

Validación de un método analítico para la cuantificación de especies de arsénico en cultivo de maíz (*zea mays*)

A.M. Cervantes-Corona, J.M. Rosas-Castor, J.L. Guzmán-Mar, E. Ruiz-Ruiz, A. Hernández-Ramírez, L. Hinojosa-Reyes*

Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Facultad de Ciencias Químicas, Cd. Universitaria, C.P. 64570. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

*E-mail: hinojosalr@gmail.com

Recibido 27 de febrero de 2014, Aceptado 20 de marzo de 2014

Resumen

El Arsénico (As) es un elemento altamente tóxico que representa una amenaza para la salud humana y el medio ambiente. Las principales especies de arsénico en muestras ambientales son: As(V), As(III), MMA(V) y DMA(V). La ingesta de alimentos y agua potable constituyen la fuente principal de exposición de As para el ser humano. En México, el maíz es el alimento básico y representa el componente más importante de la producción agrícola. Sin embargo, son limitados los estudios relacionados con la especiación de As en el cultivo de maíz. El presente estudio se enfoca en la validación e implementación de una metodología de extracción de las especies de As, As(V), As(III), MMA(V) y DMA(V), presentes en tallo, hoja y raíz de la planta de maíz (*Zea mays*), usando ácido nítrico 0.15 N como agente extractante a 80°C durante 2 h. La determinación de As total y especies de As se realizó mediante espectrometría de fluorescencia atómica con sistema de generación de hidruros (HG-AFS) y cromatografía de iones acoplada a Espectroscopia de Fluorescencia Atómica con sistema de Generación de Hidruros (IC-HG-AFS), respectivamente. La validación de la metodología de extracción se realizó mediante estudios de recuperación. La interconversión de especies fue menor al 10% y los porcentajes de extracción de especies de As en la planta de maíz fueron mayores al 80%. Las principales especies de As encontradas en cultivos de maíz de San Luis Potosí, México fueron As(V) y As(III).

Palabras clave: maíz, extracción, especies de arsénico, interconversión, ácido nítrico, IC-HG-AFS.

Abstract

Arsenic (As) is a highly toxic element that represents risk to the environment and human health. The main As species found in environmental samples are As(V), As(III), MMA(V) and DMA(V). The consumption of contaminated food and drinking water constitutes the principal sources of As exposure to human. In Mexico, corn is a staple food and represents the major component of agricultural production. However, a limited number of studies related to As speciation in maize crops. This work focuses on the implementation and validation of an extraction methodology for the determination of arsenic species in stem, leaf and root of corn plant (*Zea mays*) using 0.15 N nitric acid as extractant agent at 80°C during 2 h. Determination of total and As species was carried out by HG-AFS and IC-HG-AFS, respectively. The method for speciation analysis was validated by performing recovery and interconversion evaluations. As species interconversion was less than 10% and the extraction of As from corn plant was higher than 80%. As(V) and As(III) was the predominant As species found in maize crops from San Luis Potosi, Mexico.

Keywords: corn, extraction, arsenic species, interconversion, nitric acid, IC-HG-AFS.

1. Introducción

El Arsénico (As) es un elemento muy abundante en la corteza terrestre. Este metaloide 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) clasifica al As como carcinógeno humano [1]. La exposición crónica a este elemento puede ocasionar efectos neurológicos, cardiovasculares, respiratorios, gastrointestinales y hematopoyéticos [2]. El

As se encuentra en cuatro estados de oxidación: 5+ (arseniato), 3+ (arsenito), 0 (As elemental) y 3- (arsina). La Tabla 1 presenta el nombre y la estructura química de las principales especies de As presentes en muestras de interés ambiental como suelo, agua y plantas.

