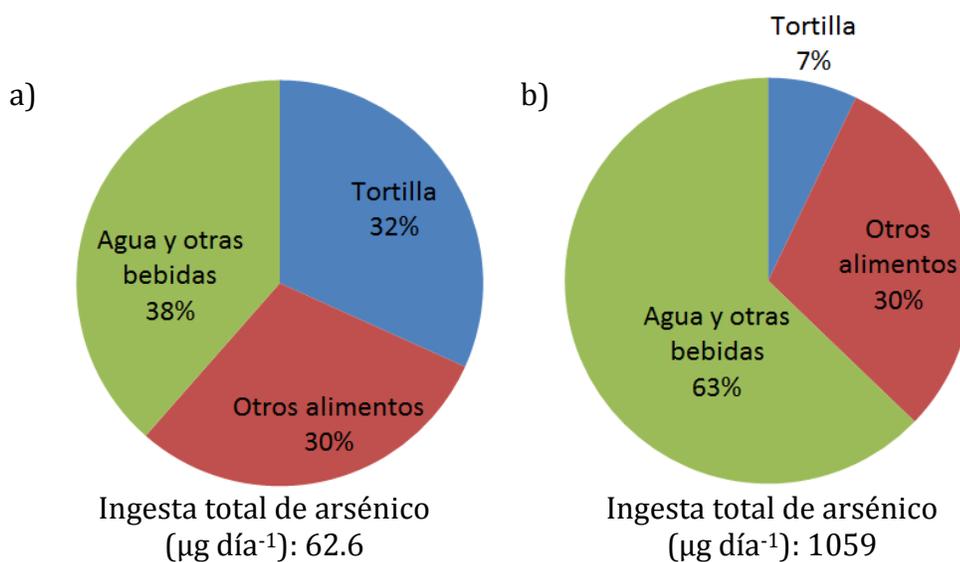


Figura 4. La ingesta de arsénico por el consumo de alimentos y bebidas típicas de poblaciones rurales mexicanas: a) Los Ángeles, Durango y b) Lagos de Moreno, Coahuila.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1. Evaluación de la transferencia de arsénico en el sistema agua-suelo-cultivo

Diversos estudios han sido enfocados a la evaluación de los factores involucrados con el flujo del As a través del sistema agua-suelo-cultivo. En un estudio realizado en Faridpur, Bangladesh, Panaullah *et al.* [81] observaron un decremento en la concentración de As (70 mg kg^{-1} - 10 mg kg^{-1}), Fe y Mn a lo largo de los canales de irrigación en la zona agrícola. Dichos gradientes fueron atribuidos a la formación de los precipitados de $\text{Fe}(\text{OH})_3$ y MnO_2 y a la co-precipitación del As en estos. En China, Neidhardt *et al.* [60] evaluaron la transferencia de As a cultivos de girasol y maíz, a partir de suelo agrícola previamente irrigado durante tres años con agua contaminada (154 y 238 mg L^{-1} de As) presentando concentraciones de As en maíz y girasol en orden decreciente con la altura de las partes de la planta: raíces > hojas > tallos > semillas.

El empleo de herramientas estadísticas multivariantes en el estudio de transferencia de contaminantes a los cultivo ha sido poco utilizado. El Análisis de Conglomerados (Análisis cluster, AC) y el Análisis de Componentes Principales (ACP) son dos herramientas comunes en métodos estadísticos, geo-estadísticos y multivariantes que han sido ampliamente utilizados en la clasificación de las

muestras de suelo en función de la concentración de compuestos adsorbentes que afectan la transferencia de contaminantes [82], en la selección del tipo de verduras de mayor contribución a la ingesta de metales pesados en la dieta humana, y en la identificación de la fuente de contaminación [83]. La evaluación de parámetros en el suelo mediante ACP permitió determinar que el pH y el contenido de materia orgánica, el Al y el Fe fueron los factores principales que afectaron la movilidad del As en el suelo cercano a regiones mineras (Sierra Minera y Portman Bay, España) [82]. En resumen, el empleo de AC y ACP permiten evaluar e interpretar los datos que describen la fitodisponibilidad del As para el cultivo de maíz y su posible movilidad en la planta.

2.2. Determinación de As(V), As(III), MMA y DMA en cultivos

Han sido pocos los estudios de distribución de especies de As en el sistema cultivo-suelo agrícola-agua de riego, limitándose a países con problemas de contaminación por As, como por ejemplo Taiwán [84], Italia [85] y México [16]. La inclusión del análisis de especiación del As en cultivo, suelo agrícola y agua de riego permite realizar una mejor evaluación del efecto de los diversos factores ambientales involucrados sobre la bioacumulación y fitodisponibilidad de As. Como se mencionó anteriormente, la movilidad y el intercambio de las especies aniónicas de As con otros aniones presentes en el suelo, así como su absorción en raíces son afectadas por la forma química en que se encuentra el As. Por lo tanto, resulta de fundamental importancia el contar con procedimientos de extracción eficientes y

técnicas analíticas sensibles y selectivas que permitan la determinación confiable de las distintas especies de As.

Una de las etapas críticas durante los estudios de especiación química en muestras ambientales sólidas es el tratamiento de la muestra. Es esencial que el proceso de extracción sea lo más eficiente posible y que las especies originales no sufran degradación ni alteración del equilibrio entre ellas, término denominado como interconversión de especies [86]. Diversos estudios han empleado metodologías de extracción para las especies de As en plantas que involucran el uso de reactivos como ácido fosfórico (0.3 M, temperatura ambiente, 10 min), ácido acético (1% v v⁻¹, 95°C) y agua destilada (temperatura ambiente) [87, 88]. En otros estudios se ha utilizado el HNO₃ 0.15-1.00 mmol L⁻¹ empleando temperaturas entre 75 y 95°C durante aproximadamente 2 h para la extracción de especies de As en semolina de trigo, así como en tallo y grano de arroz, donde fueron obtenidos mayores porcentajes de extracción de As ($\geq 80\%$) y bajos porcentajes de interconversión de especies ($< 10\%$) [89, 90]. Condiciones similares podrían ser implementadas para la determinación de especies de As en la planta de maíz. Por otro lado, en el caso del grano, diversos investigadores han reportado porcentajes de recuperación de As en arroz y trigo que varían entre 82 y 99% mediante metodologías que involucran el uso de reactivos como ácido trifluoroacético (TFA), ácido nítrico, metanol, enzimas (α -amilasas, proteasas), etc., (Tabla IV). De acuerdo a los estudios realizados en trigo y arroz, el contenido de As inorgánico predomina sobre el As orgánico, y dentro del As inorgánico, el contenido de As(III) es la forma

química de As que presenta mayor toxicidad. En ambos cereales, la concentración de As(III) fue aproximadamente dos veces la concentración de As(V) (41 ± 9 y $21\pm 19\%$ para arroz y de 61 ± 6 y $33\pm 4\%$ para trigo, respectivamente) (Tabla V). Debido a la mejor descripción del grado de toxicidad y de los fenómenos involucrados en su transferencia, la determinación de las especies de As en la planta de maíz, suelo y agua de riego es importante en la evaluación de los parámetros de cultivo que afectan su ingreso a la cadena trófica humana.

De manera general, los estudios de especiación involucran, después de la etapa de extracción, una fase de separación y una fase posterior de detección. La técnica más utilizada para la separación de especies de As ha sido la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con el empleo de columnas de intercambio aniónico y buffer de fosfatos de concentración 6.7 a 20.0 mmol L⁻¹ (pH: 6.2-8.5) como fase móvil (Tabla IV). Por otro lado, diversas técnicas analíticas han sido utilizadas para la detección de As a niveles traza, incluyendo la espectroscopia de absorción atómica (AAS) con sistema de generación de hidruros (HG), espectroscopia de emisión atómica (AES) y espectrometría de masas (MS) con plasma acoplado inductivamente (ICP) y espectrometría de fluorescencia atómica (AFS) con sistema de HG [91]. El empleo de la HG contribuye a la separación de los analitos de la matriz de la muestra, reduciendo o eliminando interferencias químicas y espectrales potenciales. La Tabla IV presenta algunas de las técnicas analíticas empleadas para la cuantificación de especies de As en granos de cereal. El ICP-MS, es la técnica analítica más ampliamente utilizada para la especiación de As

en este tipo de muestras [92], debido a que es considerada una técnica de detección versátil y sensible [92]. Sin embargo, HG-AFS presenta límites de detección comparables ($0.6-1.0 \mu\text{g L}^{-1}$ y $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$ para HG-AFS y ICP-MS, respectivamente) [88, 93] y costos menores de mantenimiento que el ICP-MS. Por lo cual, el empleo de la cromatografía iónica y posterior detección por HG-AFS resulta una técnica efectiva para la cuantificación de especies de As en el cultivo de maíz.

TABLA IV
PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN DE ARSÉNICO EN CEREALES

Cereal	Procedimiento de extracción	^a R (%)	Determinación	Ref.
Arroz	HNO ₃ 2% v v ⁻¹ de 25 a 95°C en 0.75 h y 95°C por 1.5 h.	> 81	IC-ICP-MS	[94]
Trigo	H ₂ O/CH ₃ OH (1:1) con ultrasonidos a 50°C por 2 h	80.6 (68-104)	IC-ICP-MS	[85]
Arroz	Hidrólisis enzimática: α-amilasa y proteasa en ultrasonidos por 3-180 min / Digestión enzimática con pepsina y pancreatina, 180 min	72-104 / 89	IC-ICP-MS FM: HPO ₄ ⁻² / H ₂ PO ₄ ⁻⁴ 10 mmol L ⁻¹ y 2% v v ⁻¹ CH ₃ OH, pH 8.5, Fo: 1.5 mL min ⁻¹	[95-97]
Arroz	TFA 2 mol L ⁻¹ a 100°C por 6 h / TFA 0.05 mol L ⁻¹ calentamiento hasta 85°C por 20 min, y mantenido a 80°C por 10 min	59-111 / 98-133	IC-ICP-MS FM: NH ₄ H ₂ PO ₄ 6.7-20 mmol L ⁻¹ , pH 6.2-8.5, T: 30°C, Fo: 1.5 mL min ⁻¹	[97-101]
Arroz	Extracción con: H ₂ O/ CH ₃ COOH 1% v v ⁻¹ / HNO ₃ 1% v v ⁻¹ incrementó de 55 a 75°C (2°C min ⁻¹), y mantenida a 95°C durante 30 min.	79 / 82 / 93	IC-ICP-MS FM: NH ₄ H ₂ PO ₄ / NH ₄ NO ₃ 6.7 mmol L ⁻¹ a pH 6.2, T: 30°C, Fo: 1 mL min ⁻¹	[89]
ST / Arroz	H ₃ PO ₄ 1 mol L ⁻¹ en ultrasonido a 50 W y 50 Hz.	90-98 / 92-97	HG-AFS λ: 197.3 nm, Fo _{Ar} : 330 mL min ⁻¹ , Fo _{Aire} : 2.5 mL min ⁻¹ , Fo _{NaBH₄} : 4.5 mL min ⁻¹ , Co _{HCl} : 2-4 mol L ⁻¹ , Co _{NaBH₄} : 0.7-1.4% m v ⁻¹	[88]

ST, semolina de trigo; TFA, ácido trifluoroacético; FM, fase móvil; T, temperatura; Co, concentración; R, recuperación; Fo, flujo; ^a, las concentraciones se presentan como valores: promedio (mínimo-máximo).

TABLA V
 ESPECIACIÓN DE ARSÉNICO EN MUESTRAS DE CEREALES Y
 DERIVADOS (LAS CONCENTRACIONES SE PRESENTAN COMO VALORES
 PROMEDIO (MÍNIMO-MÁXIMO))

Cereal	As(III)	As(V)	DMA	MMA	Ref.
	$\mu\text{g As kg}^{-1}$				
Arroz blanco	40-302	3-95	9-302	<LOD-29)	[89, 94, 99]
Arroz blanco escaldado	20-510 ^a		30-260	<LOD-50	[98, 101]
	87(45-127)	43(24-60)	65(17-139)	10(0-51)	[94]
Arroz integral	97-168	<5-51	36-572	<LOD-18	[94, 99]
Arroz integral escaldado	20-280 ^a		<LOD-170	<LOD-10	[98, 100, 101]
	104(94-129)	52(38-69)	82(46-111)	6(0-28)	[94]
Arroz silvestre	45(10-80) ^a		10	<LOD	[101]
Arroz	22-341	<LOD-137)	1-16	<LOD-4	[88, 96]
Arroz rojo	83(10-210) ^a		19(0-50)	-	[101]
	50 ^a		10	<LOD	[101]
Paella	80 ^a		50	<LOD	[101]
Sémola de trigo	55	25	1.9	1.5	[88]
Jarabe de arroz integral	79(89-51) ^a		18(6-46)	3(3-4)	[102]
Risotto	130(120-140) ^a		85(80-90)	<LOD	[101]
Trigo	8(2-16)	5(3-6)	1(0-2)	<LOD	[85]

LOD, límite de detección

2.3. Fraccionamiento de arsénico en suelo agrícola

La unión entre el suelo y As puede variar dependiendo de las propiedades fisicoquímicas del suelo y afectar dramáticamente la movilidad y biodisponibilidad del As. Los procedimientos de extracción secuencial o fraccionada han sido utilizados para la especiación geoquímica de contaminantes en suelos y sedimentos

contaminados. Usualmente, estos procedimientos emplean agentes extractante con diferente fuerza de elución cuyas fracciones obtenidas son asociadas con diferentes formas químicas del As en el suelo. Shan *et al.* [103] asoció las fracciones obtenidas de la extracción con H_2O , MgCl_2 1.0 mol L^{-1} , NaH_2PO_4 1.0 mol L^{-1} , $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ 0.20 mol L^{-1} , HF 10 mol L^{-1} , HNO_3 16 mol L^{-1} y HNO_3 16 mol L^{-1} + H_2O_2 30% m v^{-1} a fases de As en suelo como: a) la intercambiable, b) la unida a carbonato, c) la unida al óxido de hierro, d) la unida a materia orgánica, y e) la residual, respectivamente. Quazi *et al.* [104] asoció la fracciones obtenidas en NH_4Cl , NaOH , H_2SO_4 , H_2O_2 y HNO_3 al As soluble en agua o intercambiable, al unido débilmente a Fe y Al en fase cristalina, al unido a los iones de Ca y Mg, al unido a sulfuros o materia orgánica, y al As residual, respectivamente. Hsu *et al.* [84] emplearon disoluciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.05 mol L^{-1} , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.05 mol L^{-1} , buffer de oxalato de amonio 0.2 mol L^{-1} , buffer de oxalato de amonio 0.2 mol L^{-1} con ácido cítrico 0.1 mol L^{-1} y agua regia (HNO_3 : HCl concentrados, 1:3), para la extracción de la fracciones del As no adsorbido específicamente, del As enlazado a óxidos amorfos hidratados, del As enlazado a óxidos cristalinos hidratados, y del As residual, respectivamente.

El método BCR de extracción secuencial de tres pasos es un protocolo discontinuo propuesto por la European Community Bureau of Reference en 1993 (ahora European Standards Measurement and Testing Program) con el fin de armonizar el fraccionamiento de metales pesados en muestras de suelo de acuerdo con el proceso químico involucrado: 1) fracción soluble en ácido o intercambiable, 2) fracción reducible, y 3) fracción oxidable [105]. Este método ha sido

ampliamente utilizado para el fraccionamiento de los elementos en sustratos tales como suelos y sedimentos [106-108]. La fracción soluble en ácido y la reducible son consideradas como biodisponibles [109]. Sin embargo, el método convencional de extracción secuencial BCR presenta algunas limitaciones, como la imposibilidad de determinar la cinética de extracción del proceso de lixiviación del elemento evaluado, una baja frecuencia de análisis, y el riesgo de un sesgo en los resultados experimentales debido a fenómenos de re-adsorción de As en la superficie de las partículas de suelo [110]. Para resolver estos inconvenientes, la aplicación de técnicas de análisis automatizadas en flujo se ha destacado en varios estudios [111-113]. El análisis por inyección en flujo multijeringa (MSFIA) presenta las ventajas del análisis por inyección de flujo (FIA), y la robustez y capacidad de ahorro de reactivos en el sistema de inyección secuencial (SIA). El elemento básico del MSFIA es una bureta multijeringa que permite el movimiento simultáneo de hasta cuatro jeringas que están conectadas en bloque en un mismo motor *step-by-step*. Los reactivos son utilizados eficientemente mediante el acoplamiento de válvulas solenoides de tres vías sobre los cabezales de las jeringas, ya que sólo se inyectan en el sistema en el momento preciso en que se realiza la determinación analítica [114]. El desarrollo de un método de extracción secuencial continuo para determinar las fracciones químicas del As en el suelo representa un área de estudio poco investigada que se requiere evaluar para conocer la movilidad y disponibilidad del As en el suelo agrícola [111].

2.4. Biodisponibilidad de arsénico en grano de maíz

La ingesta oral es la principal vía de exposición humana al As. La concentración total permitiría una considerable sobrestimación del riesgo a la salud asociado exposición oral a arsénico. En la reducción de la incertidumbre de la estimación de riesgo por exposición a As, el ensayo de biodisponibilidad es crítico. [115].

La biodisponibilidad se refiere a la capacidad de un elemento para ser absorbido en el sistema de circulación sistémico [115]. Debido a que las sustancias ingeridas deben estar en su forma soluble para que su absorción sea posible, uno de los principales factores limitantes en la biodisponibilidad oral es la liberación de As de los alimentos ingeridos en el tracto gastrointestinal [80]. La máxima fracción de una sustancia en los alimentos que es teóricamente liberada de su matriz en el tracto gastrointestinal es denominada fracción bioaccesible [116]. La bioaccesibilidad se ve afectada por el tipo y la composición del alimento y las condiciones gastrointestinales [117]. En algunos casos, los métodos de cocción, como la nixtamalización, pueden afectar la bioaccesibilidad del contaminante [118].

Los estudios de bioaccesibilidad proveen resultados comparables a los ensayos de biodisponibilidad, y son considerados una alternativa conveniente en los estudios de evaluación de riesgo sin el uso de procedimientos altamente complejos y costosos y el uso de animales experimentales que requiere un mayor tiempo de análisis [119]. La similitud entre la fracción biodisponible y la bioaccesible [120] es especialmente mayor en el caso del As debido a su alta

absorción en intestino delgado. Estudios en voluntarios humanos y animales experimentales mostraron que alrededor del 90% del As inorgánico ingerido y disuelto es adsorbido por el intestino y entra en el torrente sanguíneo. Este porcentaje es mucho mayor que para otros elementos y posiblemente puede ser atribuido a las propiedades químicas estructurales de los iones arsenato y el fosfato, un componente esencial del cuerpo humano.

Los estudios de bioaccesibilidad *in vitro* involucran la adición secuencial de fluidos gastrointestinales artificiales en los alimentos [121]; condiciones similares a las encontradas en el cuerpo humano durante el proceso de digestión (37°C, pH 2-7, agitación y jugo gástrico simulado) [117]. Las enzimas más utilizadas en estudios *in vitro* para la digestión de cereales han sido proteasas tales como pepsina y pancreatina, y amilasas como la α -amilasa [88]. Aunque estos ensayos son relativamente simples proporcionan información relacionada con la liberación del elemento analizado en el intestino humano. Muchos estudios han incluido el uso de saliva artificial como agente extractante dentro del protocolo *in vitro* ya que puede ser un factor que contribuye significativamente en muchos tipos de alimentos [122].

Los estudios de exposición humana a las diversas especies del As por la ingesta de cereales han sido limitados y, en su mayoría enfocados al arroz. Laparra *et al.* [80], mediante el empleo de un método de extracción gastrointestinal *in vitro*, encontraron que más del 90% del As total en arroz cocido es bioaccesible, lo cual refleja un alto riesgo a la salud humana.

Comparado con las otras partes de la planta de maíz, la concentración de As en el grano es relativamente baja. Los métodos de preconcentración de As reportados en la literatura están usualmente basados en la generación de hidruros [123, 124], extracción en fase sólida [125, 126], extracción líquido-líquido [127], y la co-precipitación [128, 129]. Sin embargo, algunas desventajas de estos métodos limitan su aplicación tales como el tiempo de análisis, factores de enriquecimiento insatisfactorios, el uso de disolventes tóxicos y la formación de residuos secundarios. La extracción en punto nube (CPE) es una metodología simple, económica, rápida, sensible y selectiva que puede ser considerada para la preconcentración de As en muestras complejas como lo son los digeridos gástricos.

A la fecha existe poca información sobre la cuantificación y evaluación del As bioaccesible en cereales, y a nuestro conocimiento, son inexistentes los estudios de acoplamiento de la CPE en los ensayos de bioaccesibilidad de As *in vitro* en maíz, cereal de mayor producción a nivel mundial (817 millones de toneladas en 2009; FAO) [30] y alimento básico para millones de personas en América Latina.

2.5 Alcance del proyecto

Debido a la problemática ambiental que supone la presencia de As, existe la necesidad de adquirir mayor conocimiento sobre el peligro potencial de la exposición de poblaciones rurales mexicanas a este metaloide a través de la ingesta de maíz, así como del efecto de los factores relacionados con la acumulación y disponibilidad de las especies de As.

Los aspectos reportados en la literatura relacionados con transferencia de As en el cultivo de maíz como los mecanismos de adsorción en suelo, metabolismo y fitotoxicidad de As fueron analizados en este estudio. Asimismo, los parámetros fisicoquímicos del suelo, así como la acumulación y la translocación de As en el cultivo de maíz de tres sitios agrícolas cercanos a zonas mineras (San Luis Potosí, México) fueron analizados utilizando análisis de componentes principales (ACP) y el análisis de conglomerados (cluster, AC) con el objetivo de identificar y evaluar las condiciones en el campo agrícola que pueden afectar la transferencia de As hacia la planta de maíz, su fitodisponibilidad y movilidad hacia el grano.

Para evaluar el As_T extraíble en las fracciones de suelo agrícola fue desarrollado un método automatizado de extracción más rápido y eficiente que el procedimiento BCR convencional, en este proyecto fue propuesto un nuevo método de extracción en flujo que está basado en el empleo del sistema MSFIA acoplado a HG-AFS. Teniendo en cuenta la menor eficiencia en la etapa de HG observada para las especies DMA, MMA y As(V) (aproximadamente 70% menor para DMA y MMA, y hasta 38% para As(V)) en comparación con As (III) [130], al sistema desarrollado

fue acoplada una etapa de foto-oxidación UV para la degradación de las especies orgánicas extraídas y la reducción de las especies de As(V) a As(III) para la adecuada cuantificación del contenido de As total.

Asimismo, un nuevo método de determinación de As bioaccesible a niveles traza en grano de maíz basado en la preconcentración mediante CPE fue desarrollado. El método propuesto para la cuantificación de As en el digerido enzimático es una combinación de CPE, MSFIA y HG-AFS como herramientas de detección. La etapa de preconcentración CPE fue optimizada y la completa degradación de DMA y MMA previo a la etapa de generación de hidruros fue evaluada. Esta metodología versátil y económica puede ser utilizada como una herramienta analítica alternativa al empleo de técnicas costosas como ICP-MS.

Una metodología para la determinación de las formas químicas del As en el cultivo de maíz fue implementada y la distribución de especies de As en el sistema suelo-agua-maíz fue también evaluada con el objetivo de analizar la transferencia y toxicidad del As en este cereal de gran importancia nutricional y económica en México.

CAPÍTULO 3

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS: El maíz cultivado en zonas agrícolas del estado de San Luis Potosí contiene especies de As inorgánico biodisponible en concentraciones que representan un riesgo para la salud humana (superiores a 0.476 mg kg^{-1} , FAO/OMS-JECFA).

OBJETIVO GENERAL: Evaluar la especiación química de arsénico y su acumulación en maíz cultivado en zonas agrícolas del estado de San Luis Potosí y determinar su riesgo potencial para el ser humano.

OBJETIVO ESPECÍFICOS:

- 1) Definir los sitios agrícolas de muestreo de suelo, agua y cultivo (en base antecedentes de contaminación con arsénico y el uso del suelo agrícola).
- 2) Diseñar y ejecutar el plan de muestreo en los sitios seleccionados.
- 3) Caracterizar física y químicamente el suelo agrícola y el agua de riego.
- 4) Determinar del contenido de As total y de especies de As en agua de riego, suelo y planta de maíz (raíz, tallo, hoja y grano).
- 5) Desarrollar una metodología de extracción secuencial para la determinación de la movilidad del arsénico en el suelo agrícola.

- 6) Desarrollar un procedimiento de extracción para la determinación de As(III), As(V), MMA y DMA presentes en el grano de maíz.
- 7) Determinar la fracción bioaccesible de As en el grano de maíz.

CAPÍTULO 4

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Ubicación y características de la muestra

Las muestras de suelo, agua de riego y maíz fueron obtenidas de tres zonas de riego con cultivos de aproximadamente tres meses (la altura de la planta fue 1.2-1.5 m y el peso húmedo fue 2.0-3.5 kg) cerca de una zona minera en San Luis Potosí, México; zona A y B en Matehuala, y la zona C, en el municipio de Villa de Ramos. Un muestreo sistemático rectangular fue realizado en cada zona agrícola, que implicó la toma de seis muestras de suelo y de plantas de maíz, así como una muestra de agua por cada predio. Las muestras de suelo fueron tomadas de 0-30 cm de profundidad a una distancia horizontal con la raíz del cultivo menor a 20 cm. Las coordenadas de los puntos de muestreo se describen en la Tabla VI y el mapa de la Figura 5 muestra la ubicación de cada campo de maíz.

Diversas zonas agrícolas-rurales del estado de San Luis Potosí, México (a unos 500 km NE de la ciudad de México) han presentado actividad minera durante más de 200 años. Los depósitos minerales más abundantes incluyen galena, pirita, esfalerita, sales de Cu-Sb y arsenopirita [20]. Los residuos de la industria minera han contaminado las zonas agrícolas a través del agua de riego. La liberación total de As en las zonas mineras dentro de esta región fue estimada en 7.5 Ton año⁻¹ (agosto de 2008-agosto de 2009) [131]. Dado que en las muestras de agua de riego

de estas zonas, se reportan concentraciones de As de hasta 5.9 mg L^{-1} [20], es importante entender la transferencia de As a las plantas de maíz en esta región.

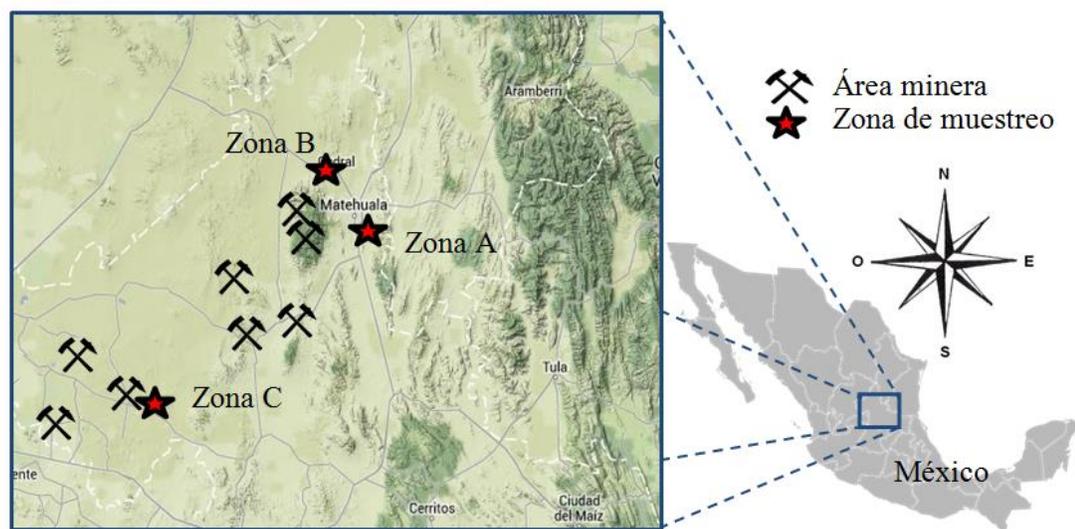


Figura 5. Distribución de las zonas de muestreo.

Las zonas agrícolas de muestreo se encuentran en la Meseta Central y la Sierra Madre Oriental de México y presentan regularmente un clima templado, semiseco y seco. Phaeozem, Calcisol y Leptosol son los tipos de suelo predominantes en la región [132]. Las precipitaciones son escasas en la zona, entre 300 a 700 mm año^{-1} [132], por lo que el riego por canal se utiliza la mayor parte del año.

TABLA VI
COORDENADAS DE LOS PUNTOS DE MUESTREO DE SUELO AGRÍCOLA,
MAÍZ Y AGUA DE RIEGO

Tipo de muestre o	Zona A (Matehuala)		Zona B (Matehuala)		Zona C (Zacatal)	
	Punto	Coordenada	Punto	Coordenada	Punto	Coordenada
Suelo agrícola y cultivo de maíz	MTA-1	N 23° 39' 57.2"	MTB-1	N 23° 43' 05.2"	ZC-1	N 22° 49' 54.2"
		W 100° 34' 35.1"		W 100° 39' 20.7"		W 102° 02' 53.6"
	MTA-2	N 23° 39' 56.9"	MTB-2	N 23° 43' 05.0"	ZC-2	N 22° 49' 54.2"
		W 100° 34' 35.9"		W 100° 39' 20.5"		W 102° 02' 32.1"
	MTA-3	N 23° 39' 57.0"	MTB-3	N 23° 43' 05.2"	ZC-3	N 22° 49' 30.8"
		W 100° 34' 35.1"		W 100° 39' 20.2"		W 102° 02' 15.9"
MTA-4	N 23° 39' 56.7"	MTB-4	N 23° 43' 05.4"	ZC-4	N 22° 49' 32.4"	
	W 100° 34' 35.7"		W 100° 39' 20.6"		W 102° 02' 19.6"	
MTA-5	N 23° 39' 56.9"	MTB-5	N 23° 43' 05.4"	ZC-5	N 22° 49' 32.1"	
	W 100° 34' 34.8"		W 100° 39' 20.4"		W 102° 02' 18.1"	
MTA-6	N 23° 39' 56.6"	MTB-6	N 23° 43' 05.5"	ZC-6	N 22° 49' 32.2"	
	W 100° 34' 35.4"		W 100° 39' 20.2"		W 102° 02' 17.2"	
Agua de riego	MTA-A	N 23° 40' 20.0" W 100° 35' 01.8"	MTB-A	N 23° 43' 05.2" W 100° 39' 20.2"	ZC-A	N 22° 49' 40.9" W 102° 02' 18.9"

4.2. Preparación de la muestra

Las muestras de suelo fueron secadas a temperatura ambiente y tamizadas para la obtención de la fracción de arcilla (<63 µm). Las muestras de plantas fueron lavadas con agua corriente de la llave, seguido de tres enjuagues con agua desionizada. Además, la raíz del maíz fue lavada con CaCl₂ 5 mM para remover los iones potencialmente adsorbidos en el tejido. Todas las muestras de la planta fueron cuidadosamente divididas en raíz, tallo, hoja y grano. Estas secciones fueron secadas en horno a 70°C durante 72 h. Posteriormente, las secciones de planta seca fueron trituradas, tamizadas (250 µm), homogeneizadas y almacenadas en

ausencia de luz. Las muestras de agua de riego fueron filtradas (acetato de celulosa, 0.45 μm), selladas herméticamente y almacenadas a 4°C en ausencia de luz.

4.3. Reactivos

Todos los reactivos fueron de grado analítico. Las disoluciones fueron preparadas en agua ultrapura (resistividad > 18 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$, Millipore Milli-Q system). Todo el material de vidrio fue sumergido en HNO_3 10% v v⁻¹ durante 24 h y enjuagado con agua Milli-Q antes de su uso.

El arseniato de sodio ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, As(V)), el arsenito de sodio (NaAsO_2 , As(III)), y el ácido dimetilarsínico ($\text{C}_2\text{H}_7\text{AsO}_2$, DMA) fueron comprados en Sigma-Aldrich (México). El ácido monometilarsónico (MMA) fue adquirido en Chem-Service (USA). Las disoluciones stock de As(V), MMA y DMA fueron preparadas a una concentración de 100 mg L^{-1} en agua ultrapura. El estándar de As(III) fue disuelto en NaOH 4% m v⁻¹ y entonces diluido con HCl 0.3 mol L^{-1} . La disolución reductora consistió en NaBH_4 10 g L^{-1} (Sigma-Aldrich, México) disuelto en NaOH 2 g L^{-1} (Sigma-Aldrich, México). Esta disolución fue preparada diariamente. Una disolución de HCl 1.2 mol L^{-1} (Fisher) fue utilizada como medio portador en la determinación de As total y de especies de As por HG-AFS.

Para el análisis de As total, una disolución reductora de tiourea 10% m v⁻¹ (Sigma-Aldrich, México) y ácido ascórbico 2% m v⁻¹ (Sigma-Aldrich, México) fue utilizada para la pre-reducción de medición de las disoluciones. Las disoluciones estándar de calibración para la determinación de As total, 0.5-200 ng mL^{-1} , también

fueron preparadas diariamente a partir de la disolución stock por medio de una dilución con HCl 10% v v⁻¹. Antes del análisis de As total, 0.2 mL de la disolución reductora de ácido ascórbico-tiourea fue añadida a 5 mL de la disolución patrón. La reducción de As(V) a As(III) fue alcanzada después de 30 min. Antes del análisis instrumental, disoluciones de blanco y las muestras fueron preparadas mediante una etapa de pre-reducción similar.

Para la determinación de la especies de As por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) acoplado a HG-AFS, buffers de fosfato 5 y 60 mmol L⁻¹ a pH 6 fueron usados como fase móvil. Una serie de disoluciones patrón de trabajo de las especies de As fueron preparadas por dilución apropiada de la disolución stock con agua ultrapura para dar un intervalo de concentración de 50 a 500 ng mL⁻¹ para todas las especies de As.

Los reactivos y las condiciones operativas para el fraccionamiento de As en suelo son descritos en la Tabla VII. Las disoluciones de trabajo utilizadas en el fraccionamiento de suelo fueron preparadas por dilución de la disolución stock con CH₃COOH 0.11 mol L⁻¹ (Scharlau, España), HONH₂·HCl 0.5 mol L⁻¹ (pH 1.5, Scharlau, España) y H₂O₂ 8.8 mol L⁻¹ (pH 2, Scharlau, España). En este estudio, las disoluciones utilizadas para la generación de hidruro a partir del contenido total de As fueron HCl 0.6-3.0 mol L⁻¹ (5-25% v v⁻¹, Scharlau, España) y NaBH₄ 0.5-2.5% m v⁻¹ (Scharlau, España). Dos agentes reductores y un oxidante fueron utilizados: tiourea 1.5-4.5% m v⁻¹ (Panreac, España) preparado con ácido ascórbico 22% m v⁻¹ (Scharlau, España), HONH₂·HCl 6-2 mol L⁻¹ (Scharlau, España); y K₂S₂O₈ 1.5% y

5.4% m v⁻¹ (Scharlau, España) en NaOH 0.5% m v⁻¹, para favorecer en la generación de hidruros y la etapa de fotoxidación UV de las especies orgánicas, respectivamente.

TABLA VII
REACTIVOS Y CONDICIONES DE OPERACIÓN UTILIZADAS EN EL
MÉTODO BCR CONVENCIONAL Y EL MÉTODO BCR EN FLUJO
AUTOMATIZADO

Etapa	Fracción	Fase(s) en suelo ^a	Método BCR convencional ^a		Método BCR automatizado ^b	
			Reactivos	Tiempo de agitación y temperatura	Reactivos	Tiempo de agitación y temperatura
F1	Soluble en ácido y agua	Carbonatos y metales intercambiables	40 mL de CH ₃ COOH 0.11 mol L ⁻¹	16 h a temperatura ambiente	Hasta 110 mL de CH ₃ COOH 0.11 mol L ⁻¹	2 h a temperatura ambiente
F2	Reducible	óxidos de Fe y Mn	40 mL de NH ₂ OH.HCl 0.5 mol L ⁻¹ (pH 1.5)	16 h a temperatura ambiente	Hasta 110 mL de NH ₂ OH. HCl 0.5 mol L ⁻¹ (pH 1.5)	2 h a temperatura ambiente
F3	Oxidable	Materia orgánica y sulfuros	10 mL de H ₂ O ₂ 8.8 mol L ⁻¹ (pH 2), después, 10 mL de H ₂ O ₂ 8.8 mol L ⁻¹ (pH 2) frío + 50 mL de NH ₄ AcO 1 mol L ⁻¹ (pH 2)	1 h a temperatura ambiente, 1 h a 85°C, y 16 h a temperatura ambiente	Hasta 110 mL de H ₂ O ₂ 8.8 mol L ⁻¹ (pH 2)	2 h a temperatura ambiente

^a [133], ^b procedimiento asistido por ultrasonido.

Las enzimas y sales biliares utilizadas en la determinación de la fracción bioaccesible de As fueron adquiridas de Sigma Aldrich. Los jugos gastrointestinales artificiales fueron preparados como sigue: 1) Jugo bucal: 11.5 mg de α-amilasa de saliva humana (9600 unidades, No cat. A-1031) fueron suspendidos en 30 mL de buffer de citratos 30 mmol L⁻¹, pH 6 y 100 mL de disolución electrolítica [122], 2) Jugo gástrico: 1.6 g de pepsina de mucosa gástrica porcina (No cat. P-7000) fueron suspendidos en 10 mL de HCl 0.1 mol L⁻¹, y 3) Jugo duodenal: 0.2 g de pancreatina de páncreas porcino (No cat. P-1750) y 1.25 g de extracto de bilis porcino (No cat.

