

Evaluación del antagonismo selenio – arsénico en alfalfa (*Medicago sativa*)**Evaluation of selenium - arsenic antagonism in alfalfa****(*Medicago sativa*)**

Cristo Omar Puente-Valenzuela¹, Ignacio Sánchez-Cohen¹, Miguel Rivera-González¹, Mariana de Jesús Marcial-Pablo¹

¹ Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Relación Agua, Suelo, Planta, Atmósfera (CENID RASPA), INIFAP. Km. 6.5 margen derecha Canal de Sacramento, Gómez Palacio, C.P. 35140, Gómez Palacio, Durango

RESUMEN

La Comarca Lagunera es una región con problemas de hidroarsenicismo, lo cual representa un riesgo ambiental y de salud ambiental, esto debido al peligro de la contaminación directa por agua de consumo o por la contaminación de la cadena trófica de los productos derivados de la explotación del recurso agua. La actividad agropecuaria es una de las principales en la región la cual usa como agua de riego con valores de arsénico contaminando la cadena derivada de esta actividad. El selenio es un metaloide que en diferentes modelos vegetales ha mostrado tener un efecto antagónico en la acumulación de arsénico en su biomasa, además que las funciones biológicas atribuibles al selenio en los organismos. En este trabajo se evaluó el efecto antagónico selenio – arsénico en alfalfa (*Medicago sativa*), esto como propuesta para su potencial uso como elemento fertilizante adicionado al suelo y/o sistema de riego y evitar la translocación del arsénico a partes aprovechables de los cultivos. Para evaluar esto se utilizaron proporciones diferentes de Arsénico:Selenio (2:1, 1:1 y 1:2), con sus respectivos tratamientos control. Se observó que la alfalfa tiene capacidad de absorber hasta $25.25 \pm 3.55 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$, cuando la alfalfa se expone a una concentración de $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ a través de su agua de riego. La acumulación de Selenio se observa un comportamiento dosis – respuesta, llegando acumular hasta $471.19 \pm 115.92 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$, cuando se expone a una concentración de $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ a través del agua de riego, finalmente no se observa un efecto antagónico arsénico-selenio, bajo las condiciones experimentales empleadas.

Palabras Clave: *Arsénico, Selenio, Medicago sativa, Antagonismo*

SUMARY

The Laguna has hydroarsenicism región problems, it make environmental health risk; this due to the danger of direct contamination by tap water or contamination of the food chain of products derived from the exploitation of the water resource. The agricultural activity is one of the main ones in the region which it uses as irrigation water with arsenic values contaminating the chain derived from this activity. Selenium is a metalloid that in different plant models has been shown to have an antagonistic effect on the accumulation of arsenic in its biomass, in addition to the biological functions attributable to selenium in organisms. In this work the antagonistic effect selenium - arsenic in alfalfa (*Medicago sativa*) was evaluated, this as a proposal for its potential use as a fertilizer element added to the soil or irrigation system and avoid the translocation of arsenic to usable parts of the crops. To assess this, different proportions of Arsenic: Selenium (2: 1, 1: 1 and 1: 2) were used, with their respective control treatments. It was observed that alfalfa has the capacity to absorb up to $25.25 \pm 3.55 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$, when alfalfa is exposed to a concentration of $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ through its irrigation water. Selenium accumulation shows a dose-response behavior, reaching accumulate up to

471.19 $\pm$ 115.92 mg * Kg⁻¹, when exposed to a concentration of 20 mg * L⁻¹ through irrigation water, finally an effect is not observed antagonistic arsenic-selenium, under the experimental conditions used.

Key words: Arsenic, Selenium, *Medicago sativa*, Antagonism

INTRODUCCIÓN

La Comarca Lagunera es una región con grandes problemas de hidroarsenicismo, representando problemas de salud ambiental muy graves, donde la exposición a este metaloide no solamente es a través del agua de bebida, sino también por los alimentos que deriven del riego y/o el aprovechamiento del agua contaminada con este metaloide. La región lagunera se encuentra ubicada en la parte norte del país, geográficamente la región está formada por una planicie semidesértica de clima caluroso y con alto grado de aridez. La región lagunera es un paradigma nivel mundial ya que pese a que se encuentra en una zona semidesértica, es la cuenca lechera más importante no solo del país, sino en Latinoamérica. Se caracteriza por ser una región agrícola y ganadera, dentro del ámbito agrícola, los cultivos principales en la región son los forrajes, de los cuales destaca el cultivo de la alfalfa, en la cual se han encontrado concentraciones de As de 400 µg/Kg (Mercado 2009; SAGARPA 2010). La producción de alfalfa es la base para la industria lechera en nuestra región, la alfalfa es una leguminosa con características de manejo y siembra que hacen su demanda se incremente (SIACON 2013).

