UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO

CARRERA: INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

Tesis previa a la obtención del título de: INGENIERO E INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

TEMA:

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS SAPONINAS EXTRAÍDAS DE *Agave americana* COMO AGENTES PRECIPITANTES Y COADYUVANTES PARA LA REMEDIACIÓN DE AGUAS CONTAMINADAS CON CROMO HEXAVALENTE Y ARSÉNICO.

AUTORES:

GABRIEL ALEXANDER ARCOS PÉREZ
ALEJANDRA ESTEFANÍA VIVAR ROBLES

DIRECTOR:
CHRISTIAN FABRICIO LARENAS URÍA

Quito, mayo del 2015

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD Y AUTORIZACIÓN DE USO DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Autorizamos a la Universidad Politécnica Salesiana la publicación total o parcial de este trabajo de titulación y su reproducción sin fines de lucro.

Además, declaramos que los conceptos y análisis desarrollados y las conclusiones del presente trabajo son de exclusiva responsabilidad de los autores.

Quito, mayo 2015

_____

Gabriel Alexander Arcos Pérez

1720013273

_____

Alejandra Estefanía Vivar Robles

1717163651

DEDICATORIA

El presente trabajo quiero dedicarlo a mi familia que siempre ha estado pendiente de cada paso que he dado en el transcurso de mi vida y han sido mi fuerza e inspiración, a mis amigos que junto con mi familia de una u otra manera han hecho de mí una mejor persona.

Gabriel

Quiero dedicar este logro a mi querido hijo, Damián Alejandro, quien se ha convertido en el motor de mi vida y la ha cambiado en muchos aspectos. A mi querida familia que ha sido mi soporte y ejemplo.

Alejandra

AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestro respeto y la más sincera e infinita gratitud a nuestro tutor, Christian Larenas, por la paciencia, el tiempo concedido y los conocimientos compartidos.

Al Sr. Víctor Cóndor por la donación de plantas de *Agave americana*, ya que sin su valiosa y desinteresada ayuda la ejecución de este trabajo no hubiera sido posible. Al Dr. Carlos López, director del CENTROCESAL, por la donación de un estándar de arsénico.

Agradecemos también al director del Herbario QCA, Álvaro Pérez por participar en la identificación botánica de la planta.

A los ayudantes del laboratorio por compartir con nosotros su tiempo, conocimientos y por la atención cálida que recibimos. Extendemos un agradecimiento especial al Ing. Edison Osorio por su paciencia y apoyo incondicional durante todo este proceso.

Finalmente nuestro más sincero agradecimiento a todos y cada uno de los docentes de la carrera de Biotecnología de los Recursos Naturales por la dedicación y enseñanzas a lo largo de toda la carrera. Un agradecimiento muy especial al docente Wilson Tapia por brindarnos su valiosa ayuda y sus consejos en la etapa final de este proceso.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN **1**

CAPÍTULO 1..... ……

MARCO TEÓRICO **7**

1.1 Situación actual del agua en el Ecuador..... 7

1.2 Disponibilidad del agua..... 8

1.3 Contaminación del agua..... 9

1.4 Legislación del Recurso Hídrico..... 10

1.5 Arsénico 11

1.5.1 Características 11

1.5.2 Toxicología 12

1.5.3 Normativa..... 12

1.5.4 Tecnologías de remoción 13

Oxidación-Reducción:..... 13

Ósmosis inversa: 13

Separación sólido-líquido: 13

Coagulación: 13

Intercambio iónico: 14

Membranas filtrantes:..... 14

Adsorción: 14

1.6 Cromo hexavalente..... 15

1.6.1 Características 15

1.6.2 Toxicología 16

1.6.3 Normativa..... 16

1.6.4 Tecnologías de remoción 16

1.7 Agave americana..... 17

1.7.1 Descripción 17

1.7.2 Usos..... 18

1.8 Saponinas 19

1.8.1 Actividad tensoactiva de las saponinas 19
1.8.2 Métodos de extracción y caracterización 20

CAPÍTULO 2.....

MARCO METODOLÓGICO 21
2.1 Ubicación y selección de los sitios de colecta 21
2.2 Colecta del material vegetal 21
2.3 Preparación del material vegetal 21
2.4 Prueba de espuma..... 22
2.5 Preparación de extractos 23
2.6 Cuantificación de saponinas por HPLC 25
2.7 Remoción de Cr^{+6} empleando extractos de saponinas 27
2.7.1 Preparación de la solución madre de Cr^{+6}..... 27
2.7.2 Preparación de soluciones Buffers 28
2.7.3 Determinación de tiempo y pH óptimos para la remoción de Cr^{+6}..... 28
2.7.4 Determinación de la concentración óptima de saponinas 29
2.8 Remoción de As^{+3} empleando extractos de saponinas..... 30
2.8.1 Preparación de la solución madre de As^{+3} 30
2.8.2 Determinación de tiempo y pH óptimos para la remoción de As^{+3} 30
2.8.3 Determinación de la concentración óptima de saponinas 31

CAPÍTULO 3.....

RESULTADOS Y DISCUSIÓN 33
3.1 Ubicación y selección de los sitios de recolección 33
3.2 Colecta del material vegetal 33
3.3 Preparación del material vegetal 33
3.4 Prueba de espuma..... 34
3.5 Preparación de extractos 34
3.6 Cuantificación de saponinas por HPLC 35
3.7 Remoción de Cr^{+6} empleando extractos de saponinas 40
3.7.1 Preparación de la solución madre de Cr^{+6}..... 40
3.7.2 Preparación de soluciones Buffer..... 41

3.7.3 Determinación de tiempo y pH óptimos para la remoción de Cr^{+6} 42
3.7.4 Determinación de la concentración óptima de saponinas 46
3.8 Remoción de As^{+3} empleando extractos de saponinas 49
3.8.1 Preparación de la solución madre de As^{+3} 49
3.8.2 Determinación de tiempo y pH óptimos para la remoción de As^{+3} 49
3.8.3 Determinación de la concentración óptima de saponinas 53
CONCLUSIONES 56
RECOMENDACIONES 58
BIBLIOGRAFÍA 59
ANEXOS 64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Dotaciones de agua potable (en l/hab/día). 8
Tabla 2. Técnicas para el tratamiento de Cr^{+6} 17
Tabla 3. Métodos de caracterización de saponinas. 20
Tabla 4. Resultados HPLC 36
Tabla 5. Resultados de remoción de $Cr^{+6.}$ 43
Tabla 6. Resultados ANOVA de pH vs tiempo de agitación para Cr^{+6} 46
Tabla 7. Resultados de remoción de Cr^{+6} 47
Tabla 8. Resultados ANOVA concentración de saponinas vs concentración de Cr^{+6} 49
Tabla 9. Resultados de remoción de As^{+3} 50
Tabla 10. Resultados ANOVA de pH vs tiempo de agitación para As^{+3} 53
Tabla 11. Resultados de remoción de As^{+3} 53
Tabla 12. Resultados de ANOVA de concentración de saponinas vs concentración de As^{+3}. 55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Saponinas esteroidales y triterpénicas 19
Figura 2. Colecta del material vegetal..... 21
Figura 3. Preparación del material vegetal..... 22
Figura 4. Prueba de espuma 23
Figura 5. Eliminación de alcohol 24
Figura 6. Extracción de saponinas 25
Figura 7. Equipo HPLC 27
Figura 8. Remoción de Cr+6 empleando saponinas 29
Figura 9. Remoción de As+3 empleando saponinas 31
Figura 10. Resultados de remoción de As..... 32
Figura 11. Resultado de la prueba de espuma..... 34
Figura 12. Curva de calibración de estándares de saponina..... 36
Figura 13. Cromatograma de muestra de Agave americana 37
Figura 14. Cromatograma de estándar S452 a 75 ppm 37
Figura 15. Potenciometro..... 42
Figura 16. Medias de pH vs tiempo de agitación para Cr+6..... 44
Figura 17. Medias de concentración de saponinas vs concentración de Cr +6..... 48
Figura 18. Medias de pH vs tiempo de agitación para As +3 51
Figura 19. Medias de concentración de saponinas vs concentración de As +3 54

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Preparación de material vegetal. A. Secado de la planta a 45°C por 9 días. B. Pesado del material vegetal seco. 64
Anexo 2. Preparación de extracto etanólico. A. Aforo del etanol. B. Maceración del material vegetal con el extracto. 64
Anexo 3. Cromatografía de capa fina. A. Filtrado de la muestra de saponina. B. Corrida de la muestra en la cámara cromatográfica. 65
Anexo 4. Extracción de saponinas. A. Preparación del extracto de benceno. B. Separación del extracto y el crudo de saponinas. 65
Anexo 5. Cromatograma de estándar S452 a 25ppm 66
Anexo 6. Cromatograma de estándar S452 a 50 ppm 67
Anexo 7. Tabla de resultados para establecer las condiciones óptimas para la retención de Cr^{+6} 68
Anexo 8. Tabla de resultados de retención de Cr^{+6} 70
Anexo 9. Tabla de resultados para establecer las condiciones óptimas para la retención de As^{+3} 73
Anexo 10. Tabla de resultados de retención de As^{+3}. 74
Anexo 11. Certificado de identificacion de Agave americana L. 76
Anexo 12. Información del estándar S452 77

RESUMEN

El As^{+3} y el Cr^{+6} están presentes de forma natural en el ambiente, debido a las actividades antropogénicas, principalmente la actividad minera, estos metales se han convertido en contaminantes de alto riesgo ambiental. Por este motivo, se decidió evaluar la actividad de saponinas extraídas de *Agave americana* como agente precipitante y coadyuvante para la remediación de aguas contaminadas con Cr^{+6} y As^{+3}. En este estudio se desarrolló un método de remoción de Cr^{+6} y As^{+3} en modelos de agua con una concentración inicial de 1.25 - 5 ppm y 0.05 - 0.25 ppm respectivamente, utilizando como surfactante natural extractos de raíz de *Agave americana* rica en saponinas. Las condiciones óptimas para remover Cr^{+6}fueron: 37,4 ppm de extracto de saponinas, T=21°C, pH= 7.5 y agitación moderada durante 10 minutos, mientras que para remover As^{+3} las condiciones óptimas fueron: 74,8 ppm de extracto de saponinas, T=21°C, pH = 8.0 y agitación moderada durante 10 minutos. Las saponinas en el extracto se identificaron por HPLC-DAD, comparando los tiempos de retención y los picos característicos con respecto al estándar S452. El Cr^{+6} residual se determinó por espectroscopia de absorción atómica, mientras que el As^{+3} residual se determinó por el Test Arsénico marca Lovibond. Se obtuvo una eficacia aproximadamente del 16% en la remoción de Cr^{+6} y 64,41% en la remoción de As^{+3}, por consiguiente, se sugiere que el *Agave americana* se use como una fuente importante de saponinas para la remoción de As^{+3} y Cr^{+6} presentes en aguas residuales.

ABSTRACT

As^{+3} and Cr^{+6} are naturally present in the environment, due to anthropogenic activities, mainly mining, these metals have become pollutants of high environmental risk. For this reason, we have decided to evaluate the activity of saponins extracted from *Agave americana* as precipitant and adjuvant for the remediation of contaminated water with Cr^{+6} and As^{+3}. In this study a method of removal of Cr^{+6} and As^{+3} in water models with an initial concentration of 1.25 - 5 ppm and 0.05 - 0.25 ppm respectively developed, using natural surfactant root extracts of *Agave Americana* rich in saponins. Optimal to remove Cr^{+6} conditions were 37, 4 ppm saponin extract, T = 21 ° C, pH = 7.5 and gentle stirring for 10 minutes, while for removing As^{+3} the optimal conditions were: 74, 8 of extract saponins, T = 21 ° C, pH = 8.0 and gentle stirring for 10 minutes. The saponins in the extract were identified by HPLC-DAD comparing retention times and the characteristic peaks relative to standard S452. The residual Cr^{+6} was determined by atomic absorption spectroscopy, while the As^{+3} residual was determined by Arsenic Test of Lovibond brand. An efficiency of about 16%, the removal of Cr^{+6} and 64.41% in the removal of As^{+3}, therefore, suggests that the *Agave Americana* used as an important source of saponins was obtained for removal of As^{+3} and Cr^{+6} present in wastewater.

INTRODUCCIÓN

La actividad minera presenta procesos que afectan a la salud y al ambiente. Según Isch (2008) estudios muestran una situación grave para el agua y el ambiente, ya que el agua ha perdido su función principal de fuente de vida, así como su disponibilidad actual y futura para todos los tipos de usos y aprovechamiento de carácter público o productivo.

Se han reportado estudios en los que se utilizan plantas para la remoción de metales pesados, como es el caso de Romero González, y otros, (2005), quienes han desarrollado un modelo para describir la adsorción y reducción de Cr (VI) de una solución acuosa por biomasa de *Agave lechuguilla*, sugiriendo que la adsorción de ese metal toma lugar en los poros internos en tanto que la reacción de reducción ocurre en la superficie externa de la biomasa (Alcázar, Proal, Gallardo, Cháirez, Antileo, & Alvarado, 2014, pág. 2). En la obtención de un surfactante a partir de biomasa residual de *Agave durangensis* descrita por Gonzalez Valdez (2011, pàg 112 - 113) y su aplicación en la remoción de arsénico por la técnica de aglomeración esférica, se obtuvo la remoción de hasta 99.83% en modelos de agua y de 99.99% en aguas naturales.

El objetivo de este estudio es evaluar la actividad de saponinas extraídas de *Agave americana* como agente precipitante y coadyuvante, para la remediación de aguas contaminadas con cromo hexavalente y arsénico trivalente, sustituyendo las sustancias tensoactivas industriales por agentes de superficie activa de origen natural, que constituyen extractos de material vegetal, generando un ahorro económico debido al alto costo de los agentes hidrofobizantes (Alcázar, Proal, Gallardo, Cháirez, Antileo, & Alvarado, 2014, pág. 2) y contribuir así también con el subsanamiento ambiental.

En Ecuador a la “Cabuya Negra” se la encuentra a lo largo del callejón interandino de la región Sierra, frecuentemente como cercas vivas. “El nombre científico

correspondiente de esta planta es *Agave americana L*.” (Cueva, Van Den, & Cabrera, 1999, pág. 80).

“El *Agave americana* ha sido una planta difundida desde hace ya muchos siglos en el continente americano por razones alimenticias, artesanales, ornamentales, religiosas y otros múltiples usos” (López & Pazmiño, 2009, pág. 18).

Para el cumplimiento de los objetivos, el presente estudio se dividió en 4 etapas. La primera etapa consistió en la extracción de saponinas presentes en *Agave americana* por el método de extracción seca, siguiendo la metodología descrita por Monroe. La segunda etapa se basó en la cuantificación de las saponinas extraídas mediante HPLC con detector por arreglo de diodos (DAD) y comparados con los resultados obtenidos del estándar S452. La tercera etapa consistió en evaluar la efectividad de las saponinas extraídas para la remoción de cromo hexavalente mediante espectrofotometría de absorción atómica, y arsénico trivalente utilizando el Test Arsénico (altamente sensible) marca Lovibond. La etapa final consistió en establecer condiciones óptimas de pH, tiempo de agitación y concentración de saponinas extraídas de *Agave americana* para el tratamiento de aguas contaminadas con cromo hexavalente y arsénico trivalente, según los datos obtenidos.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la actividad de saponinas extraídas de *Agave americana* como agente precipitante y coadyuvante para la remediación de aguas contaminadas con cromo hexavalente y arsénico.

Objetivos específicos

- Extraer saponinas presentes en *Agave americana* por el método de extracción seca (Monroe, C, & L, 1958).
- Cuantificar las saponinas extraídas mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (FOX, 2000).
- Evaluar la efectividad de las saponinas extraídas de *Agave americana* para la remoción de cromo hexavalente y arsénico mediante espectrofotometría de absorción atómica y el Test Arsénico (altamente sensible) respectivamente.
- Establecer condiciones óptimas de pH, tiempo de agitación y concentración de saponinas extraídas de *Agave americana* para el tratamiento de aguas contaminadas con cromo hexavalente y arsénico.

Justificación

Los metales pesados se encuentran en forma natural en la corteza terrestre. Estos se pueden convertir en contaminantes si su distribución en el ambiente se altera mediante actividades humanas. En general esto puede ocurrir durante la extracción minera, el refinamiento de productos mineros o por la liberación al ambiente de efluentes industriales y emisiones vehiculares. Además, la inadecuada disposición de residuos metálicos también ha ocasionado la contaminación del suelo, agua superficial y subterránea y de ambientes acuáticos. Los principales contaminantes que han registrado mayores impactos son el el cromo y el arsénico (SEMARNAT, 2009, pág. 1).

> El cromo se encuentra en rocas, plantas, suelos, polvo volcánico, y tejidos humanos y animales. El cromo se manifiesta en el medio ambiente más comúnmente como el trivalente (cromo (III), hexavalente (cromo-(VI). Las fuentes principales del cromo (VI) en el agua potable son descargas de fábricas de acero y celulosa, y la erosión de depósitos naturales de cromo (III) (EPA, 2010, pág. 1).

> El arsénico es una sustancia sólida (metaloide) que existe de forma natural en la corteza terrestre y en las rocas molidas. La exposición de arsénico es natural pero puede ser agravada debido a diversas actividades humanas. En el medio ambiente en general, la ingestión es la vía de absorción principal de arsénico (Moreno, 2007, pág. 1).