B-8631) fueron suspendidos en 50 mL de NaHCO_3 0.1 mmol L^{-1} . Las suspensiones enzimáticas fueron utilizadas inmediatamente después de su preparación. Los reactivos utilizados en CPE fueron el o,o-dietilditiofosfato (DDTP, Sigma Aldrich) 50 % m v^{-1} (preparado en etanol absoluto), el Tritón x-114 (Sigma Aldrich) 10% m v^{-1} . La disolución utilizada para la reconstitución del extracto fue HCl 1 mol L^{-1} , con etanol al 10% v v^{-1} .

4.4. Digestión de muestras agrícolas

Las muestras de suelo agrícola y las plantas de maíz (raíz, tallo, hoja y grano) fueron digeridas de acuerdo al método EPA 3052 para digestión por microondas [1], el cual fue modificado ligeramente. Una muestra de aproximadamente 0.4 g fue colocada en un recipiente de microondas; entonces, cantidades apropiadas de $\text{HNO}_{3\text{conc.}}$, $\text{HCl}_{\text{conc.}}$ y $\text{HF}_{\text{conc.}}$ fueron añadidas. Para la digestión de las secciones de la planta de maíz (raíz, tallo y hojas), fueron utilizados 3.4 y 0.4 mL de $\text{HNO}_{3\text{conc.}}$ y $\text{HCl}_{\text{conc.}}$, respectivamente, mientras que 4.0, 0.5, y 0.5 mL de $\text{HNO}_{3\text{conc.}}$, $\text{HCl}_{\text{conc.}}$, y $\text{HF}_{\text{conc.}}$, respectivamente, fueron utilizados para las muestras de suelo agrícola. Los recipientes fueron sellados y calentados en un sistema de microondas (Anton Park, Multiwave ECO) durante 15 min. La temperatura de las muestras fue incrementada a 180°C en 5.5 min, y después fue mantenida a esta temperatura durante 9.5 min. Después de enfriar, el sobrenadante fue separado por centrifugación (3000 min^{-1} durante 5 min). La muestra fue enfriada, transferida a un tubo de centrífuga y posteriormente llevada a un volumen final de 50 mL.

4.5. Caracterización química de suelo agrícola, agua de riego y raíz de la planta de maíz

Para cada zona de estudio, parámetros tales como pH (Hach PHC10101), conductividad (Hach CDC40101), temperatura, oxígeno disuelto (Hach LDO10101) y cloruro (ISECI18101) fueron analizados *in situ* en el agua de riego utilizando un Multi Meter Hach HQ40d (Apéndice A).. Por otro lado, en los suelos agrícolas fue determinado el N total (método Kjeldahl, Apéndice B), la textura (método del hidrómetro, Apéndice B), los cationes extraíbles (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , y Na^+ mediante el método de acetato de amonio a pH 7 [134]), y el contenido de CaCO_3 (método de titulación con HCl).

La fracción de arcilla de cada muestra de suelo fue extraída mediante agua desionizada en una relación 1:1. La suspensión fue agitada a 200 min^{-1} durante 24 h a 25°C . El sobrenadante fue separado por centrifugación a 3000 min^{-1} durante 5 min. El pH (pH_{WE} ; método potenciométrico, Thermo Scientific Orion 3 Star), el carbono orgánico total (TOC_{WE} ; Shimadzu TOC-VCSH), el cloruro ($\text{Cl}^{-}_{\text{WE}}$; método potenciométrico, Thermo Orion 720A+), el fosfato ($\text{PO}_4^{3-}_{\text{WE}}$; método espectrofotométrico con SnCl_2 , NMX-AA-029-SCFI-2001), y la conductividad (método potenciométrico, Thermo Scientific Orion 3 Star) fueron determinados a partir del extracto acuoso del suelo, mientras que el contenido de calcio (Ca_{T} ; espectrometría de absorción atómica), fosfato ($\text{PO}_4^{3-}_{\text{T}}$; método espectrofotométrico, NMX-AA-029-SCFI-2001), hierro y manganeso (Mn_{T} y Fe_{T} , respectivamente; NMX-AA-051-SCFI-2001) fueron determinados a partir de la muestra digerida (EPA

3052). En la raíz de la planta de maíz fueron determinados el PO_4^{3-}T (método espectrofotométrico, NMX-AA-029-SCFI-2001) y el Fe_T (NMX-AA-051-SCFI-2001) después de que la muestra fue digerida (EPA 3052). El rango lineal de las técnicas se presenta en el Apéndice C.

4.6. Análisis de especiación y del contenido de arsénico total en el sistema agua-suelo-planta de maíz

La determinación de As total en el agua de riego, en el suelo agrícola y en las diferentes partes de la planta del maíz (raíz, tallo, hoja y grano, fotografías en Apéndice D) fue realizada mediante HG-AFS (Rayleigh AF-640). Para la especiación de arsénico fue acoplado un sistema HPLC el cual contó con una bomba-SY 8100 (Beifen-Ruili Analytical Instrument (Group) Co., Ltd.). La separación se realizó en una columna Hamilton PRP-X100 (Hamilton, Reno, NV, EE.UU., Apéndice E) de intercambio aniónico (250 x 4.6 mm). Las condiciones instrumentales y operacionales utilizadas se resumen en la Tabla VIII.

TABLA VIII
CONDICIONES INSTRUMENTALES UTILIZADAS EN HG-AFS Y IC-HG-AFS

HG-AFS	
Concentración de NaBH ₄ :	1% m v ⁻¹
Disolución portadora:	HCl 10% v v ⁻¹
Gas portador (Ar):	600 mL min ⁻¹
Gas auxiliar (Ar):	200 mL min ⁻¹
Volumen de muestra:	1 mL
Voltaje de tubo fotomultiplicador:	280V
Corriente de la lámpara:	60 mA
Temperatura:	400°C
Longitud de onda:	217.6 nm (lámpara de cátodo hueco)
IC-HG-AFS	
Columna	Intercambio aniónico, Hamilton PRP-X100
Volumen de muestra:	100 µL
Flujo:	1 mL min ⁻¹
Modo de elución:	Gradiente
Programa:	(1) 0-4 min, 100% de buffer de fosfatos 5 mM, pH 6; (2) 4-4.5 min 0-100%, buffer de fosfatos 60 mM, pH 6; (3) 4.5-10.5 min, 100% de buffer de fosfatos 60 mM, pH 6; (4) 10.5-11 min 0-100% de buffer de fosfatos 5 mM, pH 6; (5) 11-12.5 min 100%, buffer de fosfatos 5 mM, pH 6.

Para la determinación de la concentración de As total en el agua de riego y las muestras digeridas de suelo agrícola y planta (raíz, tallo, hoja y grano), la curva de calibración fue elaborada en el intervalo de 0.5 a 200 ng mL⁻¹ mostrando una linealidad significativa ($r = 0.999$, $n = 6$). El límite de detección (LOD) fue de 0.05 mg kg⁻¹ en suelo y 0.5 µg L⁻¹ en agua. La determinación de As total fue verificada utilizando materiales de referencia certificados (CRM; agua subterránea BCR-610,

IRMM; harina de arroz ERM-BC211, IRMM; y suelo franco ERM-CC141, IRMM). No existieron diferencias significativas ($p > 0.05$, $n = 3$) entre los valores obtenidos y los certificados para el contenido de As total en los CRM's analizados (Tabla IX).

TABLA IX
DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO TOTAL EN LOS MATERIALES DE REFERENCIA CERTIFICADO DE LA COMISIÓN EUROPEA (IRMM)

Material de Referencia Certificado ¹	Valor certificado (mg kg ⁻¹)	Valor obtenido (mg kg ⁻¹)
Agua subterránea BCR-610, IRMM	10.8±0.4	10.1±1.2
Harina de arroz ERM-BC211, IRMM	0.260±0.006	0.280±0.02
Suelo arcilloso ERM-CC141, IRMM	9.9±1.5	9.27±0.07

¹IRMM, Institute for Reference Materials and Measurements

La identificación y cuantificación de especies de As en el suelo y la planta de maíz fueron realizadas por cromatografía iónica (IC) acoplado a HG-AFS (véase la Tabla VIII). El pH de la fase móvil fue evaluado entre 5 y 9, siendo el pH 6 el que presentó una mejor resolución cromatográfica de las especies de As (Apéndice F). La Figura 6 muestra el cromatograma de la elución completa de las especies de As en un tiempo de 29 y 12 min utilizando un sistema isocrático y el gradiente de elución, respectivamente. El gradiente de elución fue utilizado en análisis posteriores, debido a que su uso permite un menor tiempo de análisis comparado con la elución isocrática y una mejor resolución cromatográfica de las especies de As. La determinación de las especies de As fue realizada en el extracto acuoso del suelo agrícola (1:1 de suelo: agua; Sección 4.5) y en los extractos de las secciones de la planta de maíz.

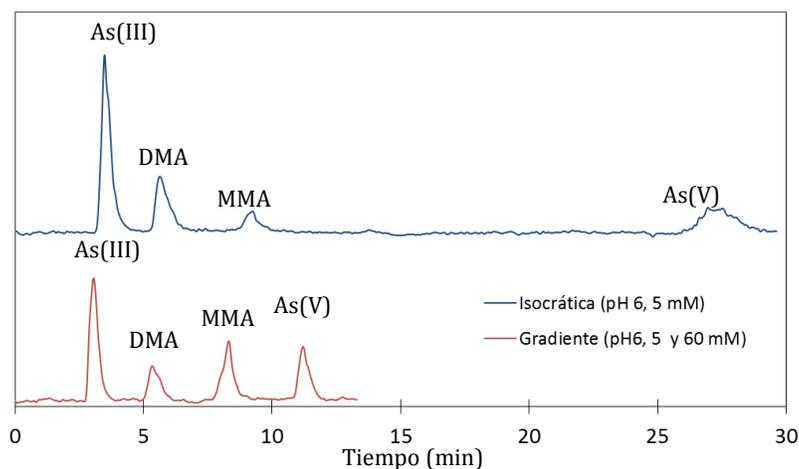


Figura 6. Efecto del gradiente de concentración de buffer de fosfatos sobre los tiempos de retención de las especies de arsénico por HPLC-HG/AFS.

La validación del método de extracción de As en cada parte de la planta fue verificada mediante estudios de recuperación. El procedimiento utilizado para la extracción de As para la raíz, el tallo y la hoja del maíz fue de acuerdo al método descrito por Zheng *et al.* [10]. Brevemente, 0.3 g de biomasa y 2 mL de HNO_3 0.15 mol L^{-1} fueron agregados a un recipiente de vidrio. Posteriormente, los vasos fueron calentados a 80°C durante 2 h y el contenido de los vasos fue centrifugado y el sobrenadante filtrado (nylon, 45 μm). Antes del proceso de extracción, una cantidad equivalente a 1.33 mg As kg^{-1} para el tallo y hojas, y 2 mg As kg^{-1} para la raíz de todas las especies de As fue agregada. En el caso del grano de maíz, cuatro diferentes procedimientos de extracción de especies de As reportados para arroz fueron evaluados mediante estudios de recuperación: 1) $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1) con ultrasonidos a 50°C durante 2 h [85], 2) H_3PO_4 1 mol L^{-1} en ultrasonido [88], 3) HNO_3 2% v v^{-1} con incremento de temperatura a 95°C en 0.75 h y mantenido a 95°C durante 1.5 h [94], y 4) TFA 0.05 mol L^{-1} con incremento a 85°C en 20 min, y

después mantenido a 80°C durante 10 min [100]. Al igual que la raíz, una cantidad equivalente a 2 mg As kg⁻¹ de grano fue agregada a cada suspensión (Apéndice G).

4.7. Parámetros de acumulación y translocación de arsénico

El factor de bioacumulación BAF_T (Ecuación 1) fue calculado para la determinación de la acumulación de As independientemente de la concentración del metaloide en el suelo. El factor de bioacumulación BAF_{WE} , (Ecuación 2) fue calculado para evaluar, excluyendo los procesos de adsorción en suelo, que parámetros en rizosfera afectan la fitodisponibilidad de As. Por otro lado, la translocación de As en plantas de maíz se evaluó de acuerdo con la Ecuación 3.

$$BAF_T = \frac{[As_{Traíz}]}{[As_{Tsuelo}]} \quad (1)$$

$$BAF_{WE} = \frac{[As_{Traíz}]}{[As_{WEsuelo}]} \quad (2)$$

$$Translocación = \frac{[As_{Traíz}][100]}{[As_{Tsuelo}]} \quad (3)$$

4.8. Fraccionamiento de arsénico en suelo agrícola

4.8.1. Preparación del suelo enriquecido

Los parámetros del método de extracción en flujo fueron primeramente optimizados utilizando suelo enriquecido con As siguiendo el protocolo establecido

para un suelo CRM [133]. El suelo fue secado hasta un peso constante ($80\pm 5^\circ\text{C}$) y posteriormente tamizado. Entonces, 500 g de suelo $<63\ \mu\text{m}$ fueron mezclados con 200 mL de una disolución de As(V) de $50\ \text{mg L}^{-1}$ ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$), colocados en un recipiente hermético y almacenados durante 1 mes en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente, la muestra de suelo enriquecido fue secada hasta peso constante ($80\pm 5^\circ\text{C}$) y homogeneizada en un molino de bolas durante 48 h. Un estudio de homogeneidad fue realizado para determinar el contenido total de As en 5 submuestras. No hubo diferencias significativas entre los valores promedio de las submuestras analizadas aplicando la prueba ANOVA de una sola vía (nivel de confianza del 95%). Este suelo homogéneo enriquecido con As fue empleado para la optimización del sistema de extracción propuesto con el objetivo de encontrar la mejor sensibilidad y reproducibilidad.

4.8.2. Sistema automatizado de extracción secuencial BCR de tres etapas en flujo

El sistema MSFIA-HG-AFS utilizado para la determinación de As se muestra en la Figura 7. Dos buretas multijeringa con velocidades programables (MicroBU 2030 Crison, Barcelona, España) fueron utilizadas (Apéndice H). Siete jeringas de vidrio S1-S7 con capacidades de 2.5, 1.0, 1.0, 5.0, 1.0, 2.5 y 2.5 mL fueron empleadas (Hamilton, Suiza). Cada jeringa tiene una válvula solenoide en la cabeza de tres vías E1-E7 (N-Research, Caldwell, Nueva Jersey, EE.UU.), lo que facilita la aplicación de los regímenes de multiconmutación. También se utilizaron tres válvulas solenoides

de tres vías E8-E10 (MTV-3-N 1/4 UKG, Takasago, Japón) para conducir el flujo de la forma deseada. Una microbomba (MP) fue acoplada al sistema para la etapa de extracción. La columna de PEEK (S) de forma bicónica dual (longitud de 40 mm, Sciware Systems, Bunyola, España) fue utilizada como contenedor de la muestra de suelo. Los filtros de membrana (nylon, de 20 mm de diámetro, Millipore) con 0.45 micras de tamaño de poro fueron utilizados en ambos extremos de la columna para evitar la salida de las partículas del suelo. La tubería para la toma de reactivos fue construida con tubos de PTFE de 1.5 mm de diámetro interno. El resto de la tubería incluyendo los bucles de reacción (RC1 y RC2) y de carga (HC) (0.24, 0.3 y 0.5 m de longitud, respectivamente) fue construida con tubos de PTFE de 0.8 mm de diámetro interno. Tres conectores de metacrilato (tres, cuatro y cinco vías, Sciware Systems) fueron utilizados en el sistema. La columna con la muestra de suelo fue sumergida en un baño de ultrasonidos (P-Selecta, España).

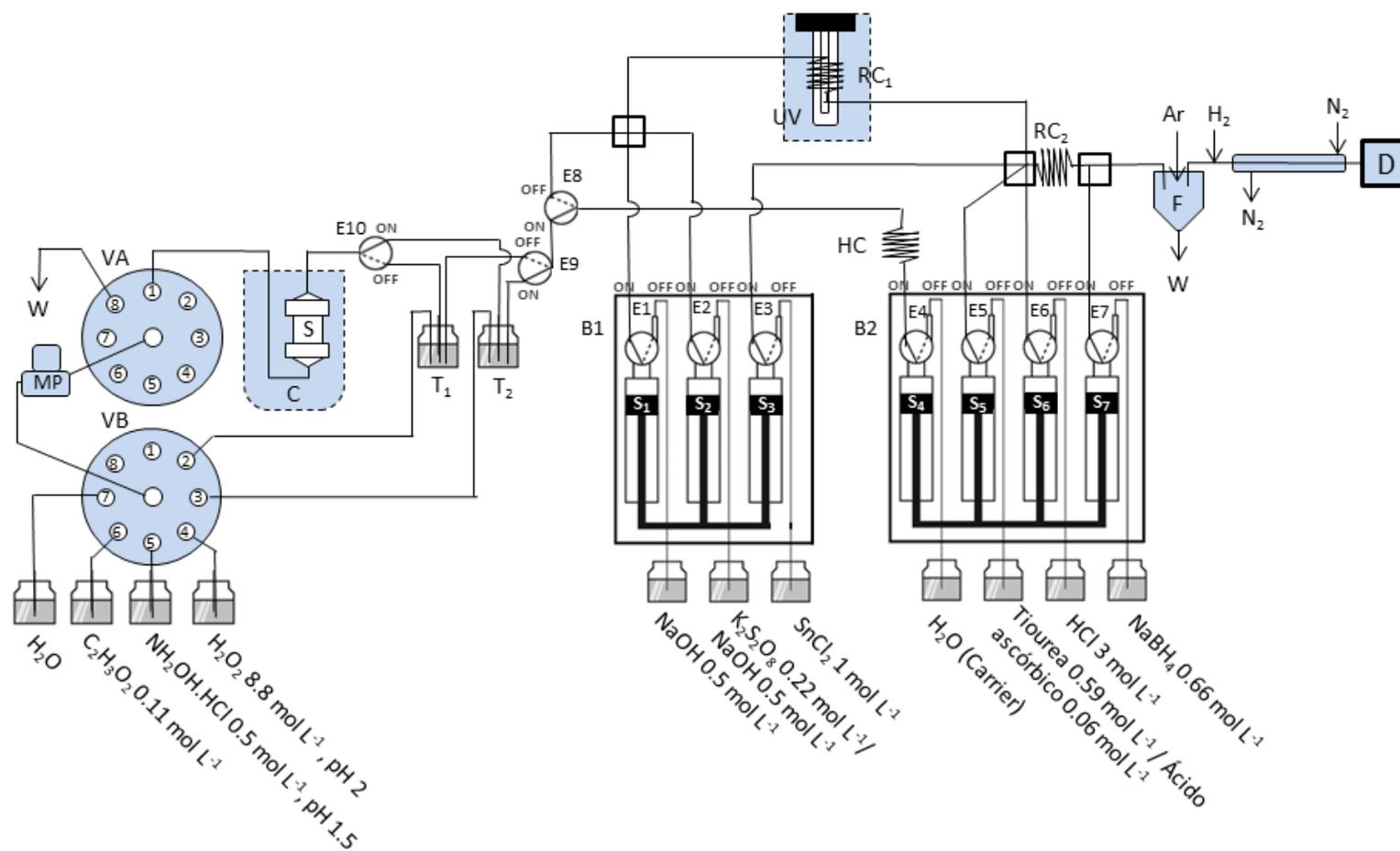


Figura 7. Sistema en flujo de extracción secuencial BCR de tres etapas. VA y VB: válvulas de conmutación; B1 y B2: buretas; C: cámara de ultrasonido; D: detector de fluorescencia atómica; E: válvulas solenoides de tres vías; F: cámara de separación de fases; HC: bucle de carga; MP: microbomba; RC: bucle de reacción; Sx: jeringa; S: columna de suelo; T: tanque de homogenización; UV: cámara de fotooxidación UV; W: desecho.

El hidruro gaseoso fue separado de la matriz mediante el separador de gas/líquido, y la humedad de la fase gaseosa eliminada mediante una membrana de nafi3n de Permapure (PermaPure, Inc., Toms River, NJ). Posteriormente, la fase gaseosa fue introducida directamente en la unidad de detección. El arg3n y el nitr3geno fueron utilizados como gas portador (100 mL min^{-1}) y de secado (10 mL min^{-1}), respectivamente y un flujo de gas hidr3geno (25 mL min^{-1}) fue suministrado externamente para soportar la llama del AFS.

Las mediciones fueron realizadas en un AFS (PS Analytical Millennium System, Kent UK) equipado con una lámpara de cátodo hueco de arsénico (Photron Super lamp, Victoria, Australia) con los siguientes parámetros: corriente primaria de 27.5 mA; corriente secundaria de 35.0 mA; y una longitud de onda de 193.7 nm. Una lámpara UV TNN 15/32 15 W modelo *Heraeus Noblelight* fue utilizada en la etapa de fotooxidación para la conversión de las especies orgánicas en inorgánicas. El software Autoanalysis 5.0 (Sciware Systems) fue utilizado para el control del instrumento y la adquisición de datos (Apéndice I).

4.8.3. Procedimiento analítico para el fraccionamiento de arsénico en suelo

El sistema MSFIA-HG-AFS fue adaptado para llevar a cabo de forma automática las siguientes dos funciones: 1) extracción del suelo con los tres eluentes BCR, y 2) la determinación del As_T en cada fracción. La Tabla X muestra los

pasos analíticos utilizando en el sistema en flujo de extracción secuencial BCR de tres etapas.

Paso 1. Extracción secuencial en línea: La primera disolución BCR (F1, ácido acético 0.11 mol L⁻¹) fue conducida por medio de las válvulas de selección (VA y VB) e impulsada mediante la microbomba (MP) desde los contenedores a través de la columna (S) con las partículas del suelo. La extracción de As de suelo agrícola fue realizada en un baño ultrasónico (C) para mejorar la eficiencia de la extracción. Finalmente, 10 mL del lixiviado del suelo fueron recolectados y homogenizados con un agitador magnético en el recipiente seleccionado (T1 o T2). El tiempo de análisis fue reducido por el empleo de dos recipientes utilizados de manera alterna colocados a los extremos de la válvula E10.

Paso 2. Toma de alícuota de lixiviado de suelo: El volumen de lixiviado fue cargado dentro del HC en función del tipo de fracción extraída (0.5 mL para F1 y F2, 0.15 mL para F3). El volumen de F3 fue menor que la de F1 y F2 con el objetivo de evitar condiciones oxidantes y la disminución de la señal analítica.

Paso 3. Proceso de fotoxidación: La alícuota de lixiviados del suelo fue mezclada con una disolución de un agente oxidante específico (K₂S₂O₈ 1.5% m v⁻¹ con NaOH 0.5% m v⁻¹ para F1, K₂S₂O₈ 5.4% m v⁻¹ con NaOH 0.5% m v⁻¹ para F2 y NaOH 0.5% m v⁻¹ para F3), y transportada a la cámara de fotoxidación UV para la degradación de las especies orgánicas. Un tiempo de 2 min de flujo detenido de la muestra dentro de la cámara de fotoxidación UV fue suficiente para la degradación completa de especies.

Paso 4. Preparación para HG: Las interferencias de los subproductos de la fotooxidación UV sobre la etapa de generación de hidruros fueron evitadas mediante el uso de una disolución reductora apropiada. La disolución producida durante la fotooxidación fue prereducida con una mezcla de tiourea y ácido ascórbico para F1 y F2 o $\text{HONH}_2 \cdot \text{HCl}$ para F3 durante 1 min.

Paso 5. Acidificación: La alícuota de la etapa 4 fue mezclada con HCl 0.6-3.0 mol L^{-1} en el mismo bucle de reacción (RC2).

Paso 6. HG: La alícuota acidificada fue mezclada con NaBH_4 0.5-2.5% m v^{-1} y transportada hasta el separador gas-líquido F de vidrio. El hidruro fue transportado y secado con un flujo de N_2 a contracorriente.

Paso 7. Detección por AFS: Un detector de fluorescencia atómica se utilizó para determinar el contenido de As.

Paso 8. Limpieza de la tubería: La tubería fue finalmente lavada con agua destilada.

El contenido de As fue determinado en cada subfracción obtenida (10 mL de F1, F2 o F3) para evaluar la cinética de la extracción. Cada subfracción se analizó por triplicado, y los pasos 2-8 fueron repetidos para cada señal analítica (Figura 8). Las subfracciones con concentraciones de As superiores al límite de cuantificación (LOQ) fueron utilizados para determinar el contenido de As en las fracciones (≤ 13 subfracciones fueron utilizados para todos los casos). La frecuencia de análisis fue incrementada por la extracción simultánea durante la determinación de As por triplicado de la subfracción anterior. La Tabla X muestra el flujo y la posición de las válvulas solenoides de las jeringas para los pasos realizados durante la extracción

simultánea de As: a) el drenaje del contenedor de lixiviado, b) el lavado del contenedor de lixiviado vacío con agua destilada, y c) paso de extracción de As.

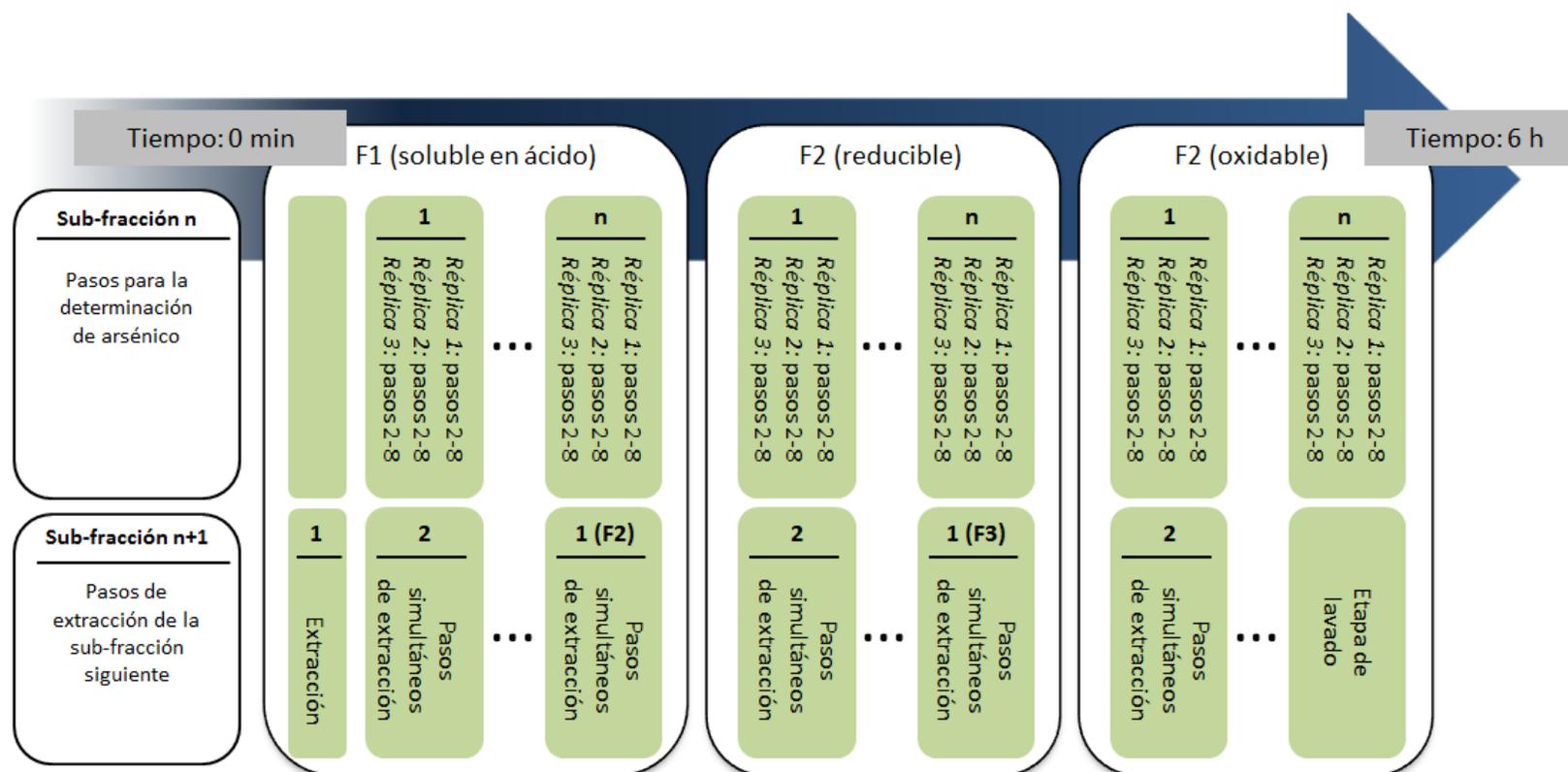


Figura 8. Representación esquemática de extracción secuencial de arsénico por el sistema MSFIA-HG-AFS.

TABLA X
PROCEDIMIENTO ANALÍTICO PARA LA EXTRACCIÓN SECUENCIAL DE ARSÉNICO EN SUELO AGRÍCOLA

Dispositivo/ operación	Flujo (mL min ⁻¹)			Volumen (mL)			Posición de las válvulas solenoide										Válvulas de selección		Comentario
	B1	B2	MP	B1	B2	MP	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	VA	VB	
<i>Paso 1</i>																			
MP	-	-	1	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Off ^d	1	6 ^b	Extracción de suelo
<i>Paso 2</i>																			
B/Cargar	-	1	-	-	0.5 ^c	-	-	-	-	On	Off	Off	Off	On	Off ^d	-	-	-	Carga de lixiviado
<i>Paso 3</i>																			
B/Dispensar ^a	1.4	5	-	0.3	1	-	On	On	Off	On	On	On	Off	Off	-	-	-	-	Paso de fotoxidación para F1
B/Dispensar ^a	5	5	-	1	1	-	On	Off	Off	On	On	On	Off	Off	-	-	-	-	Paso de fotoxidación para F2
B/Dispensar ^a	0.4	5	-	0.4	1	-	Off	On	On	On	On	On	Off	Off	-	-	-	-	Paso de fotoxidación para F3
<i>Pasos 4 y 5</i>																			
B/Cargar	15	15	-	Prim		-	Off	Off	Off	Off	Off	Off	Off	Off	-	-	-	-	Carga de jeringas
B/Dispensar ^a	-	5	-	-	1.2	-	-	-	-	On	On	On	Off	Off	-	-	-	-	Paso de prereducción para F1
B/Dispensar ^a	-	5	-	-	1.2	-	-	-	-	On	On	On	Off	Off	-	-	-	-	Paso de prereducción para F2
B/Dispensar ^a	2	5	-	0.6	1.2	-	Off	Off	On	On	Off	On	Off	Off	-	-	-	-	Paso de prereducción para F3
B/Cargar	15	15	-	Prim		-	Off	Off	Off	Off	Off	Off	Off	Off	-	-	-	-	Carga de jeringas
<i>Pasos 6 y 7</i>																			
B/Dispensar	-	8	-	-	5	-	-	-	-	On	Off	On	On	Off	-	-	-	-	HG y detección
<i>Paso 8</i>																			
B/Cargar	-	10	-	-	5	-	-	-	-	Off	Off	Off	Off	Off	-	-	-	-	Carga de jeringas
B/Dispensar	-	10	-	-	5	-	-	-	-	On	Off	Off	Off	Off	-	-	-	-	Lavado de tubería
<i>Pasos simultáneos a, b y c</i>																			
MP	-	-	4	-	-	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	3 ^e	Vaciado de los contenedores
MP	-	-	4	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	7	Lavado de tubería
MP	-	-	1	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	On ^d	1	6 ^b	Extracción de suelo	

E7: permite la carga de lixiviado de suelo; E9 y E10: permite el uso de los contenedores de lixiviado de suelo de manera alterna por el cambio de la posición de la válvula; B: bureta; MP: microbomba; HG: generación de hidruro; On: encendido; Off: apagado; Prim: dispensa o carga el volumen necesario para llegar a la posición inicial o final de la bureta, respectivamente; ^a esta operación (conmutación de las válvulas, flujo, y/o volumen) fue utilizada de acuerdo a la fracción analizada; ^b la posición puede ser 4, 5 o 7 de acuerdo con la etapa de lavado o/y el eluyente utilizado para la extracción; ^c 0.15 mL para F3; ^d de acuerdo con los cambios en la conmutación de las válvulas de acuerdo con la alternancia del contenedor; ^e la posición fue también 2 ó 3 de acuerdo a la alternancia del contenedor.

4.9. Determinación de arsénico bioaccesible en maíz

4.9.1. Caracterización química de grano de maíz

El contenido de elementos como potasio (K_T), magnesio (Mg_T), calcio (Ca_T), sodio (Na_T), cobre (Cu_T), hierro (Fe_T), manganeso (Mn_T), níquel (Ni_T) y zinc (Zn_T) en el grano de maíz fueron determinados mediante ICP-AES (Optima5300 DV, Perkin Elmer® Inc.) equipado con nebulizador neumático *Gemcone* para alto contenido de sólidos (Waltham, MA, EE.UU.). El ICP-AES fue operado utilizando los parámetros de la Tabla XI. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado.

TABLA XI
CONDICIONES DE OPERACIÓN UTILIZADAS EN EL ICP-AES

Parámetro	Valor
Potencia del generador RF	1300W
Frecuencia RF	40 MHz
Flujo de Ar en plasma	15 L min ⁻¹
Flujo de Ar en nebulizador	0.7 L min ⁻¹
Flujo auxiliar de Ar	0.2 L min ⁻¹
Tiempo de integración	5 s
Flujo de aspiración	1.5 mL min ⁻¹

4.9.2. Procedimientos de nixtamalización de maíz

Las muestras de maíz fueron nixtamalizadas de acuerdo con el procedimiento ligeramente modificado de López Martínez *et al.* [135]. Alrededor de 300 g de maíz fueron cocidos con 900 mL de cal grado alimenticio 1 g L⁻¹. Los granos de maíz

fueron cocinados a 100°C durante 1 h y posteriormente fueron lavados con agua desionizada para eliminar el exceso de la disolución de cal. Posteriormente, los granos de maíz fueron secados en estufa a 70°C, triturados en mortero, y tamizados para la obtención de la fracción <250 µm.

4.9.3. Digestión gastrointestinal *in vitro*

En este estudio, la bioaccesibilidad del As en el grano de maíz, es decir la cantidad de As liberada en el tracto gastrointestinal, fue determinada mediante ensayos *in vitro* de tres etapas secuenciales: 1) bucal, 2) gástrica y 3) duodenal. 1 g de maíz crudo o cocido fue digerido utilizando el proceso de extracción simulada basada en el método descrito por Jovani *et al.* [136] y modificado de acuerdo con la muestra y las propiedades sistema. 8 mL de agua desionizada y 0.5 mL de la disolución bucal fueron agregados a 1 g de muestra. La suspensión reposó durante 5 min y posteriormente el pH fue ajustado a 2.0 con HCl 6 mol L⁻¹. Después de 15 min el valor del pH fue reajustado a 2. Posteriormente, un volumen de 0.3 mL de una disolución de pepsina recién preparada fue agregado. La muestra fue llevada a 10 mL con agua desionizada e incubada en un baño de agua con agitación magnética a 37°C durante 2 h. Antes de la etapa de digestión intestinal, el pH del digerido gástrico fue ajustado a pH 5 por la adición gota a gota de NaHCO₃ 1 mol L⁻¹. Después 2.5 mL de la mezcla de pancreatina-extracto de bilis fueron agregados y se continuó la incubación durante otras 2 h. El pH fue ajustado a 7.2 mediante la adición gota a gota de NaOH 0.5 M. Posteriormente la mezcla fue centrifugada y el

sólido fue separado del sobrenadante. El As presente en el sobrenadante fue definido como la fracción bioaccesible de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$As \text{ bioaccesible} = \frac{([As_d])(V)(100)}{([As_{Tgrano}])(M)} \quad (4)$$

donde $[As_d]$ es la concentración de As en el sobrenadante del digerido (mg L^{-1}), V es el volumen total del digerido gástrico (L), $[As_{Tgrano}]$ es la concentración de As en el grano de maíz crudo o cocido en base seca (mg kg^{-1}) y M la masa de muestra de maíz utilizada (kg).

4.9.4. Preconcentración de arsénico mediante extracción en punto nube

Previo a la determinación por el sistema MSFIA-HG-AFS, el As del digerido gastrointestinal fue preconcentrado mediante una extracción en punto nube. Un volumen de 8 mL del digerido gástrico fue agregado a un tubo de ensayo y centrifugados a 3000 min^{-1} durante 10 min. Una vez decantado, 0.85 mL de HCl 12 mol L^{-1} fueron agregados al sobrenadante. El sobrenadante fue agitado y centrifugado una vez más (3000 min^{-1} por 10 min). Posteriormente, 50-150 μL de la disolución de Tritón 10% m v^{-1} , y de 200-600 μL de DDTP 50 % m v^{-1} fueron agregados al sobrenadante. Etanol absoluto (450-950 μL) fue agregado con el objetivo de homogenizar su contenido en los estudios de optimización. La suspensión fue incubada a 50°C durante 20-40 min y posteriormente centrifugada

(3000 rpm durante 10 min). La disolución fue enfriada en baño de hielo durante 10 min y el sobrenadante eliminado mediante decantación. Posteriormente el extracto fue reconstituido con 1 mL de la disolución HCl 1 mol L⁻¹-metanol 10% m v⁻¹. El factor de pre-concentración fue calculado como muestra la Ecuación 5:

$$FP = \frac{P_{pc}}{P} \quad (5)$$

donde, P es la concentración del As en la disolución patrón (digerido gastrointestinal de arroz o maíz con una cantidad determinada de As) (μg L⁻¹), y P_{pc} es la concentración de As en el mismo patrón de As después del proceso de CPE (μg L⁻¹).

4.9.5. Estudios de recuperación

Con el fin de evaluar la afinidad de As(V), As(III), DMA y MMA por la matriz micelar fue agregada una cantidad de cada una de estas especies equivalente a 2.5 μg L⁻¹ en digerido producido a partir de maíz y arroz (25.2 μg kg⁻¹ de grano). El contenido de cada especie de As fue determinado con y sin el uso de CPE.