El arsénico pertenece al grupo 15 del sistema periódico, tiene más características de no metal que de metal; de aquí que forme más fácilmente aniones que cationes. Se han descrito cuatro formas alotrópicas del arsénico: metálica, gris, parda y amarilla. Su configuración electrónica es [Ar] 3d¹⁰, 3s², 4p³ y en sus compuestos funciona con los grados de oxidación (-III), (III) y (V) (Marti, *et al* 2002). Tiene un radio covalente (para el estado trivalente) de 1.21 Å. Con un punto de fusión de 814°C a 36 atm. Este muestra considerables variaciones en sus características químicas, los compuestos iónicos

es difícil que se presenten, debido a la gran cantidad de energía que se necesita para adoptar la estructura electrónica del siguiente gas noble. Asimismo, es difícil obtener la pérdida de electrones de valencia debido a las altas entalpías de ionización (no existen los iones +5). Las características más importantes de las valencias están implicadas en el número de enlaces covalentes formados (Cotton *et al*; 2002). El arsénico tiene una fuerte afinidad por el oxígeno y forma varias especies en el ambiente, dependiendo del Eh, pH y del medio en donde este (Evangelou 1998; Valverde 1999; ATSDR 2005)

La contaminación del agua potable por arsénico es un problema mundial, los niveles del arsénico en agua de pozo están por encima de los permitidos para agua potable en algunas áreas de México, donde se incluyen: La Comarca Lagunera y ciudad de Durango (Durango – Coahuila), Los azufres (Michoacán), San Antonio (Baja California Sur), Hermosillo (Sonora), Zacatecas (Zacatecas), Acámbaro (Guanajuato), Puebla (Puebla), Cuautla (Morelos), Delicias (Chihuahua) y Zimapán (Hidalgo) (Méndez 2003).

Los altos niveles de arsénico en agua de bebida fueron identificados en 1958, debido a sus efectos en la salud, en 1990 el rango de la concentración de arsénico era de 0.008 a 0.624 mg/L (128 muestras), donde la especie predominante de arsénico con un 93% del total era el arsénico en estado de oxidación de +5. El origen de las concentraciones de arsénico en las aguas de La comarca Lagunera es controversial, donde procesos de evaporación, sobreexplotación de los pozos han causado la elevación de las concentraciones del arsénico, debido a que el arsénico retenido en el suelo puede movilizarse de la matriz del acuífero hacia el medio acuoso, esto promovido por la

disolución de óxido de hierro y manganeso al igual que la presencia de sulfatos en la piedra caliza del acuífero (Armienta 2008, Rosas 1999)

En La Comarca lagunera, se estima que 750,000 habitantes están expuestos a concentraciones de arsénico por encima a lo establecido en la NOM-127-SSA1-1994 (0.025 mg*L-1) con una dosis de exposición de este metaloide en un rango de 0.60 a 43 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}\cdot\text{Día}^{-1}$ [21]. El desequilibrio del acuífero de la región, lo provoca la excesiva extracción del acuífero principal y esto a su vez pone en riesgo de salud a un millón 200 mil habitantes de La Comarca Lagunera, actualmente ya se dificulta distribuir agua de buena calidad para el consumo humano a través de norias en los municipios de San Pedro, Matamoros, Viesca y Francisco I. Madero por Coahuila y Tlahualilo, Mapimí, San Juan de Guadalupe y Simón Bolívar por Durango (Vanguardia 2010)

El selenio puede encontrarse de forma natural en una gran cantidad de frutas y verduras (Nirmala 2011). En cuanto a la importancia y papel del selenio en la alimentación de los bovinos, hoy en día la carencia de selenio afecta a muchas zonas de zootecnia. Entre las causas responsables de la aparición de este problema podemos destacar las nuevas técnicas agronómicas así como las mayores exigencias nutricionales de animales cada vez más productivos. Además de ser responsable de la conocida distrofia muscular, la carencia de selenio puede disminuir el crecimiento, perjudicar la función reproductora, causar retenciones placentarias y afectar al sistema inmunitario (Swecker 1997).