> Existen tecnologías tradicionales para la remoción de metales pesados en el agua, como la Técnica de Aglomeración Esférica (TAE), oxidación-precipitación, coagulación/co-precipitación, adsorción, intercambio iónico, entre otras, en las que se utiliza un surfactante comercial, generando desventajas que se asocian principalmente a los

> costos y a la generación de cantidades altas de lodos tóxicos (Gonzalez Valdez, 2011, pág. 55).

Debido a la generación de lodos tóxicos como consecuencia de la aplicación de técnicas convencionales para la remoción de metales pesados presentes en el agua, es necesario analizar la aplicación de un surfactante de origen natural en la remoción de cromo y arsénico, que sea más eficaz en el proceso de remoción y genere residuos poco o nada tóxicos. Según datos reportados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), "el consumo de agua contaminada con metales, residuos químicos y la falta de acceso a servicios mejorados de saneamiento, da como resultado más de 4.000 muertes prematuras al año en América Latina" (OMS, 2012, pág. 1), por ello es imperativo implantar una cultura de cuidado del agua y es nuestra responsabilidad buscar alternativas que sean amigables con el ambiente para preservar las recursos para el uso de las próximas generaciones.

"Se conoce como tensión superficial a las fuerzas de atracción que existen entre las moléculas de la superficie de un líquido en una unidad de longitud" (Burbano García , Burbano de Ercilla, & García Muñoz, 2003, pág. 246).Las saponinas al ser agentes de superficie activa tienen la capacidad de intervenir en los procesos de tensión superficial, haciendo que los sólidos se dispersen y de esta manera los minerales pueden flotar de manera selectiva (Gonzalez Valdez, 2011, pág. 53). Al colocar un agente de superficie activa en un líquido en forma de capa monomolecular adsorbida en la superficie entre las fases hidrofílicas e hidrofóbicas, se obstruye el tráfico de moléculas que van de la superficie al interior de líquido en busca de un estado de menor energía, de esta manera se disminuye el fenómeno de tensión superficial (Bernad Bernad, 2008, pág. 14).

Hipótesis

Hipótesis nula

Las saponinas extraídas de *A. americana,* no tienen capacidad de remover cromo hexavalente y arsénico de aguas contaminadas.

Hipótesis alternativa

Las saponinas extraídas de *A. americana,* tienen capacidad de remover cromo hexavalente y arsénico de aguas contaminadas.

Variables

Variable dependiente

Concentración final de cromo hexavalente y arsénico en el agua

Variable independiente

Concentración de las saponinas en el agua.

CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

1.1 Situación actual del agua en el Ecuador

Debido a la situación actual de los recursos hídricos a nivel mundial y por ende a nivel local, se plantea la necesidad de tomar en consideración su conservación futura, ya que este recurso se está volviendo cada vez más escaso. Situación que se ve más compleja con los procesos de contaminación, por la falta de políticas para una gestión integral de los recursos hídricos, tanto superficiales como subterráneos. Los consumidores de este recurso no consideran el uso racional de dicho elemento y permanentemente lo desperdician (Bermeo Noboa , 2014, pág. 2).

El Ecuador es uno de los países, que en relación con su tamaño, posee mayor disponibilidad y variabilidad de recursos naturales. Las cuencas hidrográficas son unidades del territorio, donde se desarrolla un subsistema hídrico junto con un subsistema económico y social empujado por el hombre, el capital, el trabajo y la tecnología. Sin embargo, la creciente demanda de tierras agrícolas y productos forestales, estimulada por el rápido crecimiento de la población y el desarrollo, pone en peligro a los recursos ambientales y repercute en el problema de la disponibilidad del agua (Cuenca Ramírez , 2014, pág. 1).

En el Ecuador es evidente que la contaminación del agua tiene un mayor impacto cuando se trata de actividades extractivas, principalmente minería y petróleo, y el hecho de que no exista un plan adecuado de saneamiento y tratamiento de aguas residuales, agudiza aún más el problema. Es deber del estado velar por el acceso y la buena calidad del agua, como un elemento importante para la buena salud de la población, pero el derecho universal humano al agua tiene limitaciones políticas, técnicas y organizativas, especialmente en las zonas rurales y periurbanas, ya que existen diferencias significativas entre la dotación de estos servicios para la población que se encuentra en

zonas urbanas y rurales, teniendo las del medio rural un 57,4% de hogares con agua dotada por red pública y apenas un 11,9% con sistemas de eliminación adecuada de excretas (CAMAREN, 2014, pág. 8).

1.2 Disponibilidad del agua

La precipitación media anual es de 2. 274 mm y suponen 645 km^3/año en todo el territorio continental. En condiciones de régimen natural, es decir sin obras artificiales de regulación y con una garantía del 90%, Ecuador continental cuenta con dos grandes vertientes hidrográficas:

- Vertiente del Pacífico: 5.300 m^3/habitante/año.
- Vertiente Amazonas: 91.600 m^3/habitante/año.

En la tabla 1 se describe la distribución del agua potable en las diferentes regiones del país.

En total el país está dividido en 31 Sistemas Hidrográficos, incluidas las Islas Galápagos, con recursos hídricos internos renovables de 432 km^3/año. (FAO, 2014). La disponibilidad en el Pacífico, siendo alta, no está muy alejada del valor crítico de 2.000 m^3/habitante/año que es considerada peligrosamente baja en años de escasa precipitación por el Banco Mundial y la Organización de las Naciones Unidas. (Secretaría del Agua , 2014).

Tabla 1.

Dotaciones de agua potable (en l/hab/día).

Región	Dotaciones de agua potable (l/hab/día)
Costa	450
Sierra	350
Oriente	380
Nivel nacional	420

Nota: (Cuenca Ramírez , 2014).

En Ecuador de cada 100 litros de agua el consumo se distribuye de la siguiente manera:

- 81.1 en actividades agrícolas.
- 12. 3en uso doméstico
- 6.3 en industria
- 0.3 en otros usos (Guzmán , 2011, pág. 2).

1.3 Contaminación del agua

> El agua superficial se contamina principalmente por fuentes domésticas de todo el país, la mayoría de los ríos cercanos a las áreas urbanas tienen altos niveles de DBO (Demanda Bioquímica de Oxígeno), nitrógeno y fósforo, debido a la presencia de diversos contaminantes como grasas, aceites, detergentes, materia orgánica y varios microorganismos. La deforestación y el uso inadecuado del terreno han acelerado la erosión de la tierra y han incrementado las cargas de sedimentos en los ríos y arroyos (Guzmán , 2011, pág. 3).

Las aguas residuales que provienen de la actividad minera de gran parte del territorio nacional, se caracterizan por contener elevadas cantidades de metales pesados, como por ejemplo el arsénico y el cromo hexavalente, que afectan a la salud humana, flora y fauna. El arsénico es liberado al ambiente a partir de sulfuros minerales debido a la exposición de procesos de meteorización durante las tareas de excavación. La fundición de cobre y oro y la combustión de carbón producen polvo de arsénico (Fraser, 2012). “El cromo hexavalente se utiliza en operaciones de flotación de ciertos minerales como el plomo, el zinc y el cobre” (Anco Estrella , 2004, pág. 17). “Los sedimentos generados por esta actividad, son arrastrados cientos de kilómetros río abajo y terminan depositados en las zonas de manglar y el océano pacífico” (Guzmán , 2011, pág. 3). “Las provincias con potencial minero son: Esmeraldas, Imbabura,

Zamora, Napo, Morona Santiago y El Oro que lidera la extracción de minerales con el 85%" (Campoverde , 2013, pág. 1).

La presencia de arsénico en el agua representa una gran amenaza para la salud pública, ya que la exposición prolongada al arsénico a través del consumo de agua y alimentos contaminados puede causar cáncer y lesiones cutáneas, además se ha asociado a problemas de desarrollo, enfermedades cardiovasculares, neurotoxicidad y diabetes (OMS, 2012). La ingesta de cromo hexavalente provoca trastornos y úlceras a nivel estomacal, convulsiones, daños al hígado y riñón, si el contacto es externo produce úlceras en la piel (Anco Estrella , 2004, pág. 18).

1.4 Legislación del Recurso Hídrico

En el Ecuador, la Comisión Permanente de Soberanía Alimentaria y Desarrollo del Sector Agropecuario y Pesquero ha desarrollado el proyecto de Ley de Recursos Hídricos, Usos y Aprovechamiento del Agua, orientada a modificar el *statu quo* del agua, estableciendo las condiciones legales, administrativas e institucionales para la equidad en el acceso al agua en el marco de la Constitución y la ley, promoviendo el acceso legal y responsable a este patrimonio. También se restringen las prácticas para la apropiación de hecho del agua, de las fuentes y de los ecosistemas que almacenan agua. Promueve el aprovechamiento sustentable de los acuíferos y aguas subterráneas, destacando la responsabilidad de los usuarios en su protección y conservación; así como el tratamiento previo de las descargas (Comisión Permanente de Soberanía Alimentaria y Desarrollo del Sector Agropecuario y Pesquero, 2014).

Además existe la Norma de Calidad Ambiental y de Descarga de Efluentes aplicada al Recurso Agua, contenida en el Texto Unificado de la Legislación Ambiental Secundaria (TULAS), dictada bajo el amparo de la Ley de Gestión Ambiental y del Reglamento a la Ley de Gestión Ambiental para la Prevención y Control de la Contaminación Ambiental y se somete a las disposiciones de éstos, es de aplicación

obligatoria y rige en todo el territorio nacional. Dicha norma técnica determina o establece:

- Los límites permisibles, disposiciones y prohibiciones para las descargas en cuerpos de aguas o sistemas de alcantarillado.
- Los criterios de calidad de las aguas para sus distintos usos.
- Métodos y procedimientos para determinar la presencia de contaminantes en el agua (Chang Gómez, 2014, pág. 35).

1.5 Arsénico

El arsénico (As) es el elemento 33 de la tabla periódica, se encuentra distribuido en la corteza terrestre, en agua marina y dulce, en animales y plantas. Es liberado al aire por los volcanes y se encuentra, de forma natural, como contaminante en los pozos de aguas profundas, además es un subproducto de las minas (Bataller Sifre, 2004, pág. 183).

1.5.1 Características

El arsénico es un metaloide de color plateado, brillante, amorfo, de olor aliáceo y se oxida fácilmente en presencia de humedad. Se funde a 817°C y su punto de ebullición es de 615°C (sublima) (SIAFA, 2014). Se lo utiliza en la fabricación de plaguicidas, colorantes, vidrio, perdigones, conservantes de madera, fungicidas y herbicidas. En veterinaria se utilizan preparados pentavalentes como estimulantes del metabolismo. Está presente en sales inorgánicas de arsénico trivalente y pentavalente como arsenatos y arsenitos, que resultan ser altamente tóxicos, además presentan diversas formas alotrópicas: gris, negro y amarillo (Melo & Cuamatzi, 2007, pág. 374).

1.5.2 Toxicología

"El arsénico puede ingresar al cuerpo humano por diferentes vías, la vía inhalatoria es importante a nivel laboral, pero la digestiva es la más común. El arsénico pentavalente se absorbe mejor en el intestino por ser más liposoluble que el arsénico trivalente" (Bataller Sifre, 2004, pág. 184). "El miocardio puede presentar degeneración, puede existir edema cerebral, el hígado se puede tornar duro, blando o graso" (Repetto Jiménez & Repetto Kuhn, 2009, pág. 482).

> El Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (CIIC), ha clasificado al arsénico y sus derivados como cancerígenos para el ser humano. Cuando una persona ha estado expuesta a elevados niveles de arsénico inorgánico durante un tiempo prolongado, se observan cambios de pigmentación en la piel, callosidades en las palmas de las manos y en plantas de pies (hiperqueratosis), efectos que pueden ser precursores de cáncer de piel. También puede causar cáncer de vejiga y de pulmón (OMS, 2012).

1.5.3 Normativa

El arsénico es considerado por la OMS como una de las diez sustancias químicas más preocupantes para la salud pública, por tal motivo se han establecido valores referenciales en sus "Guías para la calidad del agua potable", con la finalidad de disminuir la exposición a dicha sustancia. En la actualidad el el límite recomendado para la concentración de arsénico en el agua potable es de 10 μg/L, aunque este valor de referencia se considera provisional dadas las dificultades de medición y las dificultades prácticas relacionadas con la eliminación del arsénico del agua destinada para beber. Cuando hay problemas para respetar el valor guía, los Estados Miembros pueden establecer límites más elevados teniendo en cuenta las circunstancias locales, los recursos disponibles y los riesgos asociados a fuentes con

bajos niveles de arsénico contaminadas microbiológicamente (OMS, 2012). En Ecuador la Norma INEN 1 108:2011, para agua potable, establece como límite máximo permitido 0,01 mg/L de arsénico.

1.5.4 Tecnologías de remoción

Oxidación-Reducción:

Para untratamiento efectivo de remoción de arsénico se debe incluir una etapa de oxidación, para convertir el arsenito en arsenato. La oxidación puede llevarse a cabo mediante aireación simple incorporando oxígeno, se puede emplear otros agentes oxidantes como el cloro, hipoclorito, ozono, permanganato de potasio, peróxido de hidrógeno y la radiación utilizando generadores de UV en conjunto con los productos químicos antes mencionados (D'Ambrosio., 2005, pág. 1).

Ósmosis inversa:

La ósmosis inversa se produce cuando se ejerce presión para invertir el flujo osmótico normal. Al aplicar presión, el agua es forzada a pasar a través de la membrana semipermeable desde el lado más concentrado (agua cruda), hacia el lado menos concentrado (agua tratada), quedando retenidos en la membrana, por su tamaño, los iones del arsénico. La eficiencia en la remoción de As de los equipos de ósmosis inversa puede llegar al 98% (Bournod, Cabezas , & Pérez, 2010, pág. 10).

Separación sólido-líquido:

Los procesos de precipitación, coprecipitación, adsorción e intercambio iónico pueden transferir el arsénico de la fase disuelta a la fase sólida. Los sólidos formados *in situ*, a través de la precipitación o coagulación, se deben separar del agua por sedimentación o filtración (Castro de Esparza , 2005, pág. 2).

Coagulación:

Para este tratamiento se requiere una preoxidación de As^{+3} a As^{+5}. Las sustancias coloidales disueltas o suspendidas se neutralizan mediante la adición de sustancias

insolubles en el agua, de esta manera se forman partículas mayores o aglomerados que pueden ser eliminadas por sedimentación o filtración. El tipo, la dosis del coagulante y el pH influyen en la eficiencia del proceso (Estrada Orozco, 2009, pág. 1).

Intercambio iónico:

El intercambio iónico es un proceso físico y químico en el cual los iones se intercambian de manera reversible entre una fase liquida y una sólida, donde no hay un cambio permanente en la estructura del sólido. Remueve efectivamente arsénico en un rango de pH entre 8 y 9. La solución se pasa a través del lecho hasta que se satura y comienza la fuga de contaminantes. En ese momento la resina, que es la fase sólida, se reactiva con una solución de regenerante que lleva los contaminantes retenidos para disposición como efluente. Las resinas más utilizadas para la remoción del arsénico son los sulfatos selectivos, mientras que los nitratos selectivos también remueven As (III) (Miliarium , 2008, pág. 2).

Membranas filtrantes:

Las membranas filtrantes permiten eliminar el arsénico disuelto. Algunas membranas tienen la cualidad de permear el agua y retener partículas de varias micras de diámetro, mientras que otras pueden retener iones como en el caso de la ósmosis inversa. Otras técnicas de este tipo son la nanofiltración y electrodiálisis. Mediante nanofiltración se ha llegado a eficiencias de 90% de remoción de As (V) y la electrodiálisis consigue remociones de 80% de As total (Gonzalez Valdez, 2011, pág. 20).

Adsorción:

La adsorción es un proceso de transferencia de masa, basado en la capacidad de determinadas sustancias en la retención de moléculas sobre su superficie de una manera más o menos reversible. La capacidad de adsorción depende de la superficie específica del material, la naturaleza del enlace entre sustancia adsorbida y adsorbente, y tiempo de contacto entre sustancia y adsorbente. El As puede ser adsorbido en la superficie de varios adsorbentes, como pueden ser:

• La alúmina activada es altamente selectiva para As (V), lo que constituye un problema para su regeneración, con pérdida de 5 a 10% de la capacidad de adsorción por ciclo. (Castro de Esparza , 2005, pág. 2). Alúmina activada, con una composición similar a Al_2O_3, en el cual el agua a tratar se pasa a través de un lecho fijo que contiene a dicha sustancia. Es muy efectivo para remover As (V) y el pH debe estar cerca de 8.

• Hierro y otros óxidos.

• Adsorbentes naturales: bentonitas, sílices, etc. (Bournod, Cabezas , & Pérez, 2010, pág. 11).

1.6 Cromo hexavalente

El cromo es uno de los elementos más abundantes sobre la corteza terrestre, ocupa el puesto 21, es un metal de transición, duro, presenta una estructura cúbica centrada en el cuerpo, su principal mineral es la cromita ($FeCr_2O_4$) (De Agustín Vázquez, Ibarra Sixto, Martínez , & Sáez, 2004, pág. 183).