4.9.6. Sistema MSFIA-HG-AFS para la determinación de arsénico en extractos CPE

El sistema MSFIA-HG-AFS utilizado para la determinación de As se muestra en la Figura 9. La marca y tipo de material de buretas, jeringas, tubería, lámpara y válvulas solenoides fue similar al reportado en la Sección 4.8.2. Dos buretas multijeringas con un conjunto de cinco jeringas de vidrio S1-S5 con capacidades de 2.5, 10.0, 2.5, 5.0 y 5.0 mL fueron utilizadas. Cada jeringa tiene una válvula solenoide de tres vías E1-E5 y las dos válvulas solenoides adicionales fueron empleadas para conducir el flujo de la forma deseada. La tubería incluyendo los bucles de reacción (RC1 y RC2) y de carga (HC) presenta las mismas dimensiones que las indicadas en la Sección 4.8.2.

4.9.7. Procedimiento analítico para la determinación de arsénico bioaccesible en maíz

Un nuevo método automatizado para la determinación de As bioaccesible a niveles traza en granos de maíz fue desarrollado mediante un MSFIA acoplada a HG-AFS. La determinación de As en el extracto obtenido mediante CPE fue realizada en el sistema MSFIA-HG-AFS (Figura 9), el cual fue adaptado para llevar a cabo de forma automática las siguientes dos funciones: 1) fotooxidación de las especies de As, y 2) la determinación del As_T en cada extracto gastrointestinal. La Tabla XII muestra los pasos analíticos utilizando el sistema en flujo de extracción secuencial BCR de tres etapas.

Paso 1. Limpieza del tubo de carga: 0.6 mL de extracto CPE fue cargado dentro del HC y posteriormente desechados mediante la válvula solenoide E7.

Paso 2. Toma de alícuota de extracto CPE: Una alícuota de 0.5 mL de extracto CPE fue cargado dentro del HC.

Paso 3. Proceso de fotoxidación: La alícuota de extracto CPE fue mezclada con una disolución de un agente oxidante específico ($K_2S_2O_8$ 1.5% m v⁻¹ con NaOH 0.5% m v⁻¹), y transportada a la cámara de fotoxidación UV para la degradación de las especies orgánicas. El tiempo de flujo detenido de la muestra dentro de la cámara de fotoxidación UV fue de 5 min.

Paso 4. Preparación para HG: La interferencia de las condiciones oxidantes para la etapa de generación de hidruros fue evitadas mediante el uso de una disolución reductora apropiada. La disolución producida durante la fotoxidación fue prereducida con una mezcla de tiourea y ácido ascórbico durante 1 min.

Los pasos de 5, 6, 7 y 8 (acidificación, generación de hidruros, detección por AFS y limpieza de la tubería) fueron similares a los reportados en la Sección 5.8.3, pero utilizando HCl 3.0 mol L⁻¹, tiourea 4.5% m v⁻¹ con ácido ascórbico al 1% m v⁻¹ y NaBH₄ 2.5% m v⁻¹ según el caso.

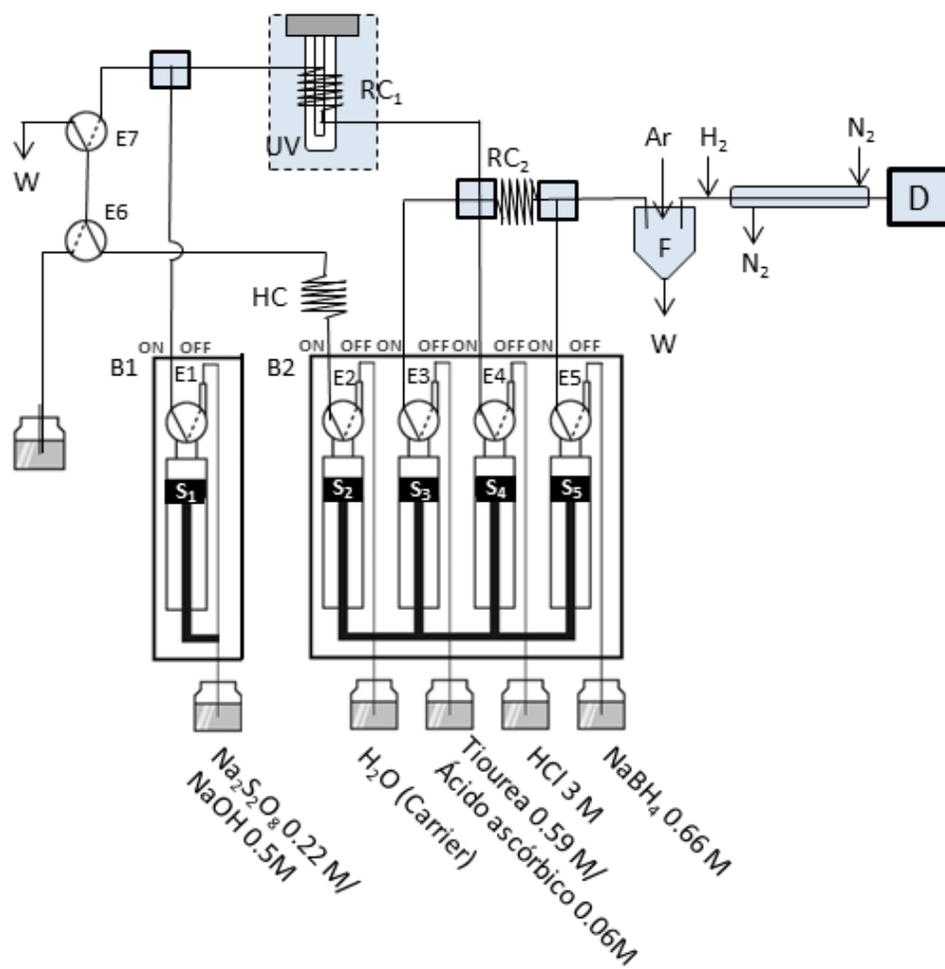


Figura 9. Sistema MSFIA-HG-AFS para la determinación de arsénico en digerido enzimático de maíz. B1 y B2: buretas; D: detector de fluorescencia atómica; Ex: válvulas solenoides de tres vías; F: cámara de separación de fases; HC: bucle de carga; RC: bucle de reacción; Sx: jeringa; W: desecho.

TABLA XII
PROCEDIMIENTO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO EN EL EXTRACTO DE CPE POR
MSFIA-HG-AFS

Dispositivo/ operación	Flujo (mL min ⁻¹)		Volúmen (mL)		Posición de las válvulas solenoide							Comentarios
	B1	B2	B1	B2	E1	E2	E3	E4	E5	E6 ^a	E7 ^a	
<i>Paso 1</i>												
B/Cargar	-	5	-	0.6	Off	On	Off	Off	Off	On	Off	Limpiar de tubo de carga
B/Dispensar	-	5	-	5	Off	On	Off	Off	Off	Off	On	
<i>Paso 2</i>												
B/Cargar	-	1	-	0.5	Off	On	Off	Off	Off	On	Off	Carga de extracto CPE (toma de alícuota)
<i>Paso 3</i>												
B/Dispensar ^a	5	5	0.3	1	On	On	Off	Off	Off	Off	Off	Fotoxidación
<i>Pasos 4 y 5</i>												
B/Cargar	15	15	Prim		Off	Off	Off	Off	Off	Off	Off	Carga de jeringas
B/Dispensar	-	5	-	1.2	Off	On	On	On	On	Off	Off	Prereducción
B/Cargar	15	15	Prim		-	Off	Off	Off	Off	Off	Off	Carga de jeringas
<i>Pasos 6 y 7</i>												
B/Dispensar	-	6	-	8	-	On	Off	On	On	Off	Off	Generación de hidruros y detección
<i>Paso 8</i>												
B/Cargar	-	15	-	10	-	Off	Off	Off	Off	Off	Off	Carga de jeringas
B/Dispensar	-	10	-	10	-	On	Off	On	Off	Off	Off	Limpieza de tubería

E6: permite la carga del extracto CPE en el sistema; E7: permite la conducir el flujo hacia el desecho; Bx: bureta; On: encendido; Off: apagado; Prim: dispensa o carga el volumen necesario para llegar a la posición inicial o final de la bureta; ^a válvulas solenoides externas; Los pasos del 2-8 fueron repetidos 3 veces para la obtención de réplicas.

4.10. Análisis estadístico

Todas las muestras fueron analizadas por triplicado. Los resultados fueron expresados como valores promedio con desviaciones estándar (DE) como medida de dispersión (promedio \pm DE). El efecto de los parámetros en la rizosfera sobre la acumulación y la translocación de As en el cultivo fue evaluado mediante Análisis de Componente Principal (ACP; IBM SPSS Statistics software versión 21) utilizando los datos de caracterización del suelo y las concentraciones As en las partes de la planta de maíz. Para ACP, el método de rotación fue Varimax con normalización Kaiser. La similitud entre las muestras de suelos agrícolas se evaluó mediante el Análisis de Conglomerados (cluster, AC) mediante la agrupación de vecinos más cercanos (Nearest Neighbor Clustering) y la distancia Euclídea.

Los parámetros críticos que afectan el rendimiento del sistema automatizado para el fraccionamiento del suelo agrícola y la determinación del As biodisponible en el grano de maíz fueron optimizados de modo multivariante mediante el uso del diseño Doehlert (Statistica versión 7, Apéndice J). En el desarrollo de la metodología para la determinación del As biodisponible en maíz la deseabilidad individual (d_x) fue calculada como muestra la Ecuación 6,

$$d_x = \frac{V - V_m}{V_M - V_m} \quad (6)$$

donde V_M es el valor mayor de las experiencias, V_m el valor menor, y V el dato que se desea decodificar. La deseabilidad global (D_G) utilizada en la optimización del sistema es una media geométrica de las d_x individuales.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Caracterización química de suelo y de agua de riego

La caracterización de muestras de suelo y de agua subterránea utilizada para el riego de maíz fue realizada en los tres sitios agrícolas de muestreo. Las Tablas XIII y XIV muestran la caracterización del agua de riego y el suelo, así como el contenido de As en cada sitio de muestreo. De acuerdo al análisis textural, las muestras de suelo evaluadas de las zonas A, B y C fueron clasificadas como arcillosa, arcillosa limosa y franco arcillosa limosa, respectivamente (Apéndice K); las dos primeras (zonas A y B) fueron ricas en el contenido de N total. La conductividad, el Ca^{2+} intercambiable, el CaCO_3 y el contenido de Cl^- en los puntos de muestreo MTA-A y MTB-A, así como en los lixiviados de suelos agrícolas en los puntos MTA 1-6 y MTB 1-6 (Matehuala, zonas A y B) fueron más altos que en las muestras de VR 1-6 (Villa de Ramos, zona C). La alta conductividad, y por lo tanto, la alta salinidad en las muestras de Matehuala podría estar asociada a los altos niveles de iones Ca^{2+} detectados en las zonas y no a la concentración de Na^+ y K^+ que fue similar y baja para todas las muestras. Una alta salinidad del suelo agrícola puede causar la disminución de la biomasa de los cultivos y causar efectos negativos sobre su crecimiento y la fisiología, produciendo clorosis e incluso muerte de la planta [137]. Asimismo, el estrés de la planta generado por los altos

niveles de sal puede alterar la absorción de nutrientes y/o contaminantes. Las muestras de suelo en este estudio fueron clasificados como "No salinas" ($<2 \text{ mS cm}^{-1}$) y "moderadamente salina" ($4\text{-}8 \text{ mS cm}^{-1}$) de acuerdo con la FAO [137]. Aunque las zonas A y B mostraron los niveles más altos de salinidad, estos sitios agrícolas presentaron un alto contenido de macronutrientes como nitrógeno lo cual podría aumentar la tolerancia de los cultivos a la salinidad del suelo. El contenido de elementos tales como Mn y Fe, cuyos hidróxidos amorfos pueden formar complejos de As insolubles, fue mayor en la zona B que en las otras zonas de muestreo. La zona B presentó el contenido más alto de As total; sin embargo, el As soluble en la zona A fue más alto que en las zonas B y C. El contenido de $\text{PO}_4^{3-\text{WE}}$, un análogo estructural del ion arseniato, también fue mayor en la zona A. La concentración de As total en el agua de riego más alta también fue encontrado en la zona A de San Luis Potosí ($1408 \pm 69 \mu\text{g L}^{-1}$), concentración que excede el límite máximo permitido por la EPA de 1 mg L^{-1} [1]. Las mismas condiciones del suelo que afectan la migración de PO_4^{3-} pueden afectar la movilidad de As y alterar su migración desde la fuente de contaminación a través de los canales de riego. Siendo análogos estructurales, tanto la migración de PO_4^{3-} como la movilidad de AsO_4^{3-} desde la fuente de contaminación a través de los canales de riego hasta las zonas de cultivo, pueden ser afectadas por características similares del suelo de la región.

TABLA XIII
 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL AGUA DE IRRIGACIÓN Y EL
 SUELO AGRÍCOLA

Parámetro	Zona A	Zona B	Zona C
	Agua de irrigación		
As total ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1408.6±69.2	5.7±2.5	23.6±2.3
Conductividad (mS cm^{-1})	2.18±0.11	2.51±0.13	0.66±0.03
pH	7.6±0.2	7.7±0.3	8.58±0.12
Fe total (mg L^{-1})	<0.2	<0.2	<0.2
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	15.1±0.3	21.4±0.3	17.7±0.3
Oxígeno disuelto (mg L^{-1})	8.6±0.2	7.2±0.1	8.06±0.2
Cloruros (mg L^{-1})	54.4±2.1	72.2±4.5	22.0±2.3
Mn total (mg L^{-1})	<0.1	<0.1	<0.1
	Suelo agrícola ^a		
Arena (%)	21.52	20.52	11.52
Limo (%)	34.16	69.16	48.16
Arcilla (%)	44.32	10.32	40.32
N total (%)	0.279	0.316	0.186
Ca ^b ($\text{meq } 100\text{g}^{-1}$)	17.33	39.31	13.75
Mg ^b ($\text{meq } 100\text{g}^{-1}$)	1.63	1.45	2
K ^b ($\text{meq } 100\text{g}^{-1}$)	0.11	0.08	0.11
Na ^b ($\text{meq } 100\text{g}^{-1}$)	0.25	0.32	4.55
CaCO ₃ (%)	>10 %	>10 %	1-2 %

^a, Muestra compuesta de 6 muestras tomadas en el sitio agrícola; ^b, Intercambiable

TABLA XIV
 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL SUELO AGRÍCOLA Y LA
 PLANTA DE MAÍZ

Punto de muestreo	As _T (mg kg ⁻¹)	As _{WE} (µg kg ⁻¹)	As(V) _{WE} (µg kg ⁻¹)	As(III) _{WE} (µg kg ⁻¹)	PO ₄ ³⁻ _T (mg kg ⁻¹)	PO ₄ ³⁻ _{WE} (mg kg ⁻¹)	Cond. (mS cm ⁻¹)	Cl ⁻ _{WE} (mg kg ⁻¹)
MTA-1	10.0±0.6	1888±95	1873±40	19±5	2643±65	18±2	4.1±0.4	26.7±0.4
MTA-2	7.3±0.3	1692±60	1641.6±0.9	<LOD	2183±172	17±3	4.08±0.07	39±1
MTA-3	7.0±0.3	1638±19	1936±255	14±3	1466±84	21±1	3.49±0.05	32±1
MTA-4	5.1±0.1	1539±32	1483±115	9±1	2160±255	7.7±0.9	4.12±0.02	35.6±0.4
MTA-5	5.5±0.3	1216±34	1146±38	41±5	2541±128	10.8±0.6	2.3±0.2	37±1
MTA-6	4.0±0.2	959±43	935±64	5±1	2822±245	2.3±0.2	4.2±0.5	69±8
MTB-1	41±1	496±154	346±96	64±16	151±23	0.5±0.3	4.90±0.05	38±5
MTB-2	42.4±0.7	749±24	734±34	<LOD	11.7±0.8	0.9±0.3	5.44±0.19	40±3
MTB-3	38±2	534±15	565±8	<LOD	12.5±0.2	0.5±0.1	5.3±0.7	134±16
MTB-4	44±5	850±58	733±52	5±1	12.0±0.6	1.1±0.4	5.03±0.11	19±4
MTB-5	20.7±0.8	942±9	876±21	<LOD	12.0±0.9	1.72±0.04	5.61±0.18	47±6
MTB-6	25±1	625±45	574±68	5±1	12.6±0.3	0.8±0.4	5.30±0.19	47±9
VR-1	10.3±0.4	202±13	286±27	48±3	210±34	1.4±0.5	1.8±0.2	24±7
VR-2	9.7±0.2	151±5	195±16	7.6±0.5	235±16	1.8±0.4	2.28±0.07	16±4
VR-3	7±2	184±1	180±46	22±4	180±6	2.1±0.2	2.40±0.03	14±3
VR-4	10.2±0.1	46.5±0.1	62±3	31.8±3	196±12	0.9±0.4	1.55±0.02	4.4±0.3
VR-5	4±1	85±5	63±10	25±2	200±41	1.0±0.4	1.83±0.06	10±3
VR-6	6.8±0.7	80±8	73±3	8±3	229±18	0.6±0.3	2.41±0.11	53±7

Punto de muestreo	Fer (mg kg ⁻¹)	Mn _T (mg kg ⁻¹)	Ca _T (g kg ⁻¹)	pH _{WE}	TOC _{WE} (mg kg ⁻¹)	PO ₄ ³⁻ ^a (mg kg ⁻¹)	Fe ^a (mg kg ⁻¹)
MTA-1	3467±22	866±22	40.2±0.6	7.13±0.15	131±44	816.6±20.8	415±27
MTA-2	3487±446	936±122	24±1	7.43±0.04	167±23	644.1±13.8	190±24
MTA-3	3135±171	844±4	22.4±0.6	7.39±0.14	160±18	1290.5±92.1	334±7
MTA-4	3110±185	856±4	23±1	7.47±0.06	168±11	1496.2±71.6	197±20
MTA-5	3429±95	829±17	23±1	7.44±0.06	125±22	2050.8±84.7	261±48
MTA-6	3186±227	837±48	23.0±0.3	7.42±0.02	154±7	398.6±6.0	211±23
MTB-1	1325±28	18.1±0.2	28.2±0.6	7.64±0.14	74±4	95.2±7.0	319±13
MTB-2	1569±284	37±7	22±4	7.61±0.17	105±4	263.1±9.1	718±58
MTB-3	816±74	18±1	12±2	7.61±0.04	70±4	90.3±0.7	412±43
MTB-4	1437±67	32±1	25.4±0.8	7.51±0.01	87±2	89.0±0.8	449±47
MTB-5	1664±400	36±8	23±4	7.51±0.07	143±8	86.2±2.4	562±32
MTB-6	97±8	2.6±0.1	11±1	7.72±0.11	78±4	83.8±6.8	562±28
VR-1	2440±97	51±2	2.6±0.1	8.1±0.2	102±15	709.8±55.1	1123±18
VR-2	2508±55	57.5±0.8	3.3±0.1	7.91±0.03	161±12	609.0±19.2	1221±19
VR-3	2435±117	55±2	6.4±0.4	7.99±0.08	151±8	430.0±14.4	734±100
VR-4	2873±144	57±1	2.7±0.1	7.9±0.3	150±9	382.5±15.5	1043±26
VR-5	2752±173	59±4	3.3±0.2	7.83±0.04	142±5	454.8±28.7	893±42
VR-6	2652±4	55±2	2.9±0.4	7.92±0.10	140±9	456.2±41.6	202±23

WE, fracción soluble en agua (1:1); T, suelo digerido; ^a, raíz digerida, Cond., conductividad

5.2. Concentración de arsénico en el cultivo de maíz

La concentración de arsénico total (As_T) en las diferentes partes de la planta (raíz, tallo, hojas, y grano) fue determinada en cada punto de muestreo (Tabla XV). Los niveles de As encontrados fueron: la raíz >> tallo y hoja > grano. Un orden decreciente similar fue reportado en otros estudios [33, 60]. El contenido de As en el cultivo de maíz tiende a variar en función del contenido de As en el suelo agrícola, el agua de riego, y el efecto químico de la rizosfera; éste fue mayor en las plantas de maíz de la zona A.

La Tabla XV muestra las concentraciones de As en el tallo y la hoja del cultivo de maíz de cada sitio agrícola evaluado. Aunque tejidos como el tallo y la hoja no se ingieren directamente por los seres humanos, el ensilaje de maíz puede ser consumido por el ganado y representa un riesgo para la salud humana a través de la cadena alimentaria. En países como Suiza, la concentración máxima tolerable de As en el ensilaje es de 4 mg kg^{-1} [33]; concentración ligeramente superior a la reportada en este estudio. Las concentraciones de As en el tallo y la hoja de maíz, partes de la planta comestible para el ganado, presentaron valores de $<LOD-3.06 \text{ mg kg}^{-1}$ ps y $<LOD-3.15 \text{ mg kg}^{-1}$ ps, respectivamente, concentraciones de aproximadamente el 10% del contenido de As en el suelo ($4.08-43.68 \text{ mg As kg}^{-1}$). Esta relación fue mayor que la reportada en otros estudios. En los estudios de campo realizados por Marwa *et al.* [61] en diversas zonas agrícolas de Tanzania con concentraciones de As en el suelo de 0.2 a 7.1 mg kg^{-1} , el As total contenido en el

tallo del maíz sólo alcanzó valores de 0.004-0.080 mg kg⁻¹ ps. En estudios realizados por D'Angelo *et al.* [38] en Kentucky, EE.UU., la concentración de As en la hoja del maíz cultivado en suelo con 7.0-13.0 mg As total kg⁻¹ fue 17.0-29.0 µg kg⁻¹ [38]. En ambos estudios, los niveles de As fueron notablemente inferiores que los reportados en el presente estudio.

TABLA XV
CONCENTRACIÓN DE ARSÉNICO TOTAL EN CULTIVO DE MAÍZ

Punto de muestreo	As total (mg kg ⁻¹)				BAF _T	BAF _{WE}	Translocación (%)
	Raíz	Tallo	Hoja	Grano			
MTA-1	47±1	2.59±0.08	3.1±0.2	0.32±0.04	4.7±0.3	25±2	5.45±0.05
MTA-2	48±3	2.89±0.05	2.15±0.10	0.23±0.03	6.5±0.5	28±2	5.99±0.07
MTA-3	54±1	2.89±0.08	2.2±0.2	0.27±0.01	7.7±0.4	33±1	5.34±0.04
MTA-4	41±2	0.68±0.06	1.6±0.2	0.24±0.01	8.1±0.6	26.6±0.8	1.66±0.11
MTA-5	29±1	1.39±0.14	2.02±0.12	0.32±0.03	5.4±0.4	24±2	4.69±0.11
MTA-6	22±3	0.87±0.14	0.93±0.10	0.33±0.01	5.3±0.7	22±2	4.0±0.2
MTB-1	7.6±0.3	3.1±0.4	1.10±0.13	<LOD	0.19±0.01	15±5	40.38±0.14
MTB-2	2.1±0.3	1.38±0.09	0.07±0.15	<LOD	0.05±0.01	2.78±0.10	66.49±0.16
MTB-3	5±1	0.2±0.6	0.52±0.06	<LOD	0.15±0.04	10.3±0.6	4±3
MTB-4	6.8±0.6	2.66±0.14	1.7±0.6	<LOD	0.16±0.02	8±1	38.96±0.10
MTB-5	5.6±0.7	1.1±0.3	1.78±0.09	<LOD	0.27±0.04	5.9±0.2	19.9±0.3
MTB-6	6.9±0.5	1.7±0.2	0.3±0.1	<LOD	0.28±0.03	10.9±0.9	24.83±0.16
VR-1	1.5±0.4	0.03±0.02	0.53±0.13	<LOD	0.14±0.04	7.4±0.6	2±1
VR-2	0.83±0.02	0.02±0.01	0.10±0.05	<LOD	0.09±0.01	5.5±0.2	2±1
VR-3	0.33±0.10	0.02±0.01	<LOD	<LOD	0.05±0.02	1.8±0.6	6±2
VR-4	0.38±0.01	<LOD	0.14±0.04	<LOD	0.04±0.01	8.25±0.14	1.30*
VR-5	0.55±0.07	0.02±0.01	<LOD	<LOD	0.13±0.11	6±5	4±2
VR-6	0.53±0.11	0.02±0.01	<LOD	<LOD	0.08±0.02	6±1	4±2

BAF: factor de bioacumulación. WE, evaluado en el extracto acuoso del suelo (1:1). T, contenido total; * Estimado a partir de LOD_{AsT} value (0.005 mg kg⁻¹).

El grano de maíz, la parte de la planta directamente consumida por los seres humanos, presentó un contenido de As menor al LOD de 0.005 mg kg^{-1} en las zonas B y C. Las concentraciones de As en el grano de la zona A (Matehuala, San Luis Potosí) variaron desde 0.23 hasta $0.34 \text{ mg As kg}^{-1}$, concentraciones superiores incluso a las reportadas en otras regiones con problemas de contaminación por As, como Mongolia, China ($0.06 \text{ mg As kg}^{-1}$) [60]; Tanzania ($0.01\text{-}0.17 \text{ mg As kg}^{-1}$) [61]; e Hidalgo, México ($0.12 \text{ mg As kg}^{-1}$) [59]. La Tabla XV muestra los valores de BAF_T y BAF_{WE} calculados para cada punto de muestreo. Algunos investigadores han reportado una correlación significativa entre la concentración de As en la planta y la concentración de As en el suelo [32, 33]. En este estudio, el valor BAF_T varió desde 0.04 hasta 8.01 con un promedio de 2.17 , lo cual es comparable a los valores reportados en la literatura. El valor BAF_T determinado por Gulz *et al.* [33] varió desde 0.8 hasta 2.5 , mientras que en estudios reportados por Neithardt *et al.* [60], este valor fue de 0.1 . El BAF_T de la zona A de San Luis Potosí, MTA (6.27 ± 1.28) (Tabla XV), fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que el correspondiente a MTB (0.16 ± 0.07) y VR (0.09 ± 0.12), lo que refleja la baja similitud entre las capacidades de absorción de As en los suelos agrícolas estudiados.

El nivel de As total en la raíz correlacionó significativamente ($p < 0.01$) con el contenido de As total en el extracto acuoso del suelo (As_{TWE}) ($r = 0.929$), pero no mostró una buena correlación con el As total en el suelo ($r = -0.362$) (Figura 10). El valor BAF_{WE} , que representa la relación entre el As total soluble en el suelo y As total en la raíz, es un parámetro que no incluye el proceso de adsorción de As en el

suelo. Este parámetro fue mayor para la zona A que para las zonas B y C de San Luis Potosí. Al igual que As_{TWE} ($r = 0.848$, $p < 0.05$), el $As(V)$ en el extracto acuoso del suelo agrícola presentó una alta correlación ($r = 0.863$, $p < 0.05$) positiva con los valores de BAF_{WE} . El contenido de As_{TWE} y el $As(V)_{WE}$ fueron los parámetro en rizosfera que más afectó a la relación entre el As total extraíble en agua del suelo y la concentración de As en la planta; a mayor concentración de As soluble, mayor absorción de As por la raíz del cultivo. Esta tendencia puede ser atribuida al agotamiento de los mecanismos de desintoxicación con el incremento de la afluencia de As a la planta de maíz.

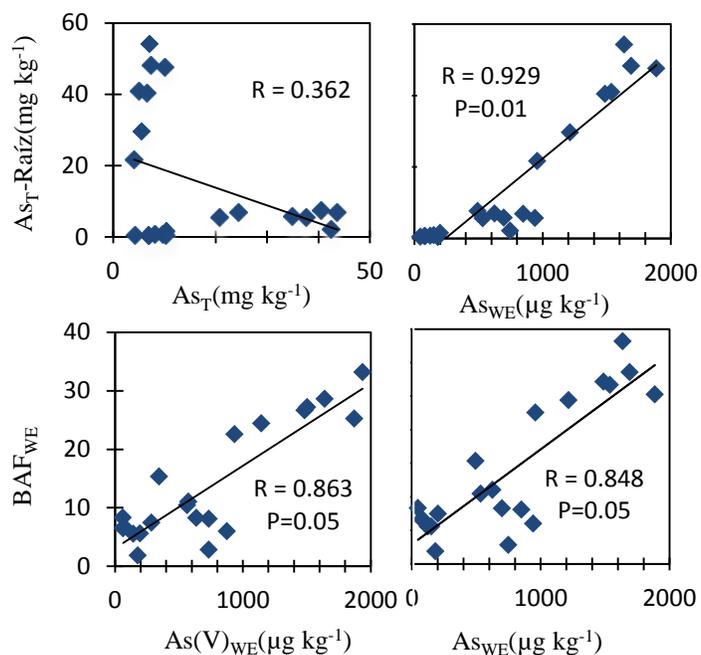


Figura 10. Efecto de As_{TWE} y $As(V)_{WE}$ en el factor de bioacumulación (BAF_{WE}).

La proporción de la forma reducida de As en el extracto acuoso del suelo fue considerablemente menor a la de las especies oxidadas, lo cual explica que As_{TWE} y el $As(V)_{WE}$ presenten una correlación similar con la concentración de As en planta. De acuerdo con Mallik *et al.* [48], únicamente la forma oxidada del As puede ser absorbida por el sistema de raíces del cultivo de maíz. La proporción de la forma reducida de As en el extracto acuoso ($As(III)/As$ total) fue mayor para la zona A (1.1%) que para las zonas B (2.9%) y C (17.0%), por lo que, la mayor concentración de As_{TWE} y proporción de las especies oxidadas de As en el extracto acuoso pueden ser la principal causa de que la zona A presentara puntos de muestreo con mayor contenido de As fitodisponible.

5.3. Efecto de los parámetros químicos de la rizosfera en la acumulación de arsénico por el cultivo de maíz

ACP y CA son dos herramientas comunes en métodos geo-estadísticos y multivariantes que han sido ampliamente utilizados en la clasificación de muestras de suelo en función de la capacidad de los contaminantes para ser inmovilizados en suelos profundos [82], en la selección del tipo de verduras que representan una mayor riesgo para la salud humana, y en la identificación de la fuente de contaminación [83]. La relación entre los parámetros químicos en la rizosfera (Tabla XIV) y el As acumulado en planta de maíz (Tabla XV) fue determinado utilizando ACP. Tres componentes principales fueron obtenidos por ACP (criterio: autovalor > 1) que representó el 87.6% de la variabilidad total (Tabla XVI,

Apéndice L). De acuerdo con el apartado anterior, CP1 mostró una mayor correlación del contenido de As en la planta de maíz con As_{TWE} que con el As_T en suelo, y una mayor correlación de la concentración de As en la planta con $As(V)$ que con la concentración de $As(III)$ en el extracto acuoso del suelo. Por otro lado, CP1 mostró que la concentración de calcio presentó una correlación positiva con el contenido de As total en el suelo. Es conocido que la adsorción de As por la materia orgánica se ve favorecida por los altos niveles de calcio en el suelo [138].

El estado nutricional del fósforo en la planta y la disponibilidad del P inorgánico en la rizosfera pueden afectar severamente la bioacumulación de As en las plantas. Algunos estudios han reportado que la correlación negativa, entre la absorción del metaloide por las raíces del maíz y la concentración de P en el suelo. Abbas *et al.* [49] evaluaron el efecto de la administración de los iones fosfato como tratamiento previo (niveles de PO_4^{3-} de 0 y 5 mM) en experimentos hidropónicos utilizando diferentes variedades de maíz y concentraciones de las especies de As (0 y 2.5 mM). La concentración de P inorgánico fue significativamente menor ($P < 0.001$) con el incremento de la absorción de $As(III)$ y DMA de 90 a 50%, respectivamente. Los estudios realizados por Mallik *et al.* [48] mostraron que el contenido de iones fosfato en la raíz y la hoja de la planta de maíz disminuyó a los 3 y 7 días cuando los niveles de As fueron incrementados en experimentos hidropónicos utilizando dos variedades de maíz y concentraciones de 2.5-12.5 mg L^{-1} . Los efectos antagónicos entre P y el contenido de As en cultivo pueden ser explicados por lo siguiente: 1) la exudación de ácidos orgánicos por el sistema de

raíces de maíz bajo condiciones carentes de fósforo, incrementa la disponibilidad de P; y por lo tanto, la fracción disponible de As es incrementada [61], 2) los cambios en la regulación de la expresión de los transportadores de membrana permiten incrementar la permeabilidad de la membrana para los iones fosfato [49], y 3) la competencia entre el arsénico y el fósforo por su mutua absorción en plantas [48]. A diferencia de lo anterior, en este estudio, el contenido PO_4^{3-} extraíble en agua presentó una alta correlación con el As soluble en el suelo (mayoritariamente AsO_4^{3-}); y en consecuencia con el contenido de As en el cultivo. Sadiq *et al.* [42] observaron resultados similares en experimentos en macetas. El P extraíble empleando como agente extractante al bicarbonato de sodio presentó una correlación positiva significativa ($p < 0.01$) con la concentración de As en el cultivo de maíz. Del mismo modo, el contenido de P extraíble en bicarbonato de sodio (al igual que el $\text{PO}_4^{3-}\text{WE}$ en este estudio) correlacionó positivamente con el contenido de As en el agua de riego. Esta correlación puede atribuirse a la semejanza estructural entre ambas especies, y por lo tanto, a la alta similitud de sus mecanismos de adsorción en suelo así como a una fuente común de enriquecimiento para P y As.

Una correlación negativa entre el valor pH y el contenido de As en la raíz fue encontrada en este estudio. Algunos factores como la carencia de nutrientes en el suelo pueden alterar su pH. La secreción de ácidos orgánicos producida por la baja concentración de P, tienden a aumentar la fitodisponibilidad de nutrientes en suelo, incluyendo la de algunos contaminantes como As [61]. Es conocido que en

condiciones ácidas, el As(V), la forma predominante en el suelo agrícola, es adsorbida principalmente en los óxidos de hierro y aluminio, mientras que en condiciones alcalinas esta especie es absorbida por los óxidos de calcio [139]. Asimismo, a pH ácido, Wolson *et al.* [47] reportaron una menor adsorción del As(V) en óxidos de calcio que en óxidos de hierro y aluminio. En dos de las zonas agrícolas evaluadas en este estudio (zona A y B) el contenido de calcio fue relativamente alto ($> 10\ 000\ \text{mg kg}^{-1}$). Estudios realizados por Martínez-Villegas *et al.* [131], revelaron que el Ca fue el principal parámetro en suelo que limita la propagación de As en una zona de muestreo cercana a la realizada en nuestro estudio (Matehuala, San Luis Potosí, México).

La materia orgánica puede estar presente en el suelo como resultado de la descomposición de plantas y animales. El contenido de materia orgánica puede afectar la movilidad y fitodisponibilidad del As debido a lo siguiente: 1) cambio de potencial redox, 2) disponibilidad de sitios de adsorción, y 3) la formación de complejos solubles [138]. En la zona de estudio, la correlación negativa entre el contenido de A_{ST} y el TOC_{WE} en suelo (CP2) podría ser debida al efecto de la materia orgánica en la disminución del potencial redox predominantemente [140]. Un alto contenido de materia orgánica en el suelo induce la proliferación de microorganismos, que en general, tienden a reducir el potencial redox en el suelo. El As(III) tiene una movilidad mayor hacia suelos profundos que el As(V), ya que la forma oxidada presenta una mayor afinidad por (hidr)óxidos de Fe(III) que la forma reducida. En consecuencia, un alto contenido de materia orgánica no

favorece la acumulación de As en el suelo superficial. En este estudio, el suelo evaluado fue de 0-30 cm de profundidad. Redman *et al.* [140] atribuyeron la reducción de As(V) a As(III) por el alto contenido de materia orgánica del río Inangahua.

Por otra parte, la correlación positiva entre el As_T y minerales como Fe y Mn (CP2) podría ser atribuida a que su dispersión se origina de una matriz mineralógica común. Existen reportes de la presencia de minerales de Pb-Zn-Ag constituidas por arsenopirita en las regiones mineras de San Luis Potosí [20].

TABLA XVI

EFFECTO DE LOS PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS DE LA RIZOSFERA SOBRE LA ACUMULACIÓN DE ARSÉNICO POR EL CULTIVO DE MAÍZ (COMPONENTES PRINCIPALES DE LAS CONDICIONES DEL SUELO AGRÍCOLA DEL CAMPO DE MAÍZ)

Factor	CP 1	CP 2	CP 3
As_{WE}	0.954		
$As_{T(Hoja)}$	0.938		
$As(V)_{WE}$	0.931		
Ca_T	0.925		
pH_{WE}	-0.923		
$As_{T(Raíz)}$	0.874		
$As_{T(Tallo)}$	0.846		
$PO_4^{3-}{}_{WE}$	0.804		
$PO_4^{3-}{}_T$	0.695	0.561	
$As_{T(Suelo)}$		-0.930	
Mn_T		0.917	
TOC_{WE}		0.910	
Fe_T		0.896	
$Conductividad_{WE}$		-0.683	0.505
$As(III)_{WE}$			-0.892
Cl^-_{WE}			0.698

$_{WE}$, evaluado a partir del extracto acuso del suelo (1:1); $_T$, contenido total; ACP, análisis componentes principal. CP1, CP2, y CP3 explican el 49.6%, 28.6% y 9.4% de la varianza total de los datos, respectivamente.