La disfunción metabólica por deficiencia de selenio que se conoce desde hace más tiempo y que más afecta a los bovinos es la distrofia muscular nutricional (miodistrofia nutricional), conocida también bajo la denominación de enfermedad del músculo blanco ("White muscle disease") por el aspecto que adquieren los músculos afectados. Las lesiones pueden afectar la musculatura esquelética y también la

cardíaca. Entre los primeros los más afectados son normalmente los músculos de la espalda, dorso y muslo. La enfermedad se caracteriza por una degeneración más o menos difusa de los músculos. Afecta sobre todo a los terneros en los primeros meses de vida y en especial a los individuos pertenecientes a razas de carne, ya que en comparación con los individuos pertenecientes a las razas lecheras los primeros presentaban un crecimiento más rápido y consecuentemente también un mayor desarrollo de las fibras musculares. Los bovinos de edad más avanzada pero todavía jóvenes (aproximadamente un año de edad) también pueden presentar la enfermedad, si bien con una casuística mucho más reducida. Los terneros enferman porque la disponibilidad de selenio y de vitamina E es insuficiente para cubrir las necesidades derivadas del crecimiento. Los animales recién nacidos pueden tener fuentes de selenio en las reservas acumuladas a nivel hepático durante la vida fetal, especialmente durante el último periodo de gestación, o en la leche (Cappa 1996). La concentración mínima de selenio en forraje para bovino es de 100 $\mu\text{g/L}$. (Ceballos 1999).

Funes-collado et al., Evaluaron la translocación de selenio en col, lechuga, cilantro y perejil, cultivadas en turba enriquecida con sales de selenio, a diferentes concentraciones. Concluyeron que el contenido de selenio en las plantas se incrementaba acorde a la suplementación, siendo las sales solubles de selenio una rápida forma de suplementación en la turba, sin embargo, una concentración mayor a 10 mg/Kg en el sustrato, puede dañar o inhibir el crecimiento de las plantas. (Funes-Collado 2013).

Estudios anteriores han mostrado un antagonismo en el efecto tóxico del arsénico debido al selenio en las plantas (He et al., 2004), se ha demostrado evidencia de desintoxicación o un efecto protector cuando concentraciones tóxicas de arsénico y selenio son suministradas (Dubois et al., 1940). Los efectos del arsénico y

del selenio se han estudiado en diferentes matrices de plantas, existe muy poca información del potencial de la interacción selenio – arsénico en el contexto de

MATERIALES Y METODOS

El trabajo se llevó a cabo en macetas, en un predio urbano ubicado en la zona centro de Cd. Lerdo Durango, en las coordenadas N 25 54 81" y O 103 52 45 con una altitud de 1100 m sobre el nivel del mar. El clima es seco desértico o estepario cálido con lluvias en el verano e inviernos frescos. La precipitación pluvial es de 258 mm y la temperatura media anual es de 22.1 °C, con rangos de 38.5 °C como media máxima y 16.1 °C como media mínima. La evaporación anual media aproximadamente es de 2396 mm. Se trabajó bajo un diseño por parcelas divididas, con 6 tratamientos y 4 repeticiones. La variedad de alfalfa fue "Altaverde" y los niveles las relaciones de masa Se/As (0.5, 1.0 y 2.0). Se realizaron curvas de dosis-respuesta para arsénico, la concentración de inhibición de los metaloides resultó ser de 10 mg/Kg para As y de 10 mg/Kg para Se, y se empleó esta concentración como base para la realización del experimento con las relaciones de masa, sugeridas en el diseño experimental. Para la preparación de la solución contaminante, se utilizó arseniato de sodio (Sigma-Aldrich, grado analítico) y seleniato de sodio (Sigma-Aldrich, grado analítico) disuelto en agua destilada a 1000 mg L.⁻¹ tomando esta concentración como solución stock. El sustrato de cultivo consiste en una proporción 60/40 de arena / peat moss. Fueron realizadas a partir de bolsas plásticas de 15 x 10 x 70, estas medidas se escogieron para permitir el correcto desarrollo vertical de la raíz. Se trabajó bajo un diseño por parcelas divididas, con 6 tratamientos y 4 repeticiones. El total de tratamientos analizados fueron: tratamiento testigo, el cual consistió en unidades experimentales sin adición de arsenico y sin selenio (T1:As(-),Se(-)), Control, el cual consistió en adicionar unicamente la concentración media de selenio, (C:Se(-),Se(+D2)), tratamiento 2:1, el cual consistió en 5 mg/L de Arsenico vs 2.5 mg/L

fitoremediación. En el presente trabajo se evaluo el efecto antagonico selenio – arsénico en el modelo de alfalfa.

de Selenio, (T2/1:As(+),Se(+D1)), tratamiento 1:1, el cual consistió en 5 mg/L de Arsenico vs 5 mg/L de Selenio, (T1/1:As(+),Se(+D2)), tratamiento 1:2, el cual consistió en 5 mg/L de arsenico vs 10 mg/L de Selenio (T1/2:As(+),Se(+D3)) y finalmente un ultimo tratamiento control As donde solo contenia 5 mg/L de Arsenico y sin adición de Selenio, (CAs:As(+),Se(-)). El aporte de los metaloides se realizo a traves del agua de riego con las diluciones respectivas.

