



APLICACIÓN DE EXTRACTOS DE LECHUGUILLA (*Agave lechuguilla* Torr.) EN LA REMOCIÓN DE COBRE (II) EN MODELOS DE AGUA POR AGLOMERACIÓN ESFÉRICA

APPLICATION OF LECHUGUILLA (*Agave lechuguilla* Torr.) EXTRACTS FOR COPPER (II) REMOVAL FROM WATER MODELS BY SPHERICAL AGGLOMERATION

F. Alcázar-Medina¹, J. Proal-Nájera^{1*}, T. Gallardo-Velázquez², I. Cháirez-Hernández¹,
C. Antileo-Hernández³, A. Alvarado-de la Peña¹

¹Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional- Unidad Durango, IPN. Calle Sigma 119. Fracc. 20 Noviembre II, Durango, Dgo. 34220, México.

²Departamento de Biofísica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB), IPN, México.

³Departamento de Ingeniería Química, Universidad de la Frontera, Temuco, Chile.

Recibido 29 de Junio, 2013; Aceptado 8 de Marzo, 2014

Resumen

El cobre en agua constituye un micronutriente esencial para el humano, pudiendo producir, por exceso, efectos perjudiciales para la salud. En ambientes acuáticos naturales, la toxicidad de este elemento está atribuida a la especie divalente Cu(II). La técnica de aglomeración esférica destaca para remover cobre en agua, empleando agentes tensoactivos industriales con alto contenido de sodio (Na). En este estudio se desarrolló un método de remoción de Cu(II) en modelos de agua (2-15 ppm) por aglomeración esférica, utilizando como biosurfactante extractos de pulpa de lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr.), rica en saponinas, libre de sodio, y constituye un subproducto en varias agroindustrias de México. Las condiciones experimentales fueron: 0.1-2 g-extracto/g de metal, T°=22°C, pH_{Inicial} = 8.0 y agitación constante de 600 rpm. Las saponinas en el extracto se identificaron por HPLC-DAD, comparando los tiempos de retención de los picos característicos contra un estándar. El cobre y sodio residuales se determinaron por espectroscopia de absorción atómica. Una eficiencia media (98.7%) obtenida en los experimentos realizados para remover cobre, que satisface las normas para agua potable y para descarga a cuerpos de agua, nos permite recomendar la sustitución de agentes tensoactivos industriales por extractos de lechuguilla (*A. lechuguilla*), en la remoción de Cu (II) en agua por la técnica de aglomeración esférica.

Palabras clave: *Agave lechuguilla*, aglomeración esférica, biosurfactante, cobre, remoción.

Abstract

Copper in water is an essential micronutrient for human beings, it can produce damage effects for health due to excess. Toxicity of this element is attributed to its divalent Cu (II) species in natural aquatic environments. For copper removal in water, the spherical agglomeration technique can be applied by using industrial tensoactive agents with high Sodium (Na) contents. In this study, a Cu (II) removal method was developed using extracts of pulp of lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr.), which is a waste in many industries in Mexico, rich in saponines and free of Sodium. The technique of spherical agglomeration was carried out in synthetic water (2 to 15 ppm) using extracts of pulp of lechuguilla as biosurfactant. The experimental conditions were: 0.1-2.0 g-extract/g metal, T°=22°C, pH_{Initial}=8.0, and constant stirring at 600 rpm. Saponines were measured by HPLC-DAD in the extract, comparing the retention time of typical peaks with a standard. Residual Copper and Sodium were measured by atomic absorption spectroscopy. A mean 98.7% Copper removal efficiency was reached in all assays, which meets the requirements of the tap- and waste- water regulations. According to this study, we suggest to replace the industrial tensoactive agents by lechuguilla (*A. lechuguilla*) extracts in order to remove Cu (II) from water by spherical agglomeration technique.

Keywords: *Agave lechuguilla*, spherical agglomeration, biosurfactant, copper, removal.

*Autor para la correspondencia. E-mail: joseproal@hotmail.com
Tel. 52-618-8142091 ext. 82634, Fax 52-618-8144540

1 Introducción

El desarrollo constante de procesos de industrialización genera la liberación de desechos que se incorporan al ecosistema, muchos de los cuales se consideran tóxicos para los seres vivos, tal es el caso de los metales pesados presentes en cuerpos de agua y entre ellos, la presencia de cobre en aguas naturales y en agua de mar (Nordberg y col., 2007; EPA, 2008).

Como parte integrante de numerosas enzimas, el cobre es un elemento traza esencial en el organismo humano, sin embargo, en los últimos años se han reportado impactos en salud en población infantil, derivados de la exposición a cobre en agua potable (Olivares y col., 2001; Araya y col., 2004). En ambientes acuáticos naturales, la toxicidad de este elemento está atribuida a las especies inorgánicas, principalmente Cu^{2+} , CuOH^+ y $\text{Cu}(\text{OH})_2$ (Chakoumakos y col., 1979). De esta especie divalente, sólo una pequeña fracción se presenta como libre (Cu^{2+}), la mayor parte estará adsorbida en partículas suspendidas o formando complejos como ligandos.

La descarga anual de cobre hacia áreas marinas, incluyendo ríos, se estima en 2.5 millones de toneladas, gran parte de la cual proviene de actividades mineras, acumulando una concentración de este metal en miles de $\mu\text{g g}^{-1}$ en los sedimentos (Salomons y Förstner, 1984; EPA, 2008). El cobre muestra efectos letales y subletales en varios grupos de invertebrados acuáticos a partir de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ (Nordberg y col., 2007), siendo amplio el reporte especializado sobre la toxicidad ocasionada en organismos acuáticos por la presencia de cobre divalente $\text{Cu}(\text{II})$, por ejemplo; en trucha alpina (*Salvelinus alpinus*) (Dallinger, 1995), en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Hansen y col., 1999), en rutilo (*Rutilus rutilus caspicus*) (Hoseini y Nodeh, 2012), y en evaluaciones histológicas en peces (Darwish y col., 2005; Grosell, 2011).

La remoción de cobre en agua puede llevarse a cabo por diversos métodos como la precipitación, adsorción sobre carbón activado, extracción con solventes, ultrafiltración, ósmosis inversa e intercambio iónico (Ramalho, 1991), por adsorción sobre hojas de plantas (Al-Suby y col., 2001), así como por aglomeración esférica (Kawashima y col., 1984; Sadowsky, 1993). La aglomeración esférica (AE) es una técnica que consta de cuatro etapas:

A) La precipitación de cobre $\text{Cu}(\text{II})$ en medio acuoso mediante la adición de un agente de precipitación, normalmente NaOH o $\text{Ca}(\text{OH})_2$, bajo

un intervalo establecido mínimo y máximo de magnitudes de pH, para lograr la precipitación completa del metal y hasta alcanzar un tamaño de partícula coloidal (Armenante, 1997).

B) La adición de un agente hidrofobizante (Wen y col., 2011), que constituye una sustancia de superficie activa como el ácido oleico ($\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$), oleato de sodio ($\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{O}_2\text{Na}$), o largas cadenas de alcoholes alifáticos (Sadowsky, 1993), cuyo papel consiste en cambiar la afinidad hidrofílica del sistema coloidal hacia una naturaleza hidrofóbica.

C) La humectación de las partículas hidrofóbicas suspendidas en medio acuoso a través de un líquido colector, normalmente n-heptano (C_7H_{16}) (Bos y Quast, 2000).

D) El crecimiento de los núcleos cristalinos por aglomeración (Göselle y col., 1990; Kang y col., 2011), todo ello bajo estricto control de parámetros fisicoquímicos como la temperatura, la magnitud de pH, la velocidad de agitación y el tamaño de partícula (House y Veal, 1989).