5.4. Efecto del agua de riego en la distribución de arsénico en los campos de maíz

Los minerales presentes en suelos agrícolas, tales como Fe, Mn y Ca pueden participar en la adsorción de As, y por lo tanto, afectar su distribución en el campo de maíz. Como se muestra en las Tablas XIII y XIV, la zona A de San Luis Potosí, exhibió la mayor concentración de As_T en el agua de riego y de Ca_T , Fe_T y Mn_T en el suelo. En este sitio agrícola, la concentración de As_T en suelo disminuye con el incremento de la distancia hasta la fuente de irrigación (Figura 11, Apéndice M). La distribución de As en el campo de maíz y la concentración de elementos como Ca, Fe y Mn en el suelo han sido correlacionados en otros estudios [60, 131]. Estudios realizados por Martínez-Villegas *et al.* [131] en una zona minera reportaron a el contenido de Ca en el suelo como mecanismo limitante en la esorrentía de As (dispersión horizontal) en una región minera. Es conocido que los iones de Ca^{2+} , concretamente el complejo Ca-materia orgánica que presenta sitios de adsorción de carga positiva, puede inmovilizar los iones de AsO_4^{3-} . Neidhardt *et al.* [60] reportaron una correlación positiva ($r \geq 0.64$) entre la concentración de As_T y el contenido Fe_T en la capa superior del suelo en un campo de cultivo de maíz, así como una disminución notable en las concentraciones de As(III) y As_T en el agua de los canales de irrigación. Después de 4 h del proceso de irrigación, las concentraciones iniciales de As(III) y As_T en el agua de canal, 219 y 238 mg L⁻¹, respectivamente, decrecieron hasta 71 y 110 mg L⁻¹, respectivamente. Durante el riego con agua de pozo, las especies As(III) y Fe(II), fácilmente oxidables con el O₂

atmosférico, tienden a co-precipitar como (hidr)óxido de As(V)-Fe(III). Los iones de As(V) también pueden ser adsorbidos sobre partículas de (hidr)óxido de Fe(III) ya presentes en el suelo agrícola [60]. De manera similar al Fe, el Mn también puede formar (hidr)óxido amorfos y fungir como sitio de adsorción para los iones de As(V) en el agua de riego.

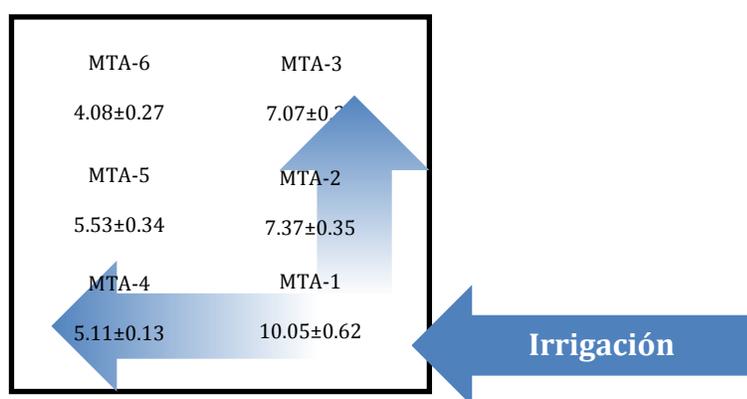


Figura 11. Distribución de arsénico en la zona A de San Luis Potosí (mg kg^{-1}).

La Figura 12 muestra las puntuaciones de los principales componentes en cada punto de muestreo. Los valores positivos indican que la variable aumenta con el incremento del CP. Por el contrario, un decremento de la variable con el aumento CP es sugerido por una puntuación negativa. La magnitud de la puntuación es igual a la tasa de cambio en esa dirección. Un valor de cero significa que la variable se encuentra en el valor promedio de CP. Valores superiores a 1 e inferiores a -1 indican un efecto considerable de la variable. En general, las puntuaciones de los puntos de muestreo más lejanos o más próximos a la fuente de irrigación tienden a exceder este valor. Los valores de CP1 muestran la tendencia del contenido de As

soluble en el suelo y la concentración de As total en la planta para cada sitio agrícola. CP1 fue mayor para la zona A que para las zonas B y C, lo cual refleja que el contenido el As soluble y fitodisponible fue mayor para la zona A. Por otro lado, CP2 representa el contenido de As total en el suelo. Los puntajes menores de CP2 para las muestras de la zona B indican un mayor contenido de As_T en este sitio que en las zonas A y C. Para la zona A, las puntuaciones de CP1 y CP2 presentaron la misma dirección en los 6 puntos de muestreo. La tendencia positiva en ambos parámetros sugirió que las características químicas del suelo en la zona A permiten un alto contenido de As soluble, y por lo tanto, una alta porción de As fitodisponible para el maíz.

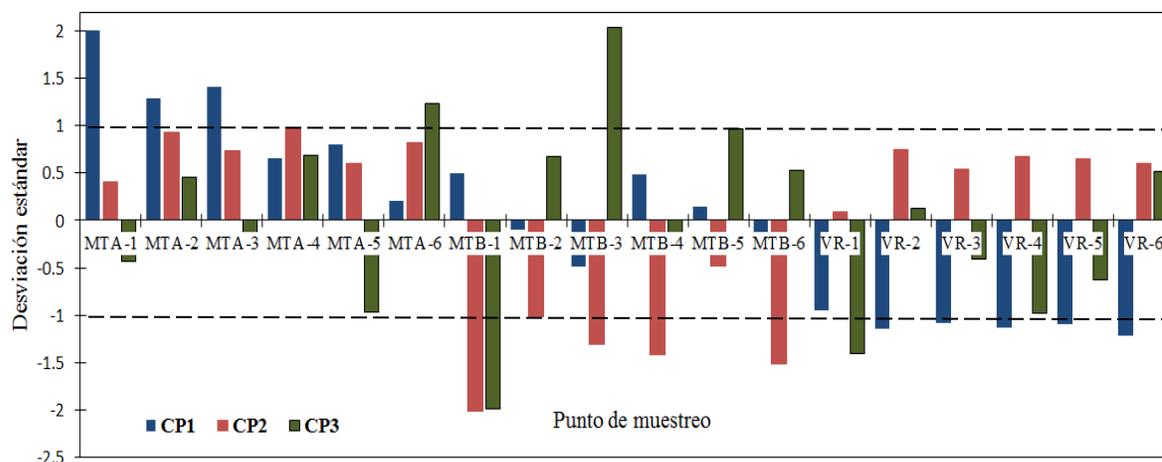


Figura 12. Puntaje de los componentes principales por punto de muestreo: CP1 (As_{WE} , $As_{T(Hoja)}$, $As(V)_{WE}$, Ca_T , $-pH_{WE}$, $As_{T(Raíz)}$, $As_{T(Tallo)}$, $PO_4^{3-}_{WE}$, y $PO_4^{3-}_T$), CP2 ($PO_4^{3-}_T$, $-As_{T(Suelo)}$, Mn_T , TOC_{WE} , Fe_T , y $-conductividad$), y CP3 ($conductividad$, $As(III)_{WE}$, y Cl_{WE}).

De acuerdo con los valores del análisis de conglomerados (dendrograma de la Figura 13), las muestras de suelo pueden ser clasificadas en tres grupos que coinciden con los tres sitios de muestreo evaluados en Matehuala (zona A y B) y Villa de Ramos (zona C). Las muestras de suelo de las zonas A y B mostraron mayor proximidad/similitud entre sí que con las muestras de la zona C. Lo anterior corresponde con su distancia geográfica. Asimismo, el dendrograma muestra que los puntos de muestreo tienden a formar agrupaciones en función de su distancia hacia la fuente de irrigación. El dendrograma muestra que los puntos VR 3, MTB 3, y MTB 6, las más alejadas de la fuente de irrigación, así como MTA 1, la más cercana a la fuente de irrigación, presentan la mayor distancia dentro de la agrupación del mismo sitio agrícola.

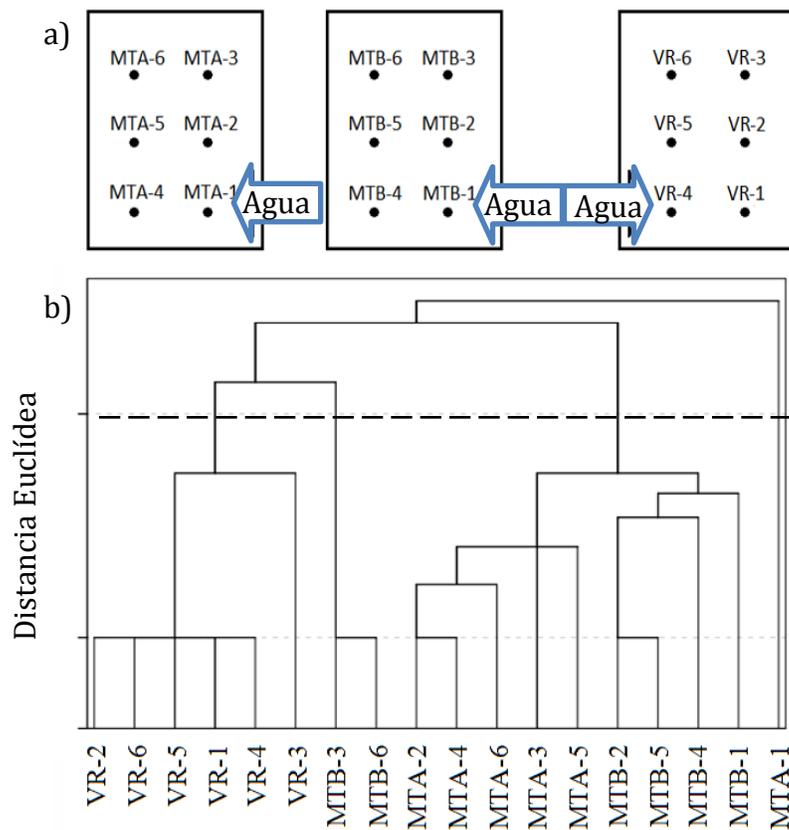


Figura 13. a) Distribución de los puntos de muestreo y b) dendrograma para las muestras de suelo agrícola de un campo de maíz utilizando la agrupación “nearest neighbor” y la distancia Euclídea.

5.5. Translocación arsénico en el cultivo de maíz

La Tabla XV muestra la translocación desde la raíz hacia tallo expresado como porcentaje. En este estudio, el valor promedio de translocación fue de 12.5%; sin embargo, varió drásticamente (intervalo: 0.33-66.49%) en función del sitio de muestreo. La translocación de As aumentó en el siguiente orden: VR <MTA <MTB. Este orden puede ser atribuido a la variabilidad del contenido de agentes complejantes del suelo entre los sitios agrícolas. La translocación de As en el cultivo de maíz ha sido reportada en otros estudios. En Khairpur Mir y Kot Diji, Pakistán, Baig *et al.* [58] reportaron un valor máximo de translocación de As hacia el tallo de maíz de 20.1%; sin embargo, en otros estudios la translocación de As al tallo ha sido reportada en el 1.4% [141] y 1.6% [54]. Gulz *et al.* [33] encontraron valores menores de translocación de As en plantas de maíz cultivadas en suelo franco limoso (0.4-0.5%) que en suelo franco arenoso (3.2 a 4.7%) para una concentración de As soluble en ambos suelos en el intervalo de 165-240 mg kg⁻¹.

El estado nutrimental de la planta de maíz o los parámetros fisicoquímicos del suelo agrícola pueden afectar drásticamente la translocación de As hacia las partes aéreas de la planta. La correlación entre los parámetros químicos de la rizosfera y la translocación de As desde la raíz hasta el tallo fue determinada usando ACP (Tabla XVII).

La translocación de As presentó una correlación negativa con el contenido de Fe y Mn. Similarmente, Mallick *et al.* (2011) reportaron una disminución en la

transferencia de As hacia las partes aéreas del cultivo de maíz con el incremento de la concentración de Fe y Mn. Esto se puede atribuir al proceso de complejación de As en el sistema de la raíces del maíz. Es posible que los hidróxidos amorfos de Fe y Mn limiten el acceso de As a las partes aéreas de la planta por la formación de complejos con As(V) [48]. La correlación negativa entre la PO_4^{3-} soluble y el porcentaje de translocación de As puede ser atribuida a la competencia entre AsO_4^{3-} y PO_4^{3-} por su absorción a través de los canales de transporte de fosfatos [48]. Abbas *et al.* [49] evaluaron el efecto del ion fosfato administrado como pretratamiento (concentración de PO_4^{3-} : 0 y 5 mmol L⁻¹) en experimentos hidropónicos utilizando diversas variedades de maíz y concentraciones de las especies de As (concentración de especies de As: 0 y 2.5 mmol L⁻¹). La concentración de PO_4^{3-} disminuyó significativamente ($p < 0.001$) el afluente de As(III) y DMA a 50 y 90% de la tasa control, respectivamente. Otros parámetros tales como el TOC_{WE} y Cl_{WE} contenidos pueden estar asociados con el estado nutricional del cultivo y su capacidad para el transporte de sustancias.

TABLA XVII

EFFECTO DE LOS PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS DE LA RIZOSFERA SOBRE LA TRANSLOCACIÓN DE ARSÉNICO EN EL CULTIVO DE MAÍZ (COMPONENTES PRINCIPALES DE LAS CONDICIONES DEL SUELO AGRÍCOLA DEL CAMPO DE MAÍZ)

Factor	CP 1	CP 2	CP 3
As _{WE}	0.967		
As(V) _{WE}	0.944		
pH _{WE}	-0.941		
Ca _T	0.934		
PO ₄ ³⁻ _{WE}	0.783		
Mn _T		0.897	
TOC _{WE}		0.893	
Fe _T		0.872	
Translocación		-0.797	
Conductividad		-0.689	
PO ₄ ³⁻ _{T(Raíz)}		0.597	
As(III) _{WE}			0.897
Cl _{WE}			-0.676

_{WE}, evaluado a partir del extracto acuoso del suelo (1:1); _T, contenido total; ACP, análisis componentes principal. CP1, CP2, y CP3 explican el 43.0, 32.0 y 10.4% de la varianza total de los datos, respectivamente.

5.6. Fraccionamiento de arsénico en el suelo agrícola

El fraccionamiento de As en el suelo agrícola fue evaluado mediante un sistema de extracción secuencial BCR en flujo. El desarrollo del método automatizado de extracción secuencial en línea se presenta en la siguiente sección.

5.6.1. Fotooxidación de las especies de arsénico

Una cámara de fotooxidación UV fue incluida en el sistema MSFIA-HG-AFS para la degradación de las especies orgánicas (MMA y DMA) extraídas durante el método automatizado de extracción secuencial en línea. La etapa de degradación es necesaria debido a la gran diferencia en las señales analíticas entre las especies orgánicas y el As(V). La etapa de fotooxidación fue evaluada usando disoluciones estándar de DMA, la especie orgánica más termoresistente [142]. El incremento de tiempo de flujo detenido en la cámara de UV mostró un efecto positivo en la señal analítica de DMA, que puede ser atribuida a la generación de As(V) (Figura 14). Por lo tanto, 2 min de flujo detenido dentro de la cámara UV fue utilizado para convertir cuantitativamente el DMA en As(V) por la ruptura del enlace As-grupo metilo. Las señales analíticas de los estándares de As(V) y DMA a la misma concentración no mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$), utilizando los reactivos oxidantes seleccionados para cada fracción ($K_2S_2O_8$ 1.5% $m v^{-1}$ con NaOH 0.5% $m v^{-1}$ para F1, $K_2S_2O_8$ 5.4% $m v^{-1}$ con NaOH 0.5% $m v^{-1}$ para F2 y NaOH 0.5% $m v^{-1}$ para F3). La etapa de fotooxidación UV disminuyó la sensibilidad en la determinación de As con el sistema en flujo implementado, sin embargo permitió la correcta determinación del contenido de As total del extracto en las muestras de suelo.

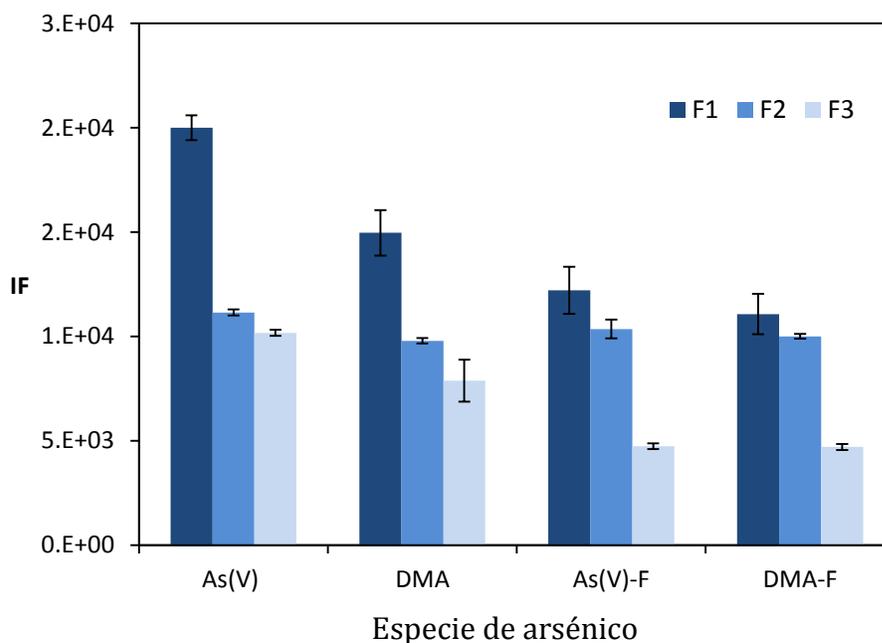


Figura 14. Señal analítica de las especies de arsénico antes (As(V) y DMA) y después (As(V)-F y DMA-F) del proceso de fotooxidación.

5.6.2. Efecto del tratamiento por ultrasonidos en la extracción

La transferencia de As de las partículas del suelo en el *bulk* de la disolución en la columna con suelo durante la extracción con los diferentes eluentes utilizados por el método BCR fue asistido por ultrasonido. La Figura 15 muestra el efecto del tratamiento por ultrasonido sobre la cinética de desorción para la fracción 1 (F1). En los primeros 40 mL, la concentración de As fue mayor cuando el proceso fue asistido por ultrasonido. Además, el As total extraído en F1 utilizando un dispositivo de ultrasonido fue 40% mayor que cuando no fue aplicado. Por lo tanto, se utilizó un tratamiento por ultrasonidos durante la extracción de las tres fracciones para acelerar el proceso.

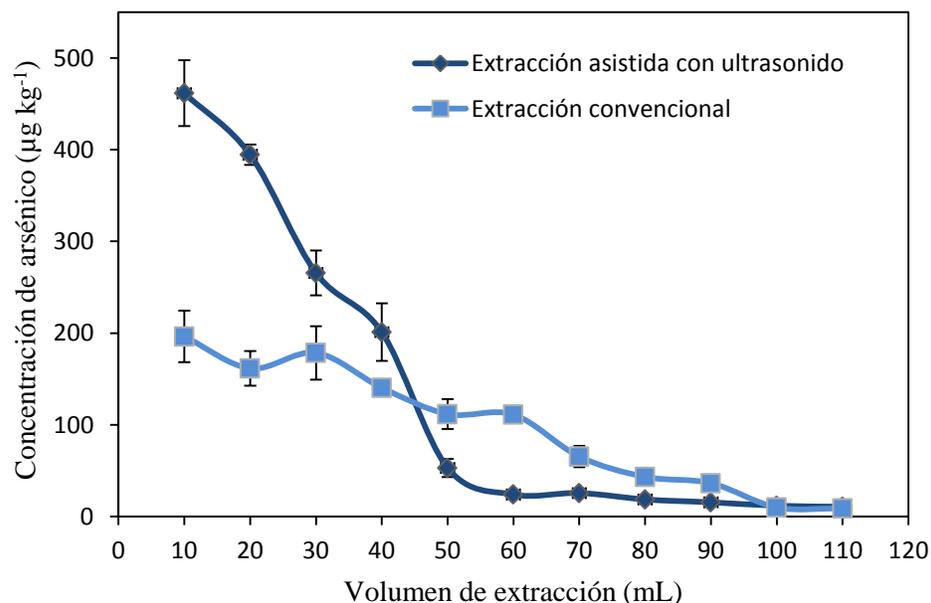


Figura 15. Efecto del tratamiento por ultrasonidos sobre la cinética de extracción de arsénico (n = 3).

5.6.3. Influencia de los flujos de Ar, H₂ y N₂

Los efectos de los caudales de los tres gases utilizados en el sistema sobre la señal analítica fueron estudiados. La señal de As aumentó con el incremento en el caudal de H₂ de 10 a 30 mL min⁻¹. El caudal se fijó en 30 mL min⁻¹ ya que mayores caudales afectaron la estabilidad de la llama. Los caudales de Ar y N₂ no mostraron efectos significativos en la intensidad de la señal analítica, en los intervalos de 20-40 y 5-15 mL min⁻¹, respectivamente, pero si en la forma de señal analítica. Por lo tanto, 100 y 10 mL min⁻¹ de Ar y N₂, respectivamente, fueron utilizados en la determinación de As. En estudios previos reportados por Leal *et al.* [111], el consumo de gases fue superior al utilizado en este estudio debido a que caudales de H₂ menores a 50 mL min⁻¹ propiciaron la extinción de la llama y el caudal de aire

(evaluado hasta 500 mL min^{-1}) presentó una correlación positiva con la señal analítica de As.

5.6.4. Efecto del caudal de eluente y la masa de la muestra

El caudal del eluente fue estudiado entre 0.7 y 4.5 mL min^{-1} . En general, caudales de eluente mayores mostraron efectos negativos sobre las concentraciones de As en las subfracciones extraídas (Figura 16). Modificando el caudal del eluente de 1 a 2 mL min^{-1} , la eficacia de la extracción presentó un decremento de aproximadamente 66% . Caudales del eluente menores a 1 mL min^{-1} permitieron una mayor concentración de As en la primera subfracción. Dado que las velocidades de flujo entre 0.7 y 1.0 mL min^{-1} no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$), una velocidad de flujo del eluente de 1 mL min^{-1} fue seleccionado para experimentos posteriores.

La cantidad de muestra de suelo en la columna mostró una relación lineal con la concentración de As en todas las fracciones. Sin embargo, altos contenidos de suelo en la columna incrementaron la sobrepresión en el sistema. El efecto de la cantidad de muestra (0.2 a 0.5 g) sobre la reproducibilidad de los resultados fue estudiado. Cantidades de muestra mayores a 0.5 g tienden a generar problemas de sobrepresión en el sistema. La desviación estándar relativa (RSD) de tres repeticiones fue evaluada, y esta disminuyó con el incremento de la cantidad de la muestra (de 16.6% a 6.5%). Así, un tamaño de muestra de 0.5 g de suelo fue seleccionado para experimentos posteriores.

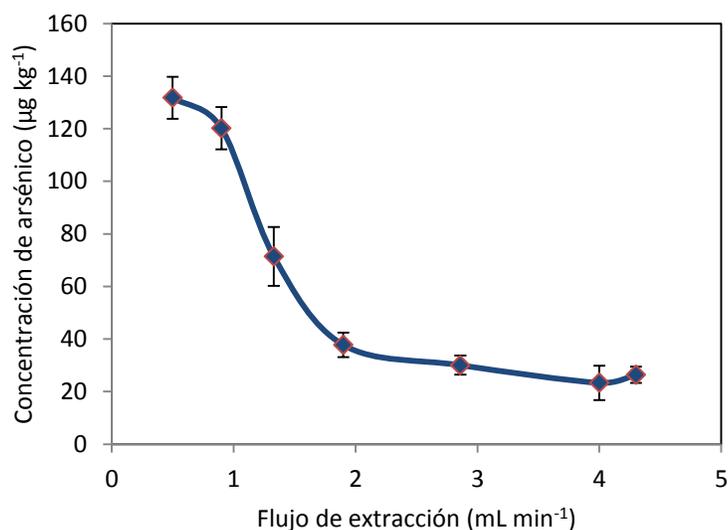


Figura 16. Efecto del caudal de extracción sobre la concentración de arsénico en la primera subfracción de F1.

5.6.5. Estudio de los parámetros críticos

Los parámetros como las concentraciones de HCl, NaBH_4 y el reactivo reductor fueron estudiados por aproximación multivariante. La disolución de ácido ascórbico-tiourea fue seleccionada para las fracciones F1 y F2, y la disolución de $\text{HONH}_2 \cdot \text{HCl}$ para F3 (otros reactivos reductores como KI, ácido ascórbico-tiourea y SnCl_2 fueron probados para F3, no mostrando resultados satisfactorios).

Por lo tanto, los factores potenciales que podrían afectar al sistema fueron estudiados por el diseño factorial completo ($2^k + 3$ puntos centrales) y el diseño Doehlert. La Tabla XVIII muestra los intervalos de las concentraciones de los reactivos utilizados en los diseños.

El modelo de interacción de 2 vías fue aplicado a F1 y F2, mientras que el modelo de interacción de 3 vías fue utilizado para F3. De acuerdo con los resultados (diagrama de Pareto y tabla de ANOVA; Apéndice N) obtenidos para las tres fracciones (F1, F2 y F3), las concentraciones de NaBH_4 y HCl presentaron un efecto positivo sobre la señal analítica debido a que los reactivos son una parte integral de la reacción de HG, y la concentración de la disolución reductora (ácido ascórbico-tiourea/ $\text{HONH}_2\cdot\text{HCl}$) no fue significativa o fue marginalmente significativa ($p < 0.05$). Por lo tanto, para F1 y F2, la superficie de respuesta fue desarrollada variando las concentraciones de HCl y NaBH_4 (tres y cinco niveles, respectivamente), mientras que la concentraciones de tiourea y ácido ascórbico fueron fijadas en 4.5% m v^{-1} y 1.0% m v^{-1} , respectivamente. En el caso de F3, el ajuste satisfactorio a un modelo lineal indica que los factores deberían ser utilizados en sus niveles más altos y que no se justifica el desarrollo de un modelo de superficie de respuesta. Por ejemplo, altas concentraciones de NaBH_4 y HCl permitieron un incremento en la señal analítica; sin embargo, concentraciones $\text{HCl} > 25\% \text{ v v}^{-1}$ pueden dañar la válvula solenoide y concentraciones $\text{NaBH}_4 > 2.5\% \text{ m v}^{-1}$ afectan la estabilidad de la llama. Por lo tanto, los valores seleccionados para F3 fueron $\text{HCl } 25\% \text{ v v}^{-1}$, $\text{NaBH}_4 2.5\% \text{ m v}^{-1}$, y $\text{HONH}_2\cdot\text{HCl } 6 \text{ mol L}^{-1}$.

En el caso de F1 y F2, una matriz Doehlert fue realizada. Este diseño permitió el estudio de los siguientes modelos: efecto principal lineal-cuadrático y el efecto principal lineal-cuadrático +2 vías, los cuales mostraron mejor ajuste a los datos experimentales de F1 y F2, respectivamente. Estos modelos indicaron que los

puntos críticos máximos estaban fuera del dominio experimental, pero con el fin de mantener la integridad del sistema, los valores óptimos fueron seleccionados dentro del rango. Debido a las limitaciones instrumentales, no fue posible cambiar el dominio experimental a valores más altos ya que mayores concentraciones de HCl y NaBH₄ generaron problemas en el sistema. Por lo tanto, las concentraciones seleccionadas de HCl y NaBH₄ para las tres fracciones fueron 25% v v⁻¹ y 2.5% m v⁻¹, respectivamente.

TABLA XVIII
CONCENTRACIONES DE LOS REACTIVOS UTILIZADAS PARA LA
OPTIMIZACIÓN DE LA SEÑAL

	<i>Screening</i>			Superficie de respuesta			Óptimo local		
	F1	F2	F3	F1	F2	F3	F1	F2	F3
NaBH ₄ (% m v ⁻¹)	0.5-1.5	1.5-2.5	1.5-2.5	1.0-2.5	1.5-2.5	1.5-2.5	2.5	2.5	2.5
HCl (% v v ⁻¹)	5-15	5-25	5-25	10-30	5-25	5-25	25	25	25
Tiourea (% m v ⁻¹) ^a	1.5-4.5	3.0-4.5	-	-	-	-	4.5	4.5	-
HONH ₂ . HCl (M)	-	-	2-6	-	-	-	-	-	6

^a 22% m m⁻¹ de ácido ascórbico fue adicionado a cada disolución de acuerdo a su contenido de tiourea

5.6.6. Parámetros analíticos

Utilizando las condiciones óptimas mencionadas en las secciones anteriores, los parámetros analíticos fueron determinados para cada fracción. La Tabla XIX resume los principales parámetros analíticos del método automatizado de extracción secuencial en línea.

Las curvas de calibración fueron construidas usando estándares preparados en la misma matriz del extracto utilizado en cada fracción. Por lo tanto, las curvas de calibración de concentración (intensidad relativa vs mg L⁻¹ de As(III)), con ajustes estadísticamente satisfactorios fueron obtenidos (valores de R² de 0.9963, 0.9930, y 0.9878 para F1, F2 y F3, respectivamente, n = 15). De acuerdo con las curvas de calibración, la intensidad de la señal varió considerablemente para las diferentes fracciones (F2 > F1 > F3).

Los límites de detección (LOD) del método fueron calculados como tres veces la desviación estándar de diez repeticiones del blanco dividido por la pendiente de la curva de calibración, mientras que los límites de cuantificación (LOQ) fueron calculados como diez veces la desviación estándar de diez repeticiones del blanco dividido por la pendiente de la curva de calibración [143]. En todos los casos, el tiempo de fotooxidación en la cámara UV incrementó los LOD. Es posible que los subproductos de la fotooxidación como los ácidos carboxílicos interfirieran en la generación de hidruros de As, incluso, el empleo de moléculas orgánicas menos oxidantes como el metanol presentaron decremento de cinco veces la señal analítica de As (pendientes de curva: 18.1 y 92 para metanol 50% v v⁻¹ y agua, respectivamente). En F1 y F2, la intensidad de la señal disminuyó hasta un 40%. El valor superior de LOD para F3 puede ser atribuido a la menor eficiencia HG debido a la prevalencia de condiciones oxidantes y al menor volumen del lixiviado utilizado (0.15 mL para F3 en lugar de 0.5 mL utilizados para F1 y F2) durante la determinación de As. La precisión de la determinación de As en cada eluyente fue

evaluada usando la RSD de diez inyecciones sucesivas de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ de una disolución estándar de As(V) para las tres fracciones.

TABLA XIX
PARÁMETROS ANALÍTICOS PARA CADA FRACCIÓN DEL MÉTODO
AUTOMATIZADO BCR

Parámetro	F1	F2	F3
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	4.0	3.4	23.6
LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	13.4	11.6	78.8
Rango lineal de trabajo (mg L^{-1})	0.013-0.800	0.011-0.900	0.079-1.400
RSD (%) ^a	5.6	7.8	8.4

^a calculado utilizando un estándar de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ As(III).

5.6.7. Validación del método

La validación del método automatizado de extracción secuencial en línea fue realizada mediante la comparación con el método BCR convencional. Las muestras de suelo agrícolas analizadas en este estudio fueron las procedentes de la zona A y B, debido a las diferencias en sus propiedades físico-químicas.

En primer lugar, con el fin de comparar las eficiencias de extracción, una muestra de cada lote fue seleccionada y analizada mediante el método BCR automatizado y el BCR convencional. Por lo tanto, el factor de recuperación (FR), que representa la relación entre el contenido de As en cada fracción obtenida a partir del método BCR convencional y el método automatizado propuesto (la suma del As contenido en cada subfracción para cada fracción), fue calculado. El FR varió entre ambos lotes (zonas A y B), debido a las diferencias de sus propiedades

fisicoquímicas. Para la zona A, los FR fueron 0.68, 0.72, y 0.79 para F1, F2 y F3, respectivamente; mientras que para la zona B, los FR fueron de 0.90, 0.73 y 0.61 para la F1, F2 y F3, respectivamente.

Otras muestras de cada zona agrícola fueron analizadas también por las dos metodologías, y el As contenido fue estadísticamente comparado. El contenido de As de las tres fracciones obtenidas por el método automatizado propuesto fue calculado utilizando los FR previamente estimados. La prueba t para la comparación de medias reveló que no hubo diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza del 95%. Los resultados se muestran en la Tabla XX. La desviación relativa incluida en la tabla XX fue calculada como la diferencia entre el contenido de As obtenido mediante el método automatizado propuesto y el obtenido por el método BCR convencional, dividido entre este último y expresado como porcentaje (%). Valores del porcentaje de desviación inferiores al 20% demuestran la aplicabilidad del método automatizado BCR en flujo para la extracción secuencial de arsénico en muestras reales de suelo agrícola.

Las subfracciones debajo del límite de cuantificación no fueron utilizadas para la cuantificación en sus respectivas fracciones (Figura 17). Este hecho podría explicar por qué el contenido de As en cada fracción del método automatizado BCR fue ligeramente inferior al obtenido por el método BCR convencional.

TABLA XX

FRACCIONAMIENTO DE ARSÉNICO EN SUELO AGRÍCOLA UTILIZANDO
LOS MÉTODOS AUTOMATIZADO Y CONVENCIONAL DE EXTRACCIÓN
SECUENCIAL BCR (n = 3)

Muestra	Método BCR automatizado ^a			Método BCR convencional			Desviación		
	Concentración*, mg kg ⁻¹						%		
	F1	F2	F3	F1	F2	F3	F1	F2	F3
MTA-2	52±4	15±1	14±1	48±8	15.9±0.4	15±1	8.4	4.9	6.5
MTA-6	18±1	5.6±0.8	5.9±0.4	16±1	6.0±0.2	6.6±0.3	15.5	5.5	10.6
MTB-2	22±2	10.7±0.9	15±2	19±3	9.8±0.7	16.7±0.5	17.4	8.8	10.1
MTB-6	14±1	5.5±0.5	10±1	13.5±0.6	5.2±0.4	9.9±0.2	5.5	4.3	6.4

^a usando el FR

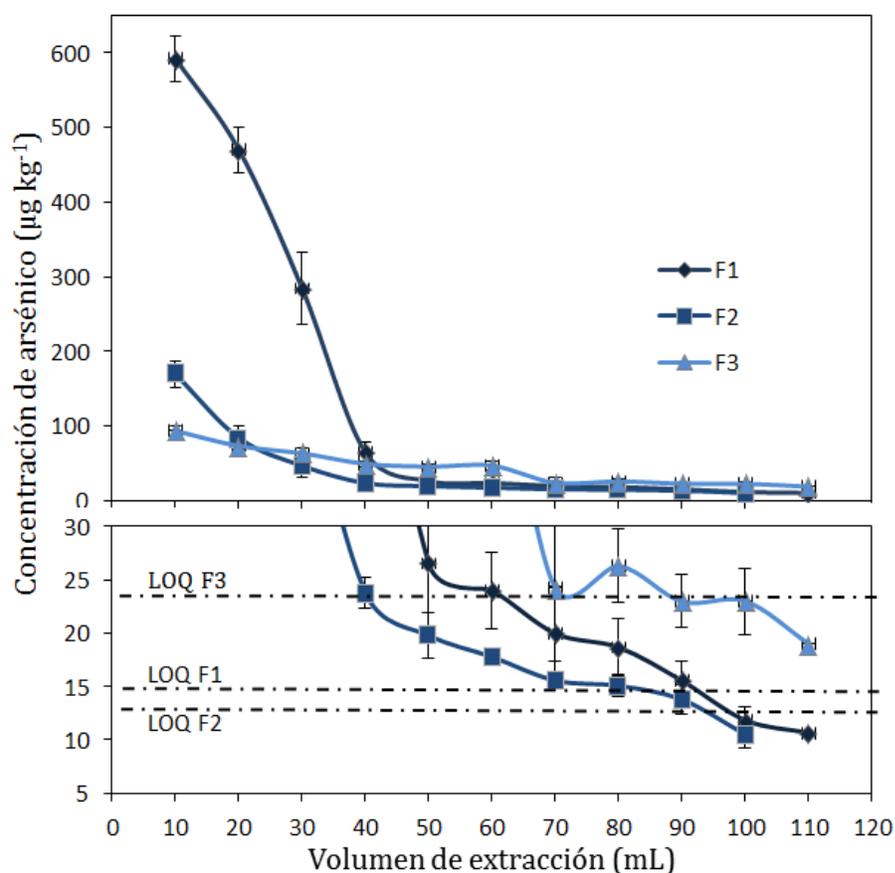


Figura 17. Cinética de la extracción secuencial de As de la muestra de suelo agrícola MTA-1 usando el método automatizado de extracción secuencial BCR (n = 3).

5.6.8. Aplicación del método automatizado para la extracción secuencial de arsénico en muestras de suelo agrícola

El método automatizado propuesto fue aplicado para el fraccionamiento en el suelo de dos zonas agrícolas de Matehuala, zonas A y B. La cinética de extracción secuencial de As de las 12 muestras de suelos agrícolas se muestra en la Figura 18. En todos los casos, la cinética de desorción de As mostró una rápida disminución de la concentración de As. Prácticamente 55-75% del contenido de As fue extraído en las tres primeras subfracciones. La Figura 19 muestra la suma del contenido de As en las subfracciones de cada suelo agrícola. Diferencias más altas fueron encontradas entre el contenido de As de las zonas A y B de la fracción F1 en comparación con los valores de F2 y F3.

La concentración de As en F1 (fracción soluble en ácido) podría ser afectada por el contenido de Ca en el suelo (Tabla XIV). Ambas zonas mostraron concentraciones de Ca superiores a 20 g kg^{-1} , y las muestras de suelo de la zona A presentaron el contenido de Ca más alto, así como las mayores concentraciones de As total y el contenido de As en F1. La precipitación de arseniato de calcio ($\text{Ca}_5\text{H}_2(\text{AsO}_4)_4 \cdot \text{cH}_2\text{O}$) fue reportado como el mecanismo limitante de la movilidad de As en el área muestreada [131]. Considerando las tres zonas de muestreo, el contenido de Ca en suelo presentó una relación lineal con el As soluble en el suelo ($r = 0.8534$) y el As en la hoja del cultivo ($r = 0.8456$). La co-precipitación de los compuestos de As con carbonatos es también posible [144] y podría explicar su alto contenido en F1. Algunos estudios han reportado que el ion carbonato, en

condiciones alcalinas, juega un papel importante en la inmovilización de As en los sedimentos en un amplio rango de condiciones redox [145]. F1 y F2 son la fracción potencialmente biodisponible en el suelo [109]. La suma de F1 y F2 fue > 50% del contenido de As total en el suelo de ambas zonas de agrícolas (65-83% y 55-60% para las zonas A y B, respectivamente); estos valores son más altos que los reportados en los sedimentos de ríos y lagos (43-50%) [109]. Por lo tanto, la alta fitodisponibilidad del As podría ser atribuida a la alta concentración de As fácilmente accesible para el cultivo. Además, el contenido de As en el suelo agrícola, particularmente el de la zona A, podría ser potencialmente transferido a través de la cadena alimentaria y representar un riesgo para la salud humana.