Las variables fenologicas

Peso seco (PS), las plantas se deshidrataron a temperatura ambiente dentro de bolsas de papel canela. Una vez secas la masa total producida por maceta se pesó.

Cuantificación de carbohidratos reductores

Se cuantificó el total de carbohidratos reductores a cada unidad experimental mediante el método de Fenol/H₂SO₄ (Nigam 2007). Se realizó una curva patrón para cuantificación de carbohidratos a partir de un stock de 10 mg/ml de glucosa y una dilución seriada (reducción progresiva, paso a paso, de la concentración de glucosa en disolución, el factor de dilución en cada paso es constante). Para lavar las hojas de alfalfa estas fueron sumergidas en una solución de HNO₃ al 5% seguido de un enjuague con agua destilada posterior a esto se realizó el machacado de las hojas de alfalfa siendo la proporción de 1g de hoja verde por 10 ml de buffer de PBS (phosphate buffered saline). Una vez obtenido el machacado, se sometió a centrifugación a 2000 RPM, a continuación se tomó una alícuota (muestra) de 50 µl a la que se le realizó una dilución 1:10 con buffer de PBS, se tomó 500 microlitros de la dilución, con 100 microlitros de fenol y 500 microlitros de ácido sulfurico, se incubaron por 10 minutos, se adiciono 500 microlitros de etanol y se midió la

absorbancia a 540 nm, contra curva de calibración.

Cuantificación de Proteínas totales

Se cuantificaron las proteínas totales de cada unidad experimental mediante el método de Bradford. Se realizó una curva patrón para cuantificación de proteínas totales a partir de un stock de 2mg/ml de albúmina bovina y una dilución seriada. El proceso de muestra fue el mismo realizado en la determinación de carbohidratos siendo la dilución de la alícuota de 1:100 con buffer PBS (Bradford 1976). Se tomaron 500 microlitros de la dilución con 500 microlitros de reactivo de Bradford.

Cuantificación de Arsénico y Selenio

Se cuantificó el Arsénico y selenio total de cada unidad experimental mediante el método de Absorción atómica con atomización electrotérmica en horno de grafito (Graphite furnace atomic absorption spectroscopy, GF AAS) (Chambi 2012), la preparación de las muestras fue la siguiente: Las hojas fueron

lavadas con HNO₃ al 5%, una vez lavadas las muestras se envolvieron en papel canela y se colocaron en una mufla a 80°C durante 24 horas para secar completamente, se molieron las muestras y se hicieron pasar por un tamiz con malla de 1 mm, el polvo obtenido se almacenó en bolsas plásticas, se pesaron 20 mg de muestra de cada unidad experimental dentro de un tubo de polipropileno con 400 µL de HNO₃ grado metal trace al 70% mas 200 µL de H₂O₂ mas 1400 µL de agua tridestilada para someterse a digestión ácida en autoclave a 121°C durante 1 hora a 15 PSI de presión. Una vez digeridas las muestras estas fueron almacenadas a 4°C para su posterior análisis de metales. Las condiciones de análisis del GF AAS fueron: longitud de onda 196 nm, rampa de ceniza de 2600 °C, muestra inyectada 10 µL (Philcor 2005)

RESULTADOS

En la evaluación de las variables fenológicas a través de los tres cortes los resultados se presentan en la tabla 1 y 2, en la cual se expresan los resultados de cada variable en los diferentes tratamientos y cuatro repeticiones.

Tabla 1. Datos experimentales de variables del primer corte

	Peso Seco hoja (g) ($\bar{x} \pm s$)	Carbohidratos en hoja (%) ($\bar{x} \pm s$)	Proteína en hoja (%) ($\bar{x} \pm s$)	Arsénico (mg/kg) ($\bar{x} \pm s$)	Selenio (mg/kg) ($\bar{x} \pm s$)
T1:As(-)Se(-)	0.75±0.08	9.11±1.35	22.46±0.83	4.27±1.03	1.91±1.34
CAs:As(+)Se(-)	0.86±0.08	8.60±1.78	13.90±2.49	25.25±3.55	1.73±0.16
CSe:As(-)Se(+D2)	0.75±0.23	9.44±2.02	17.70±2.70	4.5±0.86	62.52±14.74
T2/1:As(+)Se(+D1)	0.64±0.13	7.53±0.74	15.19±3.56	35.5±16.24	31.24±16.80
T1/1:As(+)Se(+D2)	0.71±0.26	8.40±1.29	14.61±1.22	42.85±9.32	57.87±23.76
T1/2:As(+)Se(+D3)	0.64±0.17	6.77±1.02	17.73±1.61	22.57±0.98	471.19±115.92