Los seres humanos pueden estar principalmente expuestos al As a través de la ingesta directa de agua y el consumo de productos agrícolas contaminados [3]. El As presente en suelo agrícola o agua de riego puede ser absorbido por las raíces de los cultivos comestibles y

acumularse en sus tejidos. Dentro de los cultivos comestibles más importantes se encuentran los cereales. 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 cultivo de arroz [4-6]. En la actualidad, existe poca información sobre la cuantificación de las especies de As presentes en otro tipo de cereales, incluyendo el maíz, cereal de mayor producción a nivel mundial (817 millones de toneladas en 2009; FAOSTAT) [7] y alimento básico para millones de personas en América Latina. Basado en lo anterior, 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 en productos agrícolas como el cultivo de maíz. 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 [8]. Diversos estudios han empleado metodologías de extracción para las especies de As en plantas que involucran el uso de reactivos como 0.3 M ácido fosfórico (a Temperatura (T) ambiente durante 10 min), ácido 1% v/v acético (T = 95°C) y agua destilada (T ambiente) [9-11]. En otros estudios de extracción de especies de As han utilizado HNO₃ en concentraciones de 0.15 a 1 M empleando temperaturas entre 75 y 95°C durante aproximadamente 2 h para en muestras de semolina de trigo, y en tallo y grano de arroz, donde fueron obtenidos porcentajes de extracción de As mayores ($\geq 80\%$) y porcentajes de interconversión de especies bajos ($<10\%$) [10,12,13]. Condiciones similares podrían ser implementadas para la determinación de especies de As en la planta de maíz.

Tabla 1. Nombre, fórmula química y constante de disociación de algunas especies de arsénico de importancia ambiental.

Nombre del compuesto	Estructura química	pK _a
Arsenito [As(III)]		9.29
Arseniato [As(V)]		2.24
		6.96
		11.5
Ácido monometilarsínico [MMA(V)]		3.6
		8.2
Ácido dimetilarsínico [DMA(V)]		1.78
		6.14

Después de la etapa de extracción, los estudios de especiación involucran una fase de separación y detección. La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) ha sido la técnica más ampliamente utilizada para la separación de especies de As con el empleo de columnas de intercambio aniónico y buffer de fosfatos de concentración 6.7 a 20 mM (pH: 6.2-8.5) como fase móvil. Por otro lado, diversas técnicas analíticas han sido utilizadas para la detección de As a

niveles traza, incluyendo la espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) y espectrometría de fluorescencia atómica con sistema de generación de hidruros (HG-AFS) [10]. El empleo del HG contribuye a la separación de los analitos de la matriz de la muestra, reduciendo o eliminando interferencias químicas y espectrales potenciales. El ICP-MS, es la técnica analítica más ampliamente utilizada para la especiación de As en este tipo de muestras, debido a que es considerada una técnica de detección versátil y a que presenta límites de detección adecuados para la determinación de metales traza [14]. Por otra parte, la HG-AFS presenta límites de detección comparables (0.6 y 1 µg/L para HG-AFS e ICP-MS, respectivamente) [15,16], además de costos menores de mantenimiento, por lo cual es útil para la determinación de As. Además la alta volatilidad de la especie generada (AsH₃) y la selectividad de la lámpara de As de cátodo hueco reducen las interferencias producidas durante el análisis por HG-AFS en las muestras reales.

El objetivo de este trabajo fue implementar y validar una metodología de extracción de especies de arsénico presentes en tallo, hoja y raíz de la planta de maíz (*Zea mays*) usando ácido nítrico (0.15 N) como agente extractante, mediante estudios de recuperación en muestras de planta de maíz procedentes de un sitio contaminado en el estado de San Luis Potosí.

2. Parte experimental

2.1. Reactivos.

Arseniato de sodio (Na₂HAsO₄•7H₂O, As (V)) y arsenito de sodio (NaAsO₂, As (III)), ácido dimetilarsínico (C₂H₇AsO₂, As(V)) se adquirieron en Sigma-Aldrich; el ácido monometilarsínico (MMA, As(V)) se adquirió en Chem-Service. Las disoluciones stock de diferentes especies de arsénico fueron preparadas a 100 mg/L. Los estándares requeridos de trabajo se prepararon a partir de la disolución stock. El HCl y el HNO₃ fueron grado metal traza de Fisher. Todas las disoluciones se prepararon con agua ultrapura (18 MΩ cm, Millipore Milli-Q system). Todos los demás reactivos fueron grado reactivo.

2.2. Instrumentación.

El contenido de As total fue determinado por Espectroscopia de Fluorescencia Atómica con sistema de Generación de Hidruros (RAYLEIGH AF-640A). El rango de calibración fue de 0.5 a 100 µg/L. El límite de detección fue 5 µg/kg de planta. La determinación de especies se realizó mediante cromatografía de iones acoplada a Espectroscopia de Fluorescencia Atómica con sistema de Generación de Hidruros (IC-HG-AFS). La Tabla 2 muestra las condiciones instrumentales utilizadas. Para la separación cromatográfica se utilizó una elución por gradiente empleando un buffer de fosfatos de 5 mM a 60 mM (pH 6) a un flujo de 1 mL/min. Bajo estas condiciones, la elución completa de las especies de As fue llevada a cabo en 12 min.