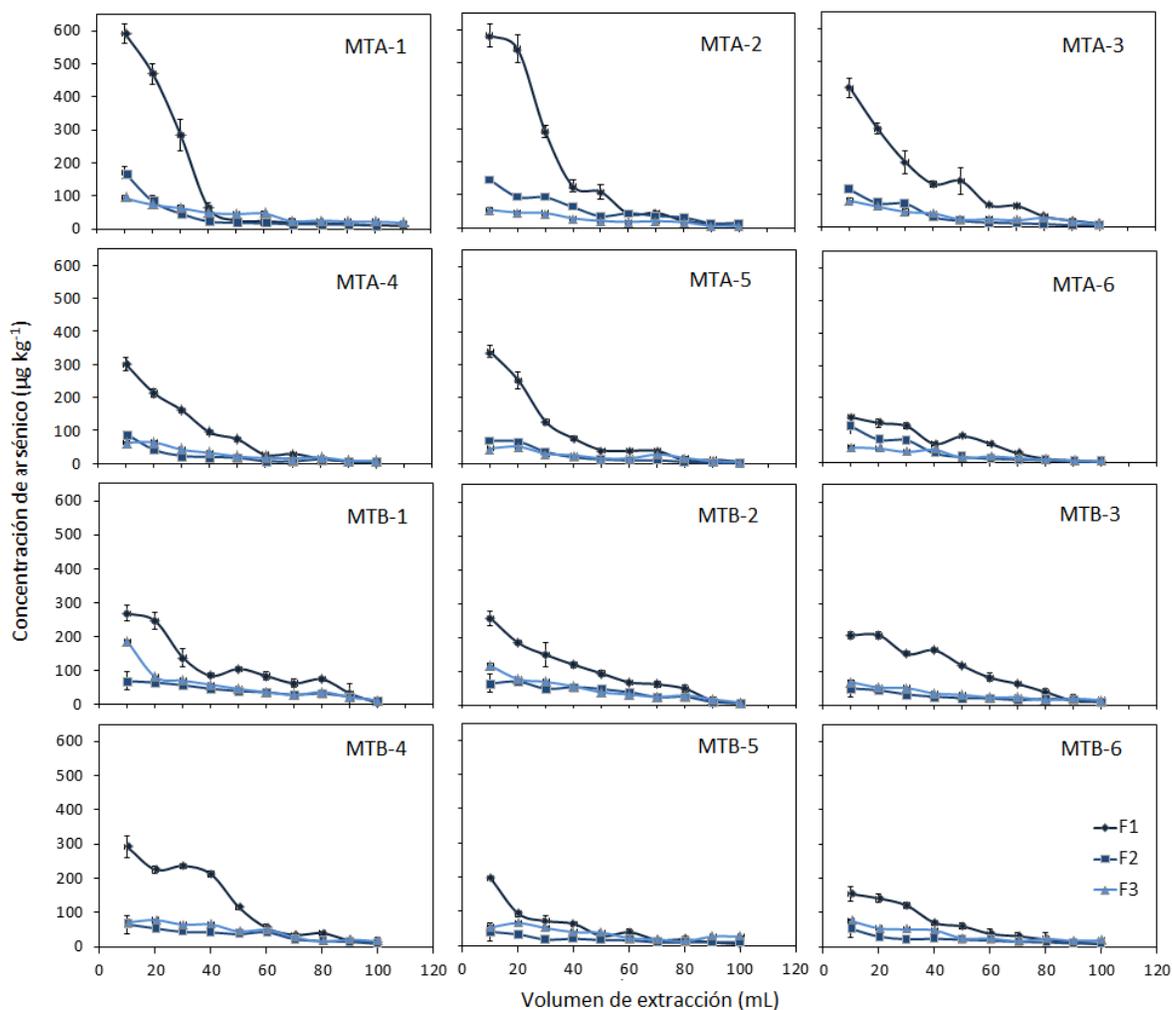


Figura 18. Cinética de extracción secuencial de As en tres fracciones de las muestras de suelos agrícolas de la zona A y B utilizando el método automatizado de extracción secuencial BCR ($n = 3$).

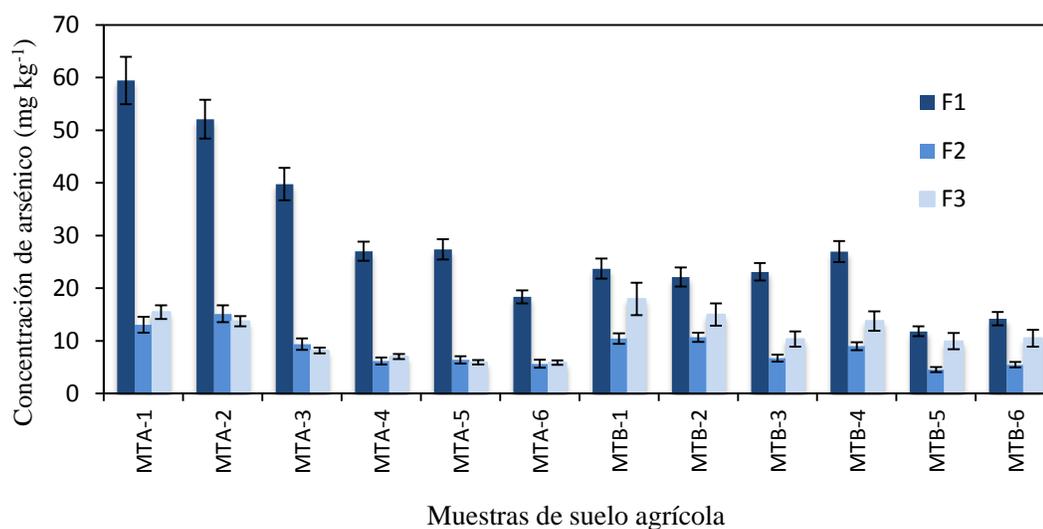


Figura 19. Concentración de arsénico de las fracciones (F1, F2 y F3) de las muestras de suelo agrícolas de las zonas A y B, utilizando el método automatizado de extracción secuencial BCR (n = 3).

5.7. Especiación de arsénico en la planta de maíz

La distribución de especies de As (As(V), As(III), DMA y MMA) en el cultivo de maíz fue estudiada. Diferentes agentes extractantes fueron estudiados en función de la parte del cultivo como muestra la Tabla XXI. La validación del método de extracción para la determinación de especies de As en maíz fue verificada mediante estudios de recuperación (Figura 20). En el caso de la raíz, el tallo y la hoja de maíz utilizando HNO₃ 0.15 N como agente extractante, el porcentaje de recuperación fue mayor al 80% y 90% (Tabla XXI) para la determinación de As total y de especies de As, respectivamente. Por otro lado, la interconversión de especies fue menor que 6%. Los LOD de As(V), As(III), MMA y DMA fueron 55 µg kg⁻¹, 90 µg kg⁻¹, 310 µg kg⁻¹, y 250 µg kg⁻¹, respectivamente. El empleo de HNO₃ 0.15 N a 80°C durante 2 h fue una metodología eficaz para la extracción de especies de As

de la raíz, tallo y hoja de maíz, debido a su bajo costo (uso de equipos y reactivos económicos), eficiencia (porcentajes de extracción mayores al 80%), fiabilidad (interconversión de especies menores al 10%) y por ser un procedimiento amigable con el ambiente (uso de reactivos no tóxicos) (Tabla XXII).

La extracción de las especies de As en grano de maíz fue evaluada mediante estudios de recuperación. Cuatro agentes extractantes fueron evaluados los cuales afectan en diferente grado la sensibilidad del método. La intensidad de la señal analítica en la recuperación de As total fue HNO_3 2% v v⁻¹ > H_3PO_4 1 mol L⁻¹ > TFA 0.05 mol L⁻¹ > $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1) (Apéndice O). Los LODs y LOQs fueron 1.49, 0.86, 0.38 y 1.01 $\mu\text{g L}^{-1}$; y 4.97, 2.87, 1.27 y 3.38 $\mu\text{g L}^{-1}$ para los procedimientos donde fue utilizado $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1), H_3PO_4 1 mol L⁻¹, HNO_3 2% v v⁻¹ y TFA 0.05 mol L⁻¹, respectivamente. El rango lineal de trabajo en los cuatro procedimientos fue de LOQ-400 $\mu\text{g L}^{-1}$. La extracción de As de acuerdo al contenido de As total en la muestra fue 89.5, 79.1, 74.1 y 45.0% para HNO_3 2% v v⁻¹, TFA 0.05 mol L⁻¹, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1) y H_3PO_4 1 mol L⁻¹, respectivamente (Tabla XXI). El procedimiento E3 presentó el mayor porcentaje de recuperación de As y el menor límite de LOD, sin embargo, a diferencia de $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1), H_3PO_4 1 mol L⁻¹ y TFA 0.05 mol L⁻¹ que no presentaron interconversión de especies, el procedimiento de HNO_3 2% v v⁻¹ mostró una interconversión de especies >10% atribuido posiblemente a una mayor temperatura (95°C) (Tabla XXIII). El procedimiento que involucró el uso $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1) como agente extractante presentó el menor porcentaje de recuperación de especies de As, particularmente de As(V), posiblemente debida a la

poca afinidad de la especie por el agente extractante y el procedimiento H_3PO_4 1 mol L^{-1} mostró baja reproducibilidad en del sistema IC-HG-AFS que puede ser atribuida a una alta extracción de materia orgánica. En resumen, debido al alto porcentaje de extracción de As y a la baja interconversión de especies, el procedimiento de TFA 0.05 mol L^{-1} fue el más adecuado para la extracción de especies de As en grano de maíz.

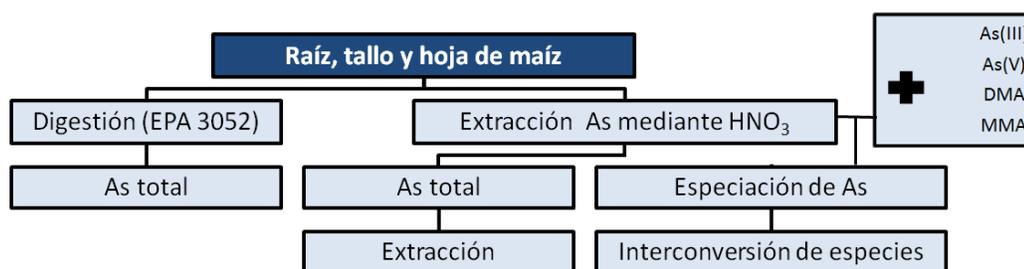


Figura 20. Diagrama de la evaluación de la metodología de extracción utilizada para la determinación de las especies de arsénico.

TABLA XXI
 PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN DE ARSÉNICO EN HOJA, TALLO Y RAÍZ
 DE LA PLANTA DE MAÍZ

Matriz	Procedimiento	Ref.	A_{ST}		Extracción (%)
			A_{ST}	A_{ST} en extracto	
Hoja	HNO ₃ 0.15 mol L ⁻¹ a 80°C durante 2 h,	[10]	(mg kg ⁻¹)		113±2
Tallo			0.9±0.1 ^a	1.1±0.1	89±8
Raíz			0.7±0.1 ^a	0.6±0.1	82±5
			(μg kg ⁻¹)		
Grano	H ₂ O/CH ₃ OH (1:1) por ultrasonidos a 50°C durante 2 h	[85]	200 ^b	148 ±9	741±4
Grano	H ₃ PO ₄ 1 mol L ⁻¹ por ultrasonidos	[88]	200 ^b	90 ±7	45±4
Grano	HNO ₃ 2% v v ⁻¹ con incremento de temperatura a 95°C en 0.75 h y mantenido a 95°C durante 1.5 h	[94]	200 ^b	179±12	89±6
Grano	TFA 0.05 mol L ⁻¹ , incremento a 85°C en 20 min, y después mantenido a 80°C durante 10 min	[100]	200 ^b	158±15	79±6

^a Arsénico total en muestras digeridas, ^b Arsénico adicionado

TABLA XXII
 RECUPERACIÓN DE ESPECIES DE ARSÉNICO EN RAÍZ, TALLO Y HOJA
 DE MAÍZ UTILIZANDO ÁCIDO NÍTRICO 0.15 M COMO AGENTE
 EXTRACTANTE

Matriz	Contenido de As (mg kg ⁻¹)				Suma de especies (mg kg ⁻¹)
	As(III)	DMA	MMA	As(V)	
Raíz	14.6±0.7	<LOD	<LOD	25.9±0.8	40±1
Raíz+As(III)	23±1	<LOD	<LOD	25.8±0.9	48±1
Raíz+DMA	16.5±0.5	2.0±0.2	<LOD	26±4	45±4
Raíz+MMA	15.6±0.6	<LOD	1.9±0.2	26±1	44±2
Raíz+As(V)	15.9±0.4	<LOD	<LOD	28±9	44±7
Tallo	0.37±0.01	<LOD	<LOD	0.21±0.02	0.58±0.01
Tallo+As(III)	1.59±0.07	<LOD	<LOD	0.22±0.02	1.80±0.08
Tallo+DMA	0.38±0.02	1.35±0.05	<LOD	0.23±0.03	1.95±0.06
Tallo+MMA	0.37±0.02	<LOD	1.52±0.13	0.22±0.01	2.10±0.12
Tallo+As(V)	0.39±0.01	<LOD	<LOD	1.18±0.19	1.58±0.18
Hoja	0.43±0.03	<LOD	<LOD	0.69±0.10	1.11±0.11
Hoja+As(III)	1.71±0.12	<LOD	<LOD	0.85±0.10	2.56±0.08
Hoja+DMA	0.43±0.06	1.41±0.18	0.01±0.01	0.73±0.11	1.9±0.3
Hoja+MMA	0.73±0.03	0.48±0.05	0.21±0.02	0.71±0.07	2.26±0.17
Hoja+As(V)	0.51±0.03	<LOD	<LOD	1.5±0.3	2.0±0.3

TABLA XXII
RECUPERACIÓN DE LAS ESPECIES DE ARSÉNICO EN GRANO DE MAÍZ
UTILIZANDO DIFERENTES AGENTES EXTRACTANTES

Matriz	Contenido de As ($\mu\text{g kg}^{-1}$)				Suma de especies ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
	As(III)	DMA	MMA	As(V)	
$\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1)					
G	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	-
G+As(III)	1725±98	<LOD	<LOD	<LOD	1725±98
G+DMA	<LOD	1734±175	<LOD	<LOD	1734±175
G+MMA	<LOD	<LOD	2039±231	<LOD	2039±231
G+As(V)	<LOD	<LOD	<LOD	965±26	965±26
H_3PO_4 1 mol L ⁻¹					
G	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	-
G+As(III)	1659±177	<LOD	<LOD	<LOD	1659±177
G+DMA	<LOD	2092±53	<LOD	<LOD	2092±53
G+MMA	<LOD	<LOD	1938±126	<LOD	1938±126
G+As(V)	<LOD	<LOD	<LOD	1378±162	1378±162
HNO_3 2% v v ⁻¹					
G	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	-
G+As(III)	1556±29	<LOD	<LOD	<LOD	1556±29
G+DMA	<LOD	1794±120	132±58	194±151	2120±200
G+MMA	<LOD	<LOD	1476±430	124±72	1600±435
G+As(V)	<LOD	<LOD	<LOD	1991±230	1991±230
TFA 0.05 mol L ⁻¹					
G	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	-
G+As(III)	1363±140	<LOD	<LOD	<LOD	1363±140
G+DMA	<LOD	1575±208	<LOD	<LOD	1575±208
G+MMA	<LOD	<LOD	1865±148	<LOD	1865±148
G+As(V)	<LOD	<LOD	<LOD	1910±136	1910±136

G, grano de maíz

Las concentraciones de As(V), As(III), DMA y MMA en la planta de maíz fueron determinadas en cada punto de muestreo de la zona A. En la raíz, el tallo y la hoja de maíz, las especies inorgánicas de As fueron la forma predominante del metaloide (siendo la concentración de las especies orgánicas <LOD) (Figura 21). En

grano, las concentraciones de las especies inorgánicas y orgánicas de As fueron menores al LOD. Raab *et al.* [45], utilizando cultivos hidropónicos de 46 especies de maíz, reportó que el DMA fue más efectivamente translocado de la raíz al tallo que el As(V) y el MMA (3 y 10 veces, respectivamente). Resultados similares han sido reportados con cereales como el arroz (*Oryza sativa L.*) [146]. Sin embargo, otros estudios reportan que el arsenito, la especie más tóxica, fue la forma predominante de As encontrada en el xilema (86-97% del As total) de cereales como arroz, trigo y cebada. En este estudio, el contenido de As(III), la especie más tóxica, varió de 33 a 65% dependiendo de la parte de la planta. La especie de As(III) fue la principal detectada en el tallo del maíz, mientras que el As(V) fue la forma predominante de As en la hoja y la raíz. Similarmente, Parsons *et al.* (2008) reportaron concentraciones relativamente altas de As(V) y As(III) de 18 y 12 mg kg⁻¹, respectivamente, en brotes, siendo las concentraciones de As en las raíces de 95 y 112 mg kg⁻¹. Según Mallick *et al.* (2011), el cultivo de maíz, el cual crece normalmente bajo condiciones aerobias, adsorbe preferentemente el As(V) sobre el As(III). Esta tendencia puede atribuirse al empleo de mecanismos de absorción similares en el sistema de raíces entre la forma oxidada de As y el fosfato, nutriente altamente demandado por el cultivo. Un contenido relativamente alto de As(III) en este cereal puede ser atribuido al mecanismo de desintoxicación del cultivo. Las formas oxidadas pueden entrar a las plantas a través de canales PO₄³⁻ de células de la raíz, y una vez allí, se reducen a As(III) a través del sistema de complejación con agentes fitoquelantes [48]. El quelato recién formado permanece

en las vacuolas celulares inmovilizado (ver Figura 22). El As no reducido puede acceder a la parte aérea de la planta a través del xilema, y estar expuesto a un mecanismo de reducción-complejación similar. En otros cereales, la relación $As(III)/As_T$ en el xilema fue considerablemente mayor cuando $As(V)$ fue utilizado como fuente de As en el sistema radicular (84, 45 y 63% para el arroz, el trigo y la cebada, respectivamente) [21]. El proceso de metilación de As como mecanismo de la planta de desintoxicación ha sido debatido [49]. Algunos autores atribuyeron la presencia de especies orgánicas sólo a la absorción de los productos metabólicos de los microorganismos en el suelo y no a procesos de metilación en los tejidos de la plantas. Los resultados reportados por Lomax *et al.* [147] sugieren que las plantas son incapaces de metilar las especies inorgánicas de As absorbidas. La inoculación de algún microorganismo como *Glomus mosseae* en cultivos de maíz ha favorecido el incremento del contenido de especies orgánicas en los tejidos vegetales [148].

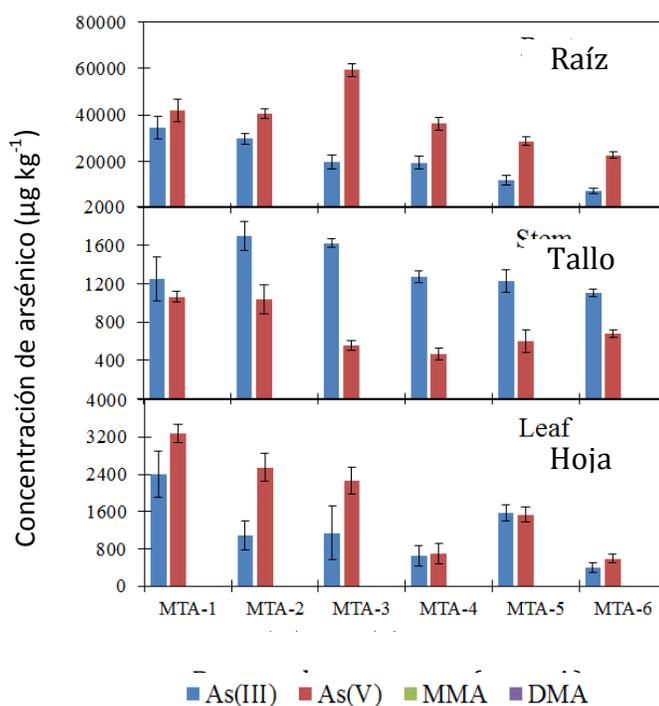


Figura 21. Contenido de las especies de arsénico en las muestras de maíz de Matehuala, San Luis Potosí, México, ($LOD_{As(V)} 55 \mu\text{g kg}^{-1}$, $LOD_{As(III)} 90 \mu\text{g kg}^{-1}$, $LOD_{MMA} 310 \mu\text{g kg}^{-1}$, $LOD_{DMA} 250 \mu\text{g kg}^{-1}$). Las concentraciones de las especies orgánicas fueron menores que el LOD.

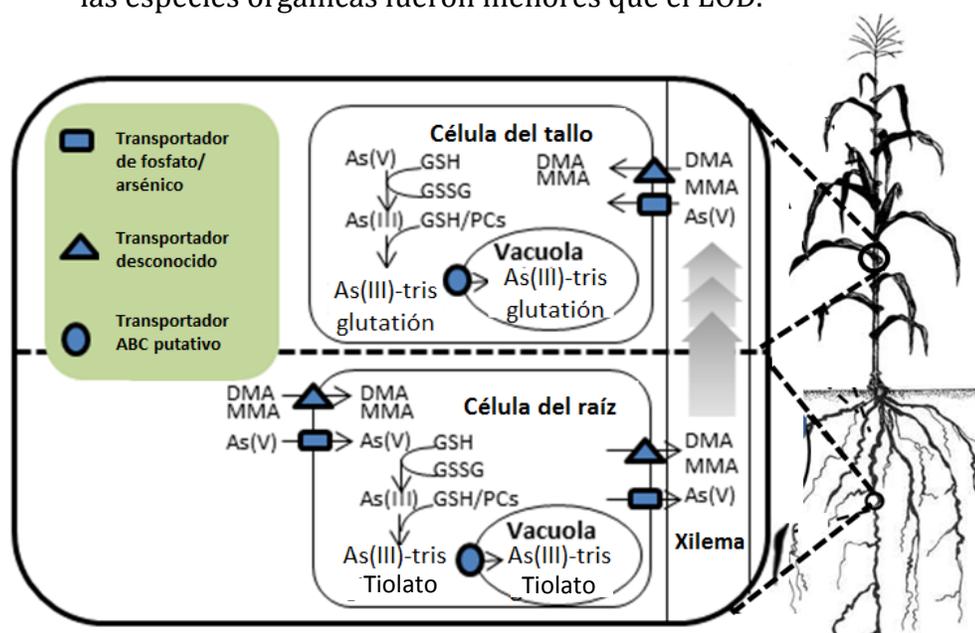


Figura 22. Transferencia de arsénico en el cultivo de maíz (adaptada [14]).

5.8. Determinación de arsénico bioaccesible en grano de maíz

La metodología para la cuantificación del As que es liberado bajo condiciones que simulan la digestión gastrointestinal fue basada en la determinación de As total por MSFIA-HG-AFS después de un proceso de digestión gástrica *in vitro* y preconcentración por CPE. Debido a que no se cuenta con CRM para As en el grano maíz, en el desarrollo de la presente metodología fueron también evaluados los resultados obtenidos a partir del análisis del material de referencia certificado de harina de arroz (CRM: Rice ERM BC-211).

5.8.1 Estudio de parámetros críticos

Los parámetros involucrados en la preconcentración por punto nube como las concentraciones de DDTP y Tritón X-114 y el tiempo de incubación de las micelas fueron optimizados por aproximación multivariante. Los parámetros involucrados en la determinación de As mediante el sistema MSFIA-HG-AFS como la concentración de reactivos y el caudal de gases fueron utilizados de acuerdo al estudio presentado en las secciones 5.6.3. y 5.6.5, respectivamente. Los parámetros que podrían afectar potencialmente al sistema fueron estudiados por el diseño factorial completo ($2^k + 3$ puntos centrales) y el diseño Doehlert (Apéndice P). La Tabla XXIV muestra los intervalos de las concentraciones de los reactivos utilizados en los diseños.

El modelo de interacción de 2 vías fue aplicado al digerido de arroz, mientras que el modelo de interacción de 3 vías fue utilizado para el digerido de maíz. De acuerdo con los resultados (diagrama de Pareto y tabla de ANOVA, Apéndice P) obtenidos para el extracto en punto nube de digeridos de arroz y maíz, las concentraciones de DDTP y Tritón X-114 presentaron un efecto negativo sobre la señal analítica debido a que aunque los reactivos evaluados son una parte integral de la formación de micelas y su adecuada proporción favorece la formación del complejo micelar y mayor capacidad de extracción de As, elevadas concentraciones de Tritón X-114 presentan un decremento de la señal analítica por la formación de burbujas durante la etapa de HG. La Figura 23, muestra un decremento de aproximadamente el 50% de la señal analítica con la adición de Tritón X-114 1.5% m v⁻¹. El efecto negativo del DDTP es propiciado por el efecto negativo del Tritón X-114 sobre la señal analítica, ya que la etapa CPE requiere una adecuada proporción de estos reactivos. Las superficies de respuesta muestran (Figura 24) que las señales analíticas fueron obtenidas sobre una línea imaginaria que va de la parte inferior izquierda a la parte superior derecha en ambos cereales. Es posible que bajas concentraciones de Tritón X-114 y altas de DDTP den lugar a la formación de complejos DDTP-As fuera del sistema micelar; y que altos niveles de Tritón X-114 y bajos de DDTP limite la formación de complejos DDTP-As y la formación de micelas. Por otro lado, el tiempo de incubación de las micelas (50°C) no fue significativa ($p > 0.01$). Por lo tanto, la superficie de respuesta fue desarrollada a partir de la deseabilidad global (D_G) calculada de las deseabilidades

individuales (d_A y d_M) de las respuestas de los digeridos de arroz y maíz (Tabla XXV), donde las concentraciones de DDTP y Tritón X-114 variaron en tres y cinco niveles, respectivamente, mientras que el tiempo de incubación de micelas fue fijado en 20 min.

TABLA XXIV
PARÁMETROS EN LA OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN EN PUNTO NUBE.

Parámetro	Screening		Superficie de respuesta		Óptimo local		
	Arroz	Maíz	Arroz	Maíz	d_A	d_M	D_G
DDTP (% m v ⁻¹)	1-3	1-3	0.5-1.5	0.5-1.5	1.153	0.737	0.830
Tritón X-114 (% m v ⁻¹)	0.5-1.5	0.5-1.5	0.25-1.25	0.25-1.25	0.139	0.092	0.098
Tiempo (min)	20-40	20-40	-	-	-	-	-

D deseabilidad global, d_A deseabilidad individual para arroz, d_M deseabilidad individual para maíz

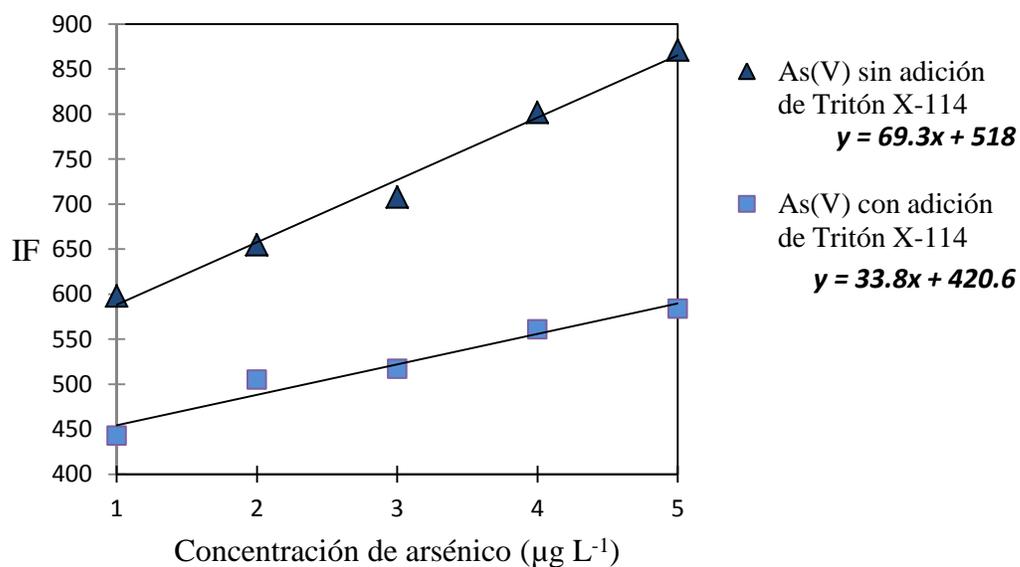


Figura 23. Efecto del Tritón X-114 sobre la señal analítica del As(V) determinado por MSFIA-HG-AFS.

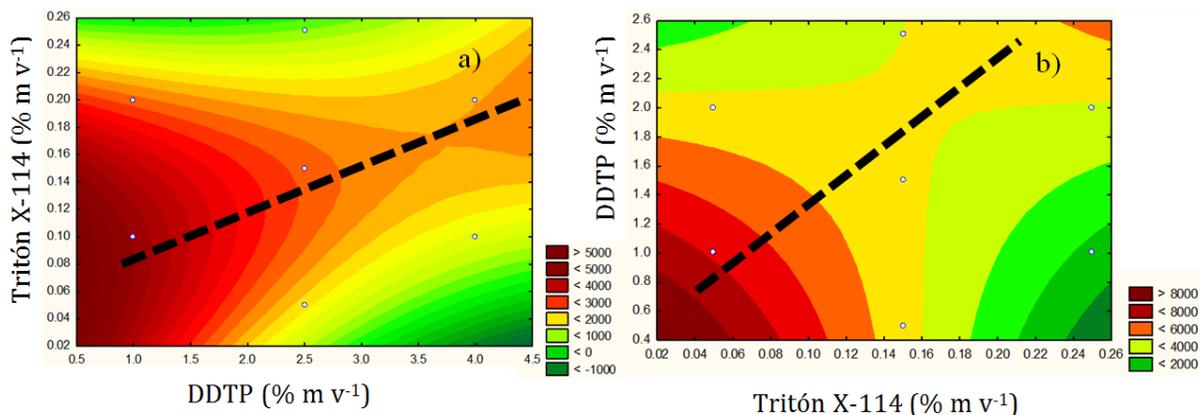


Figura 24. Efecto de la concentración de DDTP y Tritón X-114 sobre señales analíticas de arsénico en digeridos de arroz (a) y maíz (b).

Una matriz Doehlert fue realizada a partir de la D_G de los extractos de maíz y arroz. Los valores de d_A , d_M y D_G fueron calculados como se describe en la Sección 4.10. Este diseño permitió el estudio del modelo efecto principal lineal-cuadrático+2 vías, el cual mostró mejor ajuste a los datos experimentales para maíz y arroz. El análisis de la superficie de respuesta elaborado a partir de la D_G (Figura 25) indicó que los puntos críticos máximos fueron DDTP 0.83 % m v⁻¹ y Tritón X-114 0.098 % m v⁻¹.

TABLA XXV
DESEABILIDAD GLOBAL DE LAS SEÑALES ANALÍTICAS OBTENIDA
PARA ARROZ Y MAÍZ

Exp.	DDTP (% m v ⁻¹)	Tritón X-114 (% m v ⁻¹)	Arroz (IF)	Maíz (IF)	d _A	d _M	D _G
1	0.5	0.100	2183	1272	0.812	1.000	0.901
2	1.0	0.125	2458	872	1.000	0.306	0.553
3	1.5	0.100	1885	1158	0.608	0.802	0.698
4	1.0	0.075	2042	1126	0.716	0.746	0.731
5	0.5	0.050	2205	816	0.827	0.209	0.416
6	1.0	0.025	1518	927	0.358	0.402	0.379
7	1.5	0.050	993	695	0.000	0.000	0.000
8	1.0	0.075	2421	1171	0.974	0.824	0.896
9	1.0	0.075	2197	963	0.821	0.464	0.617

Exp. Número de experimento, D_G deseabilidad global, d_A deseabilidad individual para arroz, d_M deseabilidad individual para maíz

Un estudio de robustez fue realizado para la etapa de preconcentración CPE en los extractos de arroz y maíz. Las concentraciones de DDTP y Tritón X-114 en 10% de su valor óptimo, siendo su intervalo de estudio de 0.72-0.78 % m v⁻¹ y 0.09-0.11 % m v⁻¹, respectivamente. El diagrama de Pareto (Figura 26) obtenido indica que no existe diferencia significativa entre las señales analíticas del nivel bajo y el nivel alto de la concentración de los reactivos evaluados, por lo cual se infiere que la etapa de preconcentración CPE es robusta al 10%.

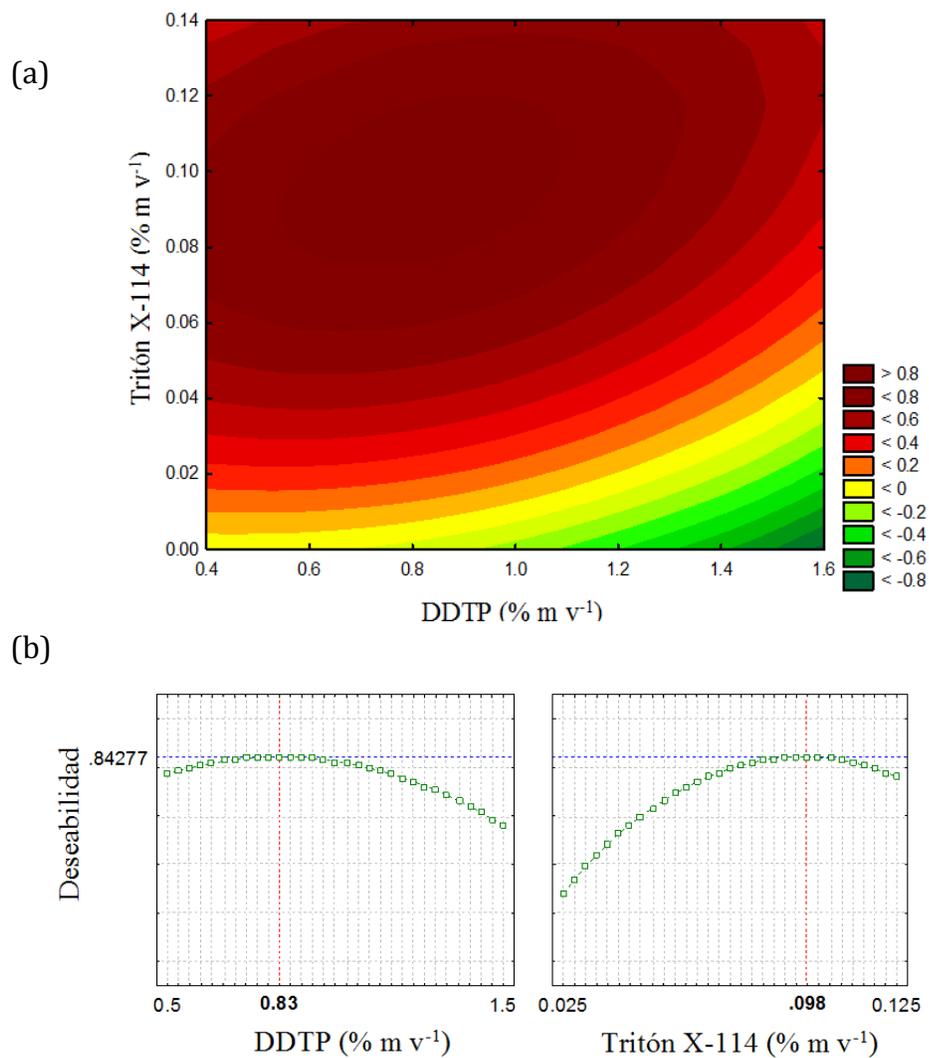


Figura 25. Gráficos de superficie de respuesta (a) y deseabilidad (b) de la etapa de extracción en punto nube. La deseabilidad fue calculada a partir de las señales analíticas obtenidas para los extractos de maíz y arroz.