1.6.1 Características

Es un metal quebradizo de color gris plateado brillante, es muy resistente a la corrosión, tiene una masa atómica de 51,996; su punto de fusión es de 1.857 °C y su punto de ebullición de 2.672 °C. Los estados de oxidación +4 y +5 son poco frecuentes, mientras que los estados más estables son +2 y +3. También forma compuestos en estado de oxidación +6, como es el caso de los cromatos que contienen el ion CrO_4^{2-}. El óxido de cromo (VI) es un agente oxidante sumamente fuerte, especialmente para la materia orgánica, se disuelve en el agua formando ácido crómico que se utiliza como un potente agente oxidante limpiador de material de vidrio (De Agustín Vázquez, Ibarra Sixto, Martínez , & Sáez, 2004, pág. 184).

1.6.2 Toxicología

El cromo presente en el aire, suelo y agua, resulta de procesos naturales y actividades humanas. La mayor parte del cromo presente en el suelo es insoluble en agua y los compuestos de cromo soluble pueden permanecer por largo tiempo en el agua antes de sedimentar. El cromo Cr^{+6} ingresa al cuerpo de manera más fácil y pasa al estado trivalente rápidamente por reducción, respirar de forma continua aire con Cr^{+6} produce perforaciones de tabique nasal con pérdidas de sangre, úlceras o asma. La ingesta de cromo hexavalente provoca úlceras estomacales, convulsiones, daños al hígado y riñón o úlceras en la piel cuando hay contacto externo (Anco Estrella , 2004, pág. 18).

Si se ingieren sales hexavalentes de cromo aparece una intensa irritación a nivel gastrointestinal, con náuseas, vómitos, diarreas, hemorragias gastrointestinales, que en el peor de los casos, provoca pérdida masiva de fluidos, shock, inconciencia y muerte (Mencías Rodríguez & Mayero Franco, 2000, pág. 631).

1.6.3 Normativa

En Ecuador la Norma INEN 1 108:2011, para agua potable, establece como límite máximo permitido 0,05 mg/L de cromo. Las Normas Internacionales para el agua potable de la OMS, establecida en 1958 y las "Guías para la calidad del agua potable", concuerdan con este valor referencial.

1.6.4 Tecnologías de remoción

Para mitigar o eliminar el cromo en una solución final, se requiere la presencia de un agente reductor y un neutralizante, para que se lleve a cabo el cambio del estado de valencia de +6 a +3 y de esta manera se precipite el cromo en un compuesto químico

(Anco Estrella , 2004, pág. 22). En la tabla 2 se resumen las diferentes técnicas para remover cromo.

Tabla 2.

Técnicas para el tratamiento de Cr^{+6}

Reactivo químico	**Desempeño**
Cloruro de Bario ($BaCl_2$)	Precipita el Cr^{+6}, se efectúa en medio ácido y se obtiene la precipitación de cristales de cromato de bario. Técnica costosa.
Sulfuro de sodio (Na_2S)	Permite que el Cr^{+6} se reduzca a Cr^{+3}, se adiciona un neutralizante y se desplaza el Cr^{+3}de la solución final.
Sulfato ferroso ($FeSO_4$)	Reduce el Cr^{+6} a Cr^{+3}, el ion ferroso se oxida a férrico y con la adición de un neutralizante se precipitan los hidróxidos.

Nota: (Anco Estrella , 2004).

1.7 Agave americana

El género *Agave* es originario de América, cuenta con 200 especies, de las cuales 150 se encuentran en México. El género se distribuye desde el sur de Estados Unidos hasta Colombia y Venezuela incluyendo todas las islas del Caribe. Estas plantas alcanzan su madurez entre los 10 y 25 años (Gonzalez Valdez, 2011, pág. 44).

1.7.1 Descripción

Es una planta perenne con hojas dispuestas en espiral y arregladas en rosetas en el ápice de un tallo corto. Las hojas presentan un color verde grisáceo, son suculentas, fibrosas, con base dilatada y carnosa, pueden tener forma linear, ovalada o lanceolada; los márgenes muestran una

especie de dientes córneos y en el ápice tienen una espina. La inflorescencia surge del meristemo apical, tiene apariencia espigada, son bisexuales, tubulares, con ovario ínfero, presenta seis tépalos, seis estambres muy largos al igualo que el estilo. Los estambres se desarrollan y maduran antes que los carpelos y el fruto es una capsula seca con semillas negras y aplanadas (García Mendoza , 2007, pág. 15).

En el género *Agave* se han identificado varias sapogeninas, como hecogenina, manogenina, yucagenina, agavogenina, sarsasapogenina, texogenina, esmilagenina, gotogenina, tigogenina, agave saponina C, saponina G y clorogenina. La savia del interior de sus hojas contiene cristales en forma de aguja de oxalato cálcico *(raphides)*, aceites volátiles, saponinas, saponinas esteroidales, goma de agave, esteroles, terpenos, vitaminas y otros componentes. Sus hojas, frutos y raíces tienen saponinas esteroidales (Hernández, Lugo, Díaz , & Villanueva , 2005, pág. 9).

1.7.2 Usos

Uno de los productos más importantes que se extraen de esta planta es el chawarmishki, el tallo del penco es conocido como el chawarquero. Su madera es tan dura que puede ser utilizada para la construcción de casas, en la fabricación de muebles y artesanías, todo tipo de bisutería e inclusive instrumentos musicales. Además de sus pencos se pueden obtener hilos para elaborar costales, tapetes, redes de pesca y cordeles. Las raíces se utilizaban para fabricar cepillos, escobas y canastas (Sampedro Albán, 2009, pág. 11).

1.8 Saponinas

Las saponinas corresponden a un amplio grupo de heterósidos y se caracterizan por sus propiedades tensoactivas (forman disoluciones espumosas en el agua), son compuestos orgánicos que contienen uno o varios azúcares. Además poseen propiedades hemolíticas y la mayoría son tóxicas para animales de agua fría, principalmente peces. Según la naturaleza de la genina se clasifican en saponinas esteroidales y triterpénicas, y su diferencia radica en que las saponinas esteroidales han eliminado tres de sus radicales metilos, mientras que las saponinas triterpénicas los mantienen intactos (Bruneton , 2001, pág. 667).

Saponinas esteroidales y triterpénicas

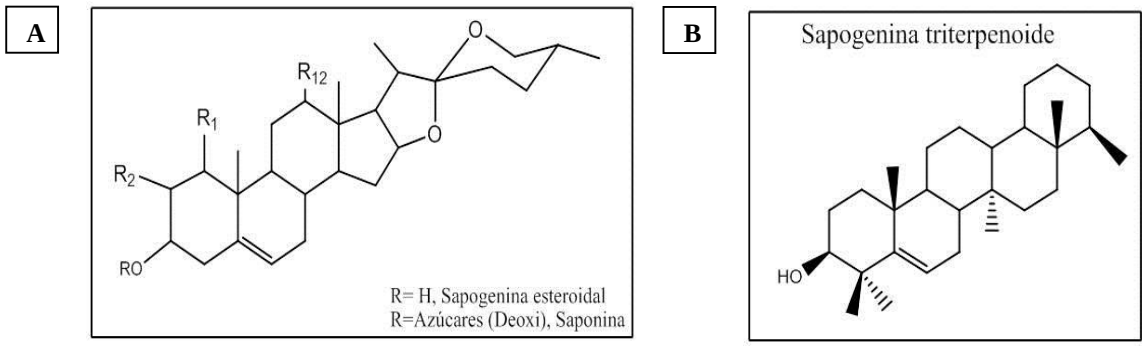


Figura 1. En el gráfico A podemos apreciar un ejemplo de saponina esteroidal, y en el gráfico B se observa un ejemplo de saponina triterpénica.

Fuente: (UNAL, 2015)

1.8.1 Actividad tensoactiva de las saponinas

Las saponinas presentan en su estructura un aglicón soluble en lípidos y una cadena de azúcares soluble en agua, debido a esto y gracias a que poseen una tensión superficial menor que la del agua actúan como agentes de superficie activa y les confiere propiedades de detergente, humectante, emulsificante y espumante. Modifican la tensión superficial, aumentándola o disminuyéndola, permitiendo así el control de

procesos interfaciales como la dispersión de sólidos, la flotación selectiva de minerales, la detergencia, la protección de superficies metálicas y la lubricación (Gonzalez Valdez, 2011, pág. 49).

1.8.2 Métodos de extracción y caracterización

Para la extracción de saponinas se utilizan alcoholes como el metanol o el etanol, o bien se pueden recurrir a disoluciones hidrometanólicas después de realizar un desengrase con éter de petróleo. Los disolventes polares solubilizan varios compuestos, por eso es necesario hacer una mezcla de agua con n-butanol para solubilizar las saponinas que posteriormente se precipitan al añadir al medio un disolvente como el éter etílico (Bruneton , 2001, pág. 670). En la tabla 3 se explican los métodos de caracterización de saponinas.

Tabla 3.

Métodos de caracterización de saponinas.

Caracterización		
Índices	Hemolítico. Ruptura de membranas en eritrocitos.	Espuma. Persistente en una decocción de agua.
Reacciones coloreadas	Reacción de Liebermann. Anhídrido acético en medio sulfúrico	Aldehído anísico con vainilla y otros aldehídos aromáticos en un medio ácido mineral fuerte.
Métodos cromatográficos	Cromatografía de capa fina. Control de calidad de drogas con saponinas.	Cromatografía liquida en alta resolución. Controles de pureza y valoración.

Nota: (Bruneton , 2001)

CAPÍTULO 2

MARCO METODOLÓGICO

2.1 Ubicación y selección de los sitios de colecta

Según datos de FAOSTAT (FAO), existe la presencia de *Agave americana*, en diferentes zonas interandinas del país como son: la Cordillera Occidental , Imbabura; partes interandinas de las provincias de Cotopaxi, Tungurahua, Chimborazo, Loja y en las zonas áridas de la Costa como Manabí, Guayas y la península de Santa Elena (FAO, 2011). Entre los límites de Pichincha e Imbabura, en las comunidades de Llano Chico y Llano Grande existe una producción significativa de *Agave americana*.

2.2 Colecta del material vegetal

Se seleccionaron 8 plantas adultas y 11 plántulas, de las cuales se tomó 1 muestra para enviarla al Herbario de la PUCE para su registro e identificación.

Colecta del material vegetal

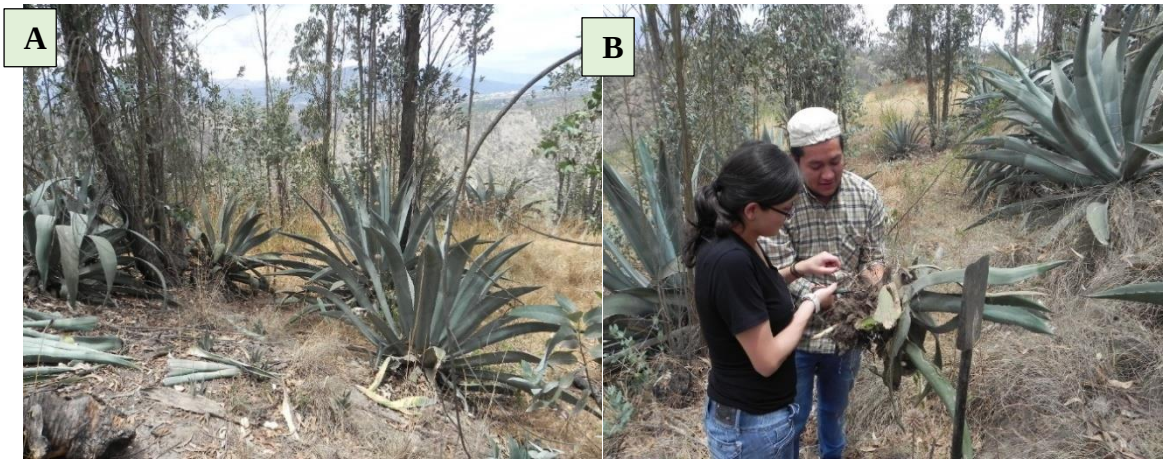


Figura 2. Reconocimiento del área de trabajo en la comuna de Cocotog. A. Selección del material vegetal. B. Colecta del material vegetal.

Elaborado por: (Arcos, Vivar, 2014).

2.3 Preparación del material vegetal

Una vez colectadas las raíces de *Agave americana* se realizó un lavado y posteriormente se las almacenó en refrigeración a 4°C.

Se realizó el secado de las raíces a una temperatura de 45°C, hasta peso constante. Una vez seco el material vegetal se efectuó una operación de molienda y tamizado para facilitar el contacto con el disolvente en el proceso de maceración.

El tamizaje se realizó en un agitador marca DURATAP.

Preparación del material vegetal

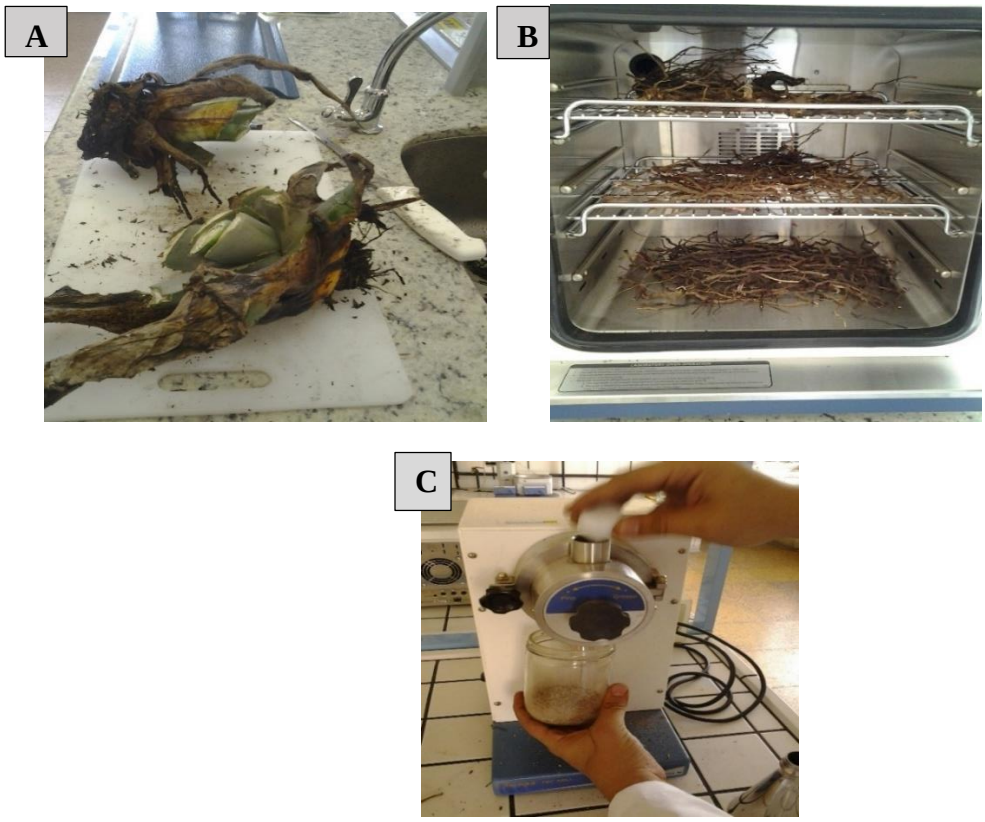


Figura 3. Preparación de raíces para la extracción de crudo de saponinas. A. Lavado de raíces. B. Secado en estufa de raíces. C. Molienda de raíces.

Elaborado por: (Arcos, Vivar, 2014).

2.4 Prueba de espuma

Se colocaron en un matraz Erlenmeyer 10g de muestra de la raíz de *Agave americana* con 150 ml de agua destilada a 50°C, inmediatamente se realizó una agitación vigorosa por 5 minutos. La prueba se considera positiva si la espuma generada perdura por más de 5 minutos como muestra la figura 4. Esta prueba fue realizada con la finalidad de determinar la presencia de saponinas. (Ortega, 2015, pág. 80).

Prueba de espuma

Figura 4.Previo a una agitación durante 5 minutos, se observa la presencia de saponinas en la muestra.

Elaborado por: (Arcos, Vivar, 2014).

2.5 Preparación de extractos

La extracción se desarrolló siguiendo la técnica descrita por (García Almanza, 2008, pág. 32), maceración en 300 ml de etanol al 70% en contacto con 50g de muestra, en oscuridad. Los parámetros fueron:

- Agitación: 100rpm
- Temperatura de maceración: ambiente
- Tiempo: 72 horas.

Para la eliminación del alcohol se efectuó una evaporación al vacío en un rotaevaporador marca TECNAL, seguido de un baño maría para una eliminación completa del etanol.

Eliminación de alcohol

Figura 5. Evaporación al vacío del alcohol presente en la muestra.

Elaborado por: (Arcos, Vivar, 2014).

El extracto obtenido se disolvió en etanol acuoso al 50%, se le añadió igual volumen de benceno saturado con etanol al 50% y se agitó vigorosamente en un embudo de separación, liberando el gas esporádicamente y dejando reposar un período de tiempo de 20 a 30 minutos hasta que se obtengan las dos fases, como se muestra en la figura 6, la última extracción se la deja reposar durante 24 horas. Para la preparación del disolvente extractor de grasas y colorantes se hicieron pruebas con xileno y benceno saturados con etanol y se obtuvo mejores resultados con benceno (menor emulsificación), se da una mejor separación entre las fases. Se realizó cuatro veces el

proceso de extracción y se eliminó en cada paso la fase bencénica con las grasas y colorantes vegetales. El volumen utilizado de disolvente fue 50 ml de benceno saturado con 10 ml de etanol en cada extracción. La fase hidroalcohólica se evaporó hasta sequedad.