2.3. Pre-tratamiento de la planta de maíz.

La planta de maíz fue seccionada en sus partes (raíz, tallo y hoja) y posteriormente secada en estufa a 70°C durante tres días. Previo al proceso de secado la raíz fue lavada con CaCl_2 5 mM para eliminar posibles iones adsorbidos en la superficie. Una vez secas, las partes de la planta de maíz fueron tamizadas a través de una malla de 250 μm .

Tabla 2. Condiciones instrumentales utilizadas en el equipo de HG-AFS e IC-HG-AFS (RAYLEIGH AF-640A).

HG-AFS	
Concentración de KBH_4 :	1% m/v
Solución acarreadora:	HCl 10% (v/v)
Gas acarreador (Ar):	600 mL/min
Gas auxiliar (Ar):	200 mL/min
Tiempo de integración:	16 s
Voltaje del fotomultiplicador:	280V
Corriente de la lámpara:	60 mA
Temperatura del atomizador:	400 °C
Modo de lectura:	área del pico
Longitud de detección	217.6 nm (lámpara de cátodo hueco)
IC-HG-AFS	
Columna	Intercambio aniónico, Hamilton PRP-X100 (250 x 4.6 mm)
Flujo	1 mL/min
Volumen de inyección:	100 μL
Elución por gradiente de concentración:	(1) 0-4 min, 100% buffer de fosfatos 5 mM. (2) 4-4.5 min 0-100% buffer de fosfatos 60 mM (3) 4.5-10.5 min 100% buffer de fosfatos 60 mM. (4) 10.5 - 11 min 0-100% buffer de fosfatos 5 mM (5) 11-12.5 min 100% buffer de fosfatos 5 mM.

2.4. Estudios de recuperación

La metodología seguida para la evaluación de la eficiencia del procedimiento de extracción se describe en el diagrama de la Figura 1. La determinación del porcentaje de extracción se realizó mediante la comparación de As total en el digerido y el extracto, y por otro lado, evaluando mediante los porcentajes de recuperación de cada una de las especies estudiadas se determinó el grado de interconversión de especies.

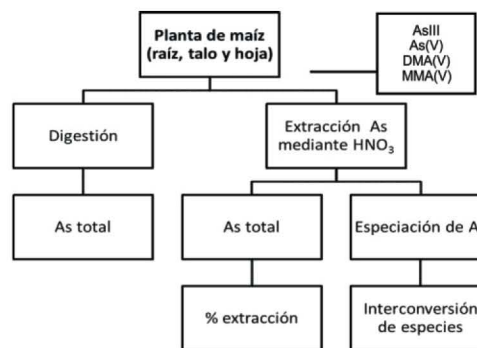


Figura 1. Diagrama de evaluación de metodologías de extracción utilizadas para la determinación de las especies de arsénico.

2.4.1. Determinación de As total.

Las muestras de la planta fueron digeridas de acuerdo al método EPA 3051 [1], previo a la determinación de As total. Una muestra de aproximadamente 0.3 g fue colocada en un recipiente de vidrio y, posteriormente 4.5 mL de HNO_3 15 N y 0.5 mL de HCl 12 N fueron añadidos. Los recipientes fueron cerrados y calentados a 90°C durante 2 h en placas de calentamiento. Después de enfriar, la suspensión fue centrifugada y el líquido sobrenadante fue diluido con agua ultrapura (1:9). Posteriormente, una solución reductora de tiourea-ácido ascórbico fue adicionada (concentración final: 1 y 0.2%, respectivamente) y después de 30 min, el As total fue cuantificado mediante HG-AFS.