El alto costo de los agentes hidrofobizantes industriales arriba mencionados, utilizados en la segunda etapa de AE, así como las altas concentraciones de sodio residual al final del proceso de remoción de metales pesados, han motivado, en el presente trabajo, a sustituir las sustancias tensoactivas industriales por agentes de superficie activa de origen natural, que constituyen extractos de material foliar de plantas (San Martín y Briones, 2000), principalmente agaváceas (Sucharzewska y col., 2003), ricas en saponinas (Flaoyen y col., 2002), con acción biológica diversa, tal como excelentes agentes antivirales (Francis y col., 2002; De Lucca y col., 2006), y que aprovechando distintos procesos productivos de nuestra sociedad relacionados con estas plantas, se pueden generar productos con un valor agregado, dando uso, por ejemplo; al bagazo de agave para producir compuestos químicos (Saucedo-Luna y col., 2010), o bien, utilizando los jugos de agave en la elaboración de mezcal para producir etanol (Pérez y col., 2013), y en el caso particular de la pulpa de la lechuguilla (*A. lechuguilla*), ésta constituye subproductos de deshecho en varias agroindustrias de México, durante el proceso de aprovechamiento de su fibra en la fabricación de utensilios diversos (Nobel y Quero, 1986; Pando y col., 2002).

Amplias son las referencias que reportan el uso de plantas en la remoción de cobre y otros metales pesados, así como su interacción descrita por diferentes mecanismos, por ejemplo; Romero-González y col., (2005), desarrollan 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 y que la reacción de reducción ocurre en la superficie externa de la biomasa. Peralta-Pérez y Volke-Sepúlveda (2012), señalan el potencial de los diferentes procesos de fitorremediación para tratar suelos contaminados con metales pesados y metaloides (Cu, Pb, Ni, Cd, Zn, Cr, Hg y As), así como con sustancias orgánicas, describiendo la importancia del control del estrés oxidativo como una estrategia de las plantas para tolerar la presencia de contaminantes.

Las saponinas constituyen un grupo diverso de compuestos ampliamente distribuidos en el reino vegetal, que se caracterizan por sus propiedades fisicoquímicas (surfactantes) y por su estructura, conteniendo un triterpeno o esteroide aglicón y una o más cadenas de azúcares (Guclu-Ustundag y Mazza, 2007). La obtención de extractos a partir de material foliar de algunas agaváceas y los métodos analíticos y estadísticos de cuantificación de las saponinas contenidas en ellos, han sido ampliamente documentados en la literatura especializada, por ejemplo; en *Yucca schidigera* (Piacente y col., 2002; Sucharzewska y col., 2003), en *Agave durangensis* (González-Valdez, 2011) y en lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr.), para la cual se reporta la presencia de esmilagenina (sapogenina esteroideal), además de 8 saponinas más: yucagenina, gitogenina, hecogenina, tigogenina, diosgenina, gentrogenina, clorogenina y ruizgenina, por lo que podría emplearse como fuente de esteroides, para la elaboración de cortisona (antiinflamatorio), e incluso estrógeno y progesterona (Hernández y col., 2005). Dada la naturaleza en gran manera polar de estos compuestos, todos los métodos coinciden en la extracción en caliente o frío, con agua o alcoholes de bajo peso molecular; sobresaliendo el uso de metanol, etanol, butanol y mezclas de diferentes proporciones de estos alcoholes y agua. Hernández y col. (2005), reportan un contenido de saponinas a partir de extractos de lechuguilla (*A. lechuguilla*), de 0.1 a 1.3 % base seca, estableciendo para esta especie, que sólo los factores temperatura y número de lote influyen en el rendimiento de extracción de saponinas a partir de material foliar.

Aunque existe información sobre la remoción de cobre en modelos de agua (Apfel, 1992; Proal y col., 1997) y en aguas residuales industriales (Laurent, 1993; Proal y col., 1997), utilizando oleato de sodio como agente surfactante, es desconocida aquella que particulariza el aprovechamiento y aplicación de extractos naturales de lechuguilla (*A. lechuguilla*)

como biosurfactante, en el proceso de remoción de cobre en modelos de agua sintética mediante el empleo de la técnica de aglomeración esférica, lo cual constituye el objetivo del presente estudio. Nuestra meta, en este estudio, consiste en demostrar que el uso de extractos de lechuguilla (*A. lechuguilla*), ricos en saponinas, pueden sustituir el empleo de agentes tensoactivos industriales, como el oleato de sodio ($C_{18}H_{33}O_2Na$) y/o detergentes comerciales con alto contenido de sodio, en el proceso de remoción de cobre Cu(II) en agua por la técnica de aglomeración esférica, y que esos extractos son capaces de remover el metal en medio acuoso con la misma eficiencia que el oleato de sodio, alcanzando los niveles permisibles de concentración establecida por la normatividad para la calidad del agua NOM-127-SSA1-1994 (DOF, 2000) y NOM-001-ECOL-1996 (SEMARNAT, 1996).

2 Metodología

2.1 Material vegetal

El material foliar fue colectado de individuos adultos de plantas de lechuguilla (*A. lechuguilla*) en la localidad de Cuencamé, Durango, México (coordenadas: 24° 49' 48" N; 103° 44' 07" O; altitud 1795 m), enviando una muestra al Herbario del CIIDIR- Unidad Durango del IPN, para su registro e identificación, determinándose la especie encontrada como *Agave lechuguilla* Torr., lo cual concuerda con lo reportado (Nobel y Quero, 1986; Pando y col., 2002) para la distribución de esta especie en el Norte de México.

2.2 Reactivos

Los solventes utilizados para la extracción de saponinas fueron acetónitrilo (grado HPLC, J.T. Baker, Cat. 9012-03, CAS No. 75-05-8, USA) y agua tridestilada (J.T. Baker, Cat. 4221-03, CAS No. 7732-18-5, México). El estándar utilizado para detectar saponinas por HPLC/DAD fue un glicósido de sapogenina extractado de plantas (Hycel de México, S.A. de C.V., Cat. 6700, CAS No. 74499-23-3, México). Los experimentos de remoción de cobre en agua fueron llevados a cabo empleando un estándar de cobre (Centro Nacional de Metrología, DMR-17h, Cenam-México). Se ocuparon, también, NaOH (J.T. Baker, B13C54, EUA), n-Heptano (Sigma Chemical, México) y CaCl₂ (J.T. Baker, X12591, EUA).

2.3 Instrumentación

Las saponinas se analizaron por HPLC (Perkin Elmer, serie 200, USA), con detector acoplado por arreglo de diodos (DAD), usando una columna C₁₈ (4.6 × 250 mm, 5 μm; Brownlee Analytical, USA). El análisis de cobre residual en agua se realizó por (AAS, por sus siglas en inglés) espectrofotometría de absorción atómica (Perkin Elmer, modelo 700 AAnalyst; Massachusetts, EUA) y el tamaño de partícula del coloide formado en la etapa de precipitación mediante la técnica de aglomeración esférica, se determinó por (SEM, por sus siglas en inglés) microscopía electrónica de barrido (JEOL 5800 LV, Japón).