Extracción de saponinas

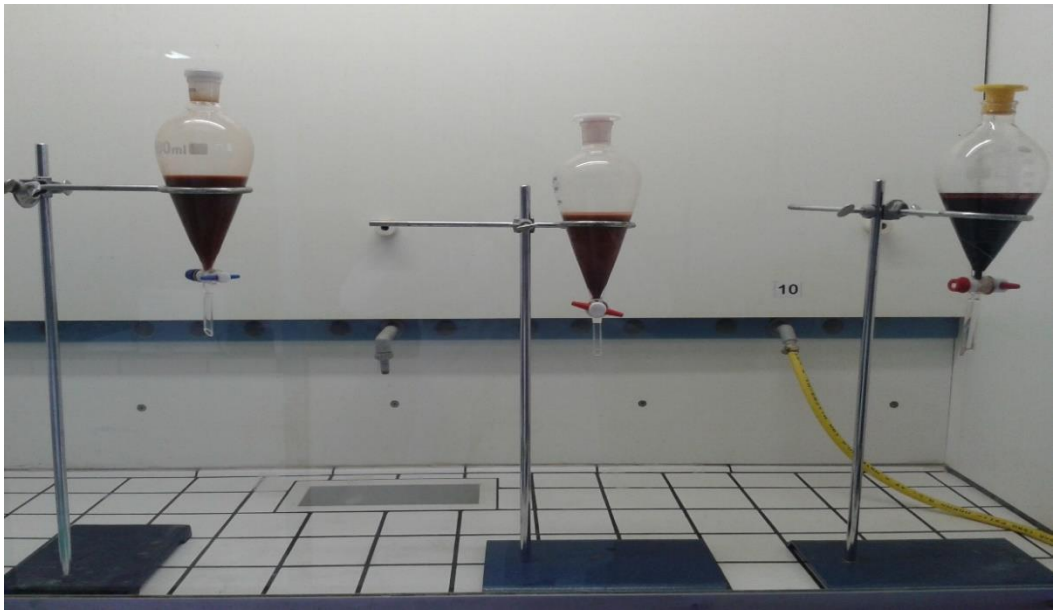


Figura 6. Separación entre el crudo de saponinas y el disolvente.

Elaborado por: (Arcos, Vivar, 2014).

2.6 Cuantificación de saponinas por HPLC

La cuantificación de saponinas se desarrolló por HPLC, empleando el equipo marca Waters, que cuenta con un detector de arreglo de Diodos.

Se efectuó una filtración al vacío y desgasificación de los componentes de la fase móvil: Agua y Acetonitrilo.

Se preparó una solución madre de la saponina estándar a una concentración de 1000 ppm, para lo cual se pesaron 100 mg del estándar S452 y se disolvió en 100 mL de la fase móvil. A partir de esta solución madre, se prepararon 4 soluciones de 25 mL con diferente concentración del estándar.

La muestra de saponina fue diluida 500 veces antes de ser colocada en el vial.

Las condiciones para determinar el contorno de saponinas fueron:

- Análisis: HPLC/ DAD
- Extractos: 20 µL
- Método: Isocrático, fase móvil: acetonitrilo: agua (70:30).
- Tiempo: 15 minutos.
- Flujo: 1 mL
- Columna: Analytical C18 (4,6×150mm, 5µm)
- λ: 297nm.
- Detector: Arreglo de Diodos (DAD), Waters
- Intervalo: 220-400 nm
- Estándar: S452
- Número de muestras: 1 muestra y 5 estándares (Gnoatto, Schenkel, & Bassani , 2005, pág. 4).

Equipo HPLC

Figura 7. Corrida de cuantificación de saponinas en cromatografía líquida de alta eficiencia.

Elaborado por: (Arcos, Vivar, 2015).

Para determinar la concentración de saponinas se realizó una curva de calibración con el estándar S452 marca Sigma que corresponde a *Quillaja saponaria* (Quillay), el mismo que contiene sapogeninas (20 – 35%) al igual que la muestra de *Agave americana*. Se analizó 1 muestra y 5 estándares de diferentes concentraciones (0, 25, 50, 75 y 100 ppm).

2.7 Remoción de Cr^{+6} empleando extractos de saponinas

2.7.1 Preparación de la solución madre de Cr^{+6}

- Se pesó 0,2829 de $K_2Cr_20_7$ (Dicromato de potasio).
- Se aforó con agua destilada en un balón de 100 ml para obtener una solución madre de 1000 ppm.
- Se tomaron 2,5 mL de la solución madre para preparar un volumen de 1000 mL con una concentración 2,5 ppm.

2.7.2 Preparación de soluciones Buffers

- Se realizaron tres soluciones buffers con pH 7, 7.5 y 8 basados en la lista "buffer solutions giving round values of pH al 25°C" (David R. Lide, ed., 2005, pág. 46).
- Se corroboró el pH de cada una de las soluciones utilizando un potenciómetro calibrado Mettler Toledo.

2.7.3 Determinación de tiempo y pH óptimos para la remoción de Cr^{+6}

- Se dispensaron 100 mL de la solución madre de Cr^{+6} en cada de uno de veinte y cuatro Erlenmeyers.
- Se reguló el pH de las soluciones en series de ocho Erlenmeyers con pH 7, pH 7.5 y pH 8 respectivamente.
- Se comprobó que la concentración inicial de Cr^{+6} era de 2.5 ppm en el Espectrofotómetro de Absorción Atómica marca VARIAN, bajo los siguientes parámetros:
  - ✓ Rango: 0,06-15 ppm
  - ✓ λ: 357.9
  - ✓ Lámpara: Photron Hollow Cathode Lamp. 7 m A Cr. Serial No. HHKO557 Parte No. P812C
  - ✓ Combustible: Acetileno
  - ✓ Oxidante: Aire
- Se añadió 1 mL de saponinas a cada Erlenmeyer
- Se agitó cada una de las soluciones a diferentes tiempos (10, 20, 40 y 60 minutos).
- Se separó la espuma generada del líquido restante, utilizando un embudo de separación.
- Se midió la concentración final de Cr^{+6} en el Espectrofotómetro de Absorción Atómica.

Remoción de Cr^{+6} empleando saponinas

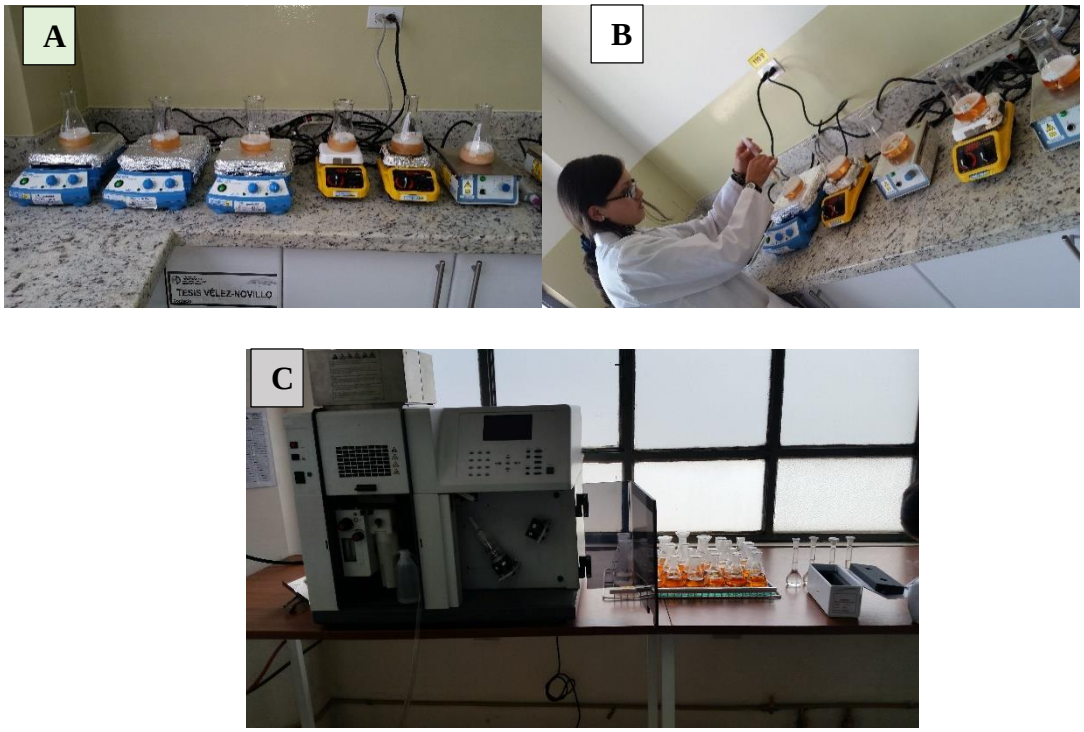


Figura 8. Determinación de las condiciones óptimas para remover Cr+6, utilizando extracto de saponinas. A. Agitación de la muestra + saponinas. B. Separación de la espuma y el líquido de la muestra. C. Medida de concentración en el espectrofotómetro de absorción.

Elaborado por: (Arcos, Vivar, 2015).

2.7.4 Determinación de la concentración óptima de saponinas

- Una vez determinado el pH y tiempo adecuados, se realizaron nuevas soluciones con diferentes concentraciones de Cr^{+6}: 1.25, 2.5 y 5 ppm, a partir de solución madre de 1000 ppm.
- Se dispensaron 100 mL de la solución de Cr^{+6}con diferentes concentraciones en cada de uno de veinte y siete Erlenmeyers.
- Se reguló el pH de las soluciones.
- Se añadieron diferentes volúmenes de saponina: 1 mL, 2 mL y 3 mL.
- Se comprobó por absorción atómica la concentración inicial de Cr^{+6}.

- Se agitó cada una de las soluciones durante el tiempo determinado.
- Se separó la espuma generada del líquido restante, utilizando un embudo de separación.
- Se midió la concentración final de Cr^{+6} en el Espectrofotómetro de Absorción Atómica.

2.8 Remoción de As^{+3}empleando extractos de saponinas

2.8.1 Preparación de la solución madre de As^{+3}

- Se tomó 1 mL de un estándar de Arsénico de 1000 ppm y se aforó en un balón de 100 mL para obtener una solución madre de 10 ppm.
- Se tomó 10 mL de la solución madre para preparar un volumen de 1000 mL con una concentración de 0.1 ppm.

2.8.2 Determinación de tiempo y pH óptimos para la remoción de As^{+3}

- Se dispensaron 75 mL de la solución madre de As en cada de uno de veinte y cuatro Erlenmeyers.
- Se reguló el pH de las soluciones, ocho Erlenmeyers con pH 7, pH 7.5 y pH 8.
- Se añadió 1 mL de saponinas a cada Erlenmeyer
- Se agitó cada una de las soluciones a diferentes tiempos (10, 20, 40 y 60 minutos).
- Se separó la espuma generada del líquido restante, utilizando un embudo de separación.
- Se midió la concentración final de As utilizando el Test Arsénico (altamente sensible) marca Lovibond. Técnica:
    - Muestra preparada: Se dispensó 60 ml.
    - Reactivo As-1: Se añadió 2 gotas y se agitó ligeramente.

- Reactivo As-2: Se agregó 1 cucharada y se agitó ligeramente hasta que se haya disuelto completamente.
- Reactivo As-3: Se completó con 1 cucharada y se cerró inmediatamente el frasco de reacción con la tapa roscada.
- Se desplegó el fijavarillas integrado en la tapa rosca hacia arriba, se introdujo inmediatamente en la abertura la varilla analítica.
- Se dejó en reposo durante 20 minutos, agitando ligeramente en forma circular, evitando el contacto de la varilla con la muestra.
- Después de los 20minutos se extrajo la varilla analítica, se sumergió inmediatamente en agua eliminando el exceso de líquido.
- Se clasificó el color de la zona de reacción de acuerdo con un campo cromático de la tarjeta colorimétrica.

Remoción de As^{+3}empleando saponinas

Figura 9. Determinación de las condiciones óptimas para remover As, utilizando extractos de saponinas. A. Test de Arsénico. B. Medición de las muestras.

Elaborado por: (Arcos, Vivar, 2015).

2.8.3 Determinación de la concentración óptima de saponinas

- Una vez determinado el pH y tiempo adecuados, se realizaron nuevas soluciones con diferentes concentraciones de As^{+3}: 0.05, 0.1 y 0.25 ppm, a partir de solución madre de 10 ppm.

- Se dispensó 75 mL de la solución de As^{+3} con diferentes concentraciones en cada de uno de veinte y siete Erlenmeyers.
- Se reguló el pH de las soluciones.
- Se añadió diferentes volúmenes de saponina: 1 mL, 2 mL y 3 mL.
- Se agitó cada una de las soluciones durante el tiempo determinado.
- Se separó la espuma generada del líquido restante, utilizando un embudo de separación.
- Se midió la concentración final de As^{+3} utilizando el Test Arsénico (altamente sensible) marca Lovibond.

Resultados de remoción de As

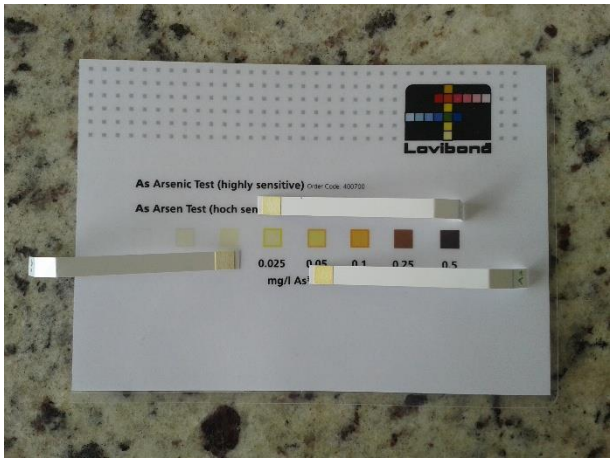


Figura 10. Comparación de la zona de reacción con la tarjeta colorimétrica, después de 20minutos.

Elaborado por: (Arcos, Vivar, 2015).

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Ubicación y selección de los sitios de recolección

Las plantas de *Agave americana* se recolectaron en la comuna San José de Cocotog, ubicada sobre la meseta del Guangüiltagua, que limita con las parroquias Zámbiza y Llano Chico del cantón Quito perteneciente a la provincia de Pichincha.

Coordenadas del sitio: 0º 08' 00.98" S 78º 25' 10.06" O. Elevación 2500 m.

3.2 Colecta del material vegetal

Se extrajeron las raíces de las plantas seleccionadas, la longitud de las raíces obtenidas oscilan entre 32.6 – 45.3 cm y 2.5 cm de diámetro.

3.3 Preparación del material vegetal

El secado de las raíces se realizó durante nueve días a la temperatura anteriormente mencionada (Gonzalez Valdez, 2011).

- Peso húmedo de la raíz: 3400 g
- Peso seco de la raíz: 1600 g
- Peso polvo de la raíz: 1270 g
- Residuo de tamizaje: 360 g

Se seleccionó las raíces de las plantas de *Agave americana* tomando en cuenta los parámetros descritos por García (2010), fase de crecimiento y edad del vegetal. Los estudios realizados con extractos de saponinas por Neira & Velastegui (2010) reafirmaron que la raíz contiene mayor cantidad de saponinas que las hojas.

3.4 Prueba de espuma

En la identificación preliminar de saponinas se observó la formación de una espuma persistente con una longitud de 3 cm que perduró por más de 30 minutos, como lo reportan González (2011) y García (2008).

Resultado de la prueba de espuma

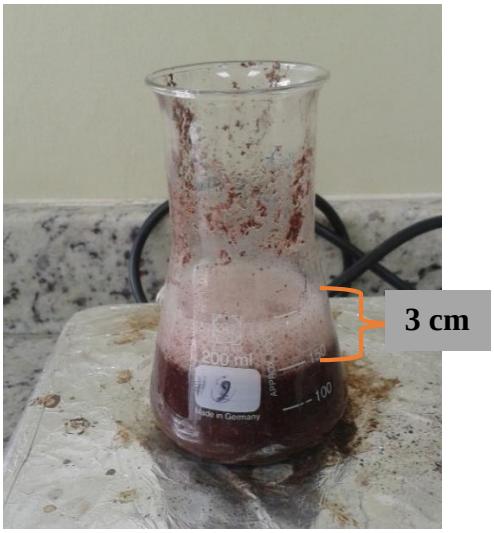


Figura 11. La prueba de espuma, considerada positiva por el tiempo que perduró la espuma y el diámetro obtenido.

Elaborado por: (Arcos, Vivar, 2015).

3.5 Preparación de extractos

Se obtuvo aproximadamente 184 mL de extracto líquido de saponina de color pardo rojizo.

3.6 Cuantificación de saponinas por HPLC

Para cada una de las soluciones con diferente concentración del estándar, a partir de la solución madre de 1000 ppm se realizaron los siguientes cálculos:

$$\mathrm{C1} \times \mathrm{V1} = \mathrm{C2} \times \mathrm{V2} \quad (\mathrm{ec.}\,1)$$

$$V2 = \frac{C1 \times V1}{C2}$$

Para 25 ppm:

$$\mathrm{V2} = \frac{25\ \cancel{\mathrm{ppm}} \times 25\ \mathrm{mL}}{1000\ \cancel{\mathrm{ppm}}}$$

$$\mathrm{V2} = 0.625\ \mathrm{mL}$$

Se efectuó los mismos cálculos para las diferentes concentraciones, para 50 ppm se tomó un volumen de 1.250 mL; para 75 ppm un volumen de 1.875 mL y para 100 ppm un volumen de 2.500 mL.