2.4.2. Determinación de especies de arsénico (As(III), DMA(V), MMA(V) y As(V)).

Se pesaron 0.3 g de muestra en un recipiente de vidrio y fueron añadidos 2 mL de HNO_3 0.15 N. Posteriormente, los recipientes fueron calentados a 80°C durante 2 h y después de enfriar, el contenido fue centrifugado y el líquido sobrenadante fue filtrado (nylon 45 μm). El extracto obtenido fue diluido con agua ultrapura (1:10) y posteriormente las especies de As fueron determinadas mediante IC-HG-AFS. Previo al proceso de extracción fueron añadidos 20 μL de cada una de las especies de As (As(III), DMA(V), MMA(V) y As(V)); la concentración de cada especie corresponde a 20 mg/L (equivalente 1.33 mg As/kg en tallo y hoja, y 2 mg As/kg para raíz).

2.5. Análisis estadísticos.

Todas las muestras se analizaron por triplicado. Los resultados son expresados como valores promedio con la desviación estándar como medida de dispersión (promedio \pm SD).

3. Resultados y discusión

3.1. Determinación del porcentaje de extracción

Para evaluar la eficiencia de la metodología de extracción, se cuantificó el As total contenido en el extracto y digerido de cada muestra; y posteriormente fue determinado el porcentaje de extracción en cada parte de la planta. Los resultados obtenidos se muestran en la

Tabla 3 y son comparables con lo reportados por Reyes *et al.* [10] en cereales de arroz y semolina de trigo con el empleo de HNO_3 0.1 M (porcentaje de extracción $82 \pm 1\%$).

Tabla 3. Porcentaje de extracción de As en hoja, tallo y raíz de la planta de maíz.

Matriz	As total en muestra digerida (mg/kg)	As total en extracto (mg/kg)	Extracción (%)
Hoja	0.9 ± 0.1	1.1 ± 0.1	113.1 ± 2.1
Tallo	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1	89.3 ± 7.8
Raíz	49.7 ± 1.6	40.5 ± 1.0	81.6 ± 4.6

3.2. Evaluación de la interconversión de especies de As.

La cantidad recuperada de cada especie de As permite evaluar la existencia de interconversión de especies y la eficacia de la metodología de extracción. La Figura 2, muestra el cromatograma del extracto de raíz antes y después de adicionar la especie de DMA. Se observó la aparición de una nueva señal al tiempo de retención del DMA(V), sin alterar la respuesta para las otras dos especies (As(V) y As(III)). Las especies de As presentes en el extracto de cada parte de la planta de maíz se reportan en la Tablas 4.

Tabla 4. Recuperación de especies de As en raíz, tallo y hoja de maíz.

Adición de especies (mg/kg)	Contenido de As (mg/kg)			
	As(III)	DMA(V)	MMA(V)	As(V)
Raíz				
-	14.58 ± 0.70	<LD	<LD	25.94 ± 0.84
2 [As(III)]	22.74 ± 1.66	<LD	<LD	25.81 ± 0.97
2 [DMA(V)]	16.55 ± 0.48	2.01 ± 0.22	<LD	26.45 ± 3.82
2 [MMA(V)]	15.56 ± 0.63	<LD	1.96 ± 0.25	26.57 ± 1.16
2 [As(V)]	15.95 ± 0.42	<LD	<LD	28.34 ± 9.78
Tallo				
-	0.37 ± 0.01	<LD	<LD	0.21 ± 0.02
1.3 [As(III)]	1.59 ± 0.07	<LD	<LD	0.22 ± 0.02
1.3 [DMA(V)]	0.38 ± 0.02	1.35 ± 0.05	<LD	0.23 ± 0.03
1.3 [MMA(V)]	0.37 ± 0.02	<LD	1.52 ± 0.13	0.22 ± 0.01
1.3 [As(V)]	0.39 ± 0.01	<LD	<LD	1.18 ± 0.19
Hoja				
-	0.43 ± 0.03	<LD	<LD	0.69 ± 0.10
1.3 [As(III)]	1.71 ± 0.12	<LD	<LD	0.85 ± 0.10
1.3 [DMA(V)]	0.43 ± 0.06	1.41 ± 0.18	0.01 ± 0.01	0.73 ± 0.11
1.3 [MMA(V)]	0.73 ± 0.03	0.48 ± 0.05	0.21 ± 0.02	0.71 ± 0.07
1.3 [As(V)]	0.51 ± 0.03	<LD	<LD	1.54 ± 0.34

