

## ACUMULACIÓN Y ESPECIACIÓN DE As EN FRESAS

D. Sánchez-Rodas<sup>1</sup>, A. González de las Torres<sup>1</sup>, I. Giráldez<sup>1</sup>, F. Martínez<sup>2</sup>, P. Palencia<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Dpto. de Química. Fac. Ciencias Experimentales. Universidad de Huelva. 21071. Huelva.

<sup>2</sup> Dpto. Ciencias Agroforestales. ETSI. Universidad de Huelva. 21071. Palos de la Frta, Huelva.

<sup>3</sup> Dpto. Biología de Organismos y Sistemas, EPM. Universidad de Oviedo. 33600. Mieres, Oviedo.

### Introducción

La fresa es una fruta que se cultiva a nivel mundial, siendo los mayores productores China, Estados Unidos, México, Egipto y Turquía. España ocupa el sexto puesto y es el principal productor europeo, con una producción de unas  $360 \times 10^3$  toneladas anuales en 2016 [1]. Más del 90% de la fresa producida en nuestro país se cultiva en la provincia de Huelva, ocupando una superficie en los últimos años en torno a las 7000 Ha [2], constituyendo uno de los motores agrícolas de esta provincia.

El gran consumo de agua en el cultivo de la fresa ha implicado históricamente el riego tanto con agua superficial como con agua subterránea, concretamente del acuífero Almonte-Marismas. En algunas zonas de dicho acuífero (dentro del Parque Nacional de Doñana) se han encontrado concentraciones de As de hasta  $110 \mu\text{g L}^{-1}$ . El análisis de especiación de estas aguas subterráneas mostraron la presencia tanto de arsenito como de arsenato (As(III) y As(V)). [3].

Se ha planteado un estudio para conocer la respuesta de las plantas de fresa en cultivo hidropónico a la exposición de especies inorgánicas de arsénico (As(III) y As(V)) a través del agua de riego. Con ello se pretende conocer tanto la acumulación en las distintas partes de la planta (raíz, tallo y fruto), como su especiación en los frutos, considerando además del As inorgánico, su posible transformación en las especies monometil arsénico (MMA) y dimetil arsénico (DMA).

### Cultivo hidropónico enriquecido en As de plantas de fresa

Se ha realizado un cultivo hidropónico de plantas de fresa, empleando fibra de coco como sustrato (Figura 1). Este tipo de cultivos sin suelos presentan varias ventajas frente al cultivo tradicional, como menor consumo de agua, menor riego de enfermedades y aplicación más eficaz de los fertilizantes [4]. Durante 4 semanas se han realizado 6 experiencias de aplicación de As al riego. Cada día se han añadido directamente a la raíz 50 ml de As(III) o As(V) a concentraciones de 10, 100 y 1000  $\mu\text{g l}^{-1}$ . Se mantuvo también un cultivo de control sin aplicación de As. Se tomaron muestras de los frutos de cada experiencia una vez cada semana para determinar el contenido total de As y realizar análisis de especiación. Al final de las 4 semanas, se arrancaron plantas para determinar el contenido total de As en las raíces y en los tallos.



Figura 1. Cultivo hidropónico de fresas

### Tratamiento de la muestra para análisis del contenido total y de especiación de As

Los distintos tipos de muestras (raíces, tallos y frutos) fueron liofilizadas y posteriormente homogeneizadas por trituración. Para la determinación del contenido total de As ( $\text{As}_{\text{total}}$ ), se realizó una digestión ácida de una porción de muestra empleando  $\text{HNO}_3$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , calentando en placa calefactora. Para la especiación de As, las muestras liofilizadas fueron extraídas con agua destilada en horno de microondas, y sometidas a limpieza con cartuchos C-18 y filtración con filtro de jeringa de  $0.45 \mu\text{m}$  antes de su análisis.

### Determinación de $\text{As}_{\text{total}}$ y especiación de As

La determinación de  $\text{As}_{\text{total}}$  se realizó mediante generación de hidruros y espectroscopia de fluorescencia atómica (HG-AFS). Para la especiación de As se empleó cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a HG-AFS (Figura 2). La separación de las especies de As se realizó en una columna de intercambio aniónico fuerte con una fase móvil de fosfato [5]. El orden de elución de las especies estudiadas es As(III), DMA, MMA y As(V) (Figura 3). La validación de los procedimientos de tratamiento de muestras, determinación de  $\text{As}_{\text{total}}$  y especiación se realizó analizando el material de referencia SRM 1568b *rice flour* (NIST) y el material 7162 *strawberry leaves* (LGC).