Para la cuantificación de saponinas se realizó una corrida del estándar S452 a diferentes concentraciones y una corrida de la muestra; se pudo observar un pico con un tiempo de retención (rt) de 1.3 minutos aproximadamente en ambas sustancias, como lo muestran las figuras 13 y 14. En la tabla 4 se resumen los resultados de los tiempos de retención con sus respectivas áreas para las diferentes concentraciones del estándar y de la muestra.

Tabla 4. Resultados HPLC

Resultados HPLC.

Concentración (ppm)	Área	Tiempo de retención (min)	Longitud de onda (λ)nm
0	0,00	0	297
25	4480,00	1.28	
50	10281,00	1,28	
75	15512,00	1,28	
100	20177,00	1,28	
Muestra	15176,00	1,26	

Nota: (Arcos, Vivar, 2015).

Curva de calibración de estándares de saponina.

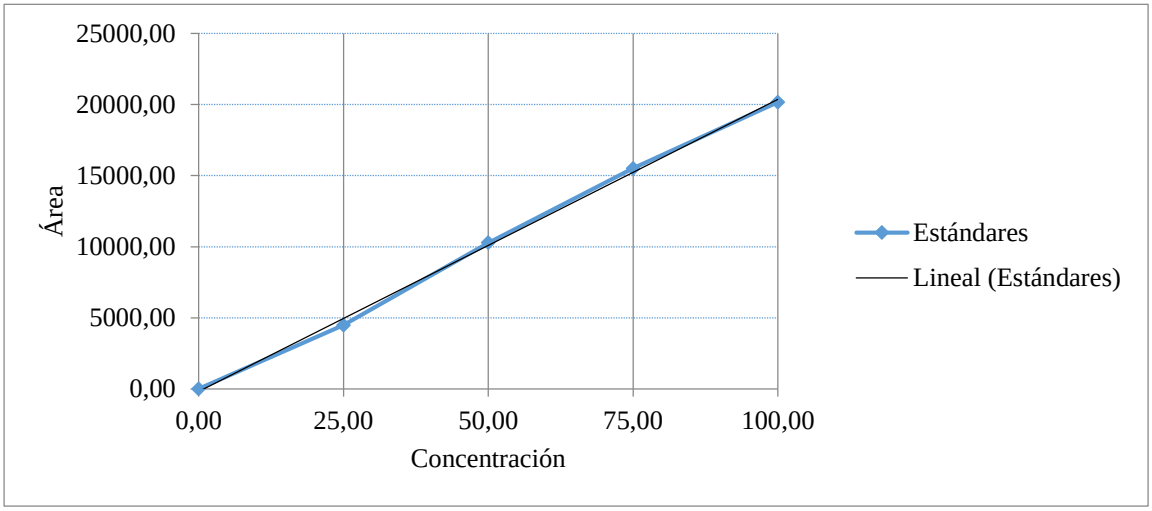


Figura 12. Con los datos obtenidos en la curva de calibración se puede interpolar el dato de la muestra de saponina extraída de *Agave americana*.

Elaborado por: (Arcos, Vivar, 2015).

La ecuación de la curva fue:

$$y = 205{,}54x - 187{,}2 \qquad \text{(ec. 2)}$$

El coeficiente de correlación de 0,9984

Cromatograma de muestra de *Agave americana*

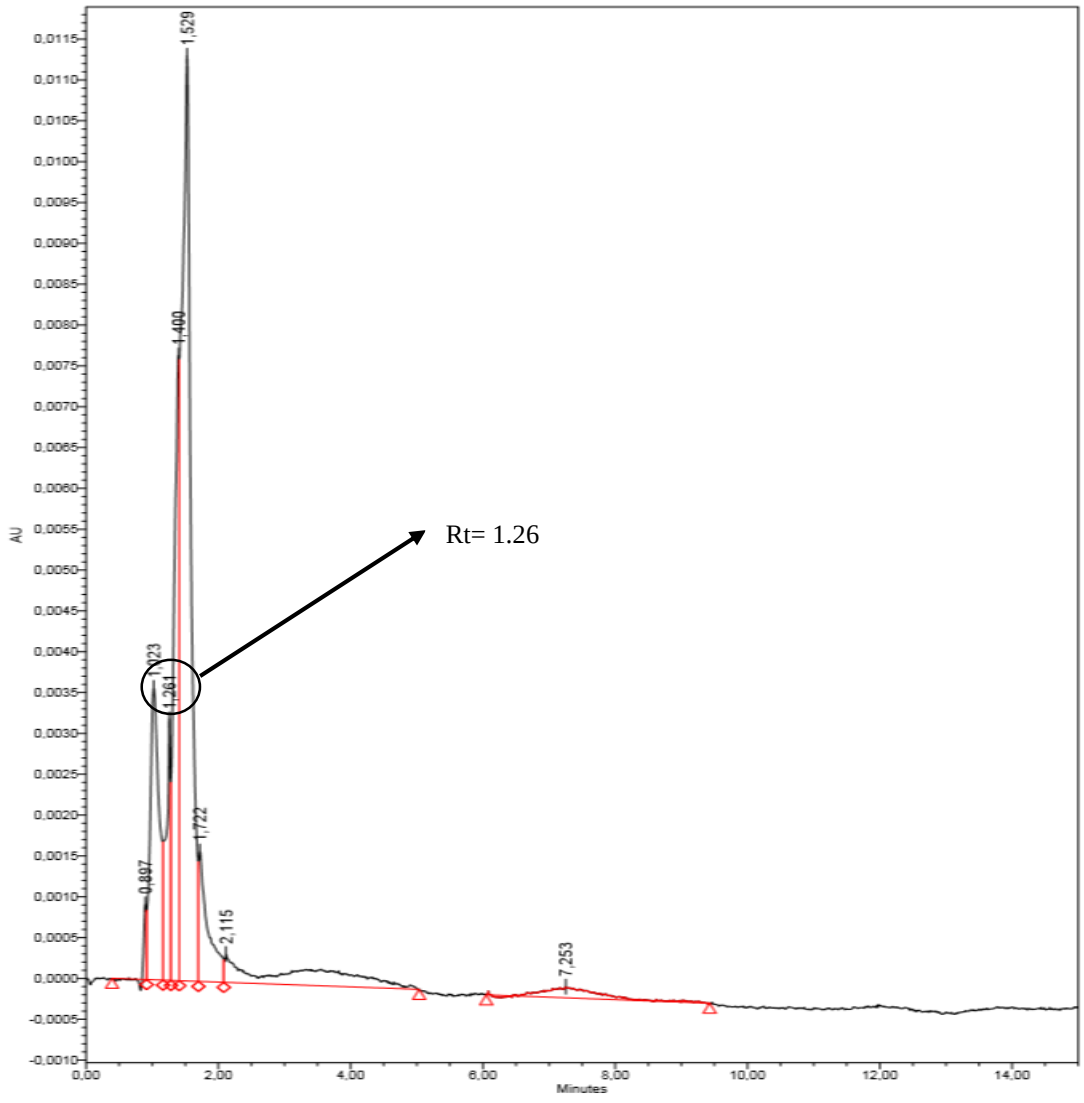


Figura 13. Se observa la formación de un pico con un tiempo de retención de 1.26 minutos en la corrida de HPLC.

Elaborado por: (Arcos, Vivar, 2015).

Cromatograma de estándar S452 a 75 ppm

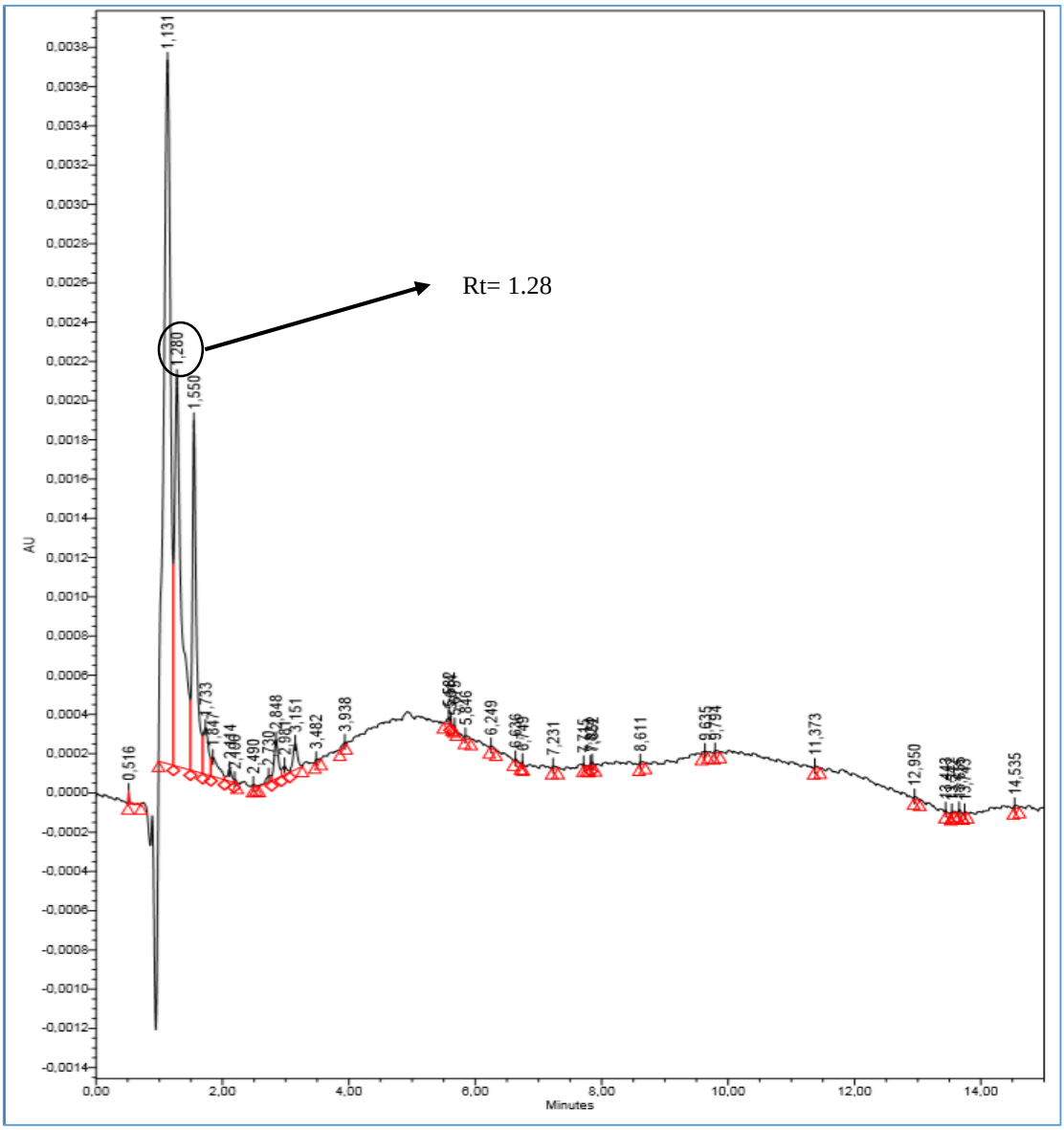


Figura 14. . Se observa la formación de un pico con un tiempo de retención de 1.28 minutos en la corrida de HPLC.

Elaborado por: (Arcos, Vivar, 2015).

Para determinar la concentración de saponinas de la muestra se realizaron los siguientes cálculos a partir de la siguiente ecuación:

$$\mathrm{CM} = \frac{\mathrm{Am} + \mathrm{Ao}}{\mathrm{m}} \qquad (\mathrm{ec.}\, 3)$$

Donde:

- CM: Concentración de la muestra
- Am: área de la muestra
- m: pendiente
- Ao: Ordenada al origen

$$\mathrm{CM} = \frac{15176{,}00 + 187{,}2}{205{,}54}$$

$$\mathrm{CM} = 74{,}75 \text{ ppm}$$

La concentración obtenida se multiplicó por el factor de dilución de la muestra:

74,75 ppm × 500=37375 ppm

Para calcular la concentración de saponinas en la muestra, se hizo la siguiente relación:

$$184 \cancel{\text{mL}} \times \frac{37375 \text{ mg}}{1000 \cancel{\text{mL}}} = 6877 \text{ mg de saponinas}$$

Se pudo calcular el rendimiento de saponinas por mL de extracto, como se muestra a continuación:

$$1 \cancel{\text{mL}} \times \frac{6877 \text{ mg}}{184 \cancel{\text{mL}}} = 37.38 \text{ ppm de saponina}$$

Con los datos de concentración obtenidos se puede calcular el rendimiento de saponina por Kg de raíz seca:

$$1\ \cancel{Kg}\ \times \frac{6877\ mg}{1.6\ \cancel{Kg}} =\ 4298.13\ \text{mg Saponinas por Kg de raíz seca}$$

Se consideró la metodología de Gnoatto, Schenkel, & Bassani (2005) debido a que el método cromatográfico empleado establece condiciones que permiten confirmar la presencia de saponinas en los extractos analizados. La fase móvil ACN + H2O (70:30) tiene una mayor afinidad por las saponinas que por solutos menos polares que pudieran estar presentes en las muestras.

3.7 Remoción de Cr $^{+6}$ empleando extractos de saponinas

3.7.1 Preparación de la solución madre de Cr^{+6}

A partir del $K_2Cr_2O_7$con peso fórmula de 294.2g se preparó una solución madre de Cr^{+6}de 1000 ppm, realizando los siguientes cálculos:

$$100\ \cancel{mg\ Cr} \times \frac{294.2\ mg\ \text{K2Cr2O7}}{104\ \cancel{mg\ Cr}} = 282.88\ mg\ \text{K2Cr2O7}$$

Se transforma de mg a g para facilitar la medición de K2Cr2O7.

$$1000\ \cancel{mg}\ \times \frac{1\ \text{g}}{282.88\ \cancel{mg}\text{K2Cr2O7}} = 0.28288\ g\ \text{K2Cr2O7}$$

Se afora a 100 ml, debido a que:

$$1000\ ppm = \frac{1000\ mg}{1000\ ml} = \frac{100\ mg}{100\ ml}$$

$0.2829\ g\ \mathrm{K2Cr2O7} \rightarrow 100\ \mathrm{mL} = 1000\ \mathrm{ppm}$

A partir de la solución madre de 1000 ppm, se prepara 3 L de solución con una concentración de 2.5 ppm, usando balones aforados de 1 y 2 litros respectivamente

.

Para los cálculos se utilizó la siguiente ecuación:

$$\mathrm{C1} \times \mathrm{V1} = \mathrm{C2} \times \mathrm{V2} \qquad (\mathrm{ec.}\,4)$$

Donde:

$$\mathrm{Vsm} = \frac{2.5\ \cancel{\mathrm{ppm}} \times \cancel{1000}\ \mathrm{mL}}{\cancel{1000\ \mathrm{ppm}}} = 2.5\ \mathrm{mL}$$

$$\mathrm{Vsm} = \frac{2.5\ \cancel{\mathrm{ppm}} \times \cancel{2000}\ \mathrm{mL}}{\cancel{1000\ \mathrm{ppm}}} = 5\ \mathrm{mL}$$

3.7.2 Preparación de soluciones Buffer

Para la elaboración de las soluciones bufferse realizaron cálculos de Molaridad establecidos en la lista “buffer solutions giving round values of pH al 25°C” (David R. Lide, ed., 2005, pág. 46).

Donde:

$$\mathrm{M} = \frac{\#\ \mathrm{moles}}{\mathrm{V\ (l)}} = \frac{\frac{\text{masa soluto}}{\text{peso molecular}}}{\mathrm{V\ (l)}} \qquad (ec.\,5)$$

$$\mathrm{M} = \frac{\text{masa soluto}}{\text{peso molecular} \times \mathrm{V\ (l)}}$$

Se despeja:

$$\mathrm{M} \times \text{peso molecular} \times \mathrm{V(l)} = \text{masa soluto}$$

Para preparar una solución de 0.1 M de KH_2PO_4, se debe pesar: 2.7218 g.

$$0.1 \times 136.09 \times 0.2 = 2.7218 \text{ g}$$

Para preparar una solución de 0.1 M de NaOH, se debe pesar: 0.8 g.

$$0.1 \times 40 \times 0.2 = 0.8 \text{ g}$$

Se establece que para preparar una solución buffer con pH de: 7, 7.5 y 8 se deben colocar 50 mL 0.1 M de KH_2PO_4 + x mL de 0.1 M de NaOH. El valor de "x" está determinado en la lista. Se preparó 200 mL de cada solución buffer.

Potenciometro

Figura 15. Regulación de pH de soluciones buffer.

Elaborado por: (Arcos, Vivar, 2015).

3.7.3 Determinación de tiempo de agitación y pH óptimos para la remoción de Cr^{+6}

Para contrastar las medias de los grupos de modelos de agua, y determinar si el tiempo de agitación y el pH tienen algún efecto en el proceso de remoción del metal, se realizó un ANOVA de dos vías. En la tabla 5 se presenta un resumen de los datos que se obtuvieron. Para este tratamiento el pH óptimo fue de 7.5 y el tiempo de agitación de 10 minutos.

Tabla 5.

Resultados de remoción de Cr^{+6}.