LD = Límite de detección

En el caso de la raíz y el tallo, tomando como referencia el extracto sin adición de especies de As, no existe una apreciable interconversión de especies ya que fue recuperada la cantidad de cada especie de As adicionada antes del proceso de extracción (raíz, 2 mg/Kg; tallo, 1.3 mg/Kg). En la Tabla 4 se puede observar que la cantidad de DMA(V) y MMA(V) determinada fue ligeramente menor a la añadida (1.3 mg/Kg), lo cual puede ser atribuido a procesos de metilación y desmetilación de las especies de As. Sin

embargo, la limitada interconversión de especies da indicio de la efectividad del empleo de HNO_3 0.15 N como agente extractante. El uso de este agente extractante mostró bajos porcentajes de interconversión de especies el estudio realizados por Reyes *et al.* en muestras de cereal [10].

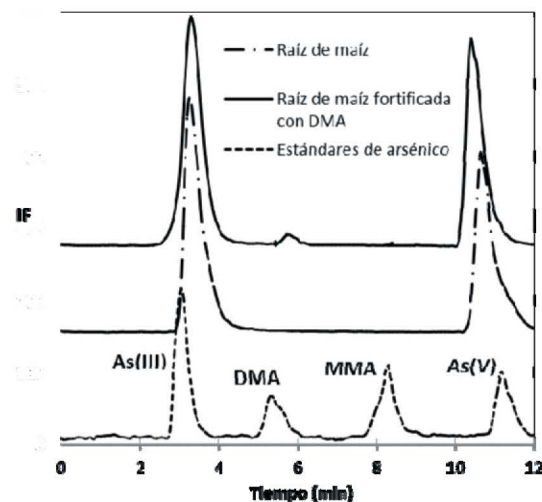


Figura 2. Cromatogramas obtenidos en la determinación de las especies de As en el cultivo de maíz por IC-HG-AFS.

3.3. Aplicación de la metodología de extracción de especies de arsénico.

El método de extracción fue aplicado en muestras de cultivo de maíz provenientes un sitio contaminado ubicado en el estado de San Luis Potosí, México. La Tabla 5 muestra las especies encontradas en el cultivo de maíz evaluado. La raíz, tallo y hoja de la planta de maíz presentó un mayor contenido de As inorgánico. El contenido de As inorgánico fue en orden decreciente: raíz > hoja > tallo. El tallo y la hoja de maíz presentan concentraciones de As inorgánico que no representan un riesgo para su uso como forraje de acuerdo a estándares internacionales (> 4 mg/Kg)[17].

Tabla 5. Determinación de especies de arsénico en muestras de planta de maíz procedentes de S.L.P.

Tipo de muestra	As(III)	As(V)	MMA(V)	DMA(V)
(μg/kg)				
Raíz				
A	34447.8 ± 1376.0	42022.9 ± 480	<LD	<LD
B	29762.3 ± 2130.2	40575.5 ± 213	<LD	<LD
C	19831.1 ± 2824.6	59401.7 ± 282	<LD	<LD
D	19467.6 ± 2766.6	36235.6 ± 276	<LD	<LD
E	12027.3 ± 1976.8	28810.4 ± 197	<LD	<LD
F	7397.4 ± 1300.6	22814.6 ± 130	<LD	<LD
Tallo				
		0.6	<LD	<LD

A	1245.5±230.2	1063.3±59.0	<LD	<LD
B	1697.9±154.0	1038.4±15.4	<LD	<LD
C	1623.4±48.9	553.3±48.9	<LD	<LD
D	1273.4±60.6	468.1±60.6	<LD	<LD
E	1225.5±119.1	596.6±119.1	<LD	<LD
F	1103.1±41.3	673.9±41.3	<LD	<LD
Hoja				
A	2400.3±505.3	3278.9±19.5	<LD	<LD
B	1087.4±301.9	2542.0±30.1	<LD	<LD
C	1137.3±779.8	2263.9±77.9	<LD	<LD
D	653.7±215.9	690.6±215.9	<LD	<LD
E	1574.2±167.4	1531.4±16.7	<LD	<LD
F	399.7±99.1	586.6±99.1	<LD	<LD

LD = Límite de detección.