Se expresa para cada tratamiento la media ($\bar{x}$) y la desviación estándar (s) de una n = 4 repeticiones

Tabla 2. Datos experimentales de variables del segundo corte

	Peso Seco hoja (g) ($\bar{x} \pm s$)	Carbohidratos en hoja (%) ($\bar{x} \pm s$)	Proteína en hoja (%) ($\bar{x} \pm s$)	Arsénico (mg/kg) ($\bar{x} \pm s$)	Selenio (mg/kg) ($\bar{x} \pm s$)
T1:As(-)Se(-)	0.83±0.07	12.32±0.21	16.40±0.24	3.46±0.26	1.49±0.32
CAs:As(+)Se(-)	0.66±0.19	12.23±0.38	14.73±0.57	25.97±1.95	1.43±0.25
CSe:As(-)Se(+D2)	0.69±0.22	11.58±0.29	15.53±0.52	3.24±0.61	54.58±4.77
T2/1:As(+)Se(+D1)	0.63±0.11	10.33±0.13	16.35±0.74	34.79±4.95	23.16±1.28
T1/1:As(+)Se(+D2)	0.95±0.14	10.21±0.37	14.67±0.48	27.28±4.58	46.28±2.84
T1/2:As(+)Se(+D3)	0.58±0.14	10.27±0.45	16.01±0.64	22.86±4.14	123.25±18.89

Se expresa para cada tratamiento la media ($\bar{x}$) y la desviación estandar (s) de una n = 4 repeticiones

Entre las variables fenológicas como lo son el peso seco, carbohidratos y proteína no existieron diferencias significativa cuando se sometieron a un analisis de anova con comparación de

medias de Fisher’s LSD, asi mismo en la Figura 1 se expresan los datos de peso seco, proteínas y carbohidratos.