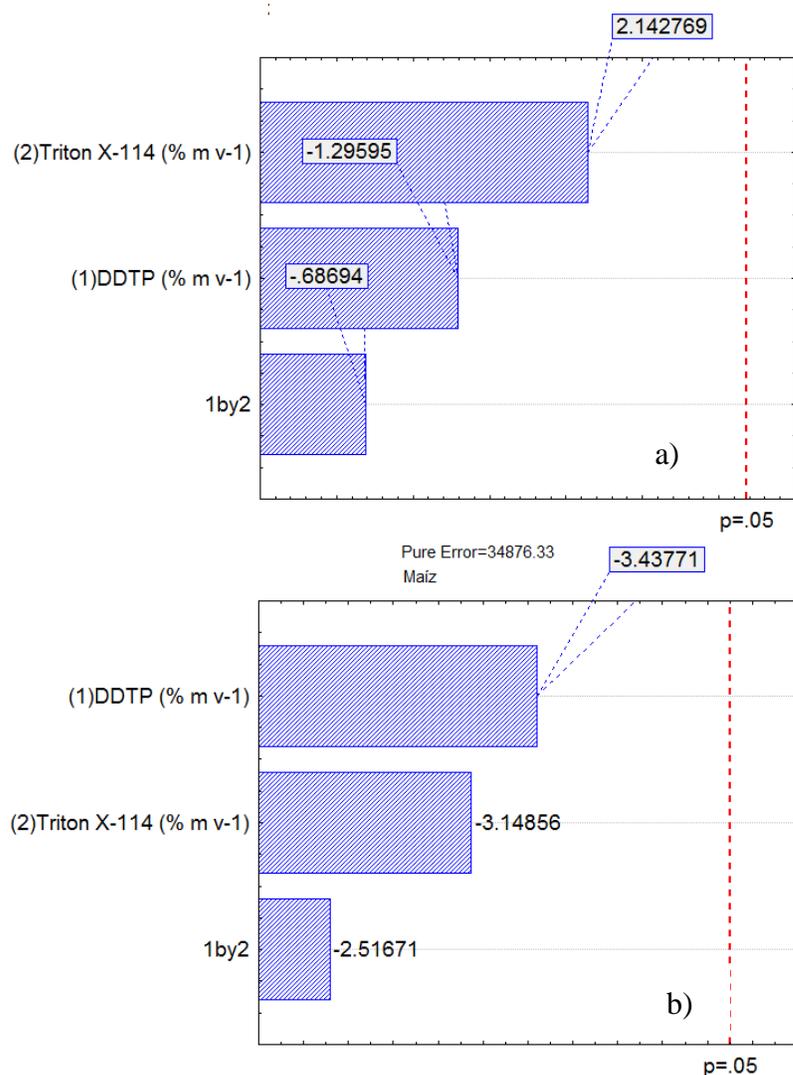


Figura 26. Estudio de robustez al 10% de los parámetros críticos de la etapa de extracción de As en punto nube en digeridos de arroz (a) y maíz (b).

5.8.2. Estudio de recuperación y fotoxidación UV de las especies de arsénico

En primera instancia, la recuperación de las 4 especies estudiadas de As fue evaluada en las condiciones óptimas de la etapa de CPE. La Tabla XXVI muestra los porcentajes de recuperación de las As(V), As(III), MMA y DMA tanto en extracto

CPE del digerido de arroz como de maíz. Los resultados muestran que las 4 especies evaluadas son fuertemente absorbidas en las micelas. La recuperación de las especies orgánicas de As fue > 85%, mientras que las formas inorgánicas mayores al 90%. La transferencia alta de las especies orgánicas e inorgánicas a la fase micelar puede ser debido al bajo pH (<1) y al alto contenido de sal en el jugo gastrointestinal artificial. En el caso de As(III), es conocido que esta forma química puede formar complejos con el DDTP lo cual puede explicar los mayores porcentajes de recuperación obtenidos en ambos cereales.

TABLA XXVI

ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN DE LAS ESPECIES DE ARSÉNICO EN ARROZ Y MAÍZ
(ADICIÓN DE 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ DE DIGERIDO GÁSTRICO)

	As(V) (%)	As(III) (%)	MMA (%)	DMA (%)
Arroz	95±6	96±3	87±6	90±8
Maíz	92±3	101±5	88±7	94±13

Con el objetivo de cuantificar todas las especies de As como As total, en el sistema MSFIA-HG-AFS fue acoplado un sistema de fotoxidación UV para la degradación de las especies orgánicas. A diferencia de la Sección 5.6.1 y debido al alto contenido de materia orgánica en el digerido artificial, el volumen de reactivo oxidante fue casi duplicado. El tiempo de flujo detenido en la cámara de fotoxidación UV fue evaluado de 0 a 20 min. La Figura 27 muestra un decremento de la señal analítica de As(V) y un incremento para DMA (la especie térmicamente más estable [142]) con el aumento del tiempo de flujo detenido. Es posible que los

subproductos derivados de la fotooxidación UV procedentes de la degradación de la materia orgánica con el aumento del tiempo consumiera el NaBH_4 disponible en la etapa HG. Aunque la generación de subproductos afecta la señal analítica de ambas especies, el incremento observado en la señal de DMA puede ser atribuido a la conversión de analito en As(V) produciendo un aumento neto observable. Una prueba *t student* indica que en tiempos de flujo detenido ≥ 5 min las señales analíticas obtenidas de ambas especies no presentan diferencias significativas ($p > 0.05$). Un tiempo de flujo detenido de 5 min fue seleccionado en el sistema propuesto.

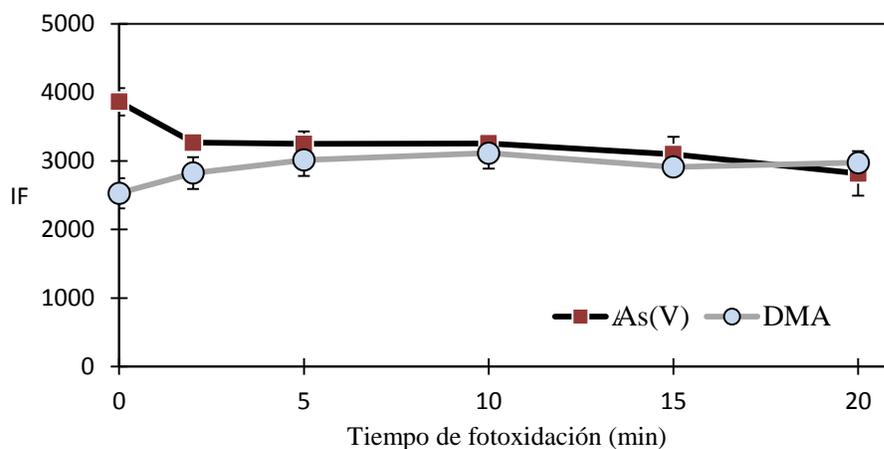


Figura 27. Efecto del tiempo de fotooxidación UV sobre la intensidad de fluorescencia para los estándares de As(V) y DMA de $5 \mu\text{g L}^{-1}$.

5.8.3. Parámetros analíticos

Utilizando las condiciones óptimas mencionadas en las secciones anteriores, los parámetros analíticos fueron determinados para cada grano de cereal. La Tabla XXVII resume los principales parámetros analíticos del método automatizado de extracción secuencial en línea.

TABLA XXVII
PARÁMETROS ANALÍTICOS PARA EN LA DETERMINACIÓN DE
ARSÉNICO BIODISPONIBLE

Parámetro	Parámetros analíticas con preconcentración			Parámetros analíticas sin preconcentración		
	Arroz	Maíz	Agua	Arroz	Maíz	Agua
Factor de preconcentración ^a	15.7	11.2	14.8	-	-	-
Factor de mejora ^b	14.7	10.9	16.0	-	-	-
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$) ^c	0.12	0.17	0.02	1.5	1.9	0.20
LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$) ^c	0.41	0.55	0.07	5.0	6.3	0.66
Ecuación de regresión:						
Pendiente	1169	685	1106	76	63	69
Intersección	2904	4191	5	822	658	519
Coefficiente de regresión (r^2)	0.9829	0.9804	0.9869	0.9458	0.9398	0.9892
Rango lineal de trabajo ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0.41-20	0.55-20	0.18-20	5-20	6.3-20	0.66-20
Repetibilidad (%) ^d	8.0	9.3	5.4	4.1	4.2	3.3
Reproducibilidad (%) ^d	10.9	12.0	6.7	5.9	7.2	5.6

a, factor de preconcentración: se define como la relación de las concentraciones de analito después y antes de la extracción del punto nube; b, factor de mejora: se calculó como la relación de la pendiente de las muestras preconcentradas y la obtenida sin preconcentración; c, límite de detección y límite de cuantificación define como tres y diez veces la relación señal-ruido, respectivamente; d, calculados en $2.5 \mu\text{g As L}^{-1}$

Las curvas de calibración fueron construidas usando estándares preparados en la misma matriz del digerido de cada cereal. Por lo tanto, las curvas de calibración (intensidad relativa vs mg L^{-1} de As(V)), con ajustes estadísticamente satisfactorios fueron obtenidos (r^2 : 0.9829 para el arroz y 0.9804 para maíz, $n =$

11). De acuerdo con las curvas de calibración, la intensidad de la señal varió considerablemente para las diferentes granos de cereal (arroz > maíz).

Los LOD del método fueron calculados como tres veces la desviación estándar de diez repeticiones del blanco dividido por la pendiente de la curva de calibración, mientras que los LOQ fueron calculados como diez veces la desviación estándar de diez repeticiones del blanco dividido por la pendiente de la curva de calibración [143]. Los valores de LOD para ambos cereales fueron muy similares. El valor superior de LOD para arroz puede ser atribuido a la menor co-extracción de materia orgánica en el CPE, y por lo tanto la menor generación de subproductos en la etapa de fotoxidación UV. Es conocido que el maíz presenta un mayor contenido de microcomponentes como proteínas y ácidos grasos que el arroz [29] (Apéndice Q).

La precisión de la determinación de As en cada eluente fue evaluada usando la RSD de diez inyecciones sucesivas de $2.5 \mu\text{g L}^{-1}$ de una disolución estándar de As(V) para los dos cereales, siendo menor para arroz.

La concentración de As después de la preconcentración CPE mostró un incremento de más de 10 veces su valor comparado con el control (Apéndice R). Los factores de preconcentración (FP) para los estándares de $1.0\text{-}5.0 \mu\text{g L}^{-1}$ de digerido fueron mayores para arroz que para maíz (valor promedio: 15.7 y 11.2, respectivamente; Tabla XXVII). El valor de FP del arroz fue similar al obtenido para agua destilada (valor promedio: 14.8) lo cual refleja la baja interferencia de los componentes de del grano de arroz sobre la CPE. La mayor interferencia de los

componentes del grano de maíz sobre la respuesta del As sólo fue apreciable después de la CPE (Tabla XXVII, Apéndice R; los valores de las pendientes fueron 76.5, 62.9 y 69.3 L μg^{-1} sin CPE y 1126, 685 y 1106 L μg^{-1} con CPE para arroz, maíz y agua, respectivamente. Esto puede ser atribuido a la mayor incorporación y concentración de sustancias matriciales interferentes en el sistema micelar.

5.8.4. Validación del método propuesto

La validación del método automatizado para la determinación de As en el digerido de maíz después de la CPE fue realizada mediante el análisis del CRM de arroz ERM BC-211. El contenido de As bioaccesible fue determinado en el ERM BC-211 mediante el método propuesto (CPE-MSFIA-HG-AFS), así como el contenido de As total en el residuo sólido del ensayo de digestión *in vitro* (EPA 3052, HG-AFS). La suma de ambas fracciones (As total en residuo + As bioaccesible) no presentó diferencia estadísticamente significativa con el valor certificado (Tabla XXVIII).

TABLA XXVIII

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO BIODISPONIBLE

CRM	As bioaccesible ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	As remanente en residuo sólido ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Suma de fracciones ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Valor certificado ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Rice ERM BC-211	211±48	75±11	286±49	260±6.5

5.8.5. Determinación de arsénico bioaccesible en muestras de maíz

El método automatizado propuesto fue aplicado para la determinación del As bioaccesible en muestras de grano de maíz de Matehuala, zona A, muestras que presentaron un mayor contenido de As total. La Tabla XXIX reporta el contenido de As bioaccesible en cada una de las seis muestras de grano de maíz del sitio. En todos los casos, el contenido de As bioaccesible fue $> 173 \mu\text{g kg}^{-1}$ no mostrando diferencias significativas en sus valores. Prácticamente 72-88% del contenido de As fue extraído con el empleo de las tres etapas de digestión gastrointestinal (La Tabla XXIX). Una muestra compuesta presento un 86% de As bioaccesible. Laparra *et al.* [80], mediante el empleo de un método de extracción gastrointestinal *in vitro*, encontraron que la mayoría ($>90\%$) del arsénico total en arroz cocido es bioaccesible. La menor disponibilidad de As en maíz puede ser atribuida a su mayor contenido de proteína y lípidos (Apéndice Q). La Tabla XXIX muestra que los contenidos de As total y As bioaccesible disminuyeron en la muestra compuesta MTA (conformada por las seis muestras de grano de maíz: MTA 1-MTA 6) después del proceso de nixtamalización, mientras que el porcentaje de As bioaccesible presento una magnitud ligeramente superior a las obtenidos para los granos crudos de maíz. En el mismo estudio de Laparra *et al.* [80], la distribución de especies de As fue evaluada utilizando grano crudo y cocido encontrando que la proporción de especies inorgánicas se incrementó después del proceso de cocción. La concentración de minerales tales como Na, K, Mg, Ca, Cu, Fe, Mn, Ni, Zn fueron evaluados en el grano de maíz (Apéndice S) y su relación con el As bioaccesible fue

analizada mediante el coeficiente de correlación de Pearson (Tabla XXX), Los valores del coeficiente de correlación de Pearson indican que minerales como el K, Cu y Ni presentan una correlación significativa ($p < 0.05$) con el contenido de As total en el grano de maíz, mientras que el contenido de Ni con los niveles de As bioaccesible.

TABLA XXIX
ARSÉNICO BIOACCESIBLE EN MUESTRAS DE MAÍZ DE ZONA A
(MATEHUALA, S. L. P.)

Grano de maíz	As bioaccesible ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	As _T ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Fracción de As bioaccesible (%)
MTA	205±17	252±18	81.10
MTA*	178±19	206±33	86.21
MTA-1	252±66	320±40	78.84
MTA-2	173±37	230±30	75.35
MTA-3	239±30	270±10	88.46
MTA-4	190±20	240±10	79.04
MTA-5	259±42	320±30	81.09
MTA-6	238±19	330±10	72.23

* Maíz nixtamalizado

El riesgo por el consumo de maíz procedente de la zona As por la población de cerrito blanco (Zona) fue calculado por el coeficiente de riesgo (CR) como muestra la Ecuación 7:

$$CR = \frac{(M)(ID)(FP)}{(DdR)(PC)} \quad (7)$$

dónde, M, es concentración de as bioaccesible en el grano de maíz (mg kg^{-1}), ID es la ingesta diaria del producto agrícola, ($0.315 \text{ kg día}^{-1}$ en México) [75], FP es el factor

para convertir el peso fresco a peso seco de grano de maíz, DdR es la dosis de referencia de exposición oral a As para toxicidad subcrónica, de 6 meses a 13 años, y crónica, mayor a 13 años ($0.0003 \text{ mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ en ambos casos), y PC es el peso corporal humano (75 y 69 kg para hombres y mujeres respectivamente [149]). Valores de CR fueron 2.23 para hombres y 2.42 para mujeres (para la etapa crónica y subcrónica). Valores de CR superiores a 1 indican un riesgo de intoxicación, por lo que hombres y mujeres que presentan un consumo de maíz proveniente de esta zona de muestreo (zona A) presentan riesgo de intoxicación crónica y subcrónica por ingesta de As a través de este cereal.

TABLA XXX
COEFICIENTES DE CORRELACIÓN DE PEARSON DE PARÁMETROS EN
EL GRANO DE MAÍZ

	Na _T	K _T	Mg _T	Ca _T	Cu _T	Fe _T	Mn _T	Ni _T	Zn _T	AsB
K _T	0.659									
Mg _T	-0.084	0.275								
Ca _T	0.081	-0.146	0.505							
Cu _T	0.567	0.939**	0.431	-0.102						
Fe _T	0.741*	0.916**	0.283	0.011	0.898**					
Mn _T	0.552	0.820*	0.326	-0.106	0.911**	0.733*				
Ni _T	-0.078	0.647	0.306	-0.520	0.664	0.491	0.468			
Zn _T	0.169	0.026	0.71*	0.847**	0.205	0.177	0.272	-0.335		
AsB	-0.051	0.601	0.587	-0.308	0.679	0.423	0.500	0.892**	-0.045	
As _T	0.058	0.732*	0.470	-0.407	0.773*	0.516	0.694	0.908**	-0.102	0.919**

*, La correlación es significativa al nivel 0.05 (bilateral); **, La correlación es significativa al nivel 0.01 (bilateral); AsB, arsénico bioaccesible; As_T, arsénico total

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES

La acumulación y translocación de As desde el suelo hasta la planta de maíz de tres sitios agrícolas cercanos a zonas mineras en México (San Luis Potosí), fueron evaluadas con la finalidad de evaluar la transferencia de As en cultivos de maíz y su riesgo potencial para la salud humana. El As(V) fue la forma predominante del metaloide en el suelo y absorbida por la planta de maíz. En general, la concentración de As total en el cultivo de maíz fue, en orden, raíz >> tallo y hoja > grano. La atención cuidadosa a los parámetros que presentan una correlación con la translocación y acumulación de arsénico y la transferencia de As a través de la cadena alimenticia puede derivar en metodologías de tratamiento de zonas agrícolas contaminadas para la reducción de la exposición humana al As por consumo de maíz. Parámetros como el contenido de Fe y Mn en los suelos agrícolas están fuertemente correlacionados con la translocación de As hacia el tallo por lo que el alto contenido de Fe y Mn en el suelo podría disminuir la concentración de As en la parte aérea de la planta y reducir la transferencia de As a través de la cadena alimenticia.

Un método automatizado de extracción secuencial en flujo y detección por HG-AFS fue desarrollado para evaluar el As extraíble y potencialmente disponible para los cultivos. La principal ventaja del método propuesto es la enorme reducción en el tiempo de análisis, de 50 h (para el método BCR convencional) a 6 h (para el

método automatizado), por lo que es una herramienta eficaz para el análisis de un gran número de muestras en un corto periodo de tiempo. Además, permite un conocimiento de la cinética de lixiviación del As. El método de extracción en flujo desarrollado se aplicó satisfactoriamente para el fraccionamiento de As en las zonas A y B de Matehuala, San Luis Potosí. La suma del contenido de As en F1 y F2 en los suelos analizados fue mayor al 50% del As total por lo cual indica que una alta proporción del metaloide es potencialmente biodisponible. La zona A presentó un mayor porcentaje de As asociado a F1 y F2 que en la zona B, posiblemente atribuido a su mayor contenido de Ca, lo cual indica que el As de esta zona presenta una mayor biodisponibilidad para el cultivo de maíz.

Con el objetivo de analizar los mecanismos de transferencia de As y su toxicidad en el cultivo de maíz, la distribución de especies de As en el sistema suelo-agua-maíz fue también evaluada. Por lo cual, un procedimiento de extracción para la determinación de las especies del As en el cultivo de maíz fue implementado. El empleo de HNO_3 0.15 mol L^{-1} para raíz, tallo y hoja y TFA 0.05 mol L^{-1} para el grano como agentes extractantes permitió la adecuada determinación de especies de As en el cultivo debido al alto porcentaje de extracción de As obtenido ($> 80\%$) y a que la interconversión de especies fue baja ($< 10\%$). En el cultivo de maíz, la especie de As(III) fue la principal detectada en el tallo, mientras que el As(V) fue la forma predominante de As en la hoja y la raíz. En general, las especies inorgánicas de As fueron la forma predominante encontrada

en la parte comestible para el ganado, siendo el contenido de As(III), la especie más tóxica, mayor al 33%, lo cual sugiere un riesgo de envenenamiento importante.

Asimismo, un nuevo método de determinación de As bioaccesible a niveles traza en grano de maíz basado en la preconcentración mediante CPE fue desarrollado presentando LOD bajos ($0.96 \mu\text{g kg}^{-1}$ y $1.36 \mu\text{g kg}^{-1}$ para arroz y maíz, respectivamente) y amplio rango lineal de trabajo ($0.41\text{-}20$ y $0.55\text{-}20 \mu\text{g L}^{-1}$ para arroz y maíz, respectivamente). Esta metodología versátil y económica puede ser utilizada como una herramienta analítica alternativa al empleo de técnicas costosas como ICP-MS. La mayor parte del As total contenido en el grano de maíz fue bioaccesible (72-82%), por lo que una proporción alta del metaloide podría acceder al torrente sanguíneo y representar un riesgo a la salud humana.

Dada la importancia toxicológica del estudio del flujo de arsénico a través del sistema agua-suelo-planta, se presentan a continuación algunas áreas de oportunidad sugeridas a partir de la realización del presente proyecto:

- Existe información limitada acerca de las acciones necesarias para controlar el riesgo toxicológico debido al consumo de follaje o grano de maíz. El efecto de la inoculación de microorganismos, además de la adición de fosfato y materia orgánica en el suelo agrícola han sido evaluados con resultados prometedores; sin embargo, esto necesita ser investigado más a fondo. El estudio del uso de fuentes alternas de materia orgánica como fertilizantes y formadores de complejos en el suelo agrícola, así como aditivos que permitan la reducción del estrés en la planta de maíz y en consecuencia la secreción de exudados de

ácidos orgánicos por la raíz son las líneas de investigación que pueden contribuir a la reducción de la transferencia de As a través del sistema agua-suelo-maíz-humano.

- Metodologías más sensibles ($LOD < 0.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ de grano) que permitan la determinación del contenido y bioaccesibilidad de las especies de As en cereales como maíz son requeridas. El riesgo de exposición humana por consumo de arsénico puede ser mejor evaluado mediante la determinación de As inorgánico bioaccesible.

Esta información permitiría el desarrollo de estrategias para la reducción del riesgo asociado al consumo de As a través de los productos derivados de maíz.

CONCLUSIONS

The accumulation and translocation of As from agricultural soil to maize plant from three agricultural zones near mining areas were evaluated to assess the As transfer in corn crops and its potential risk to human health. On the soil, As(V) was the predominant As form in leachate, which showed a positive correlation ($p = 0.05$) with the As concentration in root ($R = 0.949$), stem ($R = 0.663$) and leaf ($R = 0.883$) of the corn plant. According to ACP, the pH of the agricultural soil correlated negatively with the As accumulated in each corn plant part that can be attributed to a stress state during the growth, and therefore, the organic acids secretion. In general, the total As concentration in corn crop was: root \gg stem and leaf $>$ grain. The content of iron and manganese in agricultural soils was strongly correlated with As translocation to the stem, and therefore, a high content of this metals in soil could reduce the As concentration in the aerial part of the corn plant. Careful attention to the soil parameters that show a high correlation with As transfer through the food chain could allow the treatment methodologies development for contaminated agricultural areas and reduce human exposure by As intake through corn consumption.

An automated method for the sequential As extraction from soil using HG-AFS as detector was developed to evaluate the removable As, and therefore, the potentially available As for crops. The main advantage of the proposed method is the reduction in eight times the analysis time of conventional BCR method, which allows analyzed a large numbers of samples in a short period of time. This method also allows the understanding of the As leaching kinetics. The extraction method was applied

successfully developed for As fractionation from soil of agricultural zones. The potentially available As was > 50% for all soils samples. The As extractable content associated with the most labile fractions (F1 + F2) was higher in samples from Zone A than from Zone B, indicating that the As in Zone A could have major availability to the maize crop.

In order to analyze the As transfer mechanisms and its toxicity in maize, the As species distribution in the soil-water-maize system was also evaluated. Therefore, an extraction method for the determination of As species in maize was implemented. The use of HNO_3 0.15 mmol L^{-1} for root, stem, and leaf; and TFA 0.05 mol L^{-1} for grain corn as extractant agents was proposed, achieving percentages of As extraction higher than 80% and an species interconversion smaller than 10%, allowing the proper determination of As species in plant. The content of As(III), more toxic species, ranged from 33 to 65% depending on the plant part. In maize, As(III) was the main form in stem, while As(V) was the predominant As specie in leaf and root. In general, the inorganic As species were the predominant form found in the edible part of the corn plant for livestock, which suggests a significant risk of poisoning.

A method for the determination of bio-accessible As in corn grain based on in vitro bioaccessibility assay, 2) the cold point extraction, and 3) the MSFIA-HG-AFS system, was developed, which had a low limit detection and wide linear range. This versatile and economical methodology can use as an alternative analytical tool to costly techniques such as ICP-MS. The As bioaccessible content in corn grain from Zone A was 72-82% indicating a high As proportion can access the human bloodstream and represent a risk to human health.

Due to the toxicological importance of As pathway through the water-soil-plant system, some suggestions for the reduction of As transfer to corn plant and human are presented:

- There is limited information about the implemented strategies for the control of As content corn grain or corn foliage. The microorganisms inoculation and the organic matter addition with phosphate concentration to agricultural soil has shown promising results; however, a major knowledge needs to be development. The study of the use of organic matter as fertilizer and the complexing agents as additives in agricultural soil that can reduce the corn plant stress, the secretion of organic acids exudation by roots are research lines that can contribute to the As transfer reduction through water-soil-corn-human system.

- Methodologies with lower limit detection for the As species determination in grains of high consumption like corn grain are required. The risk assessment of As intake by food consumption is better evaluated by thought the inorganic As bioavailable determination.

The development of this research lines would allow the risk reduction by As intake through based-corn food products.

BIBLIOGRAFÍA

1. **EPA, Environmental Protection Agency of U.S; consultado: 14 de noviembre 2012, disponible en: [\[http://www.epa.gov/iris/subst/0278.htm\]](http://www.epa.gov/iris/subst/0278.htm)**
2. Watts MJ, O'Reilly J, Marcilla AL, Shaw RA, Ward NI: **Field based speciation of arsenic in UK and Argentinean water samples.** *Environ Geochem Health* 2010, **32**(6):479-490.
3. Markley CT, Herbert BE: **Arsenic Risk Assessment: The Importance of Speciation in Different Hydrologic Systems.** *Water, Air & Soil Pollut* 2009, **204**(1-4):385-398.
4. Wauchope R: **Uptake, translocation and phytotoxicity of arsenic in plants. In: Arsenic: Industrial, Biomedical, Environmental Perspectives.** In: *Arsenic Symposium, Gaithersburg, Maryland Van Nostrand Reinhold Company.* New York, N.Y: Fensterheim Ly; 1983: 348-374.
5. Simon S, Tran H, Pannier F, Potin-Gautier M: **Simultaneous determination of twelve inorganic and organic arsenic compounds by liquid chromatography-ultraviolet irradiation-hydride generation atomic fluorescence spectrometry.** *J Chromatogr* 2004, **1024** 105-113.
6. Tamaki S, Frankenberger WJ: **Environmental biochemistry of arsenic.** *Rev Environ Contam Toxicol* 1992, **124**:79-110.
7. Eguchi N, Kuroda K, Endo G: **Metabolites of arsenic induced tetraploids and mitotic arrest in cultured cells.** *Arch Environ Contam Toxicol* 1997, **32**:141-145.
8. Bai J, Lin X, Yin R, Zhang H, Junhua W, Xueming C, Yongming L: **The influence of arbuscular mycorrhizal fungi on As and P uptake by maize (Zea mays L.) from As-contaminated soils.** *Appl Soil Ecol* 2008, **38**(2):137-145.
9. O'Reilly J, Watts MJ, Shaw RA, Marcilla AL, Ward NI: **Arsenic contamination of natural waters in San Juan and La Pampa, Argentina.** *Environ Geochem Health* 2010, **32**(6):491-515.
10. Zheng MZ, Cai C, Hu Y, Sun GX, Williams PN, Cui HJ, Li G, Zhao FJ, Zhu YG: **Spatial distribution of arsenic and temporal variation of its concentration in rice.** *New Phytologist* 2011, **189**(1):200-209.
11. Garcia-Reyes RB, Rangel-Mendez JR: **Adsorption kinetics of chromium(III) ions on agro-waste materials.** *Bioresource Technology* 2010, **101**(21):8099-8108.
12. Garcia-Reyes RB, Rangel-Mendez JR: **Contribution of agro-waste material main components (hemicelluloses, cellulose, and lignin) to the removal of chromium (III) from aqueous solution.** *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 2009, **84**(10):1533-1538.

13. Páez-Espino D, Tamames J, Lorenzo V, Cánovas D: **Microbial responses to environmental arsenic**. *BioMetals* 2009, **22**(1):117-130.
14. Zhao FJ, Ma JF, Meharg AA, McGrath SP: **Arsenic uptake and metabolism in plants**. *New Phytologist* 2009, **181**(4):777-794.
15. Deng Y, Wang Y, Ma T, Gan Y: **Speciation and enrichment of arsenic in strongly reducing shallow aquifers at western Hetao Plain, northern China**. *Environ Geol* 2009, **56**:1467-1477.
16. Rosas I, Baez A, Armienta A, Belmont R: **Arsenic concentrations in water, soil, milk and forage in Comarca Lagunera, Mexico** *Water, Air & Soil Pollut* 1999, **112**(1/2):133-149.
17. NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004: **Que establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio**. In. Edited by Federación DOf. México.
18. Razo I, Carrizales L, Castro J, Díaz-Barriga F, Monroy M: **Arsenic and heavy metal pollution of soil, water and sediments in a semi-arid climate mining area in México**. *Water, Air & Soil Pollut* 2004, **152**:129-152.
19. Jasso-Pineda Y, Espinosa-Reyes G, Gonzalez-Mille D, Razo-Soto I, Carrizales L, Torres-Dosal A, Mejia-Saavedra J, Monroy M, tze AI, Yarto M *et al*: **An integrated health risk assessment approach to the study of mining sites contaminated with arsenic and lead**. *Integr Environ Assess & Manage* 2006, **3**(3):344-350.
20. Armienta MA, Segovia N: **Arsenic and fluoride in the groundwater of Mexico**. *Environ Geochem Health* 2008, **30**(4):345-353.
21. Su YH, McGrath SP, Zhao FJ: **Rice is more efficient in arsenite uptake and translocation than wheat and barley**. *Plant and Soil* 2009, **328**(1-2):27-34.
22. Huang RQ, Gao SF, Wang WL, Staunton S, Wang G: **Soil arsenic availability and the transfer of soil arsenic to crops in suburban areas in Fujian Province, southeast China**. *Sci Total Environ* 2006, **368**:531-541.
23. Bhattacharya P, Samal AC, Majumdar J, Santra SC: **Arsenic Contamination in Rice, Wheat, Pulses, and Vegetables: A Study in an Arsenic Affected Area of West Bengal, India**. *Water, Air & Soil Pollut* 2010, **213**(1-4):3-13.
24. Chowdhury UK, Rahman MM, Mandal BK, Paul K, Lodh D, Biswas BK, al. e: **Groundwater arsenic contamination and human suffering in West Bengal, India and Bangladesh**. *Environ Sci* 2001, **8**:393-415.
25. Roychowdhury T, Uchino T, Tokunaga H, Ando M: **Survey of arsenic in food composites from arsenic affected area of West Bengal, India**. *Food and Chem Toxicol* 2002, **40**:1611-1621.
26. Norra S, Berner ZA, Agarwala P, Wagner F, Chandrasekharam D, Stüben D: **Impact of irrigation with arsenic rich groundwater on soil and crops: A geochemical case study in West Bengal delta plain, India**. *Appl Geochem* 2005, **20**:1890-1906.

27. Wojciechowska-Mazurek M, Starska K, Brulińska-Ostrowska E, Plewa M, Biernat U, Karłowski K: **Assessment of contamination of cereal products with elements noxious to human health.** *Pol J of Environ Stud* 2006, **15**(2a).
28. Ferguson JF, Gavis J: **Review of the arsenic cycle in natural waters.** *Water Res* 1972, **6**:1259-1274.
29. Nuss ET, Tanumihardjo SA: **Maize: A Paramount Staple Crop in the Context of Global Nutrition.** *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2010, **9**(4):417-436.
30. **FAOSTAT, Food and Agriculture Organization of the United Nations; consultado: 13 de mayo, 2013, disponible en:** [<http://faostat.fao.org/site/613/DesktopDefault.aspx?PageID=613#anchor>]
31. El Sikaily A, Khaled A, Nemr AE, Abdelwahab O: **Removal of Methylene Blue from aqueous solution by marine green alga *Ulva lactuca*.** *Chemistry and Ecology* 2006, **22**(2):149-157.
32. Prabpai S, Charerntanyarak L, Siri B, Moore MR, Noller BN: **Effects of residues from municipal solid waste landfill on corn yield and heavy metal content.** *Waste Manage* 2009, **29**(8):2316-2320.
33. Gulz PA, Gupta S-K, Schulin R: **Arsenic accumulation of common plants from contaminated soils.** *Plant Soil* 2005, **272**:337-347.
34. Del-Razo LM, Garcia-Vargas GG, Garcia-Salcedo J, Sanmiguel MF, Rivera M, Hernandez MC, M.E. C: **Arsenic levels in cooked food and assessment of adult dietary intake of arsenic in the Region Lagunera, Mexico.** *Food and Chem Toxicol* 2002, **40**:1423-1431.
35. Gutierrez M, Alarcón-Herrera MT, Camacho LM: **Geographical distribution of arsenic in sediments within the Rio Conchos Basin, Mexico.** *Environ Geol* 2009, **57**(4):929-935.
36. Espinosa E, Armienta MA, Cruz O, Aguayo A, Cenicerros N: **Geochemical distribution of arsenic, cadmium, lead and zinc in river sediments affected by tailings in Zimapán, a historical polymetallic mining zone of México.** *Environ Geol* 2009, **58**(7):1467-1477.
37. Gault AG, Jana J, Chakraborty S, Mukherjee P, Sarkar M, Nath B, Polya DA, Chatterjee D: **Preservation strategies for inorganic arsenic species in high iron, low-Eh groundwater from West Bengal, India.** *Anal Bioanal Chem* 2005, **381**: 347-353.
38. D'Angelo E, Zeigler G, Beck EG, Grove J, Sikora F: **Arsenic species in broiler (*Gallus gallus domesticus*) litter, soils, maize (*Zea mays* L.), and groundwater from litter-amended fields.** *Sci Total Environ* 2012, **438**:286-292.
39. Liebhardt WC: **The arsenic content of corn grain grown on a coastal plain soil amended with poultry manure.** *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 1976, **7**(2):169-174.
40. Kabata-Pendias A, Mukherjee AB: **Trace Elements from Soil to Human.** *Environ Sci* 2007:578.

41. Traina S, Laperche V: **Contaminant bioavailability in soils, sediments, and aquatic environments.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, **96**:3365-3371.
42. Sadiq M: **Solubility relationships of arsenic in calcareous soils and its uptake by corn.** *Plant and Soil* 1986, **91**:241-248.
43. Carbonell Barrachina AA, Burló Carbonell FM, Mataix Beneyto JJ: **Arsénico en el sistema suelo-planta: significado ambiental.** . España: Espagrafic; 1995.
44. Khan NI, Owens G, Bruce D, Naidu R: **Human arsenic exposure and risk assessment at the landscape level: a review.** *Environ Geochem Health* 2009, **31**(S1):143-166.
45. Raab A, Williams PW, Meharg AA, Feldmann J: **Uptake and translocation of inorganic and methylated arsenic species by plant.** *Environ Chem* 2007, **4**:197-203.
46. Ci X-k, Liu H-l, Hao Y-b, Zhang J-w, Liu P, al. e: **Arsenic distribution, species, and Its effect on maize growth treated with arsenate.** *J Integr Agric* 2012, **11**:416-423.
47. Woolson EA, Axley JH, Kearney PC: **The Chemistry and Phytotoxicity of Arsenic in Soils: I. Contaminated.** *Field Soils Soil Sci Soc Amer Proc* 1971, **35**: 97-100.
48. Mallick S, Sinam G, Sinha S: **Study on arsenate tolerant and sensitive cultivars of Zea mays L.: Differential detoxification mechanism and effect on nutrients status.** *Ecotox Environ Safe* 2011, **74**(5):1316-1324.
49. Abbas MHH, Meharg AA: **Arsenate, arsenite and dimethyl arsenic acid (DMA) uptake and tolerance in maize (Zea mays L.).** *Plant Soil* 2008, **304**(1-2):277-289.
50. Mittler R: **Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance.** *Plant Sci* 2002, **7**:405-410.
51. Srivastava M, Ma LQ, Singh N, Singh S: **Antioxidant responses of hyper-accumulator and sensitive fern species to arsenic.** *J Exp Bot* 2005, **56**:1332-1342.
52. Hartley-Whitaker J, Ainsworth G, Meharg AA: **Copper and arsenate induced oxidative stress in Holcus lanatus L. clones with differential sensitivity.** *Plant Cell Environ* 2001, **24**:713-722.
53. Mylona PV, Polidoros AN, Scandalios JG: **Modulation of antioxidant responses by arsenic in maize.** *Free Rad Bio Med* 1998, **25**:576-585.
54. Schulz H, Härtling S, Tanneberg H: **The identification and quantification of arsenic -induced phytochelatin- comparison between plants with varying As sensitivities.** *Plant Soil* 2007, **303**(1-2):275-287.
55. Najmowicz T, Wyszowski M, Cieccko Z: **Effect of soil contamination with arsenic and application of different substances on the manganese content in plants.** *J Elementol* 2010, **15**(3):549-558.
56. Parsons JG, Martinez-Martinez A, Peralta-Videa JR, Gardea-Torresdey JL: **Speciation and uptake of arsenic accumulated by corn seedlings using XAS and DRC-ICP-MS.** *Chemosphere* 2008, **70**(11):2076-2083.