2.4 Preparación de extractos

A las hojas de lechuguilla (*A. lechuguilla*) se les eliminaron las espinas y se les removió la cutícula, cortándolas en trozos pequeños para facilitar su secado y colocándolas, entonces, en un secador a 40°C, hasta peso constante. Una vez seco el material se continuó con una operación de molienda para facilitar el proceso de extracción, el cual se realizó por maceración (González, 2011) de 100 g de hoja seca en etanol (70% v/v), en oscuridad, bajo agitación de 30 rpm, a temperatura ambiente y un tiempo de contacto de 72 h, posteriormente se llevó a evaporación hasta sequedad a vacío en un rotavapor (Buchi, R-114, Alemania). El proceso de extracción de material foliar de lechuguilla se efectuó 2 veces, hasta obtener 36 g de extracto base seca, preparando, entonces, una solución acuosa (Proal y col., 1997) de extracto base seca (8.43 g/L), utilizando agua destilada, para generar las dosis requeridas en la etapa de hidrofobización de AE (0.1, 0.3, 0.5, 1.0 y 2.0 g de biosurfactante/g de cobre en agua).

2.5 Determinación de saponinas

La identificación de saponinas fue realizada conforme a la estandarización de los picos en los cromatogramas obtenidos para los extractos por HPLC con detector por arreglo de diodos (DAD) y comparados en sus tiempos de retención contra los picos observados en el cromatograma del estándar empleado (Oleszek, 2002), glicósido de sapogenina. Se tomaron volúmenes de 20 μL de extracto para determinar el perfil de saponinas, utilizando el método de gradiente acetonitrilo -agua (0% B, 5 min; 9% B, 12 min; 13% B, 20 min; 32% B, 40 min; 33% B, 42 min; 43% B, 60 min; 0% B, 65 min), empleando una columna C₁₈

Brownlee Analytical y seleccionando la longitud de onda (260 y 340 nm), asimismo, para poder efectuar la comparación de picos en los cromatogramas, se establecieron los datos espectrales del perfil del estándar de glicósido de sapogenina en el equipo HPLC/DAD, bajo un intervalo de 220 - 400 nm, tomando un número de muestras igual a 10 por triplicado.

2.6 Aplicación de la técnica de aglomeración esférica

A) Precipitación. Se prepararon soluciones modelo de Cu(II), utilizando el estándar referido de cobre en agua destilada, en el intervalo de concentraciones 2-15 ppm, ajustando la magnitud óptima de pH igual a 8.0, con solución 1M de NaOH (Armenante, 1997), utilizando matraces de 500 mL, con paredes deformadas y propelas de acero inoxidable de 3.5 × 2.5 cm, en 250 mL de solución, a temperatura ambiente (22 °C) y manteniendo agitación constante (ω) a 600 rpm, durante 20 min (Proal y col., 1997), realizando experimentos por duplicado para cada concentración inicial. Se tomaron muestras por triplicado del hidróxido de metal formado, depositándolas sobre portamuestras de acero inoxidable, precalentado a 90°C, para fijar el hidróxido de metal precipitado al evaporar el solvente, y se determinó el tamaño de partícula por microscopía electrónica de barrido (SEM), bajo un flujo de electrones de 20 kV y de 1500-12000 × aumentos.

B) Hidrofobización. Sin interrumpir la reacción, se adicionaron, a partir de la solución acuosa (8.46 g/L) de extracto de lechuguilla (*A. lechuguilla*), volúmenes equivalentes a distintas dosis (0.1, 0.3, 0.5, 1 y 2 g de extracto de lechuguilla por gramo de cobre presente en agua), bajo la misma magnitud de agitación ($\omega = 600$ rpm), a temperatura ambiente (22°C) y durante 30 min (Proal y col., 1997).

C) Humectación. La etapa de acondicionamiento de los sólidos hidrofóbicos se llevó a cabo adicionando un volumen determinado de n- heptano (C₇H₁₆), 6.3 mL por gramo de metal contaminante Cu (II) en solución acuosa, siempre bajo agitación constante (600 rpm), a temperatura ambiente y durante 20 min (Proal y col., 1997).

D) La etapa de crecimiento de los núcleos cristalinos por aglomeración se alcanzó adicionando 10 mL de solución 1M de CaCl₂ por gramo de cobre presente en la solución acuosa, agitando sin interrupción a 600 rpm, a temperatura ambiente (22°C) y durante 90 min (Proal y col., 1997).

Al final del proceso descrito, se filtra la solución utilizando papel filtro Whatman # 42 para remover los aglomerados formados y determinar, en la fase líquida, la concentración de cobre residual por AAS, siguiendo las regulaciones de calidad del agua en México, NMX-AA-051-SCFI-2001 (Secretaría de Economía, 2001), por flama y horno de grafito.

2.7 Diseño experimental

Para el proceso de remoción de cobre en modelos de agua, aplicando extractos de lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr.) en la etapa de hidrofobización, se diseñó un arreglo factorial 5x4, con el factor 5 representando las diferentes dosis utilizadas del extracto de lechuguilla (*A. lechuguilla*) y el factor 4 la concentración inicial de metal Cu (II) en el modelo de agua sintética, realizando experimentos por triplicado para cada concentración inicial. El diseño experimental se empleó para determinar la influencia de la dosis de extracto de lechuguilla y la concentración inicial de cobre en la eficiencia de remoción.

2.8 Análisis estadístico

El análisis del modelo lineal general (GLM, por sus siglas en inglés) correspondiente al diseño experimental, se realizó a través de un análisis de varianza, verificando los supuestos de normalidad, independencia y homogeneidad de varianza. Se estimó el coeficiente de determinación de Pearson (R^2) para verificar la bondad de ajuste del modelo, de acuerdo al programa Statistica 7 for Windows -StatSoft, US, 2004. Posteriormente se realizaron comparaciones de medias con la prueba de diferencia mínima significativa (LSD, por sus siglas en inglés) de Fisher, para determinar los efectos de la dosis de extracto, la concentración inicial del metal Cu(II) y el efecto de la interacción dosis- concentración. Finalmente, se obtuvo un modelo cuadrático de superficie de respuesta a partir de los datos experimentales.

3 Resultados y discusión

3.1 Identificación de Saponinas

El rendimiento obtenido con respecto al extracto etanólico de material foliar de *A. lechuguilla*, fue de 19%, mismo que se encuentra comprendido dentro del intervalo (de 12.3 a 29.7) reportado (González-Valdez, 2011) para algunos agaves. Esto muestra

la factibilidad del proceso de maceración empleado en la obtención de extractos a partir de material foliar de lechuguilla, el cual permite la reducción de costos de operación, al evitar el uso de procesos más costosos (Soxhlet, exhaustiva, etc.), lo cual, a nivel de producción, podría ser de gran interés.

Se identificaron los picos de saponinas en los cromatogramas obtenidos para el extracto de lechuguilla por HPLC-DAD, comparando los tiempos de retención de esos picos característicos contra los del estándar utilizado (Oleszek, 2002), glicósido de sapogenina, que comercialmente está identificado (CAS No. 74499-23-3) como saponinas de *Quillaja saponaria*. Al comparar el perfil cromatográfico obtenido por HPLC/DAD para el estándar de referencia contra el perfil cromatográfico obtenido para el extracto de material foliar (Fig. 1) de lechuguilla (*A. lechuguilla*), se detectaron tres distintos compuestos de saponinas presentes en el extracto, lo que nos muestra que el gradiente empleado cubre un amplio espectro de polaridades, en el cual fue posible que el patrón de glicosidación de las saponinas fuera diluido. Se observó siempre reproducibilidad en los cromatogramas obtenidos para los extractos de lechuguilla, toda vez que el material foliar utilizado procede del mismo sitio de muestreo, así como también se explica por el hecho de haber mantenido siempre constante la temperatura durante el proceso de extracción, lo cual concuerda con Hernández y col. (2005), quienes reportan que los factores temperatura y número de lote son los únicos parámetros determinantes para el rendimiento de saponinas obtenidas a partir de lechuguilla (*A. lechuguilla*).