Concentración inicial Cr^{+6} (ppm)	**pH**	**Tiempo de agitación (min)**	**Concentración final Cr^{+6} (ppm) X± $\frac{ts}{\sqrt{n}}$**	**Remoción (%)**
2.5	7	10	2,0±0,1	20
2.5	7.5	10	2,0±0,1	20
2.5	8	10	2,0±0,1	20
2.5	7	20	2,2±0,1	12
2.5	7.5	20	2,0±0,3	20
2.5	8	20	2,0±0,1	20
2.5	7	40	2,2±0,1	12
2.5	7.5	40	2,1±0,1	14
2.5	8	40	2,2±0,1	12
2.5	7	60	2,3±0,1	8
2.5	7.5	60	2,1±0,1	14
2.5	8	60	2,1±0,1	14

Nota: (Arcos, Vivar, 2015).

En la tabla 5 se muestra la concentración inicial y final de Cr^{+6}, posterior a la remoción y bajo diferentes parámetros de pH y tiempo de agitación se reportan los resultados

tomando en cuenta la desviación estándar y límite de confianza (95%). El promedio del porcentaje total de remoción en este tratamiento es del 16%.

Para calcular al porcentaje de remoción en cada experimento se realizó la siguiente relación:

Co-------- 100

Co-Cf X

Donde:

Co: Concentración inicial

Cf: Concentración final

Como nos muestra la figura 16. El pH con mayor precipitación de Cr^{+6} es el de 7.5 a un tiempo de agitación de 20', existe una diferencia significativa entre el pH de 7 y pH de 7.5, mientras que el pH de 7.5 no presenta mayor diferencia con respecto al pH de 8 en cuanto al tiempo de agitación.

Medias de pH vs tiempo de agitación para Cr^{+6}

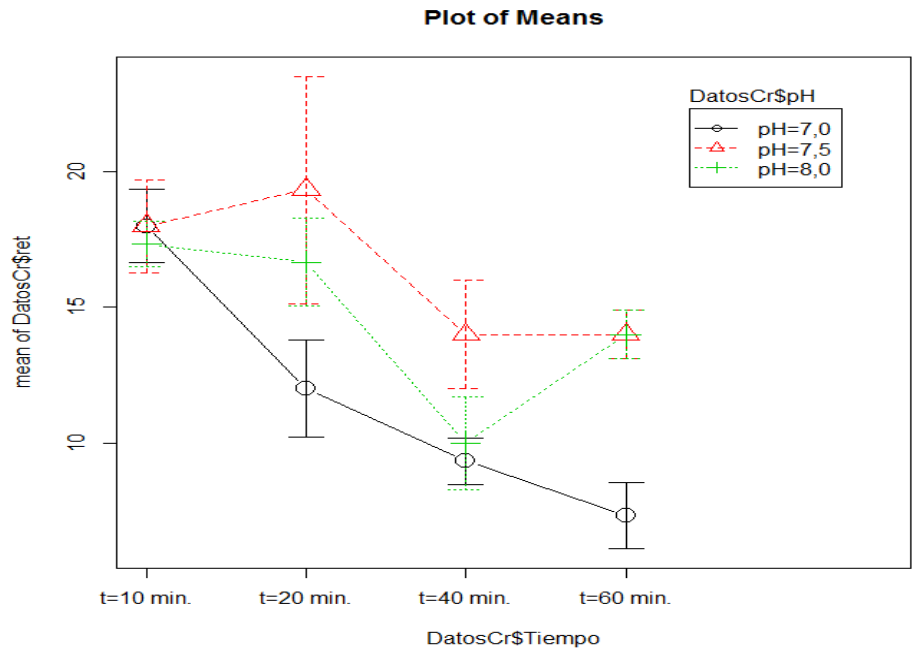


Figura 16. Interrelación entre los diferentes pH y tiempos de agitación en cada uno de los ensayos.

Elaborado por: (Arcos, Vivar, 2015).

Debido a que el ANOVA, descrito en la tabla 6, nos muestra que no existe diferencia significativa en la interacción entre los tiempos de agitación y el pH ($p > 0.05$), se decidió trabajar con el menor tiempo.

Además se realizó una prueba post hoc de Tukey para la agrupación entre tratamientos.

*T*abla 6.

Resultados ANOVA de pH vs tiempo de agitación para Cr^{+6}

>anova(b) Analysis of Variance Table Response: ret					
	Df	**Sum**	**Sq Mean**	**Sq F value**	**Pr(>F)**
tiempo	3	566.00	188.667	95.393	0.0***
pH	2	265.33	132.667	67.079	0.002**
Tiempo: pH	6	156.00	26.000	13.146	0.3
Residuals	60	1186.67	19.778		
Tukey multiple comparisons of means 95% family-wise confidence level					

Nota: (Arcos, Vivar, 2015).

Como mencionan Eckenfelder & Ortíz (2008) los metales pesados se precipitan y reaccionan mejor en pH alcalino que en pH ácido, por esta razón se decidió trabajar con pH alcalino en ambos ensayos. Se determinó que el tiempo óptimo de remoción es de 10 min y pH de 7.5.

3.7.4 Determinación de la concentración óptima de saponinas

Se realizó una tabla con los datos obtenidos de la segunda medición de concentración del Cr^{+6} en el espectrofotómetro de absorción atómica, la cual se muestra a continuación.

Tabla 7.

Resultados de remoción de Cr^{+6}.

Concentración inicial Cr^{+6} (ppm)	**Vol. Saponina (mL)**	**Concentración final Cr^{+6}(ppm) X± $\frac{ts}{\sqrt{n}}$**
1,25	1	1,2± 0,0
1,25	2	1,1± 0,1
1,25	3	0,8± 0,1
2,5	1	1,7± 0,4
2,5	2	1,4± 0,1
2,5	3	1,9± 0,1
5,0	1	4,2± 0,0
5,0	2	4,3± 0,2
5,0	3	4,1± 0,1

Nota: (Arcos, Vivar, 2015).

En esta etapa se trabajó con diferentes concentraciones de xenobiótico, y diferente volumen de saponina.

- 1 ml equivale a 37,38 ppm de saponina
- 2 ml equivalen a 74,76 ppm de saponina
- 3 ml equivalen a 112,14 ppm de saponina

La figura 17 muestra que existe una mayor precipitación de Cr^{+6}cuando se trabaja con un volumen de 2 mL de saponinas. Existe una diferencia significativa entre el volumen de 2 mL con respecto a los volúmenes de 1 mL y 3 mL, mientras que el volumen de 1 y 3 mL no muestran una diferencia significativa entre sí en cuanto a la retención de Cr^{+6}.

Medias de concentración de saponinas vs concentración de Cr $^{+6}$

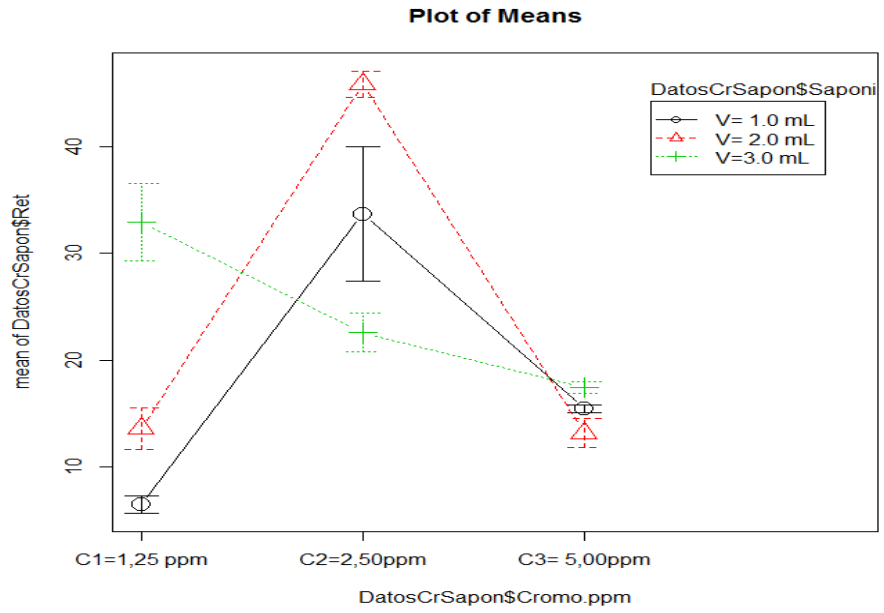


Figura 17. Interrelación entre la concentración de saponina y la concentración de Cr $^{+6}$

Elaborado por: (Arcos, Vivar, 2015).

Del ANOVA descrito en la tabla 8 podemos inferir que a una máxima y mínima concentración de Cr^{+6} (1,25-5,0 ppm), no existe diferencia significativa, mientras que a una máxima-media o mínima- media concentración de Cr^{+6}existe diferencia significativa, en cuanto a la remoción, la concentración de saponinas tiene menor diferencia significativa cuando se usa volúmenes intermedios (1-3 mL), se obtuvieron mejores resultados con volumen de 2 mL de saponina, equivalentes a 74.76 ppm. Se aceptó la hipótesis alternativa, ya que el valor de p en la concentración de Cr^{+6} y de saponinas es menor a 0.05.

Tabla 8.

Resultados ANOVA concentración de saponinas vs concentración de Cr^{+6}

Analysis of Variance Table Response: ret					
	Df	**Sum**	**Sq Mean**	**Sq F value**	**Pr(>F)**
Cromo. Ppm	2	5598.2	2799.08	434.533	0.0***
saponinas	2	584.9	292.47	45.404	0.01 *
Cromo.ppm: saponinas	4	5288.0	1322.00	205.229	0.0***
Residuals	72	4637.9	64.42		

Nota: (Arcos, Vivar, 2015).

Un estudio de Kilic *et al* (2010) reporta que saponinas extraídas de Quillaja pueden remover entre el 20 y el 45% de cromo, en este estudio las saponinas extraídas de *Agave americana* tuvieron un porcentaje de remoción de Cr^{+6} del 16% aproximadamente.

3.8 Remoción de As^{+3} empleando extractos de saponinas

3.8.1 Preparación de la solución madre de As^{+3}

A partir de la solución madre con concentración de 10 ppm se diluyó 100 veces para obtener una solución de 0.1 ppm para que pueda ser reconocida por el test arsénico.

3.8.2 Determinación de tiempo y pH óptimos para la remoción de As^{+3}

Mediante un análisis estadístico, se determinó que el tiempo óptimo de remoción es de 10 min y pH de 8.

Tabla 9.

Resultados de remoción de As^{+3}.

Concentración inicial As^{+3} (ppm)	pH	Tiempo de agitación (min)	Concentración final As^{+3} (ppm) $X\pm \frac{ts}{\sqrt{n}}$	Remoción (%)
0.1	7	10	0,025±0.038	75
0.1	7.5	10	0,038±0,043	62
0.1	8	10	0,030±0,038	70
0.1	7	20	0,050±0,038	50
0.1	7.5	20	0,018±0,026	82
0.1	8	20	0,025± 0	75
0.1	7	40	0,050± 0	50
0.1	7.5	40	0,050± 0	50
0.1	8	40	0,015±0,035	85
0.1	7	60	0,050±0,043	50
0.1	7.5	60	0,038±0,043	62
0.1	8	60	0,038±0,043	62

Nota: (Arcos, Vivar, 2015).

En la tabla 9 se muestra que la concentración inicial de As^{+3}es de 0.1ppm, posterior a la remoción y bajo diferentes parámetros de pH y tiempo de agitación se reducen y se reportan tomando en cuenta la desviación estándar. El promedio del porcentaje total de remoción en este tratamiento es del 64.4%.

Para calcular al porcentaje de remoción en cada experimento se realizó la siguiente relación:

Co-------- 100

Co-Cf X

Donde:

Co: Concentración inicial

Cf: Concentración final

Como se aprecia en la figura 18 el pH con mayor retención de As^{+3} es el de 8, sin embargo no presenta una diferencia significativa con el pH de 7,5 y 7 a un mayor tiempo de agitación, pero si a menor tiempo de agitación.

Medias de pH vs tiempo de agitación para As^{+3}.

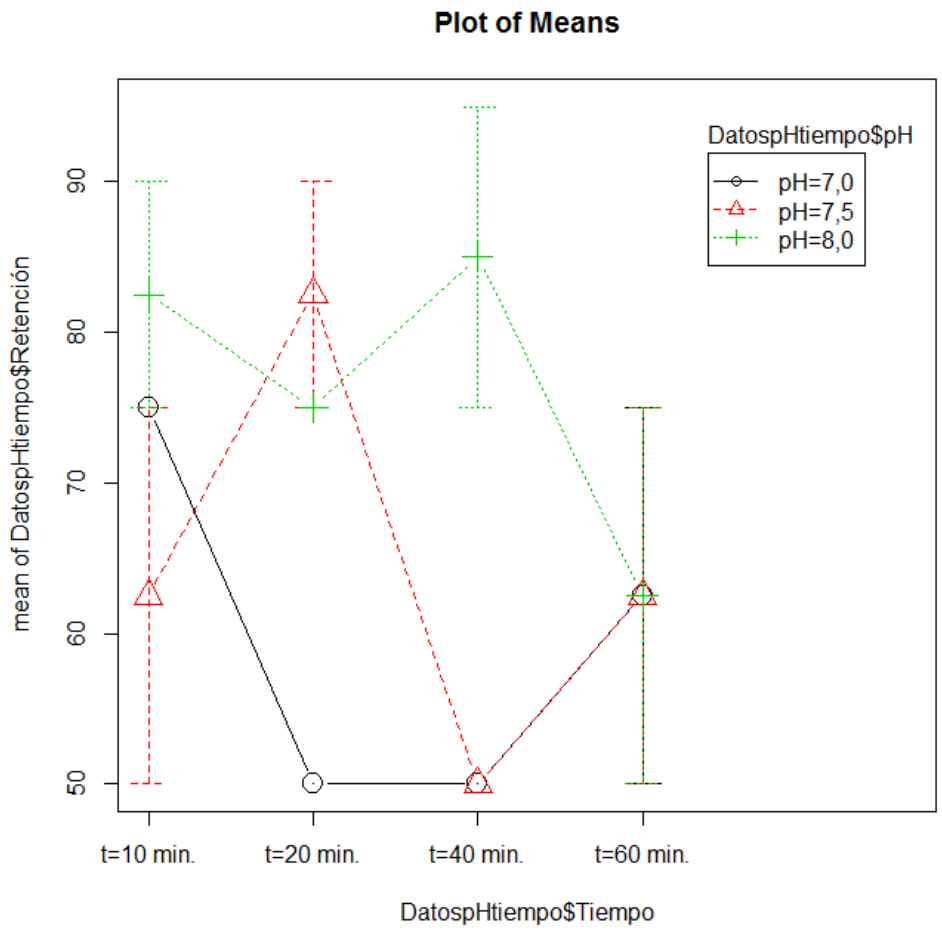


Figura 18. Interrelación entre los diferentes pH y tiempos de agitación en cada uno de los ensayos.

Elaborado por: (Arcos, Vivar, 2015).

Con respecto al ANOVA el factor pH es muy significativo, a diferencia del factor tiempo y la relación tiempo: pH, por lo que se decidió trabajar con el menor tiempo de agitación.

Se aceptó la hipótesis alternativa, ya que el valor de p en el pH es menor a 0.05.

Tabla 10.

Resultados ANOVA de pH vs tiempo de agitación para As^{+3}.

>anova (b) Analysis of VarianceTable Response: ret				
	Df	**Sum**	**Sq F value**	**Pr(>F)**
tiempo	3	558.33	1.333	0.3
pH	2	1202.08	4.306	0.04*
Tiempo: pH	6	1997.92	2.385	0.09
Residuals	12	1675.00		
Tukey multiple comparisons of means 95% family-wise confidence level				

Nota: (Arcos, Vivar, 2015).

3.8.3 Determinación de la concentración óptima de saponinas

Se realizó la tabla 11 con los datos obtenidos de la segunda medición de concentración de As^{+3} utilizando el Test Arsénico (altamente sensible) marca Lovibond.

Tabla 11.

Resultados de remoción de As^{+3}.

As^{+3} inicial (ppm)	**Vol. Saponina (mL)**	**Concentración final As^{+3} (ppm) $X\pm \frac{ts}{\sqrt{n}}$**
0.05	1	0,02 ± 0,06
0.05	2	0,05 ± 0.00
0.05	3	0,03 ± 0,05
0.1	1	0,02 ± 0,02
0.1	2	0,68 ± 0.00
0.1	3	0,03 ± 0.00
0.25	1	0,07 ± 0,14
0.25	2	0,02 ± 0,02
0.25	3	0,03 ± 0,04

Nota: (Arcos, Vivar, 2015).

Para la segunda parte del experimento se trabajó con diferentes concentraciones de xenobiótico, y diferente volumen de saponina.

- 1 ml equivale a 37,38 ppm de saponina
- 2 ml equivalen a 74,76 ppm de saponina
- 3 ml equivalen a 112,14 ppm de saponina

La figura 19 expresa que no existe diferencia significativa entre los volúmenes de 2 mL y 3 mL de saponinas a una mayor y mediana concentración de As^{+3} (0,1-0,25 ppm), mientras que a menor concentración de As^{+3} existe una diferencia altamente significativa.