Figura 2. Acoplamiento HPLC-HG-AFS

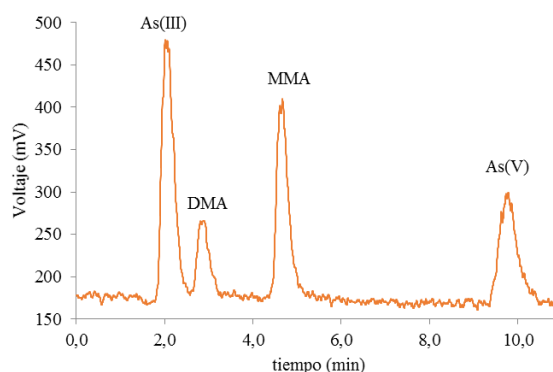


Figura 3. Cromatograma de patrones de As ( $5 \mu\text{g l}^{-1}$ )

## Acumulación de As en las raíces

Para conocer la acumulación de As en las distintas partes de la planta de fresa, se determinó el contenido de  $As_{total}$  mediante HG-AFS. Los resultados obtenidos mostraron que la acumulación dependió tanto de la especie de As adicionada al riego como de su concentración.

En la Figura 4 puede verse como la acumulación en la raíz tras la aplicación de As(III) y As(V) a las tres concentraciones estudiadas. Los resultados corresponden a la 4ª semana, una vez finalizado el periodo de exposición. Se observa que la acumulación de As(V) es baja y prácticamente independiente de la concentración aplicada, hasta un máximo próximo a  $0.5 \text{ mg kg}^{-1}$ . Para el As(III) la acumulación es significativamente mayor, aumentando hasta  $4 \text{ mg kg}^{-1}$  cuando el arsenito se aplica a  $1000 \mu\text{g l}^{-1}$ .

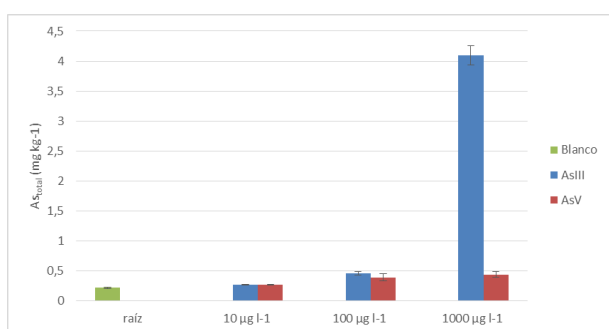


Figura 4. Acumulación de As en la raíz (4ª semana) al aplicar As(III) y As(V) en el riego a varias concentraciones

## Acumulación de As en los tallos

Los resultados correspondientes a los tallos, también de la 4ª semana, indicaron que la acumulación fue menor que en la raíz para ambas especies de As, y que el comportamiento volvió a indicar mayor acumulación del As(III) frente al As(V) (Figura 5).

En este caso sí se observó una relación para As(V) entre acumulación y concentración de aplicación, aunque la concentración máxima de As acumulado volvió a ser sobre  $0.4 \text{ mg kg}^{-1}$ . La máxima concentración de As acumulado en la planta al aplicar As(III) fue de  $1.3 \text{ mg kg}^{-1}$ , inferior a lo observado en la raíz.

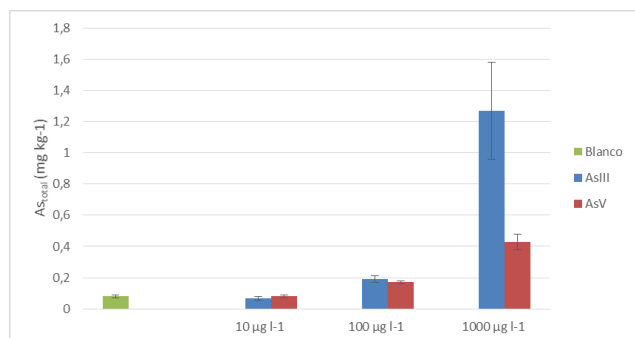


Figura 5. Acumulación de As en el tallo (4ª semana) al aplicar As(III) y As(V) en el riego a varias concentraciones

## Acumulación de As en los frutos

Como en el resto de la planta, también los frutos mostraron una mayor acumulación al ser expuestas a As(III) ( $0.3 \text{ mg kg}^{-1}$ ) frente a As(V) ( $0.2 \text{ mg kg}^{-1}$ ). En el caso de los frutos, la acumulación al final del periodo de estudio fue menor que en las raíces y en los tallos, como puede verse en la Figura 6. Estas diferencias de concentraciones en las distintas partes de la planta indican que la raíz acumula hasta diez más As que el fruto cuando se aplica As(III) ( $4.0 \text{ mg kg}^{-1}$  frente a  $0.3 \text{ mg kg}^{-1}$ ), y aproximadamente el doble cuando se aplica As(V) ( $0.4 \text{ mg kg}^{-1}$  frente a  $0.2 \text{ mg kg}^{-1}$ ).