En la Fig. 2, se muestran los espectros UV de las tres saponinas detectadas en el extracto de lechuguilla (*A. lechuguilla*), teniendo como referencia el estándar utilizado (glicósido de sapogenina), con intervalos de tiempos de retención que van de 25 a 40 min (34.4117; 36.9343; 38.6797 min), lo cual coincide, en lo que respecta a los tiempos de retención característicos de las saponinas, con reportes especializados (Lamidi y col., 1995) para separación de saponinas esteroidales en condiciones similares. La línea con el menor tiempo de retención (RT: 28.0463) de la Fig. 2, no es característica de estos compuestos, por tanto, no representa saponina alguna. Nuestros resultados son consistentes con los reportados por González-Valdez (2011), para la identificación de saponinas presentes en extractos de *Agave durangensis* por el mismo método de HPLC/DAD, obtenidas en un intervalo de longitud de onda entre 275 y 315 nm. Lo

anterior confirma, de forma reproducible y confiable, la existencia de saponinas en los extractos obtenidos a

partir de material foliar de lechuguilla (*A. lechuguilla*).

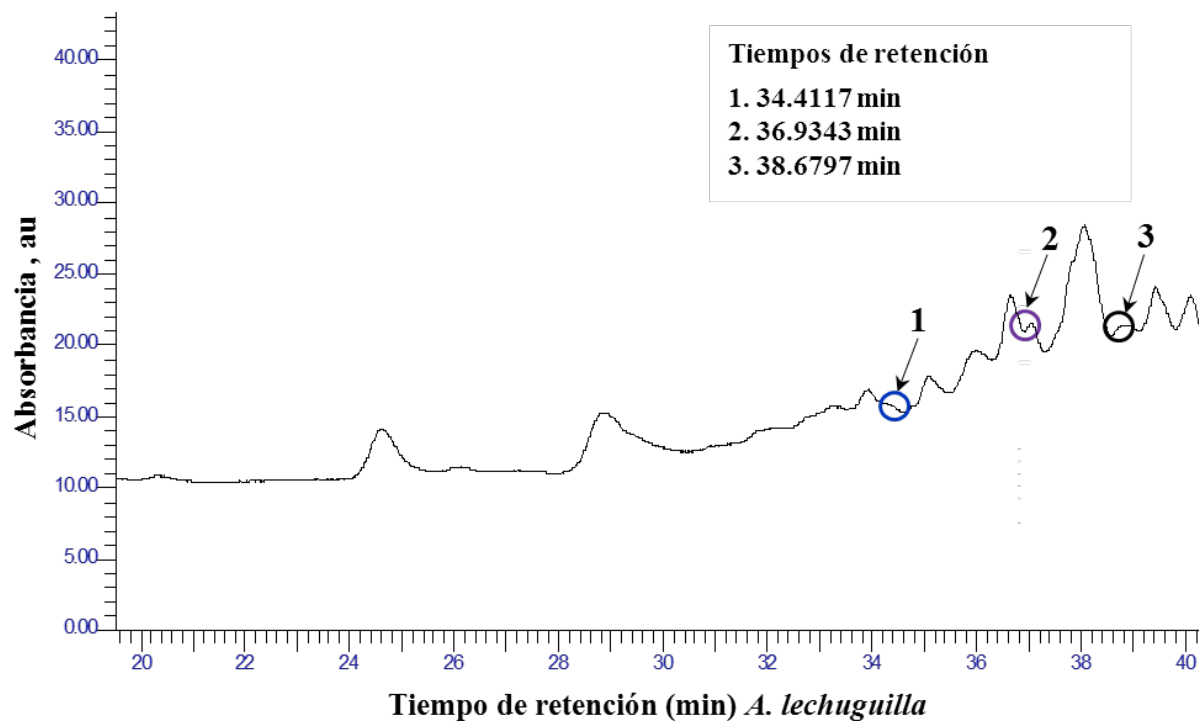


Fig. 1. Perfil cromatográfico de extractos de *Agave lechuguilla* Torr., registrado a 260 nm (Método de gradiente: Acetonitrilo - Agua).

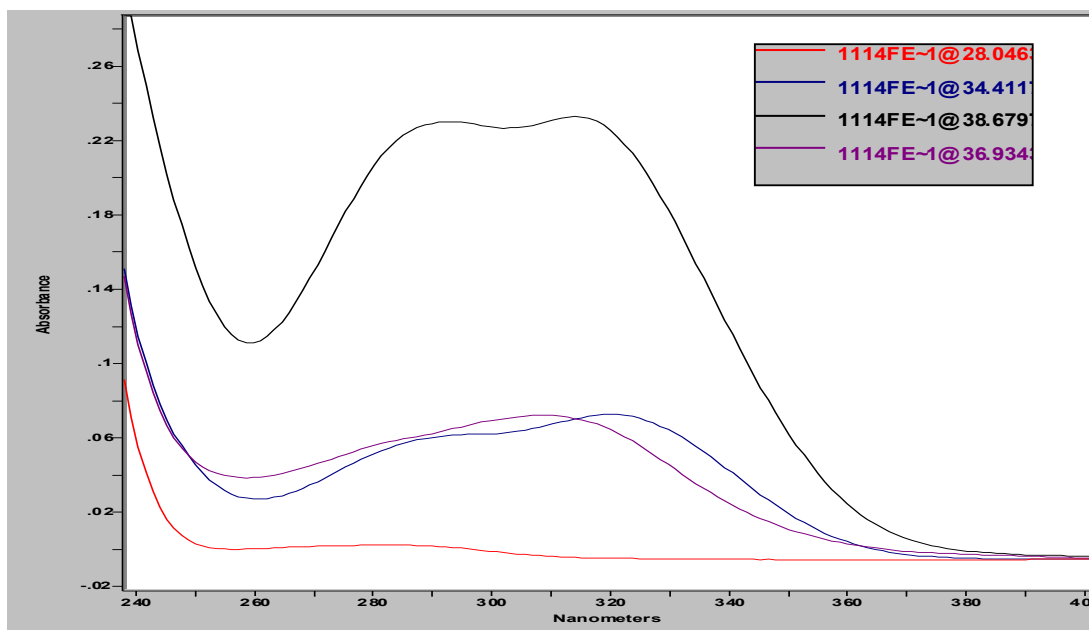


Fig. 2. Espectros UV de saponinas (RT: 34.4117; 36.9343; 38.6797) presentes en el extracto de lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr.).

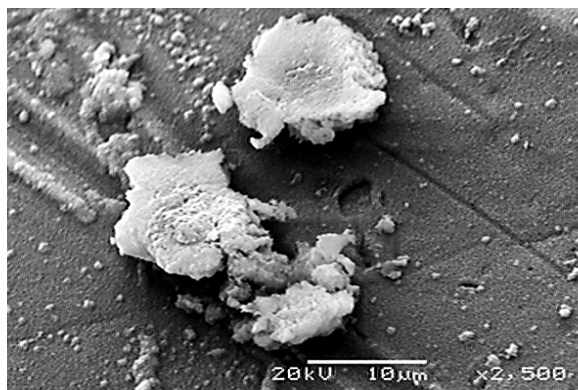


Fig. 3. Micrografía de $\text{Cu}(\text{OH})_2$ por Microscopía Electrónica de Barrido, obtenida a $T^\circ=22^\circ\text{C}$, $\text{pH}=8.0$ y agitación constante $\omega=600$ rpm.