57. Smith SE, Smith FA, Jakobsen I: **Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses.** *Plant Physiol* 2003, **133**:16-20.
58. Baig JA, Kazi TG, Shah AQ, Arain MB, Afridi HI, Khan S, Kandhro GA, Naeemullah, Soomro AS: **Evaluating the accumulation of arsenic in maize (Zea mays L.) plants from its growing media by cloud point extraction.** *Food Chem Toxicol* 2010, **48**(11):3051-3057.
59. Prieto-García F, Méndez-Marzo MA, Martínez-Pezina FH, Prieto-Méndez J: **Presencia de metales pesados en cultivos del Valle del Mezquital, México.** *Nat Res Latin J* 2007, **3**(2):100-110.
60. Neidhardt H, Norra S, Tang X, Guo H, Stüben D: **Impact of irrigation with high arsenic burdened groundwater on the soil-plant system: Results from a case study in the Inner Mongolia, China.** *Environ Pollut* 2012, **163**:8-13.
61. Marwa EMM, Meharg AA, Rice CM: **Risk assessment of potentially toxic elements in agricultural soils and maize tissues from selected districts in Tanzania.** *Sci Total Environ* 2012, **416**:180-186.
62. Sun G-X, Van de Wiele T, Alava P, Tack F, Du Laing G: **Arsenic in cooked rice: Effect of chemical, enzymatic and microbial processes on bioaccessibility and speciation in the human gastrointestinal tract.** *Environmental Pollution* 2012, **162**:241-246.
63. **<2 Removal of Basic Dye Methylene Blue from Aqueous Solutions Using Sawdust and.pdf>.**
64. Chandrasekhar S, Pramada PN: **Rice husk ash as an adsorbent for methylene blue—effect of ashing temperature.** *Adsorption* 2006, **12**(1):27-43.
65. Shen W, Guo Q, Wang H, Yang X, Liu Y, Zhang Y: **Product Composition of Pyrolyzed Sewage Sludge and Adsorption of Methylene Blue by Porous Material Derived from It.** *Environmental Engineering Science* 2008, **25**(1):99-105.
66. Shawabkeh RA, Abu-Nameh ESM: **Absorption of phenol and methylene blue by activated carbon from pecan shells.** *Colloid Journal* 2007, **69**(3):355-359.
67. Brahman KD, Kazi TG, Baig JA, Afridi HI, Khan A, Arain SS, Arain MB: **Fluoride and arsenic exposure through water and grain crops in Nagarparkar, Pakistan.** *Chemosphere* 2014, **100**:182-189.
68. Wu C, Ye Z, Shu W, Zhu Y, Wong M: **Arsenic accumulation and speciation in rice are affected by root aeration and variation of genotypes.** *J Exp Bot* 2011, **62**(8):2889-2898.
69. Kitchin KT: **Recent advances in carcinogenesis: modes of action, animal model systems, and methylated arsenic metabolites.** *Toxicol Appl Pharmacol* 2001, **172**:249-261.
70. Dopp E, Hartmann LM, Florea AM, Von Recklinghausen U, Pieper R, Shokouhi B, al. e: **Uptake of inorganic and organic derivatives of arsenic**

- associated with induced cytotoxic and genotoxic effects in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004, **201**:156-165.
71. Schwerdtle T, Walter I, Mackiw I, Hartwig A: **Induction of oxidative DNA damage by arsenite and its trivalent and pentavalent methylated metabolites in cultured human cells and isolated DNA.** *Carcinogenesis* 2003, **24**:967-974.
 72. **Food and Agriculture Organization/World Health Organization; consultado: 13 de junio de 2013, disponible en:** [<http://apps.who.int/ipsc/database/evaluations/chemical.aspx?chemID=1863>]
 73. Muñoz O, Díaz OP, Leyton I, Nuñez N, Devesa V, Suner MA, al. e: **Vegetables collected in the cultivated Andean area of northern Chile: total and inorganic arsenic contents in raw vegetables.** *J Agric Food Chem* 2002, **50**:642-647.
 74. Castro-Larragoitia J, Kramar U, Puchelt H: **200 years of mining activities at La Paz/San Luis Potosi/Mexico-consequences for environment and geochemical exploration.** *J Geochem Explor* 1997, **58**:81-91.
 75. **CNMI, Cámara Nacional del Maíz Industrializado; consultado: 16 de octubre de 2012, disponible en:** [<http://www.cnmaiz.org.mx/camara.html>]
 76. Serna-Saldivar SO, Amaya Guerra CA, Herrera Macias P, Melesio Cuellar JL, Preciado Ortiz RE, Terron Ibarra AD, Vazquez Carrillo G: **Evaluation of the Lime-Cooking and Tortilla Making Properties of Quality Protein Maize Hybrids Grown in Mexico.** *Plant Foods Hum Nutri* 2008, **63**(3):119-125.
 77. Bundschuh J, Nath B, Bhattacharya P, Liu C-W, Armienta MA, Moreno López MV, Lopez DL, Jean J-S, Cornejo L, Lauer Macedo LF *et al*: **Arsenic in the human food chain: the Latin American perspective.** *Sci Total Environ* 2012, **429**:92-106.
 78. Coronado-Gonzalez J, Del-Razo L, Garcia-Vargas G, San-Miguel-Salazar F, Escobedo-de-la-Pena J: **Inorganic arsenic exposure and type 2 diabetes mellitus in Mexico.** *Environmental Research* 2007, **104**(3):383-389.
 79. Rosado JL, Ronquillo D, Kordas K, Rojas O, Alatorre J, Lopez P, Garcia-Vargas G, Caamaño MdC, Cebrián ME, Stoltzfus RJ: **Arsenic Exposure and Cognitive Performance in Mexican Schoolchildren.** *Environmental Health Perspectives* 2007, **115**(9):1371-1375.
 80. Laparra JM, Vélez D, Barberá R, Ferré R, Montoro R: **Bioavailability of inorganic arsenic in cooked rice: practical aspects for human health risk assessments.** *J Agric Food Chem* 2005, **53**:8829-8833.
 81. Panaullah GM, Alam T, Hossain MB, Loeppert RH, Lauren JG, Meisner CA, Ahmed ZU, Duxbury JM: **Arsenic toxicity to rice (*Oryza sativa* L.) in Bangladesh.** *Plant and Soil* 2008, **317**(1-2):31-39.
 82. Martínez-Sánchez MJ, Martínez-López S, García-Lorenzo ML, Martínez-Martínez LB, Pérez-Sirvent C: **Evaluation of arsenic in soils and plant**

- uptake using various chemical extraction methods in soils affected by old mining activities.** *Geoderma* 2011, **160**(3-4):535-541.
83. Gergen I, Harmanescu M: **Application of principal component analysis in the pollution assessment with heavy metals of vegetable food chain in the old mining areas.** *Chem Cent J* 2012, **6**(156).
84. Hsu W-M, Hsi H-C, Huang Y-T, Liao C-S, Hseu Z-Y: **Partitioning of arsenic in soil-crop systems irrigated using groundwater: A case study of rice paddy soils in southwestern Taiwan.** *Chemosphere* 2012, **86**(6):606-613.
85. Cubadda F, Ciardullo S, D'Amato M, Raggi A, Aureli F, Carcea M: **Arsenic contamination of the environment-food chain: a survey on wheat as a test plant to investigate phytoavailable arsenic in italian agricultural soils and as a source of inorganic arsenic in the diet.** *J Agric Food Chem* 2010, **58**:10176-10183.
86. Yuan C-g, Jiang G-b, He B: **Evaluation of the extraction methods for arsenic speciation in rice straw, *Oryza sativa* L., and analysis by HPLC-HG-AFS.** *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 2005, **20**(2):103.
87. Larios R, Fernández-Martínez R, LeHecho I, Rucandio I: **A methodological approach to evaluate arsenic speciation and bioaccumulation in different plant species from two highly polluted mining areas.** *Science of The Total Environment* 2012, **414**:600-607.
88. Reyes MNM, Cervera ML, Campos RC, de la Guardia M: **Determination of arsenite, arsenate, monomethylarsonic acid and dimethylarsinic acid in cereals by hydride generation atomic fluorescence spectrometry.** *Spectroch Acta B Atom Spectr* 2007, **62**(9):1078-1082.
89. Zhu YG, Sun GX, Lei M, Teng M, Liu YX, Chen NC, Wang LH, Carey AM, Deacon C, Raab A *et al*: **High percentage inorganic arsenic content of mining impacted and nonimpacted chinese rice.** *Environ Sci and Technol* 2008, **42**:5008-5013.
90. Arao T, Kawasaki A, Baba K, Matsumoto S: **Effects of Arsenic Compound Amendment on Arsenic Speciation in Rice Grain.** *Environ Sci & Technol* 2011, **45**(4):1291-1297.
91. Li N, Fang G, Zhao L, Wang S: **Determination of arsenic in foods by flow injection on-line sorption pre-concentration with hydride generation atomic fluorescence spectrometry.** *Food Addit Contam B* 2009, **26**(6):839-846.
92. Gupta VK, Nayak A, Agarwal S, Dobhal R, Uniyal DP, Singh P, Sharma B, Tyagi S, Singh R: **Arsenic speciation analysis and remediation techniques in drinking water.** *Desalination and Water Treat* 2012, **40**:231-243.
93. Heilier J-Fo, Buchet J-P, Haufroid V, Lison D: **Comparison of atomic absorption and fluorescence spectroscopic methods for the routine determination of urinary arsenic.** *Int Archiv Occu and Environ Health* 2005, **78**(1):51-59.
94. Batista BL, Souza JMO, De Souza SS, Barbosa F: **Speciation of arsenic in rice and estimation of daily intake of different arsenic species by**

- Brazilians through rice consumption. *J Hazard Mater* 2011, **191**(1-3):342-348.**
95. Sanz E, Muñoz-Olivas R, Cámara C: **Evaluation of a focused sonication probe for arsenic speciation in environmental and biological samples.** *J Chromatogr, A* 2005, **1097**:1-8.
96. Sanz E, Muñoz-Olivas R, Cámara C, Sengupta MK, Ahamed S: **Arsenic speciation in rice, straw, soil, hair and nails samples from the arsenic-affected areas of Middle and Lower Ganga plain.** *J Environ Sci Health, Part A: Toxic/Hazard Subst Environ Eng* 2007, **42**:1-11.
97. Ackerman AH, Creed PA, Parks AN, Fricke MW, Schwegel CA, Creed JT, Heitkemper DT, Vela NP: **Comparison of a chemical and enzymatic extraction of arsenic from rice and an assessment of the arsenic absorption from contaminated water by cooked rice.** *Environ Sci and Technol* 2005, **39**:5241-5246.
98. Meharg AA, Lombi E, Williams PN, Scheckel KG, Feldmann J, Raab A, Yongguan Z, Islam R: **Speciation and localization of arsenic in white and brown rice grains.** *Environ Sci and Technol* 2008, **42**:1051-1057.
99. Zavala YJ, Gerads R, Gürleyük H, Duxbury JM: **Arsenic in rice: II. arsenic speciation in USA grain and implications for human health.** *Environ Sci and Technol* 2008, **42**(10):3861-3866.
100. Heitkemper DT, Kubachka KM, Halpin PR, Allen MN, Shockey NV: **Survey of total arsenic and arsenic speciation in US-produced rice as a reference point for evaluating change and future trends.** *Food Addit Contam B* 2009, **2**(2):112-120.
101. Williams PN, Price AH, Raab A, Hossain SA, Feldmann J, Meharg AA: **Variation in arsenic speciation and concentration in paddy rice related to dietary exposure.** *Environ Sci and Technol* 2005, **39** 5531-5540.
102. Jackson BP, Taylor VF, Karagas MR, Punshon T, Cottingham KL: **Arsenic, Organic Foods, and Brown Rice Syrup.** *Environ Health Perspect* 2012, **120**(5):623-626.
103. Shan J, Sáez AE, Ela WP: **Evaluating the mobility of arsenic in synthetic iron-containing solids using a modified sequential extraction method.** *J Environ Eng (Reston, VA, U S)* 2010, **136**(2):238-245.
104. Quazi S, Sarkar D, Datta R: **Changes in arsenic fractionation, bioaccessibility and speciation in organo-arsenical pesticide amended soils as a function of soil aging.** *Chemosphere* 2011, **84**:1563-1571.
105. Ure AM, Quevauviller P, Muntau H, Griepink B: **Speciation of Heavy Metals in Soils and Sediments. An Account of the Improvement and Harmonization of Extraction Techniques Undertaken Under the Auspices of the BCR of the Commission of the European Communities.** *Int J Env An Ch* 1993, **51**:135-151.
106. Bacon JR, Hewitt IJ, Cooper P: **Reproducibility of the BCR sequential extraction procedure in a long-term study of the association of heavy**

- metals with soil components in an upland catchment in Scotland.** *Science of The Total Environment* 2005, **337**(1-3):191-205.
107. Nemati K, Bakar NKA, Abas MR, Sobhanzadeh E: **Speciation of heavy metals by modified BCR sequential extraction procedure in different depths of sediments from Sungai Buloh, Selangor, Malaysia.** *Journal of Hazardous Materials* 2011.
 108. Žemberyová M, Barteková J, Hagarová I: **The utilization of modified BCR three-step sequential extraction procedure for the fractionation of Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn in soil reference materials of different origins.** *Talanta* 2006, **70**(5):973-978.
 109. Baig JA, Kazi TG, Arain MB, Shah AQ, Sarfraz RA, Afridi HI, Kandhro GA, Jamali MK, Khan S: **Arsenic fractionation in sediments of different origins using BCR sequential and single extraction methods.** *Journal of Hazardous Materials* 2009, **167**(1-3):745-751.
 110. W. Boonjob, M. Rosende, M. Miró, V. Cerdà: **Critical evaluation of novel dynamic flow-through methods for automatic sequential BCR extraction of trace metals in fly ash.** *Anal Bioanal Chem* 2009, **394**:337-349.
 111. Leal L, N.V. Semenova, R. Forteza, Cerdà V: **Preconcentration and determination of inorganic arsenic using a multisyringe flow injection system and hydride generation-atomic fluorescence spectrometry.** *Talanta* 2004, **64**(5):1335-1342.
 112. L.O. Leal, R. Forteza, Cerdà V: **Speciation analysis of inorganic arsenic by a multisyringe flow injection system with hydride generation-atomic fluorescence spectrometric detection.** *Talanta* 2006, **69**:500-508.
 113. Horner NS, Beauchemin D: **The effect of cooking and washing rice on the bio-accessibility of As, Cu, Fe, V and Zn using an on-line continuous leaching method.** *Analytica chimica acta* 2013, **758**:28-35.
 114. V. Cerdà, L. Ferrer, J. Avivar, Cerdà. A (eds.): **Flow Analysis: a practical guide.** Amsterdam, The Netherlands,; 2014.
 115. Caussy D: **Case studies of the impact of understanding bioavailability: Arsenic.** *Ecotoxicol Environ* 2003, **56** 164-173.
 116. C.H.M. Versantvoort, A.G. Oomen, E. Van De Kamp, C.J.M. Rompelberg, Sips AJAM: **Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food.** *Food Chem Toxicol* 2005, **43**:31-40.
 117. Moreda-Piñeiro J, Moreda-Piñeiro A, Romarís-Hortas V, Moscoso-Pérez C, López-Mahía P, Muniategui-Lorenzo S, Bermejo-Barrera P, Prada-Rodríguez D: **In-vivo and in-vitro testing to assess the bioaccessibility and the bioavailability of arsenic, selenium and mercury species in food samples.** *Trends Anal Chem; TrAC* 2011, **30**(2):324-345.
 118. M. He, C. Ke, W. Wang: **Effects of cooking and subcellular distribution on the bioaccessibility of trace elements in two marine fish species.** *J Agric Food Chem* 2010, **58**:3517-3523.

119. E.I. Brima, R.O. Jenkins, P.R. Lythgoe, A.G. Gault, D.A. Polya, Haris PI: **Understanding arsenic metabolism through a comparative study of arsenic levels in the urine, hair and fingernails of healthy volunteers from three unexposed ethnic groups in the United Kingdom.** *J Environ Monit* 2007, **9**:98-104.
120. A.L. Juhasz, E. Smith, J. Weber, M. Rees, A. Rofe, T. Kuchel, L. Sansom, R. Naidu: **In vitro assessment of arsenic bioaccessibility in contaminated (anthropogenic and geogenic) soils.** *Chemosphere* 2007, **69**:961-966.
121. A.G. Oomen, A. Hack, M. Mineus, E. Zeijdner, C. Cornelis, G. Schoeters, W. Verstraete, T. Van de Wiele, J. Wragg, C.J.M. Rompelberg *et al*: **Comparison of five in vitro digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants.** *Environ Sci Technol* 2002, **36**:3326-3334.
122. Nuria Mateo Anson, Robin van den Berg, Rob Havenaar, Aalt Bast, Haenen GRMM: **Bioavailability of ferulic acid is determined by its bioaccessibility.** *J Cereal Sci* 2009, **49** 296-300.
123. P. Cava-Montesinos, K. Nilles, M.L. Cervera, Guardia M: **Non-chromatographic speciation of toxic arsenic in fish.** *Talanta* 66 2005:895.
124. X. Li, J. Jia, Z.H. Wang: *Anal Chim Acta* 2006, **560**:153.
125. P. Herbello-Hermelo, M.C. Barciela-Alonso, A. Bermejo-Barrera, Bermejo-Barrera PJ: **Flow online sorption preconcentration in a knotted reactor coupled with electrothermal atomic absorption spectrometry for selective AS(III) determination in sea-water samples.** *J Anal Atom Spectrom* 2005, **20**:662.
126. C.Z. Chen, X.L. Zhan, D.B. Lu, C. Liu, L. Zhu: *Anal Chim Acta* 2009, **634**:192.
127. O. Munoz, D. Velez, Montoro R: **Optimization of the solubilization, extraction and determination of inorganic arsenic [As(III) + (As(V)] in seafood products by acid digestion, solvent extraction and hydride generation atomic absorption spectrometry.** *Analyst* 1999, **124**:601.
128. Q. Zhang, H. Minami, S. Inoue, I. Atsuya: **Differential determination of trace amounts of arsenic(III) and arsenic(V) in seawater by solid sampling atomic absorption spectrometry after preconcentration by coprecipitation with a nickel-pyrrolidinedithiocarbamate complex.** *Anal Chim Acta* 2004, **508**:99.
129. P. Niedzielski, M. Siepak, J. Siepak, Przybyłek J: **Determination of different forms of arsenic, antimony and selenium in water samples using hydride generation.** *Pol J Chem* 2002, **11**:219.
130. M.K. Sengupta, P.K. Dasgupta: **HG AS an automated hydride generation interface to ICPMS for measuring total arsenic in environmental samples.** *Anal Chem* 2009, **81**:9737-9743.
131. Martínez-Villegas N, Briones-Gallardo R, Ramos-Leal J, Avalos-Borja M, Castañón-Sandoval A, Razo-Flores E, Villalobos M: **Arsenic mobility controlled by solid calcium arsenates: A case study in Mexico**

- showcasing a potentially widespread environmental problem. *Environ Pollut* 2013, **176**:114-122.
132. INEGI: **Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos**. 2009.
 133. P. Quevauviller, G. Rauret, A. Ure, R. Rubio, J.F. López-Sánchez, H. Fiedler, Muntau. H: **Preparation of candidate Certified Reference Materials for the quality control of EDTA and acetic acid-extractable trace metal determinations in sewage sludge-amended soil and terra rossa soil**, *Mikrochim. Acta* 1995, **120** 289-300.
 134. **Capacidad de extracción de cationes mediante acetato de amonio, acetato de sodio y cloruro de amonio consultado el 22 de junio del 2015, disponible en:** [\[http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33917977010\]](http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33917977010)
 135. Lopez-Martinez LX, Parkin KL, Garcia HS: **Phase II-inducing, polyphenols content and antioxidant capacity of corn (*Zea mays* L.) from phenotypes of white, blue, red and purple colors processed into masa and tortillas**. *Plant Foods for Human Nutrition* 2011, **66**(1):41-47.
 136. Jovani M, Barbera R, Farre R, Martín de Aguilera E: **Calcium, iron, and zinc uptake from digests of infant formulas by Caco-2 cells**. *J Agric Food Chem* 2001, **49**:3480-3485.
 137. **FAO, Food and Agriculture Organization of United Nations; consultado 23 de marzo de 2012; disponible en:** [\[www.fao.org/home/en/\]](http://www.fao.org/home/en/)
 138. Wang S, Mulligan CN: **Effect of natural organic matter on arsenic release from soils and sediments into groundwater**. *Environ Geochem Health* 2006, **28**(3):197-214.
 139. Pongratz R: **Arsenic speciation in environmental samples of contaminated soil**. *Sci Total Environ* 1998 **224**:1-3.
 140. Redman A, Macalady D, Ahmann D: **Natural organic matter affects arsenic speciation and sorption onto hematite**. *Environ Sci Technol* 2002, **36**:2889-2896.
 141. Fellet G, Marchiol L, Perosab D, Zerbina G: **The application of phytoremediation technology in a soil contaminated by pyrite cinders**. *Ecol Eng* 2007, **31**:207-214.
 142. Chatterjee A: **Behaviour of anionic arsenic compounds in microwave system with nitric acid and hydrogen peroxide preliminary laboratory study**. *The Science of the Total Environment* 1999, **228**:25-34.
 143. Currie LA: **Detection and quantification limits: origins and historical overview**. *Anal Chim Acta* 1999, **391**:127-134.
 144. Fedotov PS: **Rotating coiled columns in the speciation analysis of natural samples: dynamic fractionation of element forms in soils, sludges, and bottom sediments**. *J Anal Chem* 2012, **67**:399-413.
 145. Ryu JH, Gao S, Tanji KK: **Speciation and behavior of arsenic in evaporation basins, California, USA**. *Environmental Earth Sciences* 2010, **61**(8):1599-1612.

146. Marin AR, Masscheleyn PH, Patrick WH: **The influence of chemical form and concentration of arsenic on rice growth and tissue arsenic concentration.** *Plant Soil* 1992, **139**:175-183.
147. Lomax C, Liu W-J, Wu L, Xue K, Xiong J, Zhou J, McGrath SP, Meharg AA, Miller AJ, Zhao F-J: **Methylated arsenic species in plants originate from soil microorganisms.** *New Phytologist* 2012, **193**(3):665-672.
148. Yu Y, Zhang S, Huang H, Luo L, Wen B: **Arsenic Accumulation and Speciation in Maize as Affected by Inoculation with Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus mosseae*.** *J Agric Food Chem* 2009, **57**(9):3695-3701.
149. CANAIVE: **CANAIVE, Cámara Nacional de la industria del vestido, consultado: 18 de junio de 2015, disponible en:** In.

APÉNDICES

APÉNDICE A

CARACTERIZACIÓN IN SITU DEL AGUA DE RIEGO

La Figura A.1 muestra la posición de los electrodos de Multi Meter Hach HQ40d para la determinación de los parámetros evaluados durante la caracterización del agua de riego como pH, conductividad, temperatura, oxígeno disuelto y cloruro, los cuales fueron completamente sumergidos a una distancia >30 cm de las paredes del contenedor. Las lecturas de los parámetros en las 3 zonas de muestreo fueron registradas de 9:00 am- 11:00 am.



Figura A.1. Imágenes de la caracterización *in situ* del agua de riego del municipio de Matehuala, San Luis Potosí, zona B.

APÉNDICE B

METODOLOGÍAS PARA CARACTERIZACIÓN DE SUELO AGRÍCOLA

a) Determinación de nitrógeno por método Kjeldahl

El método desarrollado por Kjeldahl consta de tres etapas:

Digestión: conversión del Nitrógeno en ion amonio mediante calentamiento (a una temperatura de 400°C aproximadamente) en bloque de digestión con adición previa de ácido sulfúrico y catalizador (CuSO_4), que desencadenan la conversión del nitrógeno de la muestra en amonio.

Destilación: Una disolución NaOH es adicionada a la disolución de NH_4^+ lo cual produce volatilización de NH_3 . El NH_3 es recuperado en un ácido fuerte en exceso y de concentración conocida.

Valoración: el amoníaco disuelto es cuantificado mediante una titulación por retroceso (la cuantificación del ácido no neutralizado por el NH_2).

b) Determinación de arena limo y arcilla por método del hidrómetro

La técnica hidrómetro se basa en el principio de que la densidad de la suspensión de suelo cambia en función de la cantidad de suelo que se encuentra en suspensión en ese momento en tiempo. La técnica se basa en la suposición de que al final de los 40 segundos, toda la arena se ha sedimentado, pero el limo y la arcilla todavía están suspendidos, y del mismo modo el sedimento después de 2 horas.

Una lectura del hidrómetro (Figura A.2) se toma en una suspensión de suelo 40 segundos y otra 2 horas después de que el suelo ha sido suspendido.



Figura A.2. Hidrómetro utilizado en la determinación de las fracciones de arena, limo y arcilla en suelo agrícola.

APÉNDICE C

RANGO LINEAL DE TRABAJO DE LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS EMPLEADAS EN LA CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA AGUA-SUELO-PLANTA DE MAÍZ

La Tabla A.I presenta el intervalo lineal de concentración de cada metodología utilizada para la determinación de los parámetros de interés en este estudio.

TABLA A.I

RANGO DE TRABAJO DE LAS METODOLOGÍAS PARA LA DETERMINACIÓN DE ANALITOS

Determinación	Técnica	Longitud de onda (nm)	Rango lineal de trabajo (mg L ⁻¹)
As total	HG-AFS	217.6	0.0002-0.8
As(V)	IC-HPLC-AFS	217.6	0.01-0.8
As(III)	IC-HPLC-AFS	217.6	0.01-0.8
DMA(V)	IC-HPLC-AFS	217.6	0.05-0.8
MMA(V)	IC-HPLC-AFS	217.6	0.05-0.8
Hierro	AAS	239.5	0.5-15
Manganeso	AAS	259.3	1-15
Fosfatos	Espectrofotométrico	690	0.2-5
Cloruros	Electrodo ión-selectivo		0.5-20
Potasio	ICP- AES	766.4	5-200
Magnesio	ICP- AES	285.2	0.5-20
Calcio	ICP- AES	317.9	5-100
Sodio	ICP- AES	589.5	5-200
Cobre	ICP- AES	324.7	5-200
Hierro	ICP- AES	239.5	10-1000
Manganeso	ICP- AES	259.3	5-200
Níquel	ICP- AES	341.4	10-200
Zinc	ICP- AES	206.2	5-1000

APÉNDICE D

SECCIONES DE LA PLANTA DE MAÍZ

La Figura A.3 muestra el seccionamiento del cultivo de maíz el cual se realizó inmediatamente después del muestreo. Tres plantas por cada punto de muestreo fueron seccionadas en raíz, tallo, hoja y grano.; el raquis y la espiga no fueron considerados en el estudio.



Figura A.3. Imagen de una planta de maíz seccionada procedente de la Matehuala, San Luis Potosí (zona A).

APÉNDICE E

CARACTERÍSTICAS DE COLUMNA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO HAMILTON PRP-X100

Las dimensiones y parámetros de la columna de intercambio aniónico utilizada para la separación de las especies de As se presentan en la Tabla A.II.

TABLA A.II

DIMENSIONES Y PARÁMETROS DE LA COLUMNA HAMILTON PRP-X100

Parámetro	Valor
Ancho de columna	4.1 mm
Longitud de columna	250 mm
Material empacado	PRP-X100
Tamaño de partícula	10 μm
Fuerza del Buffer	0.0-0.5 eq L ⁻¹
Capacidad de intercambio	0.19 meq mg ⁻¹
Capacidad de intercambio por columna	0.304 meq/columna
Presión máxima	5.000 psi
Límites de fase móvil	pH 1-13. 0-100% agua, modificador orgánico
Tipo de material empacado	PSDVB/Trimetilamonio
Tamaño de poro	100 Å
Restauración	50 mL de metanol con 1% v v ⁻¹ de HNO ₃ 6 mol L ⁻¹
Temperatura límite	pH 1-7.9 5-60°C pH 8-13 5-30°C

APÉNDICE F

EFECTO DEL pH EN LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE As(III), DMA, MMA Y As(V) POR IC-HG-AFS

La separación de As(V), As(III), DMA y MMA fue realizada por cromatografía de intercambio aniónico. La Figura A.4 presenta el efecto del pH buffer de fosfatos 5 mmol L⁻¹ sobre la resolución de los picos cromatográficos correspondientes a las cuatro especies de As evaluadas. El tiempo de retención de las especies de As depende entre otros factores del estado iónico, de la fuerza iónica del buffer y de la competencia del analito con otros aniones, por los que bajos y altos valores de pH podrían desfavorecer la resolución cromatográfica. Los bajos valores de pH bajo pueden dar lugar a la formación de las especies ácidas de As. Por otro lado, un pH alto en el medio proporciona iones hidroxilo que pueden competir por los sitios de adsorción de carga positiva en la columna.

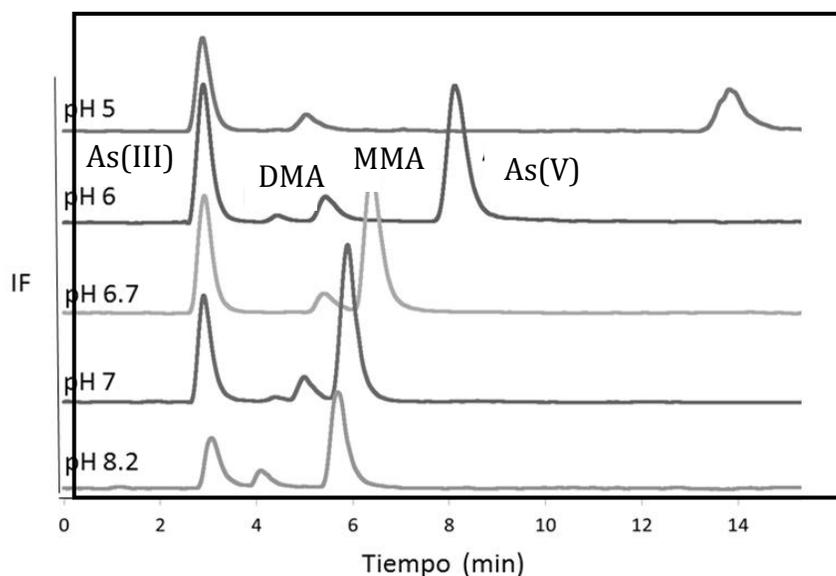


Figura A.4. Efecto del pH sobre la resolución cromatográfica, fase móvil buffer de fosfatos 5 mmol L⁻¹.

APÉNDICE G

SEÑALES ANALÍTICAS DE As(III), DMA, MMA Y As(V) EN ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN

La Figura A.5 muestra la intensidad y resolución los picos cromatográficos de las señales de As(III), DMA, MMA y As(V) obtenidas por cromatografía iónica. de los estudios de recuperación. La adición de DMA en los estudios de recuperación fue equivalente 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ de extracto. El alto contenido de As inorgánico en raíz del cultivo de maíz no interfirió con la determinación de las especies orgánicas adicionadas en los estudios de recuperación.

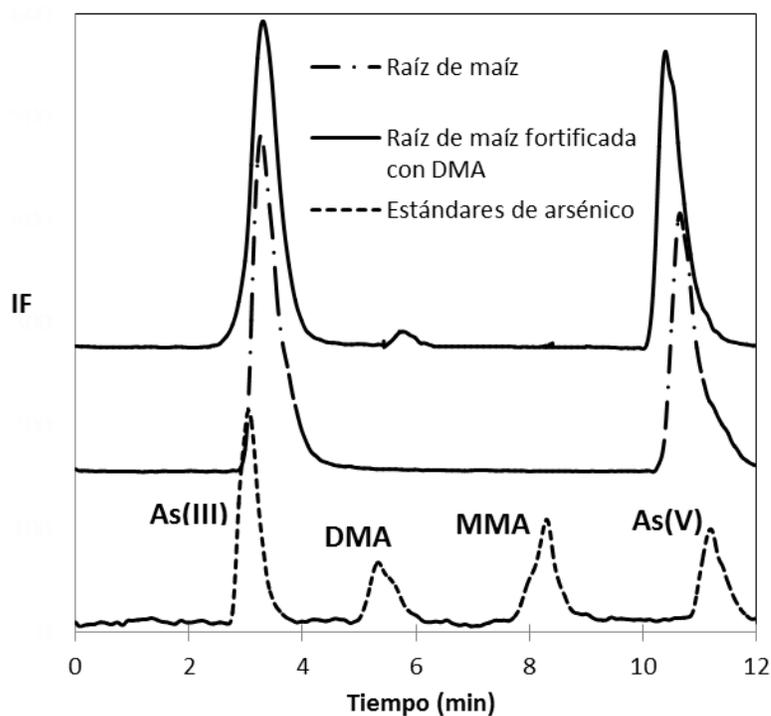


Figura A.5. Cromatograma de las especies de As en la raíz del cultivo de maíz por IC-HG-AFS.

APÉNDICE H

ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO MULTIJERINGA (MSFIA)

Los sistemas MSFIA (1999, grupo de Química Analítica, Automatización y Medio Ambiente de Departamento de Química de la Universidad de Islas Baleares) se basan en el empleo de buretas multijeringa que permiten el movimiento simultáneo de cuatro jeringas análogas a las usadas en la técnica SIA- que están conectadas en bloque al mismo motor paso a paso. Este tipo de buretas reúnen las ventajas de la operación multicanal, propia de las bombas peristálticas así como el envío de volúmenes exactos y constantes, característico de las bombas de pistón. En la Figura A.6 se muestra la fotografía de una bureta multijeringa. Con el MSFIA, se evitan los inconvenientes derivados del uso de bombas peristálticas, cuyos tubos flexibles tienen una vida corta como consecuencia, entre otras cosas, de su vulnerabilidad a ácidos y bases moderadamente concentrados y a disolventes orgánicos. Por otra parte, la utilización de válvulas solenoides de conmutación de tres vías colocadas en el extremo superior de cada jeringa aporta una gran versatilidad al sistema ya que éstas permiten conectar muy rápidamente la jeringa con el sistema o con el recipiente que contiene el reactivo, según convenga al analista sin tener que detener el movimiento de la bureta. Hasta el momento, las técnicas de detección más empleadas en los sistemas MSFIA han sido la espectrofotometría UV-Vis, la quimiluminiscencia, la fluorescencia atómica con

generación de hidruros (HG-AFS), la potenciometría y la fluorimetría. En este proyecto el sistema MSFIA fue acoplado a HG-AFS (Figura A.7).



Figura A.6. Fotografía del módulo multigeringa.



Figura A.7. Fotografía del sistema de extracción secuencial automatizado para la determinación de As en suelo agrícola.

APÉNDICE I

AUTOANALYSIS V 5.0

El software AutoAnalysis 5.0 permite la programación de instrucciones de los diferentes dispositivos del sistema desarrollado acoplados mediante una computadora y el análisis de los datos obtenidos. Este software fue desarrollado por el Grupo de Química Analítica Automatización y Medio Ambiente de la Universidad de las Islas Baleares y actualmente lo comercializa Sciware Systems, una empresa Spin Off de la Universidad de las Islas Baleares. Se programó en Delphi 5.0 y Visual C++ 6.0 y está basado en el uso de librerías de enlace dinámico (DLL, *dynamic link libraries*) a 32 bits. La Figura A.8 muestra las señales de diferentes estándares de As mediante el sistema MSFIA-HG-AFS, los cuales fueron obtenidos y analizados mediante AutoAnalysis. La interface del software empleado se muestra en la Figura A.9.

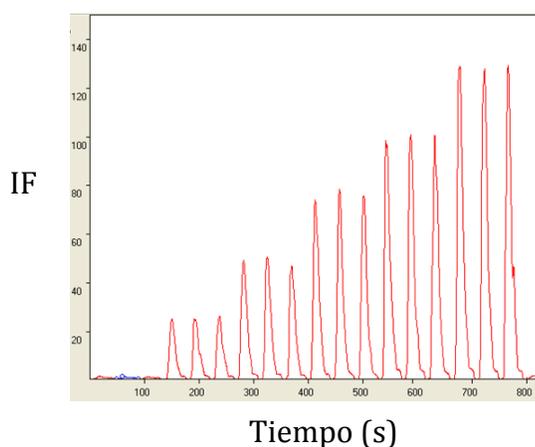


Figura A.8. MSFIA-grama obtenido con el programa AutoAnalysis aplicando a estándares de F1 (ácido acético 0.11 mmol L^{-1}). Se representan tres réplicas de inyección para un blanco y estándares de arsénico de 20, 40, 60, 80 y $100 \mu\text{g L}^{-1}$.

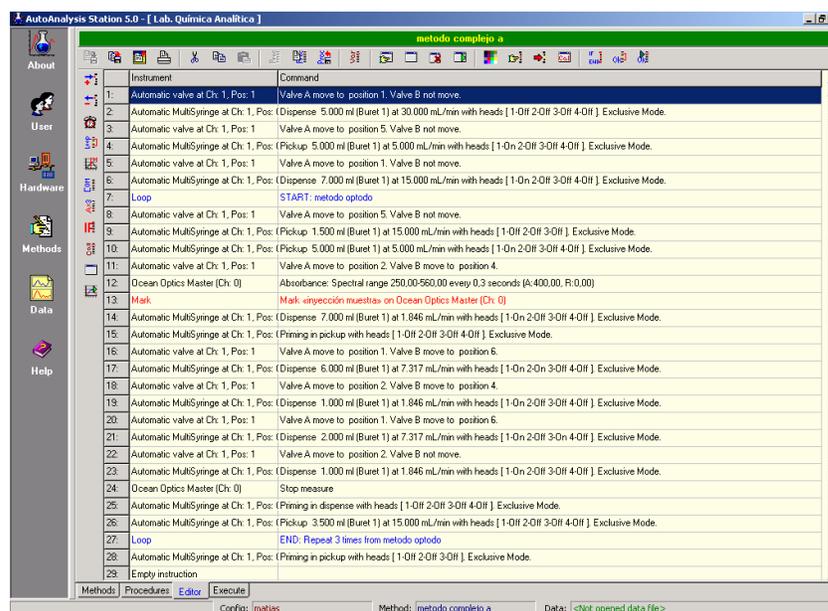
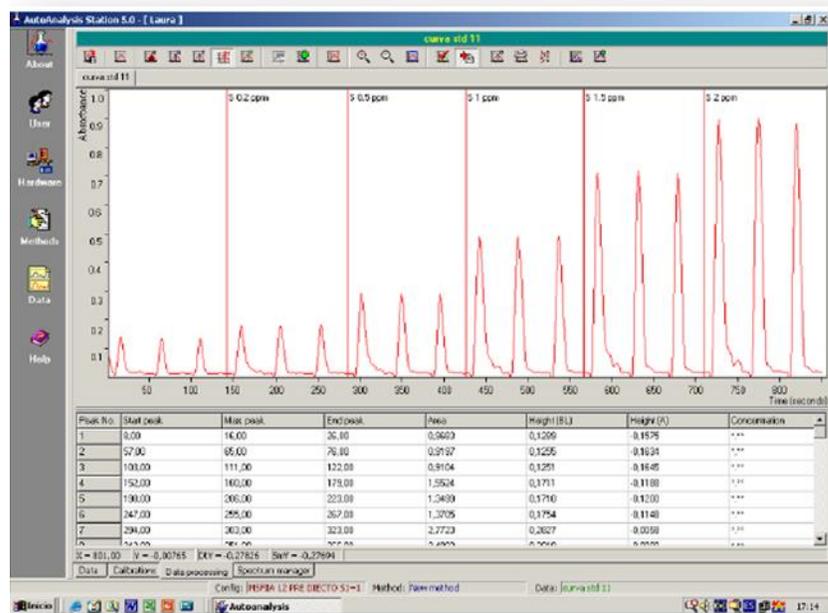


Figura A.9. Interface del programa AutoAnalysis utilizado en programación de las etapas del fraccionamiento de suelo por el sistema MSFIA-HG-AFS.