Medias de concentración de saponinas vs concentración de As $^{+3}$

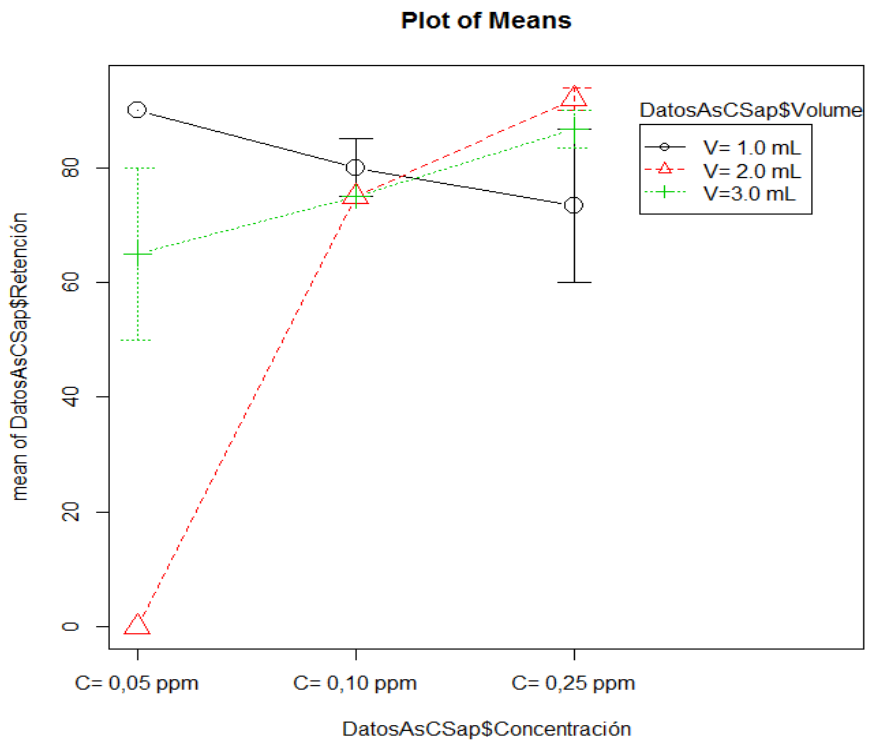


Figura 19. Interrelación entre la concentración de saponina y la concentración de As^{+3}

Elaborado por: (Arcos, Vivar, 2015).

El ANOVA reporta que la concentración de As^{+3} y el volumen de saponina son significativos, tal es el caso de las concentraciones de 0,05 y 0,1 ppm donde existe una diferencia altamente significativa. Por otro lado no existe mayor efecto de las saponinas cuando se trata de concentraciones intermedias y máximas de As^{+3}, pero sí se aprecia un efecto entre mínimas e intermedias concentraciones.

Tabla 12.

Resultados de ANOVA de concentración de saponinas vs concentración de As^{+3}.

>anova (b) Anova Table (Type II tests) Response: ret				
	Df	**Sum**	**Sq F value**	**Pr(>F)**
Arsénico ppm	2	6073.1	27.647	0.000 ***
Saponinas	2	2307.7	10.505	0.001 **
Arsénico ppm: saponinas	4	9218.4	20.983	0.000 ***
Residuals	16	1757.3		
Tukey multiple comparisons of means 95% family-wise confidence level				

Nota: (Arcos, Vivar, 2015).

Se aceptó la hipótesis alternativa, ya que el valor de p en las concentraciones de As^{+3} y de saponinas es menor a 0.05.

CONCLUSIONES

El método de extracción seca es adecuado y efectivo para la extracción de saponinas, el rendimiento fue considerable, 37.38 mg de saponina/ 1 mL de extracto equivalente al 5.3 %. Por esta razón *Agave americana* podría convertirse en una fuente importante de este tipo de compuestos.

Se observó similitud entre los cromatogramas del estándar de saponina S452 correspondiente a *Quillaja saponaria* y la muestra de *Agave americana*; para la cuantificación se tomó en cuenta el área y el tiempo de retención, obteniendo una concentración de 6877 ppm en 184 mL de muestra. La técnica de HPLC es la más eficaz, debido a su capacidad para separar compuestos no volátiles y altamente polares (García, 2010, pág. 20).

Al emplear extractos de saponina, como agente precipitante de Cr^{+6}, en los modelos de agua, se obtuvo una remoción del 16%. En el caso de As^{+3} se produjo una remoción del 64.41%. Por consiguiente podemos concluir que el poder precipitante del extracto de saponinas de *Agave americana* presenta mayor eficacia en modelos de agua con As^{+3}.

Las condiciones óptimas de pH, tiempo y concentración de saponinas en la remoción de Cr^{+6} son: pH de 7.5, tiempo de agitación 10 minutos y la concentración de saponina fue de 37, 38 ppm. Para la remoción de As^{+3} las condiciones óptimas fueron: pH de 8, tiempo de agitación 10 minutos y la concentración de saponina fue de 74.76 ppm.

Debido a los datos de concentración obtenidos en HPLC, se concluyó que *Agave americana* puede ser considerada como una fuente potencial de sapogeninas, ya que se obtuvo un rendimiento significativo de 4298.13 mg de saponina por Kg de raíz seca.

RECOMENDACIONES

Investigar con mayor profundidad las propiedades que posee *Agave americana*, con el propósito de conocer los factores ambientales que tienen mayor influencia en la biosíntesis de saponinas. De esta manera se podría asegurar su aprovechamiento en el campo de la biorremediación.

De preferencia seleccionar plantas jóvenes de *Agave americana* si se desea obtener un mayor rendimiento de saponinas, como lo explican Neira & Velastegui (2010) la edad es un factor determinante para la concentración de este metabolito secundario.

Realizar un estudio termodinámico y cinético para evaluar la eficiencia de las saponinas de *A. americana* para la remoción de As^{+3} y Cr^{+6}.

Continuar con la investigación sobre las propiedades tensoactivas de las saponinas, y así conocer si esta nueva alternativa tiene la capacidad de retener metales pesados hasta llegar a su límite permisible en la normativa ambiental.

BIBLIOGRAFÍA

Agua Ecuador. (25 de Abril de 2012). *Blogspot* . Obtenido de http://agua-ecuador.blogspot.com/2012/04/la-contaminacion-del-agua-en-ecuador.html

Alcázar, F., Proal, J., Gallardo, T., Cháirez, I., Antileo, C., & Alvarado, A. (8 de Marzo de 2014). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. Obtenido de Scielo: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1665-27382014000200024&script=sci_arttext

Anco Estrella , P. M. (2004). *Cybertesis.* Obtenido de Cybertesis : http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/3028/1/anco_ep.pdf

Bataller Sifre, R. (2004). *Toxicología clínica* . Valencia : Universidad de Valencia .

Bermeo Noboa , A. (18 de Julio de 2014). *UNEP*. Obtenido de UNEP: www.unep.org/gc/gc23/

Bernad Bernad, M. J. (2008). *UNAM*. Obtenido de UNAM.MX: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Tensoactivos_280.pdf

Bournod, L., Cabezas , E., & Pérez, C. (2010). *Edutecne.* Obtenido de http://www.edutecne.utn.edu.ar/agua/Agua_Remocion_arsenico.pdf

Bower, V., & Bates, R. (2014). *Chemistry mdma*. Obtenido de chemistry.mdma.ch/.../pdf/.../buffer_round_ph.pdf

Bruneton , J. (2001). *Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas medicinales* . Zaragoza: Acribia.

Burbano García , E., Burbano de Ercilla, S., & García Muñoz, C. (2003). *Física General 32° edición* . Tébar .

CAMAREN. (26 de Junio de 2014). *CAMAREN.* Obtenido de http://www.camaren.org/documents/conclusionesviii.pdf

Campoverde , C. (27 de Marzo de 2013). *Sociedad Ecuatoriana para la Defernsa del Patrimonio Geológico y Minero.* Obtenido de SEDPGYM-ECUADOR: http://sedpgym-ecuador.blogspot.com/2013/03/zonas-mineros-del-ecuador.html

Castro de Esparza , M. L. (Marzo de 2005). *Organización Panamericana de la Salud.* Obtenido de http://www.bvsde.paho.org/bvsair/e/hdt/hdt96/hdt96.pdf

Chang Gómez, J. (22 de Julio de 2014). *DSPACE*. Obtenido de DSPACE: www.dspace.espol.edu.ec/.../Calidad%20de%20Agua%20Unidad%201,2..

Comisión Permanente de Soberanía Alimentaria y Desarrollo del Sector Agropecuario y Pesquero. (Abril de 2014). *Ecuavisa.* Obtenido de Ecuavisa: http://www.ecuavisa.com/sites/ecuavisa.com/files/documentos/2014/04/recursos-hidricos-convocatoria.pdf

Cuenca Ramírez , N. (18 de Julio de 2014). *SENAGUA.* Obtenido de SENAGUA: http://memorias.utpl.edu.ec/sites/default/files/documentacion/periodismo2013/utpl-Gestion-Recursos-Hidricos-Ecuador.pdf

Cueva, E., Van Den, V., & Cabrera, O. (1999). *ABYA YALA.* Obtenido de http://www.abyayala.org/informacion.php?CODLIBRO=848&FAC_CODIGO=

D'Ambrosio., M. C. (2005). *Producción-animal.com*. Obtenido de http://www.produccion-animal.com.ar/agua_bebida/30-tecnologias_remocion_arsenico.pdf

David R. Lide, ed. (2005). *Handbook of Chemistry and Physics.* Obtenido de http://www.hbcpnetbase.com

De Agustín Vázquez, D., Ibarra Sixto, A., Martínez , S., & Sáez, R. (2004). *Diccionarios Oxford* . España : Complutense .

Eckenfelder, W., & Ortíz, E. (Diciembre de 2008). *BVSDE*. Obtenido de http://www.bvsde.paho.org/bvsaca/e/fulltext/seccion6/seccion6.pdf

EPA. (Diciembre de 2010). *WATER EPA*. Obtenido de http://water.epa.gov/drink/contaminants/basicinformation/upload/Cromo-VI-enelaguapotable_QAs.pdf

Estrada Orozco, P. A. (2009). *Aquaforum.* Obtenido de Aquaforum: http://seia.guanajuato.gob.mx/document/AquaForum/AF52/AF5203_EvaluacionAlternativasRemocionArsenico.pdf

FAO. (19 de Julio de 2014). *AQUASTAT* . Obtenido de AQUASTAT : http://www.fao.org/nr/water/aquastat/countries_regions/ecuador/indexesp.stm

FAO. (2011). *FAO.* Obtenido de FAO. ORG: http://faostat.fao.org/site/377/default.aspx#ancor

Fraser. (2012). *Fraser Institute* . Obtenido de Fraser Institute : http://www.miningfacts.org/Ambiente/Que-papel-juega-el-arsenico-en-la-industria-minera/

García Almanza, M. (1 de Agosto de 2008). *Métodos de investigación fitoquímica*. Recuperado el 11 de 11 de 2014, de Extracción y determinación de propiedades de saponinas extraídas: http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/jspui/bitstream/123456789/4881/1/EXTRACCIONYDETERMINACIONDEPROPIEDADESDESAPONINASOBTENIDASAPA.pdf

García Mendoza , A. (Septiembre de 2007). *UNAM.* Obtenido de UNAM: http://www.alumno.unam.mx/algo_leer/AgaveMexico.pdf

García, A. (2010). *Academia.edu.* Obtenido de http://www.academia.edu/8522936/TESIS_EXTRACCI%C3%93N_CUANTIFICACI%C3%93N_Y_AISLAMIENTO_DE_SAPONINAS

Gnoatto, S., Schenkel, E., & Bassani , V. (2005). HPLC method to assay total saponins in Ilex paraguariensis aqueous extract. *Scielo* , 4-5.

Gonzalez Valdez, L. S. (Julio de 2011). *Instituto Politécnico Nacional* . Obtenido de Instituto Politécnico Nacional : http://www.repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/15761?show=full

Guzmán , V. (25 de Julio de 2011). *CEPAL*. Obtenido de Comisión Económica para América Latina y el Caribe: http://www.cepal.org/deype/noticias/noticias/1/44071/SENAGUA_calidad-agua.pdf

Hernández, R., Lugo, E., Díaz , L., & Villanueva , S. (1 de Junio de 2005). Extracción y cuantificación indirecta de las saponinas de Agave lechuguilla Torrey. *e-Gnosis* , 9.

INEN. (21 de Julio de 2014). *DSPACE*. Obtenido de DSPACE: https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/10608/8/Norma%20Inen%20Agua1108-2.pdf

Isch López, E. (2008). Los daños de la actual actividad minera a las fuentes de agua . *OPCIÓN* , 2.

López, S., & Pazmiño, X. (Junio de 2009). *Escuela Politécnica Nacional.* Obtenido de http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/1693/1/CD-2305.pdf

Mastrogiovanni, M. (2012). *UDELAR.* Obtenido de http://www.fcien.edu.uy

Melo, V., & Cuamatzi, O. (2007). *Bioquímica de los Procesos Metabólicos* . México : Reverté.

Mencías Rodríguez , E., & Mayero Franco, L. M. (2000). *Manual de Toxicología básica.* Madrid: Díaz de Santos.

Miliarium . (2008). *Miliarium.com Ingeniería Civil y Medio Ambiente*. Obtenido de Miliarium.com: http://www.miliarium.com/Bibliografia/Monografias/Arsenico/MetodosReduccionArsenico.asp

Moreno, D. (2007). *Dean Carter Binational Center*. Obtenido de http://binational.pharmacy.arizona.edu/content/arsenico

Neira, M., & Velastegui, R. (2010). *Buscagro*. Obtenido de http://www.buscagro.com/www.buscagro.com/biblioteca/Ramiro-Velastegui/sanidad-en-rosas-de-exportacion.pdf

OMS. (2012). *Organización Mundial de la Salud*. Obtenido de Organización Mundial de la Salud: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs372/es/

Ortega, A. (30 de Enero de 2015). Algunos aspectos de los géneros Agave y Fourcrea como causantes de enfermedades ocupacionales. Colombia, Colombia.

Repetto Jiménez, M., & Repetto Kuhn, G. (2009). *Toxicología Fundamental* . Díaz de Santos .

Romero González, J., Cano Rodríguez, I., Walton, J., Peralta Videa, J., Rodríguez, E., & Gardea Torresdey, J. (28 de Septiembre de 2005). *ADIMIQ*. Obtenido de http://rmiq.org/new%20page/Pdfs/Vol.%204,%20No.%203/6.pdf

Sampedro Albán, M. P. (2009). "Estudio e inmvestigación del SHAWARMISHKI (AGUA MIEL), análisis de sus propiedades, su explotación, aplicación culinaria de este producto milenario" . Quito, Pichincha , Ecuador.

Secretaría del Agua . (19 de Julio de 2014). *Secretaría del Agua* . Obtenido de Secretaría del Agua : http://www.agua.gob.ec/

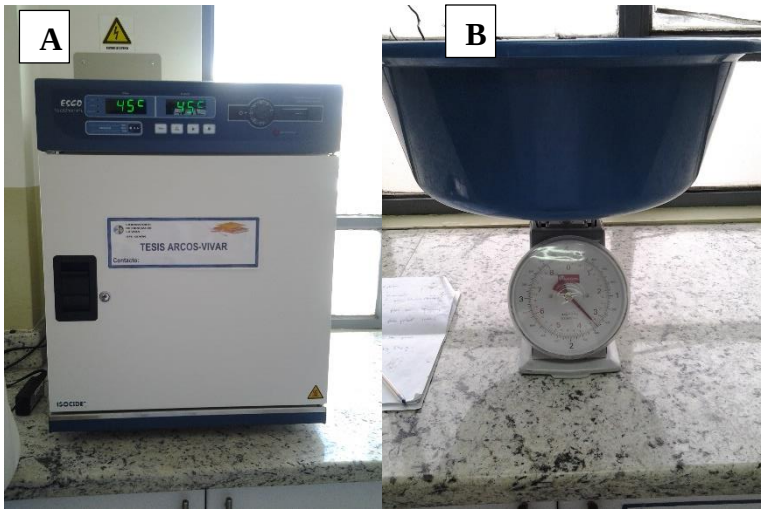
SEMARNAT. (17 de Agosto de 2009). *INECC*. Obtenido de http://www.inecc.gob.mx/sqre-temas/763-aqre-metales

SIAFA. (30 de Julio de 2014). *SIAFA*. Obtenido de SIAFA: http://www.siafa.com.ar/notisiafa/12/Arsenico.pdf

UNAL. (30 de Marzo de 2015). *UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA*. Obtenido de http://www.plantastoxicas.unal.edu.co/saponinas.html

ANEXOS

Anexo 1. Preparación de material vegetal. A. Secado de la planta a 45°C por 9 días. B. Pesado del material vegetal seco.

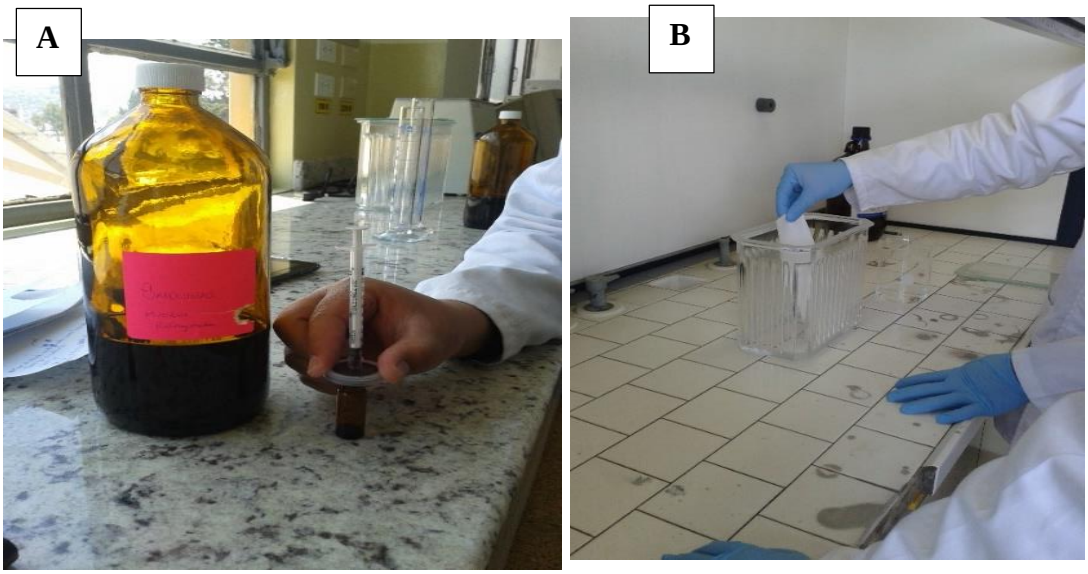


Elaborado por: (Arcos, Vivar, 2014).