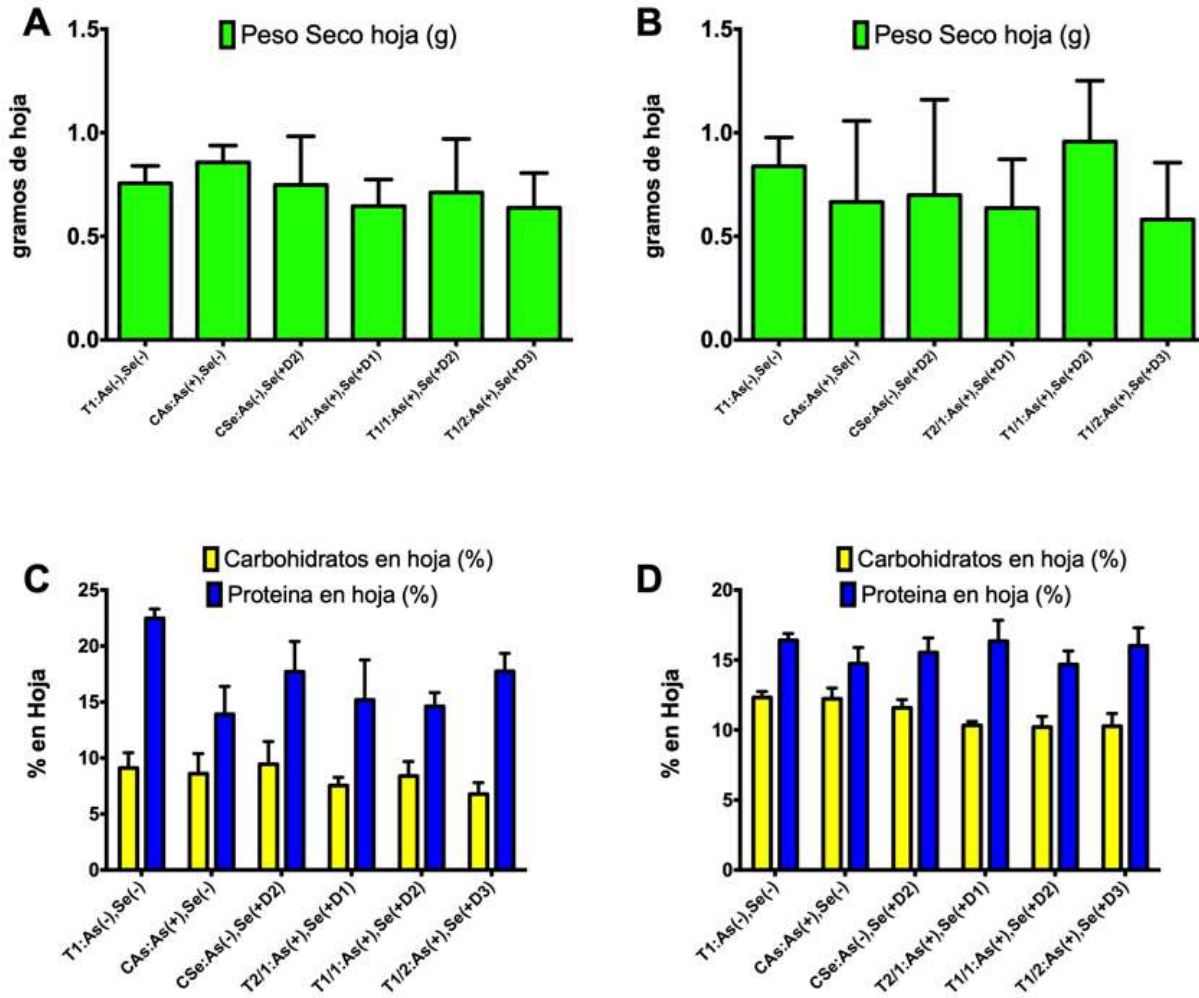


Figura 1. Representación de variables fenológicas de corte 1 y 2.

Para todos los casos se Figura la media de cuatro repeticiones, donde las barras de error representan la desviación estándar, donde el panel A y B, se muestran el rendimiento en peso seco de hoja para el primero y segundo corte, respectivamente; en el panel C y D se muestra los valores de carbohidratos y proteínas del primero y segundo corte respectivamente. En todos los casos no existe diferencia significativa bajo el análisis de anova con la comparación de medias de Fisher’s LSD.

En el caso de las variable de la absorción de arsénico, esta no presento diferencias significativas para los diferentes tratamientos con selenio, indicando presuntamente que no exite un efecto antagonico evidente, bajo este tipo de diseño experimental. Mas sin embargo, en la Figura 2, panel B, puede observarse una tendencia inversamente proporcional a la concentración de selenio en el medio.

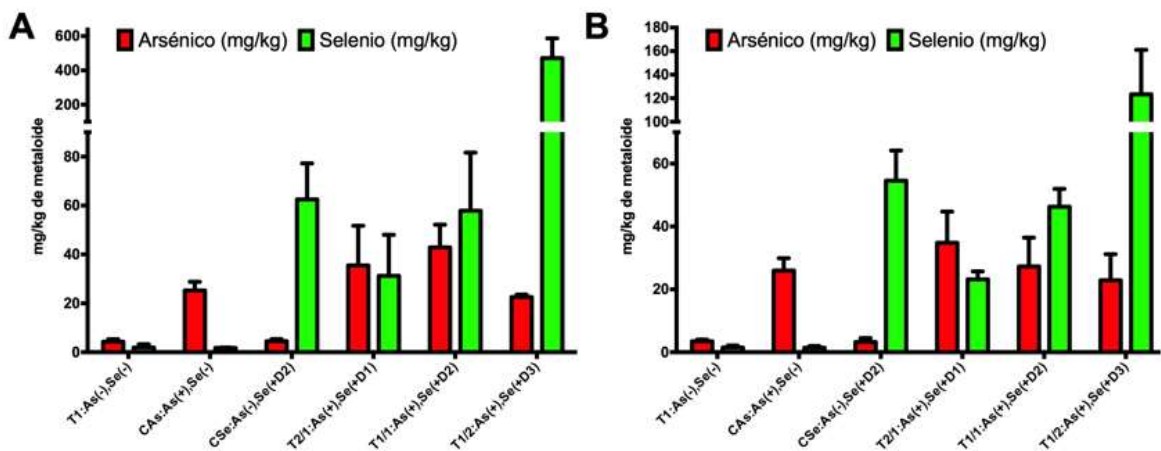


Figura 2. Absorción de Arsénico y Selenio en los diferentes tratamientos.

Para todos los casos se Figura la media de cuatro repeticiones, donde las barras de error representan la desviación estándar, donde el panel A y B, corresponden al corte uno y dos, respectivamente.

Finalmente en la Figura 3, se expresan las concentraciones de arsénico, del promedio de

las concentraciones de la absorción de Arsénico en los diferentes tratamientos, en esta Figura nuevamente reafirma la poca evidencia para de un efecto antagonico del Selenio en la absorción de Arsenico.