4. Conclusiones

Se propone el uso de una metodología eficaz para la extracción de especies de As de la planta de maíz basada en el empleo de HNO_3 0.15 N a 80°C durante 2 h. Éste método de extracción fue aplicado para evaluar la distribución de especies de As en raíz, tallo y hoja de cultivos de maíz procedentes de una zona agrícola de San Luis Potosí, México. As(V) y As(III) fueron las especies predominantes de As en el cultivo. La extracción de especies de As con HNO_3 resulta una metodología económica y eficiente para su cuantificación en las partes vegetativas del cultivo de maíz.

El procedimiento analítico utilizado en este estudio presentó las siguientes ventajas:

- Bajo costo: uso de equipos y reactivos económicos, comparado con ICP-MS.
- Eficiencia: porcentajes de extracción mayores al 80%.
- Fiabilidad: interconversión de especies menores al 10%.
- Amigable con el ambiente: uso de reactivos no tóxico.

5. Agradecimientos

Este estudio fue apoyado por el Fondo de Investigación del PAICYT-UANL y CONACYT a través de las subvenciones UANL-PAICYT-CN885-11 y CONACYT/CB/167372, respectivamente. J. M. Rosas-Castor agradece a CONACYT por la beca de doctorado (no. de becario: 247646).

6. Referencias

1. U.S. Environmental Protection Agency. <http://www.epa.gov> (accesado el 26 de octubre de 2013)
2. Watts, M. J.; O'Reilly J.; Marcilla, A. L.; Shaw, R.A.; Ward, N.I. Environ Geochem Health. **2010**, 32(6), 479-490.
3. Norra, S.; Berner, Z. A.; Agarwala, P.; Wagner, F.; Chandrasekharam, D.; Stüben, D. Appl Geochem. **2005**, 20, 1890-1906.
4. Batista, B. L.; Souza, J. M. O.; De Souza, S. S.; Barbosa, F. J Hazard Mater. **2011**, 191(1-3), 342-348.
5. Bhattacharya, P.; Samal, A. C.; Majumdar, J.; Santra, S. C.; (). Water, Air & Soil Pollut. **2010**, 213(1-4), 3-13.
6. Carey, A.-M.; Lombi, E.; Donner, E.; Jonge, M. D.; Punshon, T.; Jackson, B. P.; Guerinot, M. L.; Price, A. H.; Meharg, A. A. Analytical and bioanalytical chemistry. **2011**, 402(10), 3275-3286.
7. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://faostat.fao.org/site/613/DesktopDefault.aspx?PageID=613#ancor> (accesado el 4 de noviembre de 2013)
8. Yuan, C.-G.; Jiang, G.-B.; He, B. Anal Atomic Spec. **2005**, 20(2), 103.
9. Zheng, M. Z.; Cai, C.; Hu, Y.; Sun, G. X.; Williams, P. N.; Cui, H. J.; Li, G.; Zhao, F. J.; Zhu, Y. G. Environ. Sci. Technol. **2008**, 42, 5008-2013
10. Reyes, M. N. M.; Cervera, M. L.; Campos, R. C.; De la Guardia, M. Spectroch Acta B Atom Spectr. **2007**, 62(9), 1078-1082.
11. Larios, R.; Fernández-Martínez, R.; LeHecho, I.; Rucandio, I. Science of the Total Environment. **2012**, 414, 600-607.
12. Zheng, M. Z.; Cai, C.; Hu, Y.; Sun, G. X.; Williams, P. N.; Cui, H. J.; Li, G.; Zhao, F. J.; Zhu, Y. G. New Phytologist. **2011**, 189(1), 200-209.
13. Arao, T.; Kawasaki, A.; Baba, K.; Matsumoto, S. Environ Sci & Technol. **2011**, 45(4), 1291-1297.
14. Li, N.; Fang, G.; Zhao, L.; Wang, S. Food Addit Contam B. **2009**, 26(6), 839-846.
15. Gupta, V. K.; Nayak, A.; Agarwal, S.; Dobhal, R.; Uniyal, D. P.; Singh, P.; Sharma, B.; Tyagi, S.; Singh, R. Desalination and Water Treat. **2012**, 40, 231-243.
16. Simon, S.; Tran, H.; Pannier, F.; Potin-Gautier, M. J Chromatogr. **2004**, 1024, 105-113.
17. Heilier, J.-F.; Buchet, J.-P.; Haufroid, V.; Lison, D. Int Archiv Occu and Environ Health. **2005**, 78(1), 51-59.