Anexo 2. Preparación de extracto etanólico. A. Aforo del etanol. B. Maceración del material vegetal con el extracto.

Elaborado por: (Arcos, Vivar, 2014).

Anexo 3. Cromatografía de capa fina. A. Filtrado de la muestra de saponina. B. Corrida de la muestra en la cámara cromatográfica.

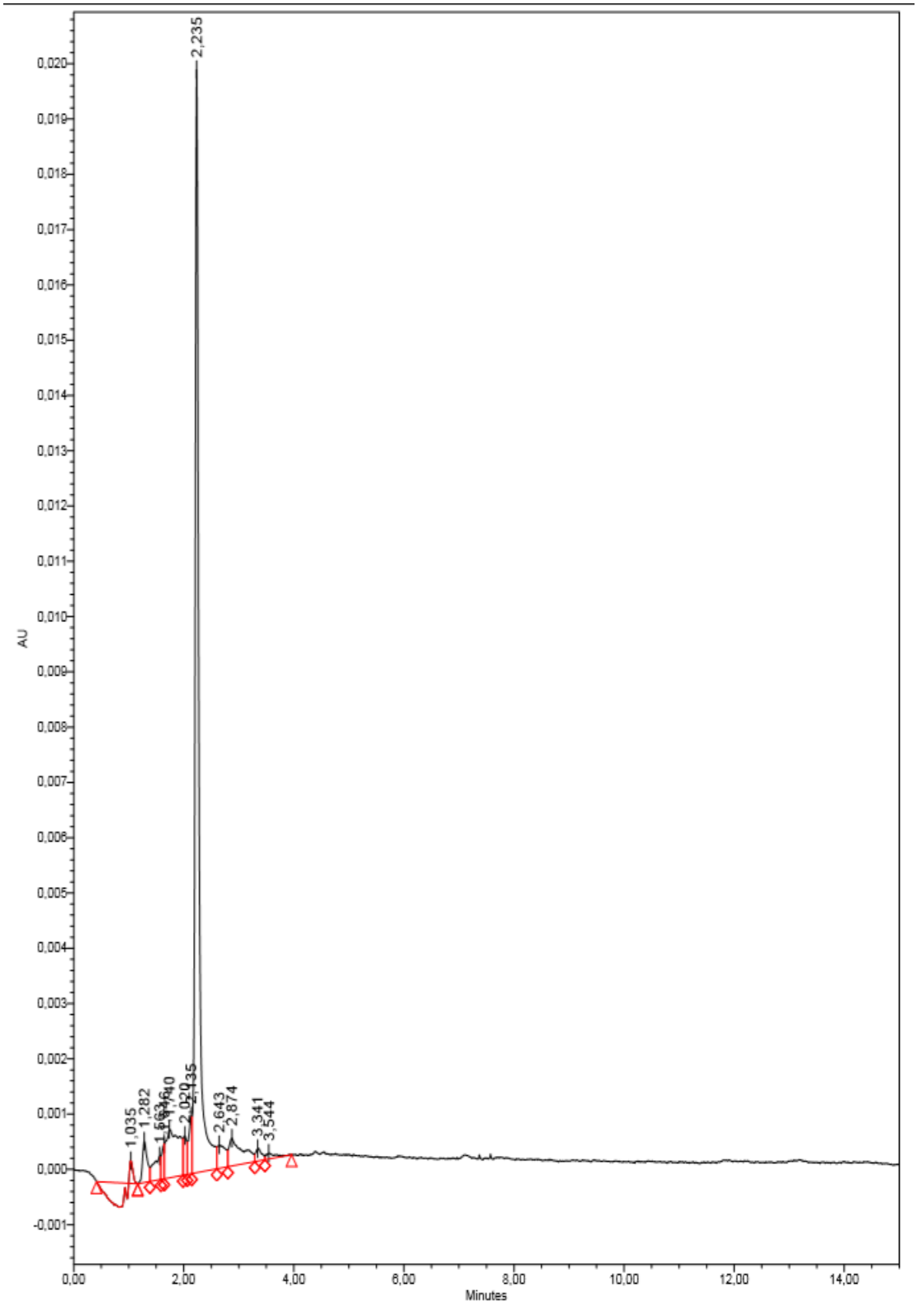


Elaborado por: (Arcos, Vivar, 2014).

Anexo 4. Extracción de saponinas. A. Preparación del extracto de benceno. B. Separación del extracto y el crudo de saponinas.

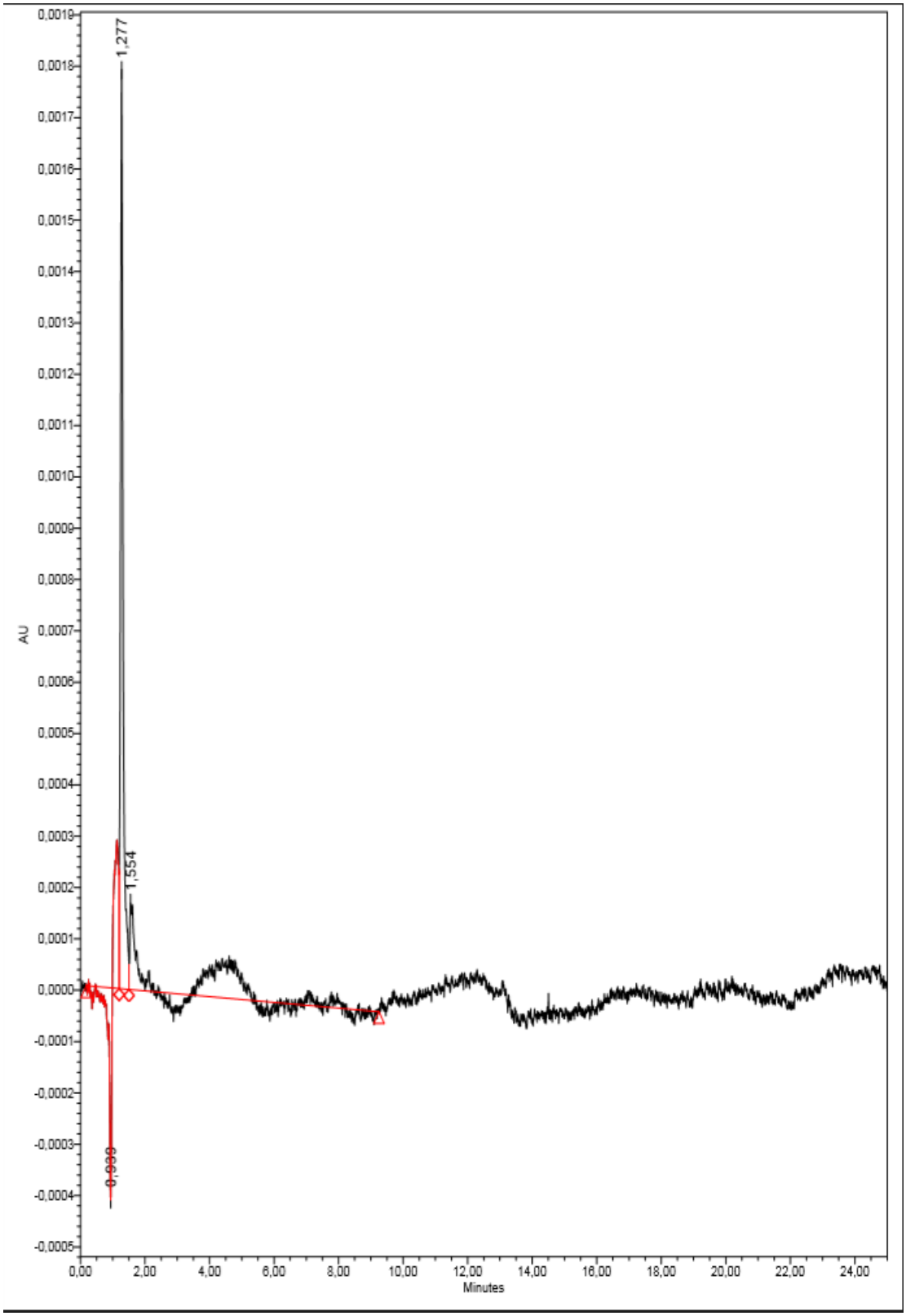
Elaborado por: (Arcos, Vivar, 2014).

Anexo 5. Cromatograma de estándar S452 a 25ppm



Elaborado por: (Arcos, Vivar, 2015).

Anexo 6. Cromatograma de estándar S452 a 50 ppm



Elaborado por: (Arcos, Vivar, 2015).

Anexo 7. Tabla de resultados para establecer las condiciones óptimas para la retención de Cr^{+6}

pH	Tiempo (min)	Concentración Cr ^{6} (ppm)	Promedio
7	10	2.1	
		2.1	2.0
		1.9	
7	10	2.0	
		2.1	2.0
		2.1	
7.5	10	1.9	
		2.0	2.0
		2.1	
7.5	10	2.2	
		2.0	2.1
		2.1	
8	10	2.1	
		2.0	2.0
		2.1	
8	10	2.1	
		2.1	2.0
		2.0	
7	20	2.2	
		2.1	2.1
		2.1	
7	20	2.2	
		2.2	2.3
		2.4	
7.5	20	2.3	
		2.1	2.2
		2.3	
7.5	20	1.7	

		1.8	1.8
		1.9	
8	20	2.2	
		2.1	2.1
		2.1	
8	20	2.1	
		2.1	2.0
		1.9	
7	40	2.3	
		2.2	2.3
		2.3	
7	40	2.3	
		2.2	2.3
		2.3	
7.5	40	2.2	
		2.2	2.2
		2.2	
7.5	40	1.9	
		2.2	2.1
		2.2	
8	40	2.4	
		2.2	2.3
		2.3	
8	40	2.1	
		2.3	2.2
		2.2	
7	60	2.3	
		2.2	2.3
		2.3	
7	60	2.4	

		2.4	2.4
		2.3	
7.5	60	2.2	
		2.2	2.2
		2.1	
7.5	60	2.1	
		2.1	2.1
		2.2	
8	60	2.1	
		2.2	2.2
		2.2	
8	60	2.1	
		2.2	2.1
		2.1	

Fuente: (Arcos, Vivar, 2015).

Anexo 8. Tabla de resultados de retención de Cr^{+6}

Concentración inicial Cr ^{6} (ppm)	**Volumen de Saponina**	**Concentración final Cr ^{6} (ppm)**
A	S1	1,18
A	S1	1,21
A	S1	1,12
A	S1	1,18
A	S1	1,2
A	S1	1,15
A	S1	1,16
A	S1	1,19
A	S1	1,13
A	S2	1,14
A	S2	1,12
A	S2	1

A	S2	0,94
A	S2	1,08
A	S2	1,14
A	S2	1,12
A	S2	1,15
A	S2	1,03
A	S3	0,85
A	S3	0,89
A	S3	0,81
A	S3	1,02
A	S3	0,95
A	S3	0,96
A	S3	0,6
A	S3	0,68
A	S3	0,79
B	S1	1,97
B	S1	1,94
B	S1	1,92
B	S1	1,98
B	S1	1,99
B	S1	2,02
B	S1	0,96
B	S1	1
B	S1	1,14
B	S2	1,3
B	S2	1,35
B	S2	1,25
B	S2	1,46
B	S2	1,51
B	S2	1,41

B	S2	1,3
B	S2	1,38
B	S2	1,23
B	S3	1,79
B	S3	1,77
B	S3	1,76
B	S3	2,07
B	S3	2,12
B	S3	2,03
B	S3	1,98
B	S3	1,9
B	S3	2
C	S1	4,24
C	S1	4,25
C	S1	4,36
C	S1	4,18
C	S1	4,15
C	S1	4,23
C	S1	4,21
C	S1	4,22
C	S1	4,2
C	S2	4,63
C	S2	4,57
C	S2	4,58
C	S2	4,17
C	S2	4,16
C	S2	4,1
C	S2	4,34
C	S2	4,29
C	S2	4,23

C	S3	4,12
C	S3	4,11
C	S3	3,96
C	S3	4,27
C	S3	4,13
C	S3	4,11
C	S3	4,13
C	S3	4,19
C	S3	4,14

A= 1.25 ppm Cr

B= 2.5 ppm Cr

C= 5 ppm Cr

S1= 1mL saponinas

S2= 2mL saponinas

S3= 3mL saponinas

Fuente: (Arcos, Vivar, 2015).

Anexo 9. Tabla de resultados para establecer las condiciones óptimas para la retención de As^{+3}.

pH	**Tiempo (min)**	**Concentración As^{+3}(ppm)**
7	10	0,025
7	10	0,025
7.5	10	0,025
7.5	10	0,05
8	10	0,01
8	10	0,025
7	20	0,05
7	20	0,05
7.5	20	0,025
7.5	20	0,01
8	20	0,025
8	20	0,025

7	40	0,05
7	40	0,05
7.5	40	0,05
7.5	40	0,05
8	40	0,005
8	40	0,025
7	60	0,05
7	60	0,025
7.5	60	0,05
7.5	60	0,025
8	60	0,05
8	60	0,025

Fuente: (Arcos, Vivar, 2015).

Anexo 10. Tabla de resultados de retención de As^{+3}.

Concentración inicial As (ppm)	Vol. Saponina (mL)	Concentración final As (ppm)
A	1	0,005
A	1	0,005
A	1	0,05
A	2	0,05
A	2	0,05
A	2	0,05
A	3	0,01
A	3	0,025
A	3	0,05
B	1	0,01
B	1	0,025
B	1	0,025
B	2	0,025
B	2	0,025

B	2	0,025
B	3	0,025
B	3	0,025
B	3	0,025
C	1	0
C	1	0,1
C	1	0,1
C	2	0,01
C	2	0,025
C	2	0,025
C	3	0,05
C	3	0,025
C	3	0,025

A= 0.05 ppm

B= 0.1 ppm

C= 0.25 ppm

Fuente: (Arcos, Vivar, 2015).

Anexo 11. Certificado de identificación de *Agave americana L.*

CERTIFICADO DE IDENTIFICACIÓN

El espécimen examinado corresponden a:

Agave americana L.

- Clase: Equisetopsida C. Agardh
- Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.
- Superorden: Lilianae Takht.
- Orden: Asparagales LinkF
- Familia: Asparagaceae Juss.
- Género: *Agave* L.
- Especie: *americana* L.
- Nombre común: Penco

Álvaro J. Pérez Castañeda

Curador de Angiospermas Herbario QCA

Anexo 12. Información del estándar S452

3050 Spruce Street
Saint Louis, Missouri 63103 USA
Telephone 800-325-5832 • (314) 771-5765
Fax (314) 286-7828
email: techserv@sial.com
sigma-aldrich.com

SIGMA®

ProductInformation

SAPONIN FROM QUILLAJA BARK PURIFIED
Sigma Prod. No. S4521
Storage: Room Temperature

CAS NUMBER: 8047-15-2
SYNONYMS: Sapogenin Glycosides[1]

STRUCTURE:

Quillaja saponaria saponin (Quillaja saponins) is a heterogenous mixture of molecules varying both in their aglycone and sugar moieties.[2] The main aglycone (sapogenin) moiety is quillaic acid, a triterpene of predominantly 30-carbon atoms (hydrophobic) of the Δ^{12}-oleanane type. The aglycone is bound to various sugars (hydrophilic) including glucose, glucuronic acid, galactose, xylose, apiose, rhamnose, fucose and arabinose. Sapogenin devoid of any sugars can be isolated by acid hydrolysis of saponins.[3,4,5,6,7] The structure of a component isolated from the acylated triterpenoid saponin mixture of Quillaja saponaria was reported.[8]

PHYSICAL DESCRIPTION:

Appearance: powder[3]
Methods for the identification and quantitative determination of the aglycone and carbohydrate moieties of saponins have been reported.[2,4,9,10,11]

METHOD OF PREPARATION:

Quillaja saponin is obtained from the bark of the South American soaptree, Quillaja saponaria Molina (Rosaceae family). Product S4521 is purified by ultrafiltration to reduce low molecular weight contaminants.[3] A general method of preparation of the extract has been reported.[2]

STABILITY / STORAGE AS SUPPLIED:

Quillaja saponin is hygroscopic and is expected to be stable for at least one year at room temperature when stored dry.

SOLUBILITY / SOLUTION STABILITY:

Quillaja saponin is soluble in water yielding micelles with an average MW of 56,000. The solubility is tested at 50 mg/ml deionized water.[3] The solubility in water may be increased by additions of small amounts of alkali.[12]