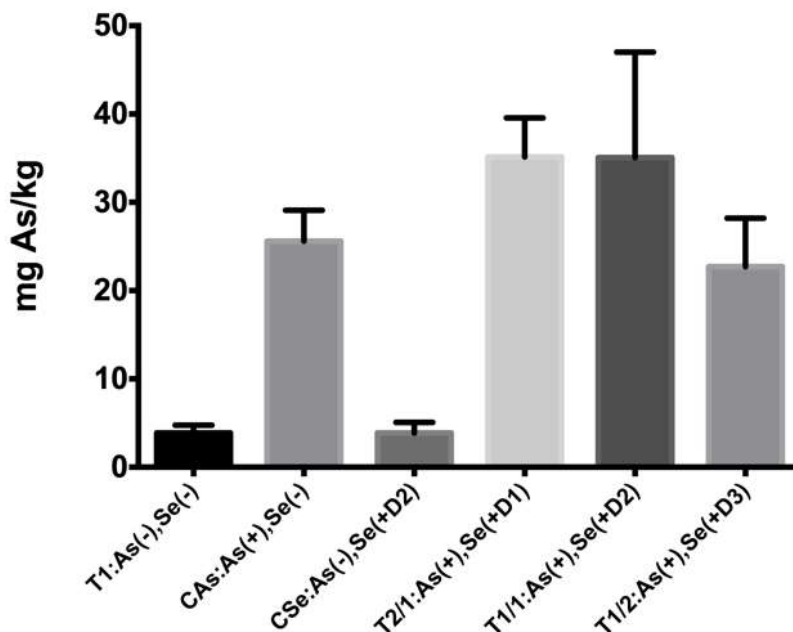


Figura 3. Efecto del Selenio en la absorción de Arsénico en alfalfa; Se representa la media y la desviación estándar de una $n = 4$, no se observan diferencias significativas entre los tratamientos con dosis de Selenio.

DISCUSIÓN

Zolnowski et al, evaluarón el efecto de riego con aguas arsenicales (0, 25, 50, 75 y 100 ppm) en relación con el rendimiento (gramos de raíz) a plantas de maíz, su trabajo concluye que a mayor contaminación del suelo, se reduce el rendimiento del cultivo de maíz, debido al efecto tóxico del arsénico en la planta (Zolnowski et al 2010). En contraste con estos resultados la alfalfa no mostró una pérdida de rendimiento, posiblemente debido a que la concentración máxima de Arsénico en el agua de riego para la alfalfa fue de 5 ppm, mientras que zolonowski utilizó una concentración máxima de 100 ppm.

Horner et al., Evaluarón la concentración de proteína en hoja en 2 cortes de alfalfa cultivada a cielo abierto y dedujeron que la concentración media en el primer corte fue de 21.4% y el segundo corte de 16.5% valores muy aproximados al arrojado en el presente experimento en el primer y segundo corte del tratamiento testigo.

Prieto-Garcia et al. Evaluaron la Bioacumulación de arsénico en las etapas de desarrollo de la

cebada maltera, su trabajo concluyó que las máximas concentraciones de arsénico son absorbidas en la raíz, después de desaparecer la semilla (a partir de la tercera etapa de desarrollo), esto se explica por hecho de que la raíz es el medio por el cual las plantas absorben los nutrientes del suelo, sucede lo mismo con las hojas donde son un destino determinado de los nutrientes. Los tallos por su parte siguen en orden de Bioacumulación, debido a que son órganos de transporte de los nutrientes y en las distintas etapas del crecimiento se bioacumula en éste el arsénico. En contraste con este experimento, la alfalfa muestra una Bioacumulación de As directamente proporcional a la concentración del metaloide en el agua de riego, esto muestra un efecto similar al descrito por Prieto-Garcia et al. Posiblemente debido a que la cebada maltera y la alfalfa son un cultivo forrajero.

Funes-Collado et al. Analizaron la Bioacumulación de selenio en col, lechuga, acelga y perejil, cultivados en turba enriquecida con sales de selenio, sus experimentos arrojaron evidencia que indica la translocación

del elemento a las hojas de estos vegetales, a mayor concentración de selenio en la turba, mayor fue la translocación del elemento.

CONCLUSION

El cultivo de alfalfa es uno de los principales forrajes de la región, por lo que su demanda es alta por sus valores nutritivos. La alfalfa es capaz de absorber concentraciones significativas de arsénico cuando este es aportado a través del agua de riego, e igualmente el selenio se acumula en concentraciones significativas que ayudan a suplementar la dieta del ganado con este mineral; mas sin embargo bajo las condiciones experimentales desarrolladas en este trabajo no se establece estadísticamente el efecto antagónico Arsénico-Selenio, dejando apreciable únicamente tendencias este efecto, indicando que debemos de indagar más en este fenómeno, evaluando cualitativa y cuantitativamente las variables que promuevan o inhiban dicho efecto.

LITERATURA CITADA

Armienta, M.A. and N. Segovia, Arsenic and Xuoride in the groundwater of Mexico. 2008.