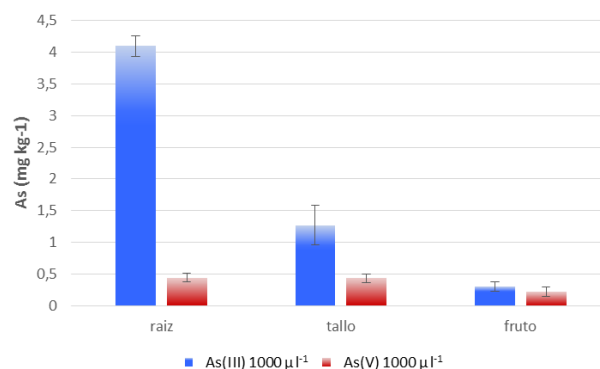


Figura 6. Acumulación de As en raíz, tallo y fruto (4ª semana) tras exposición diaria a  $1000 \mu\text{g l}^{-1}$  de As(III) o As(V).

Los resultados correspondientes a las cuatro semanas de estudio (Figura 7) mostraron un aumento progresivo y sostenido del contenido de  $As_{total}$  en las fresas, siendo siempre superior la acumulación para la experiencia de riego con As(III) frente al riego con As(V).

Los resultados corresponden a concentraciones de  $1000 \mu\text{g l}^{-1}$ , no detectándose el As en las fresas en las otras experiencias de riego a concentraciones de 10 y  $100 \mu\text{g l}^{-1}$ , independientemente de su aplicación con As(III) o As(V).

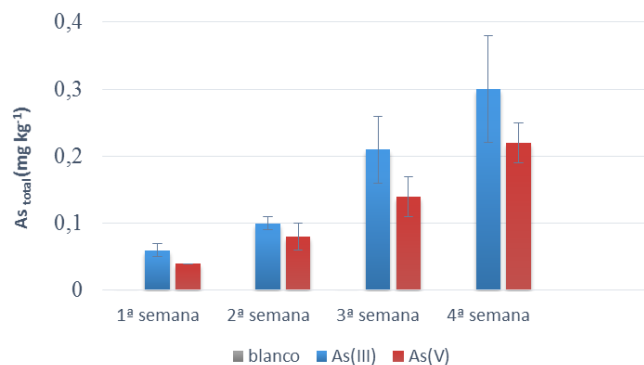
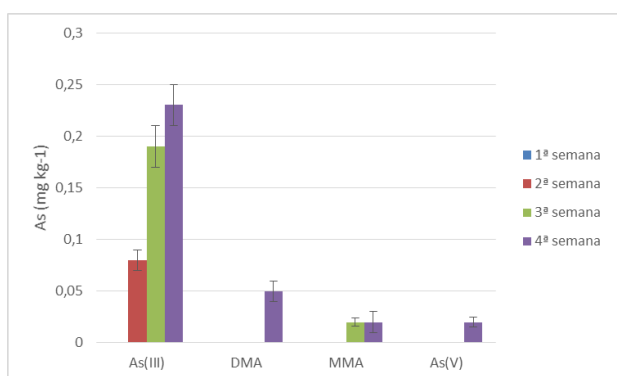


Figura 7. Acumulación de As en fruto durante las 4 semanas de exposición diaria a  $1000 \mu\text{g l}^{-1}$  de As(III) o As(V).