APÉNDICE J

DISEÑO DOEHLERT

La Figura A.10 muestra la representación esquemática del diseño Doehlert de dos factores utilizado en la optimización de la determinación de As por HG-AFS y de la preconcentración en extracción en punto nube. Un primer factor es analizado a 3 niveles y el segundo (regularmente el factor más significativo) a 5 niveles.

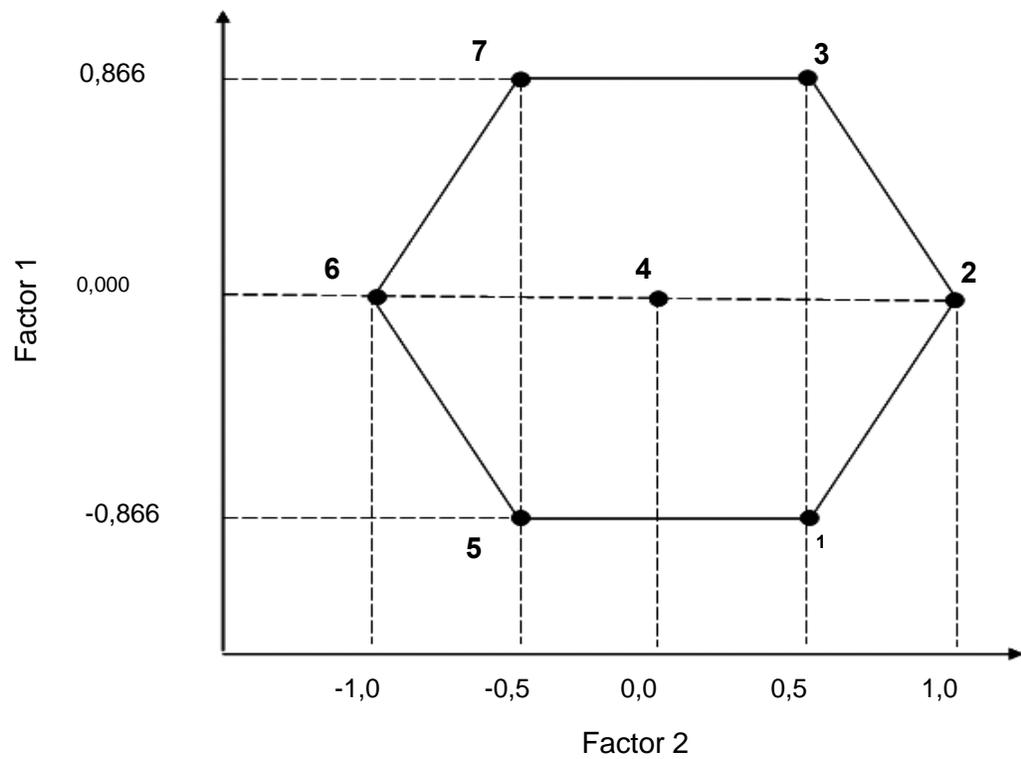


Figura A.10. Representación esquemática del diseño Doehlert.

APÉNDICE K

SISTEMA DE CLASIFICACIÓN DE TEXTURAS

La Figura A.11 muestra el triángulo de clasificación de texturas utilizado para la clasificación de la textura del suelo de las zonas A, B y C. De acuerdo al análisis textural del suelo, las muestras de suelo evaluadas de las zonas A, B y C fueron clasificadas como arcillosa, arcillosa limosa y franco arcillosa limosa, respectivamente.

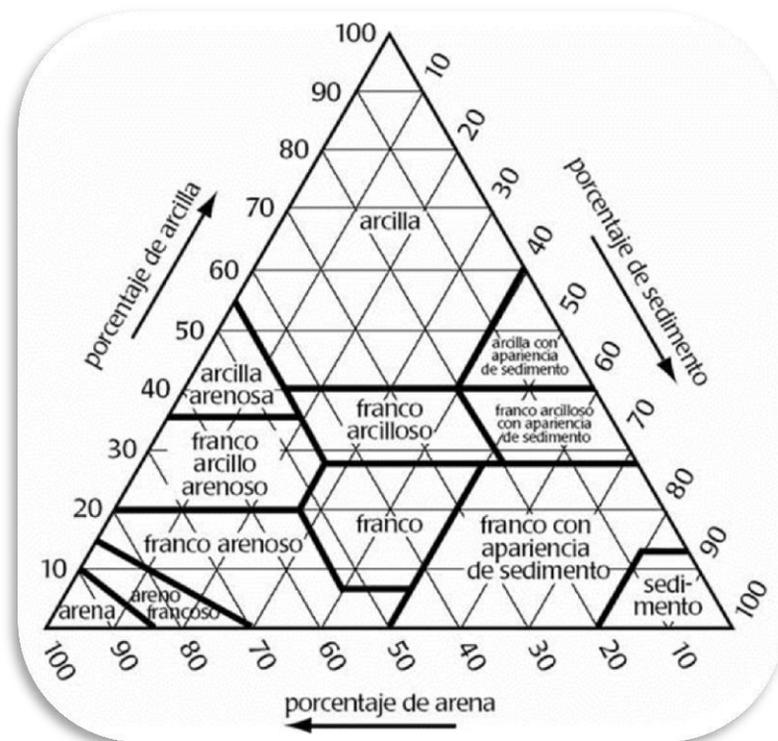


Figura A.11. Sistema de clasificación de texturas propuesto por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura (FAO).

APÉNDICE L

ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DE PARÁMETROS EN SUELO AGRÍCOLA

Información adicional del análisis de componentes principales utilizando el método CORRELACIÓN y rotación VARIMAX es presentada en las Tablas A.III y A.IV y la Figura A.12.

TABLA A.III

MATRIZ DE CORRELACIÓN DE ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

	FAB	pH	Cl	Cond.	Fe	Mn	COT	P
pH	-0.687							
Cl ⁻	0.030	-0.254						
Cond.	0.040	-0.572	0.530					
Fe	-0.769	0.839	-0.382	-0.534				
Mn	-0.590	0.772	-0.463	-0.661	0.956			
COT	0.523	-0.069	-0.394	-0.462	0.028	0.268		
P	0.819	-0.662	-0.119	-0.020	-0.627	-0.460	0.426	
As _{TS}	-0.483	-0.086	0.326	0.702	0.001	-0.210	-0.805	-0.398

Cond., conductividad; FAB, factor de biacumulación; As_{TS}, arsénico total en suelo

TABLA A.IV
 VARIANZA TOTAL EXPLICADA DE ANÁLISIS DE COMPONENTES
 PRINCIPALES

	Autovalores iniciales			Suma de las saturaciones al cuadrado de la extracción			Suma de las saturaciones al cuadrado de la rotación		
	Total	Varianza (%)	A (%)	Total	Varianza (%)	A (%)	Total	Varianza (%)	A (%)
1	4.23	47.026	47.026	4.232	47.026	47.026	4.16	46.246	46.246
2	3.11	34.629	81.655	3.117	34.629	81.655	3.18	35.409	81.655
3	0.70	7.847	89.502						
4	0.43	4.776	94.279						
5	0.26	2.978	97.257						
6	0.12	1.330	98.587						
7	0.09	1.062	99.650						
8	0.02	0.240	99.889						
9	0.01	0.111	100.000						

A, varianza acumulada

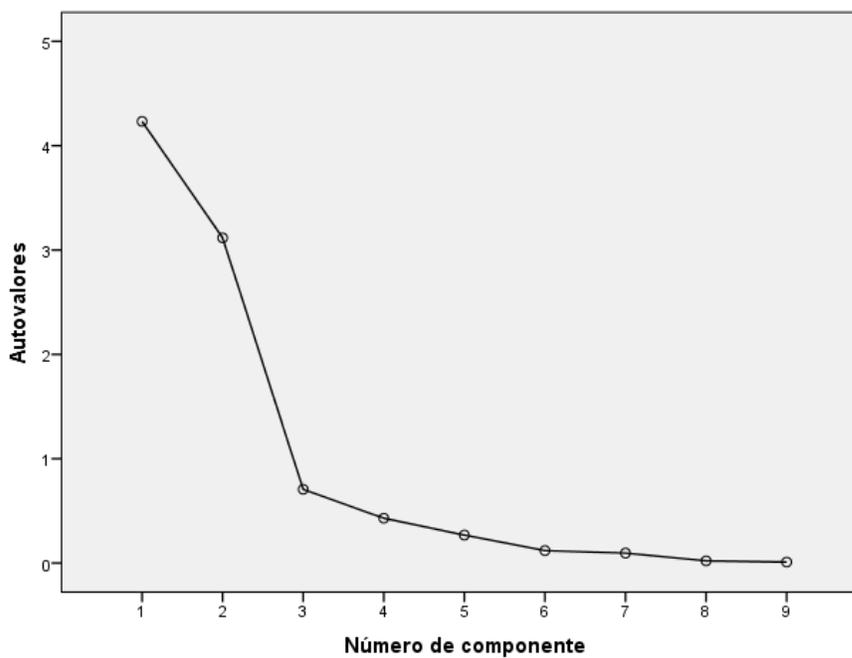


Figura A.12. Gráfico de sedimentación.

APÉNDICE M

ANÁLISIS DE CONGLOMERADOS (CLUSTER) DE MUESTRAS DE SUELO

AGRÍCOLA

Información adicional del análisis de conglomerados utilizando el método WARD y SEUCLID es presentada en la Tabla A.V.

TABLA A.V

HISTORIAL DE CONGLOMERACIÓN

Etapa	Conglomerado que se combina		Coeficientes	Etapa en la que el conglomerado aparece por primera vez		Próxima etapa
	C 1	C 2		C 1	C 2	
1	1	2	772	0	0	2
2	1	4	2624	1	0	4
3	14	15	12076	0	0	7
4	1	6	22377	2	0	11
5	7	10	38093	0	0	12
6	8	11	58063	0	0	12
7	14	18	84334	3	0	13
8	16	17	130813	0	0	9
9	13	16	243564	0	8	13
10	9	12	506376	0	0	14
11	1	3	821409	4	0	15
12	7	8	1195714	5	6	14
13	13	14	1811081	9	7	17
14	7	9	3271493	12	10	16
15	1	5	5614143	11	0	16
16	1	7	16425614	15	14	17
17	1	13	56262053	16	13	0

C, conglomerado

APÉNDICE N

OPTIMIZACIÓN DE LA GENERACIÓN HIDRUROS EN EL SISTEMA MSFIA-HG-AFS PARA EL FRACCIONAMIENTO DE ARSÉNICO EN SUELO AGRÍCOLA

Información adicional relacionada con el *screening* de parámetros y la optimización de la señal analítica de As en el sistema automatizado para la extracción secuencial del metaloide en suelo es presentada en las Figuras A.13-A15 y las Tabla A.VI y A.VII.

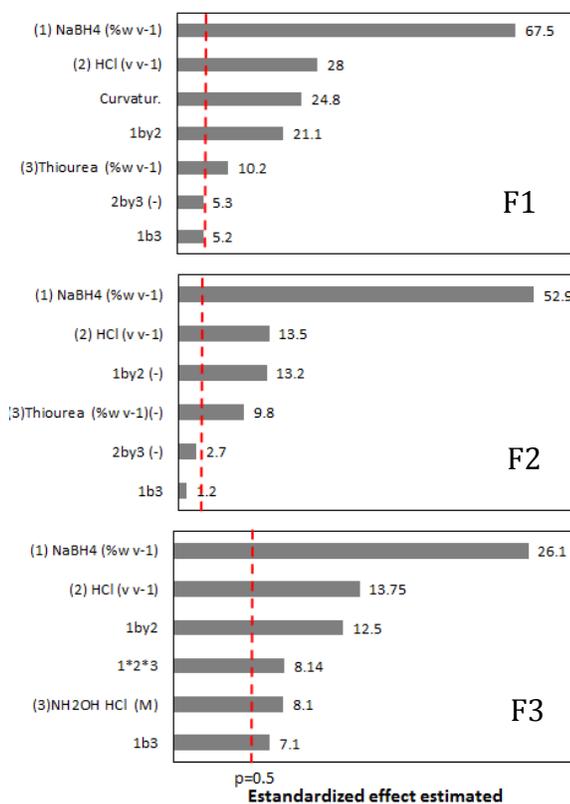


Figura A.13. Diagramas de Pareto del efecto de la concentración de NaBH₄, HCl y agente reductor (tiourea-ácido ascórbico o cloruro de hidroxilamina) sobre la señal analítica de arsénico en fracción BCR (F1, F2 y F3).

TABLA A.VI

ANOVA DEL DISEÑO 2^k+3C PARA LAS FRACCIONES BCR

	SS	df	MS	F	p
F1: $R^2 = 0.99682$, Ajuste: 0.9894, Error puro = 3190.7					
Curvatura	1975948	1	1975948	619.283	0.001611
NaBH ₄	14566503	1	14566503	4565.295	0.000219
HCl	2500966	1	2500966	783.829	0.001273
Tiourea	330078	1	330078	103.450	0.009529
1 por 2	1417086	1	1417086	444.130	0.002244
1 por 3	86597	1	86597	27.141	0.034926
2 por 3	90525	1	90525	28.372	0.033486
Error de ajuste	60494	1	60494	18.959	0.048907
Error puro	6381	2	3191		
Total SS	21034580	10			
F2: $R^2 = 0.90601$, Ajuste: 0.7650, Error puro = 176.7					
NaBH ₄	495344.2	1	495344.2	2803.248	0.000357
HCl	32088.9	1	32088.9	181.597	0.005462
Tiourea	16866.7	1	16866.7	95.452	0.010315
1 por 2	31083.6	1	31083.6	175.908	0.005637
1 por 3	234.7	1	234.7	1.328	0.368257
2 por 3	1300.5	1	1300.5	7.360	0.113253
Error de ajuste	59494.5	2	29747.3	168.345	0.005905
Error puro	353.4	2	176.7		
Total SS	636766.5	10			
F3: $R^2 = 0.88202$, Ajuste: 0.6067, Error puro = 12798.7					
NaBH ₄	2422934	1	2422934	189.3098	0.005241
HCl	8751533	1	8751533	683.7788	0.001459
Tiourea	833771	1	833771	65.1446	0.015006
1 por 2	2005337	1	2005337	156.6819	0.006322
1 por 3	654749	1	654749	51.1572	0.018992
2 por 3	401408	1	401408	31.3630	0.030437
1*2*3	848904	1	848904	66.3270	0.014744
Error de ajuste	2103623	1	2103623	164.3612	0.006029
Error puro	25598	2	12799		
Total SS	18047857	10			

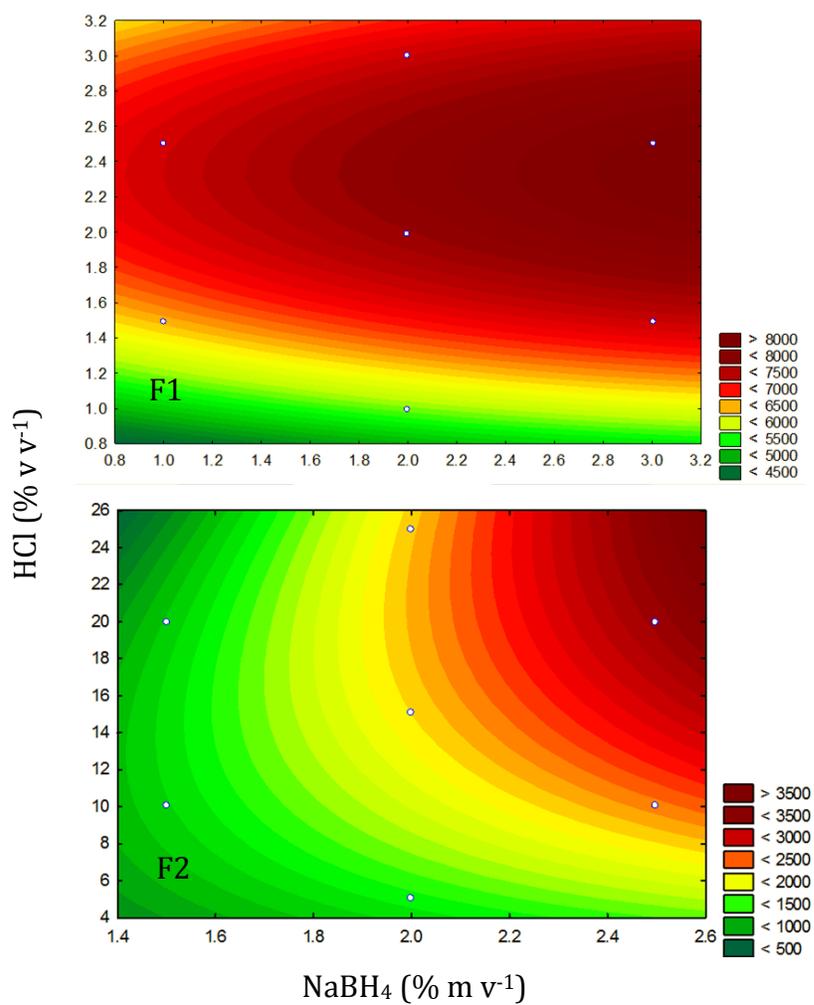


Figura A.14. Gráfico de superficie de respuesta de la señal analítica de arsénico en F1 y F2.

TABLA A.VII

ANOVA DE LA SEÑAL ANALITICA DE ARSÉNICO UTILIZANDO EL
DISEÑO DOEHLERT

	SS	df	MS	F	p
F1: R ² = 0.9526, Ajuste: 0. 9052, Error puro = 9373					
HCl (L)	735878	1	735878	78.5054	0.012500
HCl (Q)	21619	1	21619	2.3063	0.268174
NaBH ₄ (L)	1984262	1	1984262	211.6864	0.004691
NaBH ₄ (Q)	1751439	1	1751439	186.8482	0.005309
Error de ajuste	204268	2	102134	10.8959	0.084062
Error puro	18747	2	9374		
Total SS	4709013	8			
F2: R ² = 0.9901, Ajuste: 0. 9737, Error puro = 17705					
NaBH ₄ (L)	2708493	1	2708493	152.9761	0.006474
NaBH ₄ (Q)	3763	1	3763	0.2125	0.690058
HCl (L)	505326	1	505326	28.5409	0.033297
HCl (Q)	137228	1	137228	7.7507	0.108436
1L por 2L	229202	1	229202	12.9453	0.069313
Error de ajuste	187	1	187	0.0106	0.927513
Error puro	35411	2	17705		
Total SS	3616015	8			

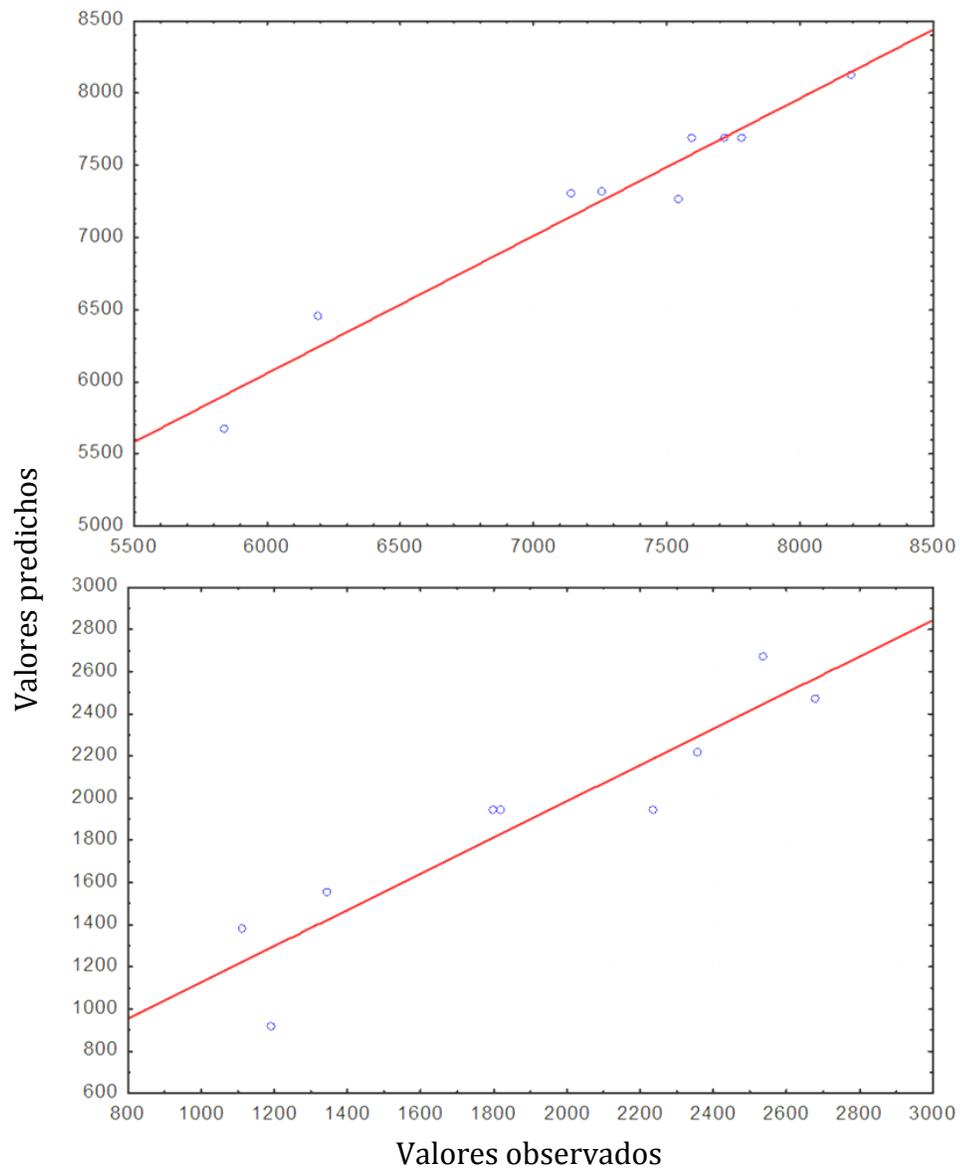


Figura A.15. Valores observados vs valores calculados a partir del modelo de la optimización de la señal analítica de arsénico en F1 (Error puro: 9373) y F2 (Error puro: 61205).

APÉNDICE O

INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA DE ARSÉNICO EN DIFERENTES AGENTES EXTRACTANTES

El empleo de los diferentes agentes seleccionados presenta un efecto negativo sobre la señal analítica de As comparado con la lectura en medio acuoso. La Figura A.16 y la Tabla A.VIII muestran que las pendientes de la señal de arsénico en los agentes extractantes para el grano de maíz fueron: $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1) < TFA 0.05 mol L^{-1} < H_3PO_4 1 mol L^{-1} < HNO_3 $2\% \text{ v v}^{-1}$.

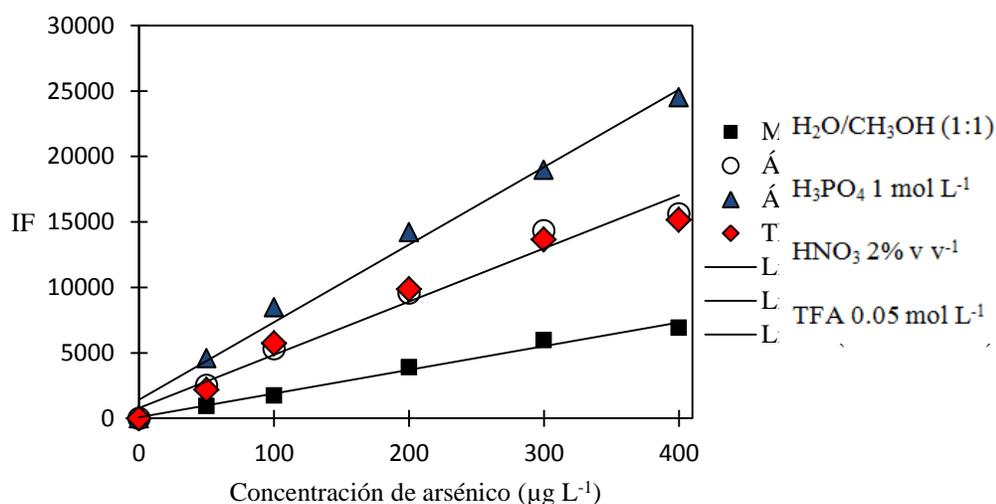


Figura A.16. Curvas de calibración de arsénico en agentes extractante del metaloide en el grano de maíz.

TABLA A.VIII

EFECTO DE LA AGENTE EXTRACTANTE SOBRE LA SEÑAL ANALITICA DE
ARSÉNICO

Agente extractante	Pendiente (L mg ⁻¹)	Intersección	R ²
H ₂ O/CH ₃ OH (1:1)	18.1	72.3	0.9884
H ₃ PO ₄ 1 mol L ⁻¹	40.6	773.6	0.9742
HNO ₃ 2% v v ⁻¹	59.2	1428.2	0.9890
TFA 0.05 mol L ⁻¹	39.2	891.8	0.9665

APÉNDICE P

OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN EN PUNTO NUBE DE ARSÉNICO MEDIANTE DISEÑO FACTORIAL DOEHLERT

La optimización del sistema de CPE aplicado en las disoluciones gástricas intestinales artificiales de arroz y maíz fue realizada mediante el diseño factorial Doehlert: valores predichos vs observados, superficie de respuesta, y tablas ANOVA son mostrados en las Figuras A.17 y A.18, y la Tabla A.IX. Los factores optimizados fueron la concentración de Tritón X-114 y DDTP.

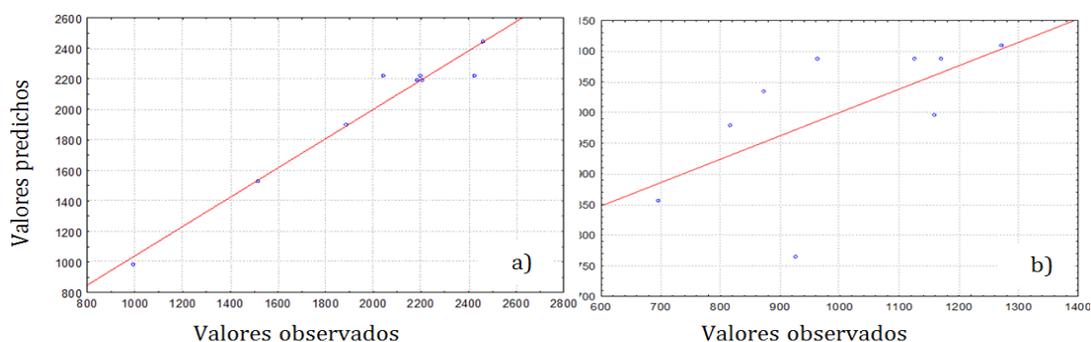


Figura A.17. Valores predichos a partir de los modelos de interacción de 2 vías de la extracción en punto nube para arroz (a) y de 3 vías para maíz (b).

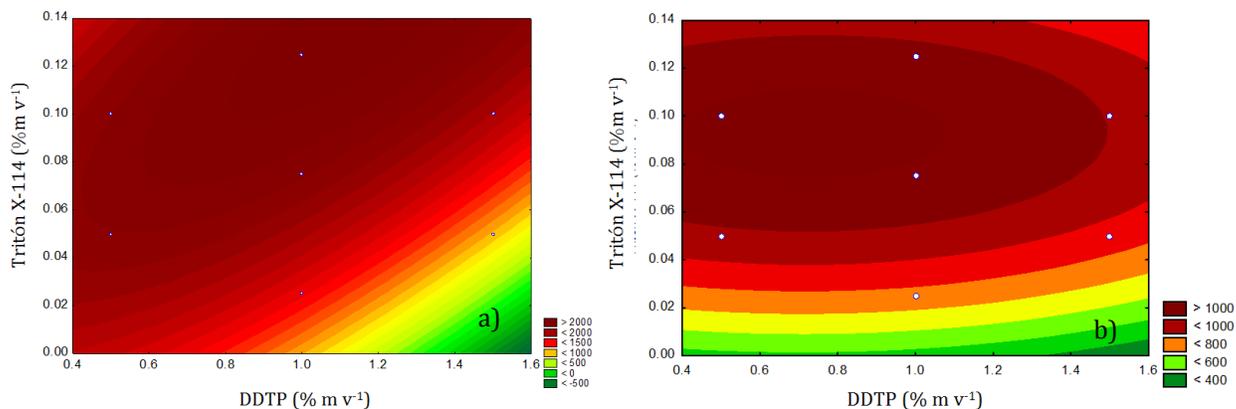


Figura A.18. Superficie de respuesta para la optimización de la extracción en punto nube para arroz (a) y de 3 vías para maíz (b).

TABLA A.IX

TABLA DE ANOVA DE LA OPTIMIZACIÓN DE ARROZ Y MAÍZ

	SS	df	MS	F	p
Arroz					
(1)DDTP (% m v ⁻¹)(L)	570025	1	570025.0	15.7	0.0581
DDTP (% m v ⁻¹)(Q)	254657	1	254656.5	7.0	0.1178
(2)Tritón X-114 (% m v ⁻¹)(L)	630208	1	630208.3	17.3	0.0530
Tritón X-114 (% m v ⁻¹)(Q)	64589	1	64588.8	1.7	0.3138
1L por 2L	208849	1	208849.0	5.7	0.1385
Curvatura	817	1	816.7	0.0	0.8945
Error puro	72614	2	36307.0		
Total SS	1761623	8			
Maíz					
(1)DDTP (% m v ⁻¹)(L)	13806.2	1	13806.2	1.1	0.3953
DDTP (% m v ⁻¹)(Q)	6365.6	1	6365.6	0.5	0.5417
(2)Tritón X-114 (% m v ⁻¹)(L)	54540.1	1	54540.1	4.5	0.1664
Tritón X-114 (% m v ⁻¹)(Q)	42037.6	1	42037.6	3.5	0.2018
1L por 2L	12.3	1	12.3	0.0	0.9773
Curvatura	158112.7	1	158112.7	13.2	0.0680
Error puro	23952.7	2	11976.3		
Total SS	294028.0	8			

L, lineal; Q, cuadrático

APÉNDICE Q

CARACTERIZACIÓN PROXIMAL DE MAÍZ Y ARROZ

La Tabla A.X muestra el análisis proximal reportado para arroz y maíz. El maíz presentó un contenido mayor de grasa, proteína y fibra que el arroz, lo cual puede afectar la sensibilidad del As en CPE en ambos cereales.

TABLA A.X

ANÁLISIS PROXIMAL PARA MAÍZ Y ARROZ

	Maíz ^a	Arroz
Agua (g)	10.4	12.9
Energía (kcal)	365	360
Proteína (g)	9.42	6.61
Grasa (g)	4.74	0.58
Ceniza (g)	1.2	0.58
Carbohidratos (g)	74.3	79.3
Fibra (g)	7.3	ND
Azúcar (g)	0.64	ND

[29]; ND, no disponible; ^a, maíz amarillo

APÉNDICE R

EFFECTO DE LA EXTRACCIÓN EN PUNTO NUBE SOBRE LA SEÑAL ANALÍTICA DE ARSÉNICO

El efecto de la empleo de CPE como método de preconcentración sobre la señal analítica de arsénico puede ser observado en la Figura A.19. Los factores de preconcentración calculados a partir de CPE a concentraciones de As en el digerido de 1-5 $\mu\text{g As L}^{-1}$ de disoluciones gastrointestinales artificiales son presentados en la Tabla A.XI.

TABLA A.XI

FACTORES DE PRECONCENTRACIÓN DE ARSÉNICO (1-5 $\mu\text{g As L}^{-1}$)

Concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Arroz	Maíz	Agua
	Factor de preconcentración		
1.0	17.5	13.3	10.5
2.0	14.3	9.4	17.1
3.0	12.7	10.1	15.8
4.0	18.1	11.3	16.1
5.0	16.0	11.7	14.8

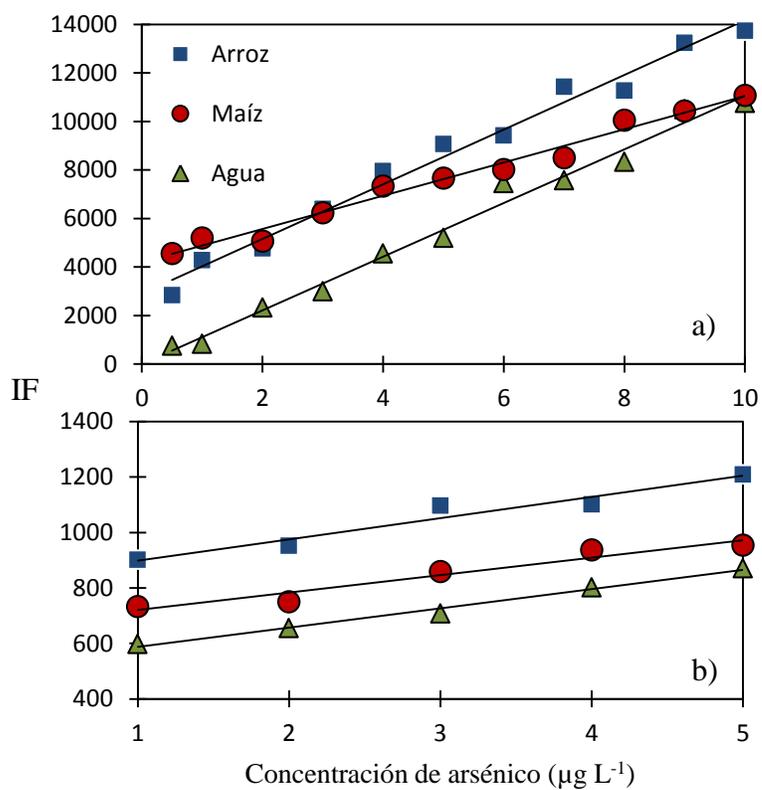


Figura A.19. Efecto de la matriz sobre la señal analítica de arsénico con (a) y sin (b) empleo de la extracción en punto nube.

APÉNDICE S

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE MICROELEMENTOS EN MAÍZ Y ARROZ

Las concentraciones de los elementos evaluados en el grano de maíz son presentados en la Tabla A.XII.

TABLA A.XII

DETERMINACIÓN MULTIELEMENTAL EN GRANO DE MAÍZ POR ICP-OES DESPUÉS DE DIGESTIÓN ÁCIDA

Grano de maíz	Na _T	K _T	Mg _T	Ca _T	Cu _T	Fe _T	Mn _T	Ni _T	Zn _T
	(mg kg ⁻¹)								
MTA	0.24±0.03	17.3±0.4	10.0±0.2	1.0±0.0	16.2±0.03	161±2	58.5±0.3	14±3	254±2
MTA*	0.49±0.06	25.7±0.5	12.1±0.1	23.6±0.1	17.6±0.6	215±3	68.2±0.5	8±5	485±4
MTA-1	0.30±0.02	40.3±0.7	12.4±0.4	5.7±0.3	21.4±0.9	216±5	69±1	18±3	266±5
MTA-2	0.45±0.04	30.3±0.4	7.5±0.1	2.1±0.1	13.7±0.6	158±2	58.9±0.6	11±2	157±1
MTA-3	0.39±0.02	25.5±0.3	10.7±0.2	2.4±0.1	18±2	132±5	61±1	14±2	260±7
MTA-4	0.68±0.05	39.8±0.9	9.4±0.3	2.2±0.1	21±1	296±3	76.5±0.7	11±2	250±2
MTA-5	0.62±0.03	67.5±0.5	11.2±0.1	4.8±0.0	37.9±0.6	427±3	142±7	19±5	273±2
MTA-6	0.58±0.03	55.5±0.9	11.5±0.3	3.4±0.1	34±1	308±6	193±3	15±6	359±7

* Maíz nixtamalizado

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

José Martín Rosas Castor

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con orientación en Química Analítica Ambiental, UANL y

Doctor en Ciencias y Tecnología Química, UIB

Tesis: ESTUDIO DE LA ACUMULACIÓN Y ESPECIACIÓN DE ARSÉNICO EN CULTIVOS DE MAÍZ Y SU RIESGO POTENCIAL PARA LA SALUD HUMANA

EDAD: 28 años

Biografía:

Datos Personales: nacido en San Nicolás de los Garza, Nuevo León el 14 de Marzo de 1987, hijo de Martín Rosas Morales y María Enriqueta Castor Agüero.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Farmacéutico Biólogo en 2008, con orientación en alimentos. Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Maestro en Ciencias con Orientación en Procesos Sustentables en 2012.

Experiencia Profesional: Auxiliar de Investigación de Ciasa Sucursal en el departamento de Desarrollo de Nuevos Productos, Grupo Maseca, desde 2007 hasta 2010.