3.2 Aplicación de la técnica de aglomeración esférica

La Fig. 3, muestra una micrografía obtenida para precipitados de $\text{Cu}(\text{OH})_2$ por microscopía electrónica de barrido (SEM), para la etapa de precipitación de $\text{Cu}(\text{II})$ en agua mediante la adición de solución 1M de NaOH , hasta alcanzar una magnitud de $\text{pH}=8.0$, a temperatura constante ($T^\circ=22^\circ\text{C}$). El tamaño de partícula de los precipitados obtenidos muestra una distribución coloidal (1-10 μm), característico de los metales pesados asociados a agentes de precipitación y termodinámicamente muy inestables, lo que explica su naturaleza hidrofílica y la tendencia hacia una rápida redisolución. Es por ello que esta etapa se llevó a cabo bajo una lenta dosificación del agente de precipitación (NaOH), propiciando la sobresaturación de la solución y, de esa manera, evitar la redisolución del hidróxido de metal formado hacia la solución, lo que generaría la formación de hidroxicomplejos, por lo cual es necesario mantener una agitación constante e ininterrumpida ($\omega = 600$ rpm) durante la etapa de precipitación. La magnitud óptima de $\text{pH}=8.0$, alcanzada en la etapa de precipitación, se explica por el intervalo de los límites mínimo y máximo ($\text{pH}_{\text{mín}}=6.70$ y $\text{pH}_{\text{máx}}=7.58$) de total precipitación de $\text{Cu}(\text{II})$ en modelos de agua (Proal y col., 1997), alcanzando de esa manera, la presencia completa del metal en el coloide formado. Nuestros resultados de formación coloidal y el correspondiente tamaño de partícula de los precipitados obtenidos, coinciden con los reportes de otros autores (Apfel, 1992; Laurent, 1993).

La Tabla 1, muestra la concentración residual de $\text{Cu}(\text{II})$ y los niveles de remoción (%) de este

metal al final de las cuatro etapas de la técnica de aglomeración esférica, bajo temperatura constante ($T^\circ=22^\circ\text{C}$) y agitación constante ($\omega = 600$ rpm) a lo largo de todas las etapas, obtenida bajo el diseño experimental 5x4. Los resultados demuestran el cambio de afinidad hidrofílica de los sistemas coloidales hacia una naturaleza hidrofóbica por acción de los extractos de lechuguilla (*A. lechuguilla*), para todas las dosis de biosurfactante empleadas (0.1, 0.3, 0.5, 1.0 y 2.0 g de biosurfactante/g de metal) y para todos los casos de concentración experimental inicial de $\text{Cu}(\text{II})$ presente en modelos de agua (2, 5, 10 y 15 ppm), toda vez que la concentración residual de este elemento ($\text{Conc}_{\text{Cu}(\text{II}) \text{Resid}} < 0.5$ ppm) satisface los límites permisibles de las normas de referencia (SEMARNAT, 1996; DOF, 2000).

La Tabla 1, muestra asimismo las magnitudes finales de pH , aceptables todas ellas con respecto a la normatividad que nos ocupa, resultados que señalan la conveniencia de utilizar extractos de lechuguilla en la segunda etapa de AE, puesto que explica, indirectamente, la adecuada hidrofobización de los sólidos presentes en solución acuosa y, en consecuencia, el crecimiento de la estabilidad termodinámica del sistema coloidal, una vez alcanzado el cambio de afinidad fílica a fóbica de los precipitados, evitando su redisolución hacia la solución. Los resultados obtenidos comprueban, también, la adecuada humectación que ejerció el líquido colector (n-heptano) sobre los sistemas hidrofóbicos microheterogéneos formados en la etapa de hidrofobización por AE, aplicado en un amplio intervalo de dosis de extracto de lechuguilla (0.1, 0.3, 0.5, 1.0 y 2.0 g de biosurfactante/g de metal) y para cualquier concentración inicial (2, 5, 10 y 15 ppm) de $\text{Cu}(\text{II})$ en agua, toda vez que nos encontramos ante una interacción sólido-líquido de total naturaleza hidrofóbica, que explica la ausencia de materia sólida que pudiera haberse depositado sobre las propelas de acero inoxidable utilizadas y/o sobre las paredes del matraz contenedor de la reacción, por un exceso en la adición del agente acondicionador (n-heptano) o bien, por una velocidad angular demasiado alta ($\omega > 600$ rpm).

Las magnitudes óptimas establecidas en este trabajo para la remoción de $\text{Cu}(\text{II})$ en modelos de agua, utilizando extractos de lechuguilla, concretamente $\text{pH}_{\text{inicial}}=8.0$, velocidad angular en todas las etapas de la técnica AE ($\omega = 600$ rpm), así como los tiempos de reacción para cada etapa de AE, la dosificación (6.3 mL por gramo de metal contaminante) del agente de humectación (n-heptano)

y la dosificación del agente en la etapa de crecimiento de los núcleos cristalinos por aglomeración (10 mL de solución 1M de CaCl_2 por gramo de cobre presente en la solución acuosa), son similares a los reportados por Proal y col. (1997), para la remoción de cobre en agua por AE, utilizando oleato de sodio como agente tensoactivo en la etapa de hidrofobización, notándose una clara desventaja, para el caso del tensoactivo industrial, por su alto costo comercial, así como por la excesiva concentración residual de sodio en agua ($\text{Na}^{1+} = 1100$ ppm), producto del alto contenido de ese metal en el oleato de sodio. En la Tabla 1, se muestran las concentraciones de sodio residual para los experimentos realizados en el presente trabajo, con un máximo residual de $\text{Na}^{1+} = 169.75$ ppm y un mínimo residual de $\text{Na}^{1+} = 58.12$ ppm, que satisfacen, en todos los casos, los límites permisibles establecidos en las normas de referencia, señalando la ventaja de utilizar extractos de lechuguilla como un biosurfactante de alta eficiencia en el proceso de remoción de Cu (II) en agua por AE.

El análisis de los residuales del modelo lineal factorial 5×4 mostró que no se violan los supuestos de normalidad, independencia y homogeneidad de varianza, el coeficiente de determinación (R^2) fue de 0.982, lo que permite considerar un diseño experimental confiable ($p < 0.05$), y demuestra la eficiencia de la técnica de aglomeración esférica, toda vez que los resultados experimentales obtenidos satisfacen plenamente la normatividad establecida para la calidad del agua, tanto para descargas a cuerpos de agua NOM-001-ECOL-1996 (SEMARNAT, 1996), como para límites permisibles de cobre en agua potable NOM-127-SSA1-1994 (DOF, 2000).

En el efecto de la interacción concentración inicial-dosis de extracto, los mayores niveles de remoción se encontraron en la concentración inicial de 5 ppm, con dosis de 0.5, 1 y 2 (g-extracto/g de metal). Se observó una diferencia significativa con la concentración inicial de 5 ppm y dosis de 0.1 y 0.3 (g-extracto/g de metal), que presentan menor remoción.

Tabla 1. Remoción de Cu (II) por aglomeración esférica bajo un diseño factorial 5×4 , utilizando *A. lechuguilla* como biosurfactante.