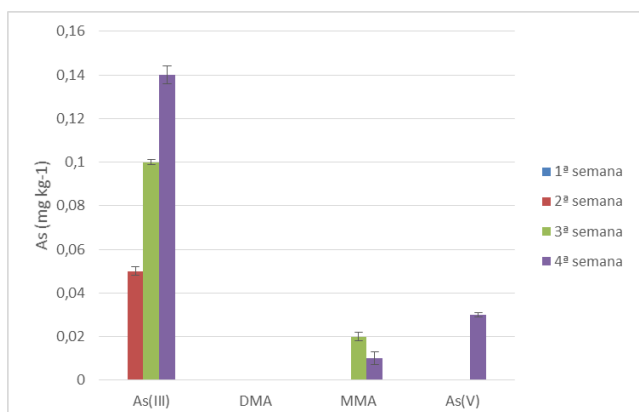
## Especiación de As en los frutos

Los resultados de especiación de exposición a  $1000 \mu\text{g l}^{-1}$  As(III) (Figura 8) indicaron como durante la primera semana no se detectó ninguna especie de As. Es a partir de la segunda semana cuando se encontró As(III) en las fresas como única especie de las estudiadas. Su concentración se triplicó desde  $0.08$  a  $0.23 \text{ mg kg}^{-1}$  en la cuarta semana. En la tercera semana de estudio se apreció una metilación parcial del As, formándose MMA ( $0.02 \text{ mg kg}^{-1}$ ) que posteriormente dio lugar a DMA ( $0.05 \text{ mg kg}^{-1}$ ). El As(V) fue una especie minoritaria a lo largo de todo estudio, que solo se pudo cuantificar al finalizar la cuarta semana ( $0.02 \text{ mg kg}^{-1}$ ).



**Figura 8.** Especiación de As en el fruto durante 4 semanas tras exposición diaria a  $1000 \mu\text{g l}^{-1}$  de As(III).

La segunda experiencia de especiación corresponde a la exposición a  $1000 \mu\text{g l}^{-1}$  As(V) en el riego (Figura 9). Los resultados mostraron que el As(V) añadido, al ser acumulado por la planta, experimenta una reducción a As(III). Esto hace que se detecte de nuevo As(III) en las fresas a partir de la segunda semana ( $0.05 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Al igual que en el caso anterior, su concentración prácticamente se triplica al finalizar la experiencia ( $0.14 \text{ mg kg}^{-1}$ ). A pesar de que se adiciona As(V) a la planta, en el fruto solo se detecta As(V) en la cuarta semana ( $0.03 \text{ mg kg}^{-1}$ ). El grado de metilación a partir de As(V) es inferior que con As(III). Solo se detectó MMA en las tercera y cuarta semana ( $0.02 \text{ mg kg}^{-1}$ ), mientras que el DMA no fue detectado.



**Figura 9.** Especiación de As en el fruto durante 4 semanas tras exposición diaria a  $1000 \mu\text{g l}^{-1}$  de As(V).

## Conclusiones

Se ha realizado un cultivo de fresas sobre sustrato hidropónico, adicionando As al riego. Los resultados indican que la acumulación de As en las plantas de fresa varía según la parte de la planta estudiada, disminuyendo desde un máximo en las raíces hasta un mínimo en los frutos. La acumulación depende del estado del oxidación del As, siendo en todos los casos superior para el As(III) frente al As(V).

La acumulación depende también de la concentración de la especie de As añadida al riego ( $10$ ,  $100$  y  $1000 \mu\text{g l}^{-1}$ ). Las raíces y los tallos acumulan As a esas tres concentraciones, mientras que en los frutos se ha visto que la acumulación solo se produce con riegos de  $1000 \mu\text{g l}^{-1}$ , siendo progresiva a lo largo de las cuatro semanas del estudio.

El acoplamiento HPLC-HG-AFS permite realizar análisis de especiación de As en extractos acuosos de las fresas. Todos ellos indicaron que la especie mayoritaria fue el As(III), independientemente de si se adicionó As(III) o As(V) al riego. El grado de metilación en el fruto fue mayor en las experiencias de exposición a As(III) frente a As(V).

## Agradecimientos

Consejería de Economía, Innovación y Ciencia (Junta de Andalucía), proyecto de excelencia convocatoria 2012 FQM-752 "Biosíntesis de compuestos de selenio y arsénico en el cultivo de fresas (*Fragaria x ananassa* Duch.)."

## Referencias

- [1] Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations. Faostat. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (20/01/2018)
- [2] Ministerio Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Anuario 2011. [http://www.mapama.gob.es/estadistica/pags/anuario/2011/AE\\_2011\\_13.pdf](http://www.mapama.gob.es/estadistica/pags/anuario/2011/AE_2011_13.pdf) (20/01/2018)
- [3] Kohfahl, C., Sánchez-Rodas, D., Mendoza, J.A., Vadillo, I., Giménez-Forcada, E., Sci. Total. Environ. 544 (2016) 874-882.
- [4] Van Os, E.A., Water Sci. Technol. 39 (1999) 105-112.
- [5] Sánchez-Rodas, D., Gómez-Ariza, J.L., Oliveira, V., Anal. Bioanal. Chem. 385 (2006) 1172-1177