ATSDR (2005) Resumen de Salud Publica ARSENICO.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

Cappa, V. (1996). Importancia y papel del selenio en la alimentación de los bovinos. *Veterinaria en Praxis*, 11, 15-20

Ceballos, A., Wittwer, F. G., Contreras, P. A., Quiroz, E., & Böhmwald, H. (1999). Actividad de glutatión peroxidasa en

bovinos lecheros a pastoreo correlacionada con la concentración sanguínea y plasmática de selenio. *Pesq agropec bras*, 34, 2331-2338.

Chambi, L. J., Orsag, V., & Niura, A. (2012). Evaluación de la Presencia de metales pesados y arsenico en suelos agrícolas y cultivos en tres micro-cuencas del Municipio de Poopo. *Revista Boliviana de Química*, 29(1), 111-119.

Cotton, F.A. and G. Wilkinson, *Quimica Inorganica Avanzada*. Cuarta ed. 1990, Mexico: LIMUSA NORIEGA EDITORES. 1670.

Dubois KP, Moxon AL, Olson OE. 1940. Further studies on the effectiveness of arsenic in preventing selenium poisoning. *Journal of Nutrition* 19, 477-482.

Evangelou, V.P., *Environmental soil and water chemistry*. 1998, Canada: John Wiley&Sons.

Funes-Collado, V., Morell-Garcia, A., Rubio, R., & López-Sánchez, J. F. (2013). Selenium uptake by edible plants from enriched peat. *Scientia Horticulturae*, 164, 428-433.

Gleason, S.V., *RIESGO SANITARIO AMBIENTAL POR LA PRESENCIA DE ARSÉNICO Y FLUORUROS EN LOS ACUÍFEROS DE MÉXICO*. 2001.

Martí, F.B., et al., *Química Analítica Cualitativa*. Desimoctava-Segunda Reimpresion ed. 2002, España: THOMSON. 1036.

Méndez, M. and M.A. Armienta, Arsenic phase distribution in Zimapan mine tailings, Mexico. *GEOFISICA INTERNACIONAL-MEXICO-*, 2003. 42(1): p. 131-140.

Mercado, M., García, M. E., & Quintanilla, J. (2009). Evaluación de los Niveles de Contaminación por Plomo y Arsénico

- en muestras de Suelos y productos Agrícolas
- ndex.php?option=com_content&view=article&id=286&Itemid=428.
- Nigam, A. (2007). Lab manual in biochemistry, immunology and biotechnology. Tata McGraw-Hill Education. Pag 53.
- Swecker, W. S. (1997). Selenium and immune function in cattle. The Compendium on continuing education for the practicing veterinarian (USA).
- Philcor, W., Mallea, A., & Morales, V. (2005). Estudio de los niveles de contaminación por Arsénico en trabajadores metalúrgicos del departamento de Oruro. Biofarbo, 73-78.
- Valverde, G.J., Especiación de arsénico en suelos contaminados tras el accidente minero de aznalcollar, in. Química Analítica. 1999, Universidad de Barcelona: Barcelona. p. 123.
- Prieto García, F., Prieto Méndez, J., Callejas Hernández, J., Gutiérrez, R., Delia, A., & Méndez Marzo, M. A. (2010). Bioacumulación de arsénico en las etapas de desarrollo de la cebada maltera (*Hordeum distichon* L.). Revista mexicana de ciencias agrícolas, 1(1), 37-44.
- Vanguardia. Mantos acuíferos de Coahuila y Durango contaminados por arsénico. [Periodístico] 2010 Agosto, 26 de 2010
- Procedentes de la región cercana al Complejo metalúrgico Vinto. Revista Boliviana de Química, 26(2), 101-110.
- Zolnowski, A. C., Ciecko, Z., & Najmowicz, T. (2010). Arsenic Content in and Uptake by Plants from Arsenic-Contaminated Soil. In Application of Phytotechnologies for Cleanup of Industrial, Agricultural, and Wastewater Contamination (pp. 135-145). Springer Netherlands.
- Nirmala, S. V. S. G., & Reddy, V. S. (2011). A comparative study of pH modulation and trace elements of various fruit juices on enamel erosion: an in vitro study. Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry, 29(3), 205.
- Rosas, I., et al., Arsenic concentrations in water, soil, milk and forage in Comarca Lagunera, Mexico. Water, Air, & Soil Pollution, 1999. 112(1): p. 133-149.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura Ganadería y Pesca y Alimentación). <http://w4.siap.sagarpa.gob.mx/AppEstado/monografias/Forrajes/AlfalfaFo.html>.
- SIACON (Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta). 2015. SIAP-SAGARPA. <http://infosiap.siap.gob.mx/i>