Dosis de extracto ^{††}	Concentración inicial de cobre (ppm)	Concentración residual de cobre (ppm) [†]	Remoción de cobre (%)	Concentración residual de sodio (ppm)	Magnitud final de pH
2	15	0.499	96.67 ^c	169.75 ^d	6.70
1	15	0.151	99.00 ^g	148.00 ^d	6.71
0.5	15	0.192	98.72 ^f	146.50 ^d	6.76
0.3	15	0.131	99.13 ^h	145.80 ^d	7.97
0.1	15	0.096	99.36 ⁱ	145.84 ^d	7.88
2	10	0.143	98.57 ^e	109.50 ^c	6.57
1	10	0.025	99.75 ^j	100.15 ^c	6.97
0.5	10	0.095	99.05 ^g	102.00 ^c	6.86
0.3	10	0.122	98.79 ^f	101.75 ^c	7.50
0.1	10	0.222	97.78 ^d	101.46 ^c	6.97
2	5	0.006	99.88 ^j	91.70 ^b	6.81
1	5	0.004	99.93 ^j	92.65 ^b	6.73
0.5	5	0.002	99.97 ^j	91.00 ^b	6.85
0.3	5	0.107	97.87 ^d	91.20 ^b	7.07
0.1	5	0.063	98.75 ^f	90.87 ^b	6.83
2	2	0.005	99.75 ^j	76.10 ^a	6.95
1	2	0.007	99.68 ^j	74.50 ^a	6.68
0.5	2	0.009	99.58 ^j	60.50 ^a	6.75
0.3	2	0.087	95.68 ^a	58.98 ^a	6.63
0.1	2	0.077	96.18 ^b	58.12 ^a	6.86

[†]Se obtuvo a pH inicial=8.0, T°=22°C, ω =600 rpm y tiempo de reacción=160 min

^{††}Unidades en g g^{-1} (masa de extracto por gramo de cobre en agua)

Superíndices distintos expresan diferencias significativas, donde: $a < b < c \dots$

Nota: El Análisis de varianza (ANOVA) para la concentración de sodio residual indica que todos los niveles, con respecto a la concentración inicial de Cu (II), son diferentes.

Tabla 2. Análisis de varianza para la remoción de Cu (II) en agua por aglomeración esférica.

Fuente de variación	Suma de cuadrados (SC)	Grados de libertad (GL)	Cuadrados medios (CM)	F calculado	P valor
Intercepto	389693.3	1	389693.3	7050684	0.000000
Concentración inicial Cu (II)	6.4	3	2.1	39	0.000000
Dosis extracto	18.8	4	4.7	85	0.000000
Conc. Inicial	35.7	12	3.0	54	0.000000
*Dosis extracto Error	1.1	20	0.1		

Tabla 3. Comparación de medias (LSD) de dosis de extracto y de concentración inicial de Cu (II).

Dosis de extracto ^{††}	Promedio	Conc. Inicial Cu(II) [†]	Promedio
2	98.718 ^b	15	98.576 ^b
1	99.588 ^d	10	98.787 ^b
0.5	99.329 ^c	5	99.280 ^c
0.3	97.865 ^a	2	98.170 ^a
0.1	98.016 ^a		

[†] Unidades expresadas en ppm

^{††} Unidades en g g⁻¹ (masa de extracto por gramo de cobre en agua)

Superíndices distintos expresan diferencias significativas, donde: $a < b < c \dots$

Asimismo, existen diferencias significativas entre la concentración inicial 2 ppm, con las dosis 0.5, 1 y 2 (g-extracto/g de metal), respecto a las observadas con esa misma concentración (2 ppm) y con las dosis 0.1 y 0.3 (g-extracto/g de metal), mostrando mayor remoción con la dosis 5 (g-extracto/g de metal), que fue el resultado experimental más alto obtenido en este estudio (99.97%), para la remoción de Cu (II) en agua.

A concentración inicial de 15 ppm, se observaron diferencias significativas entre las dosis 0.1 y 0.3 (g-extracto/g de metal), respecto de las dosis 0.5, 1 y 2 (g-extracto/g de metal), mostrando mayor remoción la dosis 0.1 (g-extracto/g de metal). Los resultados obtenidos para una concentración inicial de 10 ppm, no muestran una tendencia clara respecto a la dosis de extracto aplicada.

La Tabla 2, muestra el análisis de varianza para la remoción de Cu (II) en agua por aglomeración esférica, en la cual se nota la existencia de diferencias significativas en la concentración inicial del metal, la dosis de extracto y en la interacción concentración inicial de metal- dosis de extracto ($p < 0.05$), confirmando que esos tres factores se constituyen en los parámetros determinantes de la eficiencia de remoción de Cu (II) en modelos de agua por aglomeración esférica, a partir de lechuguilla (*A. lechuguilla*) como agente biosurfactante.

La Tabla 3, muestra la comparación de medias por la prueba de diferencias mínimas significativas (LSD, por sus siglas en inglés) de Fisher, para determinar los efectos de la dosis de extracto y de la concentración inicial del metal Cu (II), señalando diferencias significativas entre las concentraciones iniciales 2, 5 y 15 ppm, no habiendo, sin embargo, diferencias entre las concentraciones iniciales 10 y 15 ppm. La mayor remoción se observa a 5 ppm, lo cual concuerda con los resultados mostrados en la Tabla 1. Respecto a la dosis de extracto, se observaron diferencias significativas entre 2, 1, 0.5 y 0.1 (g-extracto/g de metal), y no se encontró diferencia en las dosis 0.1 y 0.3 (g-extracto/g de metal), obteniendo el mejor resultado de remoción con la dosis 1.0 (g-extracto/g de metal).

La Fig. 4, muestra el gráfico de superficie de respuesta, diseñado mediante un modelo con ajuste cuadrático. La ecuación (1), explica dicho comportamiento, que muestra las eficiencias de remoción de cobre en agua, en función de la dosis de extracto de lechuguilla (S) y de la concentración inicial de cobre presente (M). Como es fácil observar, existe una amplia superficie que identifica el máximo de eficiencia correlativa entre las distintas concentraciones iniciales de Cu (II) en la solución acuosa y las diferentes dosis de extracto de

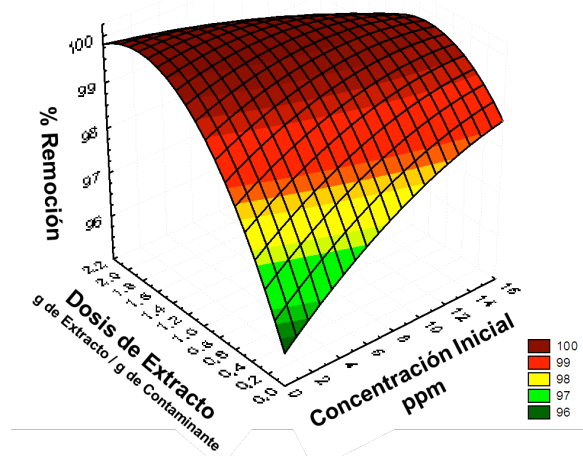


Fig. 4. Superficie de respuesta para la remoción de Cu (II) en modelos de agua.

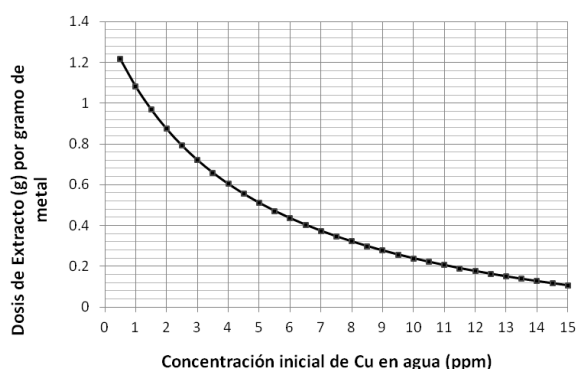


Fig. 5. Relación de concentración inicial de Cu (II) en agua contra dosis de extracto, obtenida a pH inicial = 8.0, T°=22°C y agitación constante $\omega=600$ rpm.

lechuguilla, lo que permite, de manera muy amplia, predecir el resultado de eficiencias de remoción de Cu (II) en agua, bajo un gran intervalo de concentraciones de este metal en la muestra de agua a tratar.

$$\%Remoción = 95.7397 + 0.2937M + 5.1349S - 0.0072M^2 - 0.1558MS - 1.4888S^2 \quad (1)$$

La Fig. 5, se generó con los datos del modelo de estimación de parámetros del análisis estadístico, y es muy significativo observar en ella, que el aumento gradual de concentración inicial de cobre Cu (II) en agua requiere de menores dosis de extracto, lo cual es consistente con los resultados obtenidos para este estudio por el método de Fisher (LSD), asimismo puede comprobarse, de manera muy precisa, observando la Fig. 5, que la dosis óptima de extracto de lechuguilla requerida experimentalmente, para una

concentración de 2 ppm de Cu (II) en agua, coincide con el supuesto del diseño experimental, misma que no sobrepasa la relación de 2 g de extracto por gramo de cobre. Suponer concentraciones de modelos acuosos de Cu (II) < 2 ppm, no tiene sentido experimental, toda vez que un caso así establece la presencia del metal en los límites permisibles para agua potable. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran una mayor eficiencia en las dosis empleadas de lechuguilla para remover Cu (II) en agua (g-extracto/g de metal) por aglomeración esférica, que las reportadas por otros autores (Apfel, 1992), para remover metales pesados individuales y/o en mezclas de 2-3 elementos de metal pesado, presentes en modelos de agua, mediante la técnica de aglomeración esférica, empleando de 3 a 8 gramos de oleato de sodio ($C_{18}H_{33}O_2Na$) por cada gramo de metal pesado contenido en la solución.

La concentración residual de calcio en todos los experimentos realizados ($Ca < 100$ ppm) cumple con los límites permisibles establecidos por la normatividad (SEMARNAT, 1996; DOF, 2000) y confirma una dosis adecuada del agente de aglomeración ($CaCl_2$), utilizado para generar un correcto balance de cargas en el sistema, lo que condujo al crecimiento de los aglomerados en la solución acuosa, obteniendo cuerpos esféricos entre 1-2 mm de diámetro.

Conclusiones

La comparación de los picos característicos en los cromatogramas obtenidos para el extracto de lechuguilla (*A. lechuguilla*), contra el estándar por HPLC/DAD, evidenciaron la presencia de saponinas con diferentes tiempos de retención (34.4117; 36.9343; 38.6797 min) y las réplicas confirmaron su reproducibilidad. El modelo desarrollado para la remoción de Cu (II) en agua por aglomeración esférica, alcanzó muy altas eficiencias de remoción para todos los experimentos realizados (hasta del 99.97%), bajo amplios intervalos de concentración (2-15 ppm) y en amplios espectros de dosificación (0.1-2 g-extracto/g de metal) de extractos de lechuguilla, lo cual demuestra que los extractos de lechuguilla contienen saponinas que pueden ser utilizadas como biosurfactantes y se pueden aplicar en la remoción de Cu (II) presente en modelos de agua, por aglomeración esférica.

El análisis de los residuales del modelo lineal factorial 5x4 mostró que no se violan los supuestos de normalidad, independencia y homogeneidad de

varianza. El coeficiente de determinación obtenido ($R^2 = 0.982$) permite considerar un diseño experimental confiable ($p < 0.05$), y demuestra la eficiencia del método de remoción de Cu (II) en agua, utilizando la técnica de aglomeración esférica.

La eficiencia de remoción de Cu (II) en agua utilizando extractos de lechuguilla es mayor a la que muestra el uso de oleato de sodio por esta técnica, teniendo como parámetro de comparación, la dosis de agente tensoactivo utilizado (g de surfactante/g de metal en agua), toda vez que en este estudio se aplicaron exitosamente dosis de extractos de lechuguilla en el intervalo de 0.1-2 g de extracto/g de metal, en comparación con las dosis óptimas que reportan otros autores (2-8 g oleato de sodio/g de metal) para remover concentraciones proporcionales de Cu (II) en agua. Las concentraciones residuales de Cu (II) en agua ($\text{Conc}_{\text{Cu (II) Resid}} < 0.5 \text{ ppm}$), Ca^{2+} ($< 100 \text{ ppm}$) y Na^+ (58.12- 169.7 ppm), para todos los experimentos realizados por aglomeración esférica, utilizando extractos de lechuguilla, cumplen con la normatividad vigente establecida para la calidad del agua.

Por lo antes expuesto, el presente estudio sugiere el uso de extractos de lechuguilla (*A. lechuguilla*) en la remoción de Cu (II) en agua por aglomeración esférica y recomienda sustituir el empleo de oleato de sodio en la etapa de hidrofobización de esa técnica. Un punto adicional a considerar, consiste en señalar a la lechuguilla (*A. lechuguilla*) como una materia prima económica y abundante, pues constituye un subproducto de deshecho en muchas agroindustrias de México y puede, por ese motivo, generar alta expectativa en la planeación de su cultivo a mayor escala.

Agradecimientos

El primer autor agradece el apoyo al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para cursar el Doctorado en Ciencias en Biotecnología, dentro del programa de doctorado en red del IPN, incluido en el padrón de Postgrados de Excelencia. El autor correspondiente agradece a la Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional por el apoyo brindado, a través de los Proyectos SIP: 20100563, 20110513 y 20130837.

Nomenclatura

AAS Espectrofotometría de Absorción Atómica

AE	Aglomeración Esférica
DAD	Detector por Arreglo de Diodos
DOF	Diario Oficial de la Federación
EPA	Agencia de Protección Ambiental (Environmental Protection Agency)
GLM	Modelo Lineal General
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Presión
LSD	Mínima Diferencia Significativa
NMX	Norma Mexicana
NOM	Norma Oficial Mexicana
RT	Tiempo de Retención
S	dosis de extracto de lechuguilla
SEM	microscopía Electrónica de Barrido

Referencias

- Al-Subu, M. M., Salim, R., Braik, H. y Swaileh, K. (2001). Removal of dissolved copper from polluted water using plant leaves. II. Effects of copper concentration, plant leaves, competing ions and other factors. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 17, 123- 127.
- Apfel, H. P. (1992). Untersuchungen zum Anwendbarkeit der Umbenetzungsagglomeration zur Reinigung Schwermetallhaltiger Abwasser. Diplomarbeit. *Institut für Mechanische Verfahrenstechnik der Universität Karlsruhe (TH)*, Germany.
- Araya, M., Olivares, M., Pizarro, F., Llanos, A., Figueroa, G. y Uauy, R. (2004). Community-based randomized double-blind study of gastrointestinal effects and copper exposure in drinking water. *Environmental Health Perspectives* 112, 1068 - 1073.
- Armenante, P.M. (1997). *Precipitation of Heavy Metals from Wastewaters*. Ed. New Jersey Institute of Technology, USA.
- Bos, J. L., y Quast, K B. (2000). Technical note effects of oils and lubricants on the flotation of copper sulphide minerals. *Minerals Engineering* 13, 1623- 1627.
- Chakoumakos, C., Russo, R.C. y Thurston, R.V. (1979). Toxicity of copper to Cutthroat Trout (*Salmo clarki*) under different conditions of alkalinity, pH, and hardness. *Environmental Science & Technology* 13, 213- 217.
- Dallinger, R. (1995). Metabolism and toxicity of metals: metallothioneins and metal elimination.

- En: *Cell Biology in Environmental Toxicology*, (M. Cajaraville, ed), Pp. 171- 190. Bilbao, Spain.
- Darwish, A. M., Straus, D.L. y Griffin, B. R. (2005). Histologic Evaluation of the Safety of Copper Sulfate to Channel Catfish. *North American Journal of Aquaculture* 67, 122- 128.
- De Lucca, A. J., Boue, S., Palmgren, M.S., Maskos, K. y Cleveland, T.E. (2006). Fungicidal properties of two saponins from *Capsicum frutescens* and the relationship of structure and fungicidal activity. *Canadian Journal of Microbiology* 52, 336- 342.
- DOF. (2000). Modificación a la norma oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994. Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. *Diario Oficial de la Federación*, 22 de Nov., de 2000.
- EPA's Report on the Environment. (2008). *Toxic Chemicals in Production- Related Wastes Combusted for Energy Recovery, Released, Treated, or Recycled*. Pp: 4.33- 4.36.
- Flaoyen, A., Wilkins, A. y Sandvik, M. (2002). Ruminal metabolism in sheep of saponins from *Yucca schidigera*. *Veterinary Research Communications* 26, 159- 169.
- Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H.P. y Becker, K. (2002). The biological action of saponins in animal systems: a review. *British Journal of Nutrition* 88, 587- 605.
- González-Valdez, L.S. (2011). Obtención de un surfactante a partir de Biomasa Residual de *Agave durangensis* y su aplicación en la remoción de arsénico por la técnica de aglomeración esférica. Tesis de Doctorado en Ciencias en Biotecnología. Instituto Politécnico Nacional, México.
- Göselle, W., Egel-Hess, W., Wintermantel, K., Faulhaber, F.R. y Mersmann, A. (1990). Feststoffbildung durch Kristallisation und Fällung. *Chemie Ingenieur Technik* 62, 544- 552.
- Grosell, M. (2011). Homeostasis and Toxicology of Essential Metals. En: *Fish Physiology -2- Copper*. Pp. 65-78. Volume 31, Part A. Elsevier, Great Britain.
- Guclu-Ustundag, O. y Mazza, G. (2007). Saponins: Properties, Applications and Processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 47, 231- 258.
- Hansen, J.A., Rose, J.D., Jenkins, R.A., Gerow, K.G. y Bergman, H.L. (1999). Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to copper: Neurophysiological and Histological effects on the olfactory system. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 1979 - 1991.
- Hernández, R., Lugo, E.C., Díaz, L. y Villanueva, S. (2005). Extracción y cuantificación indirecta de las saponinas de *Agave lechuguilla* Torrey. *e-Gnosis* 3, 1- 9.
- Hoseini, S.M. y Nodeh, A.J. (2012). Toxicity of Copper and Mercury to Caspian Roach *Rutilus rutilus caspicus*. *Journal of the Persian Gulf* 3, 9- 14.
- House, C.I. y Veal, C.J. (1989). Selective recovery of chalcopyrite by spherical agglomeration. *Minerals Engineering* 2, 171- 184.
- Kang, B., Han, S., Kim, J., Ko, S. y Yang, M. (2011). One-Step Fabrication of Copper Electrode by Lasser-Induced Direct Local Reduction and Agglomeration of Copper Oxide Nanoparticle. *Journal of Physical Chemistry C* 115, 23664- 23670.
- Kawashima, Y., Aoki, S., Takenaka, H. y Miyake, Y. (1984). Preparation of Spherically Agglomerated Crystals of Aminophylline. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 73, 1407- 1409.
- Lamidi, M., Martin, T., Ollivier, E., Crespin, E., Nze, E.L. y Balansard, G. (1995). Separation of saponins and determination of quinovic acid 3-O- α -L-Rhamnopyranoside from *Nauclea diderrichii* bark by high performance liquid chromatography. *Chromatographia* 41, 581- 584.
- Laurent, B. (1993). *Untersuchungen zur Behandlung schwermetallhaltiger Abwässer durch*

- Umbenetzungsagglomeration*. Diplomarbeit. Institut für Mechanische Verfahrenstechnik der Universität Karlsruhe (TH), Germany.
- Nobel, P.S. y Quero, E. (1986). Environmental productivity indices for a Chihuahuan desert CAM plant, *Agave lechuguilla*. *Ecology* 67, 1-11.
- Nordberg, G.F., Fowler, B.A., Nordberg, M. y Friberg, L. (2007). Copper. En: *Handbook on the Toxicology of Metals*. Pp 529-546. Third Edition. Academic Press. Copenhagen, Denmark.
- Oleszek, W.A. (2002). Chromatographic determination of plant saponins. *Journal of Chromatography A* 967, 147- 162.
- Olivares, M., Araya, M., Pizarro, F. y Uauy, R. (2001). Nausea threshold in apparently healthy individuals who drink fluids graded concentrations of copper. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 33, 1- 5.
- Pando, M., Eufasio, O., Jurado, E. y Estrada, E. (2002). Post-harvest growth of lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr., Agavaceae) in northeastern Mexico. *Econ. Bot.* 58, 78- 82.
- Peralta-Pérez, M. del R. y Volke-Sepúlveda, T. L. (2012). The antioxidant defense in plants: A key tool for phytoremediation. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 11, 75- 88.
- Pérez, E., González-Hernández, J.C., Chávez-Parga, M.C. y Cortés-Penagos, C. (2013). Caracterización fermentativa de levaduras productoras de etanol a partir de *Agave cupreata* en la elaboración de mezcal. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 12, 451- 461.
- Piacente, S., Bifulco, G., Pizza, C., Stochmal, A. y Oleszek, W. (2002). A novel phenolic spiro derivative, Yuccaone A, from *Yucca schidigera* bark. *Tetrahedron Letters* 43 9133- 9136.
- Proal, J.B., Martínez, L. y Mueller, M. (1997). Estudio sobre el tratamiento de aguas residuales industriales altamente concentradas en metales pesados bajo aglomeración esférica. *Journal of the Mexican Chemical Society* 41 51- 56.
- Ramalho, R.S. (1991). Tratamiento terciario de aguas residuales. En: *Tratamiento de Aguas Residuales*. Pp: 585- 696. Editorial Reverté. Barcelona, España.
- Romero-González, J., Cano-Rodríguez, I., Walton, J.C., Peralta-Videa, J.R., Rodríguez, E. y Gardea-Torresdey, J.L. (2005). Un modelo para describir la adsorción y reducción de Cr (VI) de una solución acuosa por biomasa de *Agave lechuguilla*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 4, 261- 272.
- Sadowsky, Z. (1993). The spherical oil agglomeration of barite suspensions in the presence of surfactant and cosurfactant. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 80, 147- 152.
- Salomons, W. y Förstner, U. (1984). *Metals in the Hydrocycle*. Springer Verlag, Berlin, Germany.
- San Martín, R. y Briones, R. (2000). Quality control of commercial quillaja (*Quillaja saponaria* Molina) extracts by reverse phase HPLC. *Journal of Science of Food and Agriculture* 80 2063- 2068.
- Saucedo-Luna, J., Castro-Montoya, A.J., Rico, J.L. y Campos-García, J. (2010). Optimization of acid hydrolysis of bagasse from *Agave tequilana* Weber. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 9, 91- 97.
- Secretaría de Economía (2001). NMX-AA-051-SCFI-2001. Análisis de agua- determinación de metales por absorción atómica en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas- Método de prueba. Diario Oficial de la Federación. 13 de Agosto de 2001.
- SEMARNAT (1996). NOM-001-ECOL-1996. Límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Publicado en el Diario Oficial de la Federación, 6 de Enero de 1997.
- Sucharzewska, D., Stochmal, A. y Oleszek, W. (2003). The effect of *Yucca schidigera* extract on the physical structure and on the oxidative stability of sugar-candy foam products. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 36, 347- 351.
- Wen, J., Li, J., Liu, S. y Chen, Q.Y. (2011). Preparation of copper nanoparticles in a water/oleic acid mixed solvent via two-step reduction method. *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects* 373, 29- 35.